



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional**

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

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



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



AT 2025-FFBB-073

CONSTANCIA

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

**Tamizaje fitoquímico y actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huacui* (A. Gray) HEMSL**

Presentado por:

**SUICA SARAVIA EFRAIN JEAMPIERE**

**Bachiller** del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **1%** por el cual se otorga el calificativo de:

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

Con Código de Matricula: 20173517

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

Ica, 25 de agosto de 2025

Dr. PEÑA GALINDO JULIO JOSE  
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Tamizaje fitoquímico y actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL

Línea de investigación

Salud pública y conservación del Medio Ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

Autor

Bach. SUICA SARA VIA EFRAIN JEAMPIERE

Ica, Perú

2025

## **Dedicatoria**

A Dios, por siempre guiarme, protegerme y brindarme la fortaleza necesaria para cada paso en mi vida.

A mis padres, Maria y Leandro, quienes son mi mayor ejemplo de esfuerzo y sacrificio. A ustedes por siempre confiar en mí y enseñarme que es la dedicación.

A mis hermanos, Jair, Camila, Giulliana, Andrés, Paolo y Lucas, quienes son la fuente de mi inspiración para seguir adelante.

## **Agradecimientos**

A lo largo de mi vida académica y personal, he contado con el apoyo invaluable de personas que han sido fundamentales en mi crecimiento personal y profesional.

A mi asesora, la Dra. Santos Haydeé Chávez Orellana, por su guía, paciencia y dedicación inquebrantable. Su compromiso con la excelencia y su pasión por la investigación han sido una fuente constante de inspiración. Gracias por compartir su conocimiento y por motivarme a superar cada desafío con determinación. A mi asesor, el Blgo. Alex de Jesús Bendezú Ramos, por su disposición continua, sus consejos y exigencias que permitieron realizar un excelente trabajo, por explicarnos cada proceso con claridad y brindarnos siempre su confianza.

Al Semillero de Investigación: Asociación Científica de Investigación Farmacéutica (ACIF), por permitirme formar parte de su familia, el cual se convirtió en un espacio de aprendizaje y colaboración, donde la investigación se convierte en una pasión compartida. A cada uno de sus integrantes, gracias por su apoyo, por los congresos enriquecedores y por el trabajo en equipo que ha fortalecido mi formación. Asimismo, un agradecimiento especial a mi amigo Derian, quien forma parte de este semillero, por su invaluable ayuda y apoyo en el proceso de investigación en el presente trabajo, por su disposición para compartir conocimientos y por las anécdotas compartidas en el laboratorio. Su apoyo ha sido clave en este proceso, y le estaré siempre agradecido.

A mis amigos de la universidad por ser mi segunda familia en este viaje. Gracias por las risas, las largas jornadas de estudio, el apoyo incondicional en los momentos difíciles y por hacer de estos años una experiencia inolvidable. En especial a Stefanny, Geraldine, Alejandra, Katiuska, Sonia y Diego, porque juntos enfrentamos cada reto universitario con determinación, apoyándonos mutuamente y sin temor a las adversidades. De cada uno de ustedes me llevo valiosas experiencias que atesoraré siempre. ¡Si se pudo!

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	13
1.1.	Descripción de la realidad problemática.....	14
1.2.	Antecedentes de la investigación.....	15
1.3.	Justificación e importancia de la investigación.....	17
1.4.	Objetivos.....	18
1.4.1	Objetivo general.....	18
1.4.2	Objetivos específicos .....	18
1.5.	Marco teórico .....	18
1.5.1	<i>Orthopterygium huaucui</i> “pate” .....	18
1.5.2	Antimicrobiano.....	21
1.5.3	Antibacteriano .....	21
1.5.4	Microorganismo patógeno.....	22
1.5.5	Resistencia antimicrobiana.....	29
1.5.6	Metabolitos secundarios.....	29
1.5.7	Método de extracción.....	30
1.5.8	Métodos de evaluación antimicrobiana.....	31
II.	ESTRATEGIA METODOLÓGICA .....	32
2.1.	Tipo, nivel y diseño de la investigación.....	32
2.2.	Lugar de investigación.....	32
2.3.	Materiales de trabajo.....	32
2.4.	Hipótesis y variables.....	34
2.5.	Población y muestra.....	35
2.6.	Métodos, técnicas y procedimientos para la recolección de datos.....	36
III.	RESULTADOS.....	48
IV.	DISCUSIÓN .....	70
V.	CONCLUSIONES .....	73
VI.	RECOMENDACIONES.....	74
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

VIII.	ANEXOS .....	85
-------	--------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diámetros de inhibición referenciales de gentamicina del Instituto Nacional de Salud (INS) (63).....	46
<b>Tabla 2.</b> Metabolitos secundarios de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de hojas de <i>Orthopterygium huacui</i> .....	48
<b>Tabla 3.</b> Lectura de los halos de inhibición de la fracción A en el método de difusión en pozo	49
<b>Tabla 4.</b> Lectura de los halos de inhibición de la fracción B en el método de difusión en pozo	49
<b>Tabla 5.</b> Lectura de los halos de inhibición de la fracción C en el método de difusión en pozo	49
<b>Tabla 6.</b> Lectura de los halos de inhibición de la fracción D en el método de difusión en pozo	49
<b>Tabla 7.</b> Lectura de los halos de inhibición de la fracción E en el método de difusión en pozo	50
<b>Tabla 8.</b> Lectura de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina) en el método de difusión en pozo.....	50
<b>Tabla 9.</b> Lectura de los halos de inhibición del control negativo (Alcohol) en el método de difusión en pozo.....	50
<b>Tabla 10.</b> Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a <i>E. coli</i> .....	51
<b>Tabla 11.</b> Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a <i>S. typhimurium</i> .....	52
<b>Tabla 12.</b> Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a <i>S. aureus</i> .....	54
<b>Tabla 13.</b> Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a <i>E. faecalis</i> .....	55
<b>Tabla 14.</b> Efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas .....	57
<b>Tabla 15.</b> Diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas. ....	58
<b>Tabla 16.</b> Efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas.....	59
<b>Tabla 17.</b> Diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas.....	61
<b>Tabla 18.</b> Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>E. coli</i> ....	62
<b>Tabla 19.</b> Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>S. typhimurium</i> .....	63
<b>Tabla 20.</b> Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>S. aureus</i>	64
<b>Tabla 21.</b> Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>E. faecalis</i> .....	65
<b>Tabla 22.</b> Promedios de inhibición de las fracciones A, B, C, D y E frente a las bacterias evaluadas en comparación con el control positivo y control negativo.....	66

<b>Tabla 23.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a <i>S. aureus</i> .....	68
<b>Tabla 24.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a <i>S. typhimurium</i> .	68
<b>Tabla 25.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción E frente a <i>S. aureus</i> .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hojas en crecimiento de <i>Orthopterygium huacui</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de <i>Orthopterygium huacui</i> . Fuente: (Jiménez V, 2014)(17) .....	20
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de la burbuja de cavitación con el material vegetal. Fuente: Jiménez L. (2023)(53).....	31
<b>Figura 4.</b> Figura de Screening fitoquímico de <i>Orthopterygium huacui</i> (A. Gray) HEMSL.....	42
<b>Figura 5.</b> Siembra por estría escocesa. Fuente: Universidad Miguel Hernández (2023)(62).....	43
<b>Figura 6.</b> Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a <i>E. coli</i> .....	51
<b>Figura 7.</b> Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a <i>E. coli</i> .....	52
<b>Figura 8.</b> Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a <i>S. typhimurium</i> .....	53
<b>Figura 9.</b> Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a <i>S. typhimurium</i> .....	53
<b>Figura 10.</b> Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a <i>S. aureus</i> .....	54
<b>Figura 11.</b> Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a <i>S. aureus</i> .....	55
<b>Figura 12.</b> Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a <i>E. faecalis</i> .....	56
<b>Figura 13.</b> Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a <i>E. faecalis</i> .....	56
<b>Figura 14.</b> Representación en gráfica de cajas del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas .....	57
<b>Figura 15.</b> Representación en gráfica de intervalos del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas.....	58
<b>Figura 16.</b> Representación gráfica de las diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas .....	59
<b>Figura 17.</b> Representación en gráfica de cajas del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas .....	60
<b>Figura 18.</b> Representación en gráfica de intervalos del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas.....	60
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica de las diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas. .....	61
<b>Figura 20.</b> Representación gráfica de las diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>E. coli</i> .....	62
<b>Figura 21.</b> Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>S.</i> <i>typhimurium</i> .....	63
<b>Figura 22.</b> Representación gráfica de las diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>S. aureus</i> .....	64

<b>Figura 23.</b> Representación gráfica de las diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a <i>E. faecalis</i> .....	65
<b>Figura 24.</b> Representación gráfica de los promedios de inhibición de las fracciones A, B, C, D y E frente a las bacterias evaluadas en comparación con el control positivo y control negativo ...	67
<b>Figura 25.</b> Ladera cubierta de la especie <i>Orthopterygium huacui</i> .....	86
<b>Figura 26.</b> Ubicación de recolección de <i>Orthopterygium huacui</i> .....	86
<b>Figura 27.</b> Secado de la especie vegetal .....	86
<b>Figura 28.</b> Recolección de la especie vegetal .....	86
<b>Figura 29.</b> Muestra vegetal triturada manualmente .....	86
<b>Figura 30.</b> Muestra vegetal secada.....	86
<b>Figura 31.</b> Método de extracción por ultrasonido.....	86
<b>Figura 32.</b> Secado a temperatura ambiente del extracto obtenido por ultrasonido .....	86
<b>Figura 33.</b> Obtención de la Fracción A.....	86
<b>Figura 34.</b> Obtención de la Fracción B .....	86
<b>Figura 35.</b> Obtención de la Fracción C .....	86
<b>Figura 36.</b> Obtención de la Fracción D .....	86
<b>Figura 37.</b> Obtención de la Fracción E.....	86
<b>Figura 38.</b> Reacción de identificación para alcaloides en la fracción C.....	86
<b>Figura 39.</b> Reacción de Shinoda para identificar flavonoides en la Fracción E .....	86
<b>Figura 40.</b> Reacción de identificación para triterpenos y esteroides en la fracción C .....	86
<b>Figura 41.</b> Lectura de halos de Inhibición en el método de difusión en pozo .....	86
<b>Figura 42.</b> Placas de agar Mueller Hinton inoculadas para la evaluación antimicrobiana .....	86
<b>Figura 43.</b> Halos de inhibición de la fracción A contra <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 44.</b> Halos de inhibición de la fracción B frente <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 45.</b> Halos de inhibición de la fracción D frente <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 46.</b> Halos de inhibición de la fracción C frente <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 47.</b> Halos de inhibición de la fracción E frente <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 48.</b> Halos de inhibición de la fracción E frente <i>S. typhimurium</i> .....	86
<b>Figura 49.</b> Halos de inhibición del control positivo frente <i>S. typhimurium</i> .....	86
<b>Figura 50.</b> Bacterias gram positivas y gram negativas suspendidas en caldo tripticasa soya para ser activadas y evaluadas en la actividad antimicrobiana .....	86
<b>Figura 51.</b> Halos de inhibición del control positivo frente a <i>E. faecalis</i> .....	86
<b>Figura 52.</b> Repicación en agar Mueller Hinton de los caldos evaluados en el CMI para verificar el crecimiento de bacterias a la concentración de 1%, 1,5% y 2% de la fracción D frente a <i>S. typhimurium</i> .....	86

<b>Figura 53.</b> Replicación en agar Mueller Hinton de los caldos evaluados en el CMI para verificar el crecimiento de bacterias a la concentración de 1,5% y 2% de la fracción E frente a <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 54.</b> Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a <i>S. typhimurium</i> .....	86
<b>Figura 55.</b> Lectura de resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a las 24 horas de la fracción D frente a <i>S. typhimurium</i> .....	86
<b>Figura 56.</b> Comparación de los controles del CMI con la fracción D al 1% frente a <i>S. typhimurium</i> .....	86
<b>Figura 57.</b> Comparación de crecimiento bacteriano al 1% en la evaluación del CMI de las fracciones D y E frente a <i>S. aureus</i> .....	86
<b>Figura 58.</b> Halos de inhibición en el método de difusión en pozo a las 24 horas de las fracciones A, B, C, D y E frente a <i>S. aureus</i> y <i>S. typhimurium</i> .....	86

## RESUMEN

Las plantas medicinales han sido utilizadas por generaciones para tratar diversas patologías, lo que resalta la importancia de su estudio para preservar estos conocimientos y validar científicamente sus propiedades. Entre las propiedades beneficiosas, se encuentra el efecto antimicrobiano de algunas especies que pueden ser una opción relevante para combatir la resistencia bacteriana. En tal sentido, surge la iniciativa de identificar los metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Orthopterygium huaucui* mediante un tamizaje fitoquímico, evaluar la actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones obtenidas y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). La materia vegetal fue recolectada en la zona de Cruz Verde y la obtención del extracto se realizó mediante la extracción por ultrasonido con etanol de 96°. La identificación de los metabolitos secundarios se realizó por reacciones de coloración y/o precipitación. La evaluación antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en pozo y el CMI de las fracciones más activas. Como resultados se identificaron metabolitos como: Flavonoides, taninos gálicos, grupos fenólicos libres, triterpenos y/o esteroides y leucoantocianidinas y/o catequinas. La evaluación de difusión en agar determinó que todas las fracciones tienen un efecto antimicrobiano frente a las bacterias evaluadas, pero las fracciones D y E demostraron un mayor efecto con halos de inhibición entre 25 mm y 29 mm contra *S. aureus* y/o *S. typhimurium*. En el CMI se observó que la fracción D inhibió el crecimiento bacteriano hasta en un 1%, mientras que la fracción E presentó inhibición en el rango de 1.5% y 2%.

**Palabras claves:** *Orthopterygium huaucui*, actividad antimicrobiana, *S. aureus*, *E. coli*, fracción D

## ABSTRACT

Medicinal plants have been used for generations to treat various pathologies, highlighting the importance of studying them to preserve this knowledge and scientifically validate their properties. Among their beneficial properties, the antimicrobial effect of certain species stands out as a potentially relevant option to combat bacterial resistance. In this regard, the initiative arises to identify the secondary metabolites of the ethanolic extract of *Orthopterygium huaucui* through a phytochemical screening, evaluate the antimicrobial activity of the different obtained fractions, determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The plant material was collected in the Cruz Verde area, and the extract was obtained through ultrasound-assisted extraction using 96% ethanol. The identification of secondary metabolites was carried out through coloration and/or precipitation reactions. Antimicrobial evaluation was determined by the well diffusion method and the MIC of the most active fractions. As a result, metabolites such as flavonoids, gallic tannins, free phenolic groups, triterpenes and/or steroids, and leucoanthocyanidins and/or catechins were identified. The agar diffusion test determined that all fractions exhibited antimicrobial effects against the tested bacteria; however, fractions D and E demonstrated a stronger effect, with inhibition zones ranging from 25 mm to 29 mm against *S. aureus* and/or *S. typhimurium*. Regarding MIC, fraction D inhibited bacterial growth at concentrations as low as 1%, while fraction E showed inhibition within the range of 1.5% to 2%.

**Keywords:** *Orthopterygium huaucui*, antimicrobial activity, *S. aureus*, *E. coli*, fraction D

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas a lo largo de los años como un recurso para el alivio de diferentes patologías. Este conocimiento ha sido heredado a lo largo de las diferentes generaciones, lo que hace imprescindible el estudio de estas plantas para preservar y proteger la riqueza de estos saberes tradicionales, así como la validación científica de estos efectos que se les atribuyen.

A nivel mundial se han identificado 17 países megadiversos, de los cuales ocho se encuentran en América Latina, siendo Perú uno de ellos (1). Actualmente, el Perú representa el 10% de la flora mundial con un estimado de 25000 especies, de las cuales un 30% son endémicas (2). Una de estas plantas endémicas corresponde a *Orthopterygium huaucui*, el cual tiene poblaciones representativas en las laderas de Lima, Ayacucho e Ica. Cabe destacar que, en la región de Ica, esta especie forma parte del grupo de las 583 especies conocidas hasta el momento (3).

En nuestro país, el uso de plantas medicinales es conocido por casi el 80% de la población debido a la riqueza y variedad de especies vegetales y a la tradición existente desde tiempos inmemoriales (3); a pesar de ello, al día de hoy existen numerosas especies cuya utilidad es desconocida o subestimada. Este hecho resalta la importancia de invertir en investigación científica moderna, respetando los parámetros éticos establecidos a nivel internacional. Asimismo, cabe mencionar que las plantas medicinales son una esencial fuente de medicamentos y moléculas líderes en el mercado farmacéutico. Esto debido a las diferentes actividades farmacológicas que se les atribuyen en estudios realizados en los últimos años, y esto se ha asociado a los diferentes metabolitos secundarios que puedan presentar las plantas. Dichos metabolitos se encuentran distribuidos de manera diversa entre distintos grupos taxonómicos, los cuales poseen propiedades biológicas, cumplen funciones ecológicas importantes y se distinguen por sus múltiples usos y aplicaciones (4). Estos son identificados mediante un tamizaje fitoquímico, el cual es un ensayo preliminar que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos de una planta para orientar posteriormente el aislamiento de aquellos de mayor interés (1).

Los mencionados compuestos, que incluyen alcaloides, flavonoides, terpenos, entre otros, han despertado gran interés debido a sus múltiples propiedades biológicas, como su actividad antioxidante, antiinflamatoria y, especialmente, antimicrobiana. Debido a que en los últimos años la evaluación de la actividad antimicrobiana ha generado una importancia de respuesta global coordinada para abordar la resistencia a los antimicrobianos, con un enfoque en la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos, así como en la implementación de políticas de salud pública efectivas. En el mismo sentido, la OMS ha sugerido mayor énfasis en el estudio de bacterias que han presentado resistencia a los diferentes tratamientos convencionales,

considerando un listado prioritario de patógenos bacterianos que requieren estudios en investigación y desarrollo para buscar nuevas alternativas contra estas bacterias resistentes. Cabe resaltar que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza en constante crecimiento que desafía la eficacia de los tratamientos disponibles. Sin embargo, el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos no ha avanzado al mismo ritmo que la evolución de la resistencia, lo que genera una significativa brecha para atender las necesidades no cubiertas de los pacientes. Cuantificar el impacto global de la RAM resulta complicado debido a la limitada disponibilidad de datos confiables, lo que subraya la importancia de realizar evaluaciones continuas a medida que se amplían los conocimientos y la evidencia científica. En este contexto, la OMS reconoció en su "Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios" del 2024 que las brechas de datos globales representan una limitación clave, destacando la urgencia de llevar a cabo más investigaciones y recopilar información para comprender mejor la magnitud de la RAM en diferentes entornos (5).

En base a todo lo expuesto, se realizó la presente investigación enfocada en presentar un estudio oportuno de la actividad antimicrobiana que puedan presentar las hojas de *Orthopterygium huaucui* y demostrar los beneficios que aún se pueden encontrar en la flora peruana.

### **1.1. Descripción de la realidad problemática**

Cada año, más de 700,000 personas fallecen en todo el mundo a causa de infecciones provocadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos, convirtiéndose en un problema crítico de salud pública a nivel global. Si esta tendencia continúa, se estima que, en los próximos 25 años, podrían registrarse hasta 10 millones de muertes anuales y pérdidas económicas que superarían los 100 billones de dólares para 2050.

Aunque la resistencia antimicrobiana (RAM) es un proceso natural que ocurre con el tiempo, su avance se ha acelerado notablemente en las últimas décadas. Esto se debe a una serie de factores, como el uso inadecuado de antibióticos en la salud humana y la sanidad animal, la transmisión de bacterias resistentes entre animales y humanos, ya sea por contacto directo o a través de los alimentos, y la contaminación de fuentes de agua con medicamentos antimicrobianos y sus residuos(6).

Se estima que dos de cada cinco muertes (569,000) relacionadas con infecciones en las Américas en 2019 estuvieron asociadas con la resistencia antimicrobiana (RAM); eso representa el 11.5% de las muertes globales asociadas con la RAM y que al menos 141,000 muertes se les atribuyó directamente a la RAM, lo que representa el 11.1% del total mundial de muertes atribuibles a la RAM. Los seis patógenos más mortales fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Las infecciones

asociadas a la RAM fueron la tercera causa principal de muerte en Bolivia, Brasil, Chile, Haití, República Dominicana, Uruguay y Perú, después de las enfermedades cardiovasculares y las neoplasias, y la cuarta en otros 22 países americanos. La prevención y el control de infecciones podrían contribuir a reducir la carga de RAM en países como Haití, Bolivia y Perú, pero en países con altas tasas de muertes resistentes entre las muertes infecciosas, como Chile, México y Perú, se necesitan un estricto control y vigilancia de la RAM de forma urgente(7).

En el Perú, durante el año 2021, al menos el 72% de los pacientes hospitalizados por COVID-19 recibieron antibióticos sin necesitarlos. De este grupo, cerca del 50% utilizó antimicrobianos de forma inadecuada, en un intento por prevenir posibles coinfecciones bacterianas. Sin embargo, solo el 14% de estos pacientes presentaba una infección secundaria que justificaba el uso de antibióticos. Asimismo, un especialista en Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos de la Organización Panamericana de la Salud indicó que aproximadamente para el año 2050, diez millones de personas morirán cada año a causa de la resistencia a los antibióticos, convirtiéndose en la primera causa de muerte desplazando al cáncer. En respuesta a esta amenaza global, el Perú se sumó al “Plan de Acción Mundial para contrarrestar el impacto del uso inadecuado de los antibióticos” y conformó la Comisión Nacional Multisectorial sobre RAM. Es así que, en el año 2019, se aprobó con Decreto Supremo N°010-2019-SA el Plan Nacional para enfrentar la Resistencia a los Antimicrobianos 2019 – 2021 bajo el enfoque denominado “Una Salud”. En el presente decreto se busca concientizar, reforzar los conocimientos, reducir la incidencia de infecciones, entre otros puntos claves para evitar la exposición a microorganismos resistentes a los antimicrobianos.(8)(9)

En este orden de ideas, es que surge significativamente el interés por la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos de origen natural, destinados a inhibir microorganismos patógenos relevantes. Debido a que el uso de los antimicrobianos sintéticos ha generado inquietud entre los consumidores por los diversos efectos negativos que pueden tener sobre la salud y el medio ambiente. En este contexto, las plantas ricas en compuestos naturales con propiedades antimicrobianas se presentan como una alternativa prometedora.

## **1.2. Antecedentes de la investigación**

Pese a realizar búsquedas bibliográficas sobre la actividad antimicrobiana de la especie *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL., no se han evidenciado estudios recientes relacionados con dicha propiedad. Los únicos antecedentes disponibles corresponden a

investigaciones previas o de carácter referencial, sin datos actualizados que aborden específicamente su potencial antimicrobiano.

### **ANTECEDENTES INTERNACIONALES**

**Amaro J. A. L. (1984).** en su trabajo investigativo “Metabolitos secundarios de dos especies de la flora medicinal peruana: *Orthopterygium huancuy* y *Maytenus octogona*”, propuso aislar metabolitos secundarios de gran interés de dos especies endémicas del Perú. Las muestras vegetales se extrajeron con alcohol y fueron concentradas al vacío y se utilizaron técnicas cromatográficas. Del *Orthopterygium huancuy* se lograron aislar e identificar, el  $\beta$ -sitosterol; el  $\beta$ -D-glucósido de  $\beta$ -sitosterol y los triterpenos ya conocidos, así como los taninos ácido gálico y ácido digálico. Los ácidos; sumaresinólico y 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico. De esta especie, se aislaron asimismo tres nuevos ácidos triterpénicos: ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-18-en-28 oico; ácido 3 $\beta$ , 6 $\beta$ -6-oxo-20-hidroxilupan-28-oico y ácido-dihidroxiolean-18-en-28-oico. De *Maytenus octogona* se obtuvieron el  $\beta$ -sitosterol y los triterpenos ya conocidos. De esta especie se aisló asimismo un nuevo triterpeno, el metiléster del ácido 3-oxo-fríedelan-28-oico (10).

**Gonzales A. G. et al. (1983)** en su trabajo titulado “Triterpenos menores de *Orthopterygium huancuy*”, tuvo como objetivo aislar nuevos triterpenos en forma de éster metílico. En el presente estudio utilizaron técnicas cromatográficas y espectroscópicas para elucidar las estructuras de nuevos triterpenos en forma de éster metílico utilizando la cromatografía con diazometano y un espectro infrarrojo, es así que se aisló como producto principal el ácido 3-oxo-20-hidroxi-lupan-28-oico en forma de su éster metílico (11).

**Gonzales A. G. et al. (1983)** en su trabajo de investigación titulado “Ácido 3-oxo-6 $\beta$ 3-hidroxioleano-18-en-28-oico del *Orthopterygium huancuy*”, tuvo como objetivo identificar nuevos componentes químicos de plantas sudamericanas. La especie vegetal fue recolectada en Perú, y se estudiaron las partes aéreas. Prepararon un extracto etanólico el cual fue concentrado al vacío, para el aislamiento de los metabolitos secundarios. Se utilizaron técnicas cromatográficas usando una columna en seco de gel de sílice. Como resultado se obtuvieron mezclas de  $\beta$ -sitosterol, ácido betulónico y una mezcla de ácido triterpenoide. Asimismo, se obtuvieron los ésteres metílicos del ácido morónico, 3-oxo-6- Ácido hidroxioleano-12-en-28-oico y 3-oxo-6 $\beta$ -ácido hidroxioleano-18-en-28-oico. El éster metílico fue reducido a 3-oxo-6-hidroxiolean-18-en-28-oico, el 3 $\beta$  hidroxilo (siendo éste el menos polar) y el 3 $\alpha$ -compuesto (12).

**Hernández M. et al. (2024)** en su investigación titulado “Perfil fitoquímico completo de hojas, tallos y frutos de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) Hemsl. y sus actividades antioxidantes”, en el cual identificaron los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de las diferentes partes de la planta (Tallos, hojas y frutos). Obteniendo como resultado que la presente planta es una fuente de flavonoides, procianidinas y taninos, en donde las hojas tenían el doble de contenido de flavonoides que los frutos. En cuanto a la actividad antioxidante, el método DPPH indicó una alta actividad en los tallos y hojas en comparación con los frutos, y mediante el método ORAC se mostró una mayor actividad en tallos (13).

### **ANTECEDENTES NACIONALES**

**Molina A. et al. (2019)** en su investigación titulada “Evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) Hemsley”, evaluaron la actividad antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) Hemsley. Mediante una marcha fitoquímica logran obtener sus metabolitos secundarios y la actividad antioxidante la evaluaron mediante tres métodos, los cuales son: El método Trolox para el Poder Antioxidante de Reducción Férrico (FRAP), para la Reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS) y para la inhibición contra el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 2,3 se determinó mediante la CI50. En la marcha fitoquímica se logró identificar los siguientes metabolitos: flavonoides, taninos, triterpenos y/o esteroides, y catequinas. Asimismo, el extracto etanólico mostró una favorable actividad antioxidante en todos los métodos utilizados, en donde se demostró que 1 mg del extracto total es equivalente a: Trolox 1.678 mM (FRAP), Trolox 0,4078 mM (ABTS) y el IC50 es equivalente a 2,8573 mg de extracto (DPPH) (14).

### **1.3. Justificación e importancia de la investigación**

La presente investigación plantea un tamizaje fitoquímico y una evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico total de hojas de la especie *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL, así como también evaluar el efecto antibacteriano de las diferentes fracciones obtenidas en el tamizaje fitoquímico, esto con el fin de aportar conocimientos científicos y un mayor entendimiento a la medicina natural. Pese a la gran diversidad de flora empleada en la medicina tradicional, muchas de ellas no han sido estudiadas o algunas de ellas son poco estudiadas, como es el caso de la materia vegetal en estudio de este trabajo; pues en cuanto a estudios fitoquímicos y estudios de las propiedades atribuidas por la etnobotánica para esta especie encontrados en referencias bibliográficas fueron muy escasos. En tal motivo, se decide evaluar de

forma cualitativa mediante un tamizaje fitoquímico para tener una visión más amplia de los metabolitos secundarios que pueda contener la planta en mención, siendo así también estos metabolitos responsables de diferentes usos populares que se les atribuyen. Es por ello que, se pretende fraccionar el extracto etanólico para obtener diferentes muestras que puedan contener ciertos grupos de metabolitos secundarios con un interés prometedor. Al tratarse de una planta medicinal con poca información farmacológica, se pretende dar como una opción antimicrobiana sugestiva, en donde se busca profundizar en la actividad y presentar como una opción a futuro con buenos resultados, en donde posteriormente se puedan desarrollar antibióticos alternativos derivados de una fuente natural y así proporcionar un buen sustituto a fármacos sintéticos.

#### **1.4. Objetivos.**

##### **1.4.1 Objetivo general**

- Determinar los principales grupos de metabolitos secundarios y la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL.

##### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL.
- Evaluar la efectividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico total de hojas de *Orthopterygium huaucui* frente a bacterias gram positivas y gram negativas a una concentración de 20mg/40ul mediante el Método de Difusión en Pozo.
- Evaluar que fracciones serán las más activas del tamizaje fitoquímico frente a bacterias gram positivas y gram negativas a una concentración de 20mg/40ul del extracto etanólico de las hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL mediante el Método de Difusión en Pozo.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las fracciones más activas del tamizaje fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL.

#### **1.5. Marco teórico**

##### **1.5.1 *Orthopterygium huaucui* “pate”**

- ✓ Descripción de la especie

Es una planta leñosa dioica de la familia Anacardiaceae, es la única especie representante del género *Orthopterygium* y es endémica del Perú. (15)

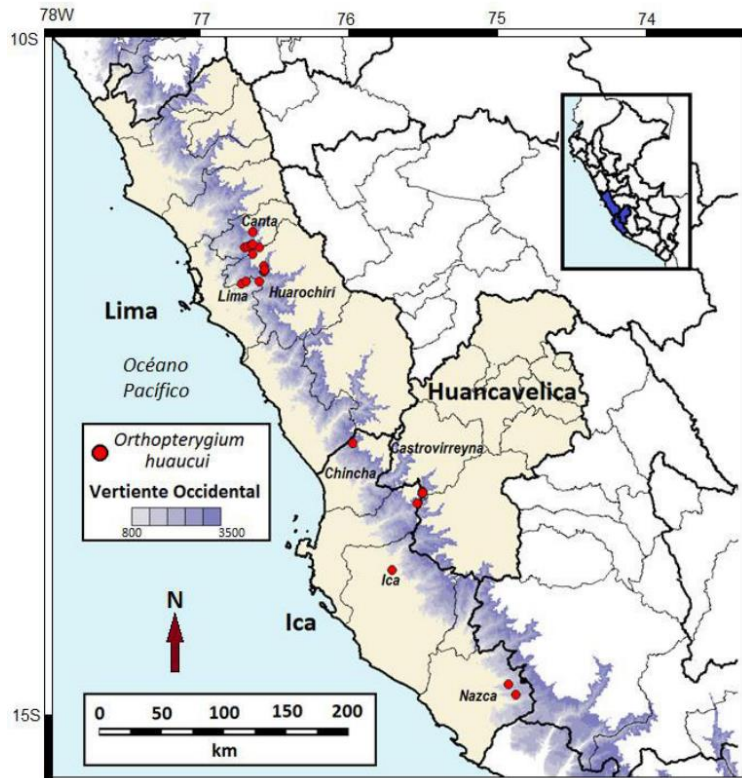
Presenta inflorescencias masculinas de tipo panícula axilar, flores actinomorfas, apétalas con tres a siete piezas, sépalos y estambres alternos. Las inflorescencias femeninas son cimas compactas envueltas por un involucre (cúpula) y cada flor sin perianto probablemente sea pseudomonómera. Las inflorescencias femeninas maduras son estructuras samaroides. Los pedúnculos aplanados son la parte vistosa por su color rojizo, que se aplanan y anchos con la madurez floral. Respecto a sus hojas, estas están compuestas con folíolos de borde aserrado (16). Asimismo, presenta un líquido lechoso de color blanquecino considerado como su látex. Los frutos miden de 6 a 7 cm. de largo, de 11 a 16 mm. de ancho y son ligeramente pubescentes. (17)



**Figura 1.** Hojas en crecimiento de *Orthopterygium huaucui*

✓ Distribución

*O. huaucui* se localiza en la ladera occidental de la Cordillera de los Andes, conformado por poblaciones aisladas en los departamentos de Lima, Ica y Huancavelica (17). Su distribución está limitada latitudinalmente entre los 11° y 14° S y altitudinalmente entre 800 y 2000 msnm (18). Cabe resaltar que en las zonas donde habita esta especie, no recibe protección oficial (19). Asimismo, la presencia de *O. huaucui* en estas zonas permite mantener condiciones favorables para que las cactáceas puedan germinar, crecer y desarrollarse (20).



**Figura 2.** Distribución geográfica de *Orthopterygium huaucui*. Fuente: (Jiménez V, 2014)(17)

✓ Clasificación taxonómica

*Orthopterygium huaucui* fue reconocida por Asa Gray en 1854 a partir de un ejemplar incompleto. Este autor la describió como *Juliania huaucui*, en el cual también asignó especies del género que hoy conforman *Amphipterygium*. Posteriormente, William Hemsley en 1907 con una muestra vegetal más completa, produce el cambio de género que se conoce actualmente. (18)(21)

El material vegetal fue identificado y clasificado por Biólogo Miranda Huamán David Máximo en la facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”. Se obtuvo la siguiente clasificación taxonómica:

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: ANACARDIACEAE

GÉNERO: *Orthopterygium*

ESPECIE: *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL

N.V: "pate" (Anexo 8.1)

✓ Uso tradicional

Actualmente, debido a la falta de información e investigación de la especie, se conocen pocos usos medicinales, entre ellos, *O. huaucui* es utilizado por los pueblos aledaños para tratar quemaduras y dolores de estómago, así también presenta un látex lechoso que es utilizado contra la "uta" o "leishmaniasis" ocasionada por *Leishmania brasiliensis* (13)(17).

### 1.5.2 Antimicrobiano

Los antimicrobianos se definen como medicamentos diseñados para eliminar microorganismos o inhibir su crecimiento y desarrollo. Este grupo de fármacos se clasifica en varias categorías, incluyendo antibacterianos, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios y antirretrovirales (22).

El uso de agentes antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades infecciosas ha marcado un hito sin precedentes, ya que su capacidad para eliminar y/o curar las infecciones por microorganismos ha transformado de manera significativa el panorama de morbilidad y mortalidad, donde estas enfermedades ocupaban el primer lugar entre las principales causas de muerte.

### 1.5.3 Antibacteriano

Los antibacterianos conforman un extenso conjunto de medicamentos con una gran variedad de propiedades químicas y farmacológicas. Estos compuestos tienen la capacidad de eliminar bacterias o inhibir su crecimiento, lo que los hace útiles para tratar infecciones tanto localizadas como sistémicas causadas por estos microorganismos. Se clasifican en diferentes familias según su estructura química, la cual está directamente relacionada con su mecanismo de acción, su perfil de toxicidad y su espectro de acción frente a bacterias (22).

✓ Gentamicina

Es un antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos de administración parenteral, tópica y uso oftálmico. Los aminoglucósidos están formados por 2 restos de aminoazúcar enlazados a través de otro resto de azúcar o de ciclitol (23). Se utiliza para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles a este antibiótico localizadas en el tracto

gastrointestinal, la piel, los huesos, la sangre, el oído, el tracto urinario o genital, quemaduras graves o las meninges (24).

#### Mecanismo de acción

Presenta un efecto bactericida tanto en la proliferación como en el estado de reposo de las bacterias. Forma una unión con las proteínas de las subunidades 30S de los ribosomas bacterianos, lo que provoca una "mala lectura" del ARNm (25).

La gentamicina y otros aminoglucósidos muestran en ensayos *in vitro* e *in vivo* un efecto postantibiótico en la mayoría de los modelos experimentales. Esto indica que, al administrarse en dosis adecuadas, estos medicamentos son efectivos contra infecciones causadas por muchos microorganismos sensibles, incluso si las concentraciones plasmáticas y tisulares caen por debajo de la CIM durante parte del intervalo de dosificación. Este efecto permite extender el tiempo entre administraciones sin comprometer su eficacia frente a la mayoría de los bacilos gramnegativos (25).

#### Espectro

La gentamicina presenta un amplio espectro antimicrobiano principalmente frente a bacterias gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus*, *Serratia*) y tiene actividad frente a ciertas bacterias grampositivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*).

En combinación con antibióticos betalactámicos es eficaz en infecciones producidas por *E. fecalis* y *Streptococcus sp.* (26)

### 1.5.4 Microorganismo patógeno

#### ✓ Bacterias gram negativas

Las bacterias gram negativas poseen una pared celular compleja que incluye una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos (LPS). Esta estructura las hace más resistentes a ciertos antibióticos y agentes antimicrobianos en comparación con las bacterias gram positivas. Entre las características principales de las bacterias gram negativas se encuentra la presencia de una membrana externa que protege a la bacteria de sustancias tóxicas, mayor resistencia a los antibióticos debido a la barrera que representa la membrana externa y produce endotoxinas que pueden causar reacciones inflamatorias graves en humanos (27).

✓ *Escherichia coli*

Es una bacteria que forma parte de la flora intestinal humana y de animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son inofensivas, algunas, como las productoras de toxina Shiga, pueden provocar enfermedades graves asociadas al consumo de alimentos contaminados.

La transmisión a los seres humanos ocurre principalmente a través de alimentos como carne molida cruda o insuficientemente cocida, leche cruda, y vegetales crudos contaminados (28). Se estima que el 25% de la población peruana

Los patotipos o variantes patogénicas más estudiados incluyen *E. coli enteropatogénica* (EPEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *E. coli enteroinvasiva* (EIEC). (29)

#### Características

*E. coli* tiene dimensiones aproximadas de 1.1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre 2 y 6  $\mu\text{m}$  de longitud. Generalmente, es una bacteria móvil debido a la presencia de flagelos peritricos y es anaerobia facultativa. Sin embargo, también existen cepas inmóviles. Aunque en la mayoría de los casos *E. coli* actúa como un microorganismo comensal en el tracto gastrointestinal, algunas cepas patógenas pueden causar diversas enfermedades.

*E. coli* emplea fimbrias, de las que se han descrito más de 30 tipos, presentes tanto en cepas patógenas como comensales, y frecuentemente ambas son capaces de expresar en su superficie varios tipos al mismo tiempo. En general *E. coli* es una bacteria resistente a condiciones ambientales adversas y puede crecer en un rango variado de temperaturas (15-45°C, si bien la temperatura óptima es 37°C) y pH (5-9). La presencia de *E. coli* comensal se usa como indicador de contaminación fecal en diversas situaciones, y es uno de los organismos modelo por excelencia en experimentos de biología molecular tales como clonación y expresión de proteínas. (30)

#### Patogenia

Los patotipos de *E. coli* relacionados con el tracto intestinal difieren significativamente en su fisiopatogenia, en sus factores de virulencia y en la forma en que se desarrolla y se propaga la infección.

En el caso de *E. coli enteropatogena* (EPEC), su unión estrecha a los enterocitos genera una lesión característica, que reduce la superficie absorptiva del intestino y contribuye al desarrollo de diarrea.

Por su parte, *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) se inicia con la adhesión a los enterocitos mediante factores de colonización, seguida por la producción de enterotoxinas que provocan diarrea secretora.

*E. coli enteroagregativa* (EAEC), se caracteriza por la diversidad de sus factores de virulencia y su capacidad de formar microcolonias que persisten en el intestino, causando episodios de diarrea aguda o persistente. Por otro lado, el principal factor de virulencia de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) es dicha toxina, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas celulares, lo que provoca la destrucción de la mucosa del colon y da lugar a diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Finalmente, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) tiene un mecanismo de patogenia basado en la invasión de la mucosa intestinal, en este caso, la bacteria ingresa a través de las células M de la mucosa colónica, invade los enterocitos, se replica dentro del citoplasma y genera episodios de diarrea disintérica. (31)

✓ *Salmonella typhimurium*

La bacteria de la salmonela generalmente vive en los intestinos de animales y humanos y se expulsa mediante las heces. La forma más frecuente de infección en los humanos es a través de agua o alimentos contaminados. La infección por salmonela se le conoce como salmonelosis, y es una enfermedad bacteriana común que afecta el tubo intestinal. (32)

En la actualidad, se han identificado 2.579 serovares de *Salmonella* caracterizados según el esquema de White-Kauffmann-Le Minore (W-K-L), que se basa en la detección de los antígenos del polisacárido O, que determinan el serogrupo, los factores flagelares H1 y H2 y el antígeno capsular VI que complementan la definición del serotipo. (33)

*Salmonella enterica*, subespecie enterica serovar *Typhimurium* (*Typhimurium*), es el principal serotipo a nivel mundial proveniente de muestras clínicas. Asimismo, el género *Salmonella* spp. fue reconocido como una de las principales causas de enfermedad diarreica a nivel global; según la Organización Mundial de la Salud (OMS), debido que una de cada diez personas adquiere este agente patógeno por el consumo de agua o comida contaminadas. (34)

### Características

El género *Salmonella* se distingue por ser bacterias anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, generalmente móviles gracias a flagelos peritricos capaces de utilizar el citrato como su única fuente de carbono y presentan un metabolismo tanto oxidativo como fermentativo. Aunque no requieren NaCl para su desarrollo, pueden crecer en concentraciones que varían entre el 0.4% y el 4%. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* se desarrollan en un rango de temperatura entre 5°C y 47°C, con un óptimo de 35°C a 37°C; sin embargo, algunos pueden crecer a temperaturas tan bajas como 2°C o 4°C y tan altas como 54°C. En cuanto al pH, su rango de crecimiento se encuentra entre 4 y 9, siendo el óptimo de 6.5 a 7.5. Su desarrollo se detiene completamente a temperaturas inferiores a 7°C y pH menor a 3.8. Los serotipos más comúnmente aislados en alimentos incluyen *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Enteritidis* y *Newport*. (35)

### Patogenicidad

*Salmonella* se transmite mediante la ruta fecal-oral, ya sea de forma directa o indirecta a través de alimentos contaminados. Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago y a la alta osmolaridad del intestino delgado. Una vez allí, facilita su internalización en las células epiteliales del íleon y es capaz de resistir la fagocitosis realizada por células dendríticas y macrófagos. Esto le permite colonizar el tejido linfóide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos. Los macrófagos son considerados las principales células diana de la infección, ya que la bacteria se establece en un compartimento ácido conocido como vacuola que contiene a *Salmonella*. En este entorno, la bacteria evade la acción lítica de los componentes lisosomales, se multiplica y se propaga, pudiendo extenderse dentro del tejido intestinal o hacia otras partes del organismo, dependiendo de si se desarrolla una infección localizada o sistémica. (36)

### ✓ Bacterias gram positivas

Las bacterias grampositivas son microorganismos que se caracterizan por la singular composición de su pared celular. Entre sus principales características se encuentra una pared celular gruesa compuesta de peptidoglicano, la cual retiene el colorante cristal violeta durante la tinción de Gram. También presentan ácidos teicoicos y lipoteicoicos, que desempeñan un papel clave en la estabilidad estructural y en la capacidad de

adherirse a superficies. A diferencia de las bacterias gramnegativas, carecen de una membrana externa. Dentro de este grupo se encuentran tanto microorganismos beneficiosos como patógenos responsables de diversas infecciones en humanos. (37)

✓ *Enterococcus faecalis*

Entre los enterococos que colonizan el tracto gastrointestinal, la cepa cultivada más prevalente encontrada en las heces humanas es *E. faecalis*. Sin embargo, estos números pueden cambiar con la ubicación geográfica del huésped y, especialmente, la dieta. Esta bacteria comensal grampositiva pertenece a las bacterias del ácido láctico (BAL) y presenta resistencia a desafíos ambientales extremos y generalmente se encuentra en la cavidad oral humana, el tracto gastrointestinal y la mucosa vaginal. (38)(39)

*E. faecalis* es el primer colonizador del tracto gastrointestinal humano y tiene un impacto importante en el desarrollo inmunológico intestinal en las primeras etapas de la vida. En los recién nacidos, desempeña un papel protector regulando la homeostasis colónica durante el desarrollo al suprimir las respuestas inflamatorias mediadas por patógenos en las IEC humanas, induciendo la expresión de IL-10, y atenuando la secreción de citocinas proinflamatorias, especialmente IL-8.(38) Asimismo, *E. faecalis* es reconocido como patógeno oportunista, formador de biopelículas, altamente competentes en la resistencia antimicrobiana, capaces de producir una gran variedad de enfermedades en humanos. (39)

#### Características

*E. faecalis* es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa, conocida por su alta resistencia. Es capaz de soportar periodos prolongados de inanición, adaptándose y sobreviviendo en condiciones ambientales extremas. Puede desarrollarse en un rango de temperaturas de 10 a 45°C y resistir temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos.

Esta bacteria posee diversos factores de virulencia, como enzimas líticas, citolisina, sustancias de agregación, feromonas y ácido lipoproteico. Estas características facilitan su adherencia al huésped, promoviendo la invasión de tejidos. Además, *E. faecalis* es capaz de formar biopelículas organizadas, lo que le confiere una notable capacidad de resistencia y persistencia bacteriana. (38)

## Patogenicidad

La patogenicidad y la dificultad para eliminar *E. faecalis* pueden atribuirse a su capacidad para formar biopelículas, las cuales están implicadas en aproximadamente el 65% de las infecciones bacterianas. Las biopelículas pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las células planctónicas. Además, se ha comprobado que las biopelículas de *E. faecalis* en dispositivos médicos son responsables de algunas infecciones nosocomiales. (40)

Entre las principales infecciones producidas por *E. faecalis* tenemos a la bacteremia, el cual puede tener origen primario, y este se produce por introducción accidental de la bacteria en la sangre. En cuanto al origen secundario, estas aparecen previa infección en alguna otra región anatómica, destacando las vías urinarias, el tracto respiratorio o los tejidos cutáneos y subcutáneos, sobre todo después de haberse sufrido de quemaduras o de traumatismos graves, e inclusive, como resultado de intervenciones quirúrgicas. Otra de las infecciones corresponde a endocarditis, esta infección se produce en una o más válvulas cardíacas, y así también tenemos a las infecciones urinarias por *E. faecalis* el cual presenta factores que favorecen la aparición de estas infecciones que incluyen la obstrucción del flujo urinario, la neutralización de la acidez de la orina, los traumatismos, el ayuno prolongado y la diabetes, entre algunos otros. (41)

### ✓ *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es una bacteria grampositiva capaz de causar enfermedades mediante la producción de toxinas o superantígenos. Tiene la capacidad de invadir diversos órganos y tejidos, provocando procesos como supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Es uno de los microorganismos con mayor capacidad para generar metástasis a través de la sangre. Además, puede proliferar dentro del citoplasma celular, formar biopelículas y dar lugar a bacteriemia persistente o infecciones crónicas. En algunos casos, puede permanecer en estado latente y reactivarse después de meses o incluso años. *S. aureus* coloniza ciertas zonas de la piel y mucosas, desde donde puede causar reinfecciones, contaminar el entorno y propagarse a otros individuos. (42)

*S. aureus* forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo

por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. (43)

#### Características

El género *Staphylococcus* está compuesto por cocos Gram positivos con un tamaño que varía entre 0.5 y 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas bacterias pueden encontrarse de manera individual, en pares, formando tétradas, en cadenas cortas o en agrupaciones similares a racimos de uvas. Son microorganismos inmóviles, no esporulados y, en general, carecen de cápsula, aunque algunas cepas pueden desarrollar una cápsula de limo. Además, son anaerobios facultativos. Una de sus principales características es la producción de catalasa, una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. Esta propiedad se emplea como criterio diferencial para distinguir *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, los cuales son catalasa negativos. (42)(43)

La principal característica de *S. aureus* es su capacidad para producir diversas toxinas que atacan las células sanguíneas humanas. Además, en su superficie posee proteínas que bloquean la fagocitosis y la opsonización mediada por el sistema del complemento del huésped. La bacteria genera múltiples factores que no solo facilitan su supervivencia en el organismo, sino que también favorecen su patogénesis. Varios de estos factores contribuyen a la inhibición del sistema fagocítico del huésped, lo que permite a *S. aureus* resistir la eliminación por parte de las células del sistema inmune innato. (43)

#### Patogenicidad

La patogenicidad de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* está vinculada a varios componentes de su superficie, entre los que se incluyen el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y la proteína A. La enfermedad provocada por este microorganismo se desencadena cuando los factores de virulencia interactúan con una disminución de las defensas del huésped, lo que favorece la bacteria presente características virulentas y provoque daño. Esta situación se ve empeorada por el desarrollo de resistencia múltiple de la bacteria a los antibióticos, lo que dificulta cada vez más el tratamiento y la curación de las infecciones que provoca. (42)

La capacidad de supervivencia e invasión de *S. aureus* está relacionada con un sistema de comunicación entre células, conocido como quorum sensing (QS). Este proceso, es regulado por pequeñas proteínas llamadas autoinductoras, permite a las bacterias activar una variedad de genes que están vinculados a factores de virulencia, adaptándose así a las condiciones del entorno. (43)

### 1.5.5 Resistencia antimicrobiana

#### ✓ Resistencia antibacteriana

La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias sufren mutaciones en respuesta a la exposición a estos medicamentos. Estas bacterias resistentes pueden provocar infecciones en personas y animales, las cuales resultan más complicadas de tratar en comparación con aquellas causadas por bacterias no resistentes. Cabe destacar que no son los seres humanos ni los animales quienes desarrollan resistencia, sino las propias bacterias. (44)

Esta resistencia puede ocurrir de forma natural o adquirida. La resistencia natural es una característica propia de cada familia, especie o grupo bacteriano y existe antes de la introducción de los antibióticos. Por ejemplo, todas las bacterias Gram negativas son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, y esta propiedad no cambia con el tiempo, ya que se hereda de manera vertical de una generación a otra. Por otro lado, la resistencia adquirida es una característica variable que puede desarrollarse en una cepa específica de una especie bacteriana. Este tipo de resistencia puede ocasionar el fracaso del tratamiento cuando se administra un antibiótico que, en teoría, debería ser eficaz contra la bacteria causante de la infección.

El desarrollo de resistencia en una bacteria puede ocurrir a través de mutaciones que alteran la secuencia de bases en su cromosoma o mediante la adquisición de material genético extracromosómico de otras bacterias. En este último caso, la transferencia de genes se lleva a cabo de forma horizontal a través de plásmidos u otros elementos genéticos móviles, como transposones e integrones. (45)

### 1.5.6 Metabolitos secundarios

#### ✓ Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica es un procedimiento utilizado en investigación de recursos naturales para identificar y caracterizar los principales grupos de

metabolitos secundarios presentes en una planta. Este proceso implica la extracción del material vegetal previamente recolectado, secado y molido, con el objetivo de obtener la mayor cantidad posible de sus constituyentes químicos, resultando en un extracto total o crudo.

Esta evaluación fitoquímica permite obtener información esencial para orientar estudios posteriores de aislamiento, purificación y evaluación de la actividad biológica de los compuestos identificados.(46)

### **1.5.7 Método de extracción**

Un método de extracción es el conjunto de técnicas utilizadas para obtener compuestos bioactivos de origen vegetal, como alcaloides, flavonoides, terpenoides y otros metabolitos secundarios. Estos métodos buscan extraer los metabolitos secundarios de una planta sin degradarlos y maximizando su rendimiento. Los métodos tradicionales de extracción de metabolitos secundarios se realizan mediante la maceración y la extracción Soxhlet.

Actualmente se han logrado avances significativos en el procesamiento de plantas medicinales, como los métodos de extracción modernos; la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción con fluidos supercríticos, en los que estos avances tienen como objetivo aumentar el rendimiento a un menor coste. (47)(48)

En la presente investigación se optó por utilizar el método de ultrasonido debido a su capacidad para reducir los costos de consumo de solventes, reducir el tiempo de operación, reducir el consumo de energía y producir mayores rendimientos. (49)

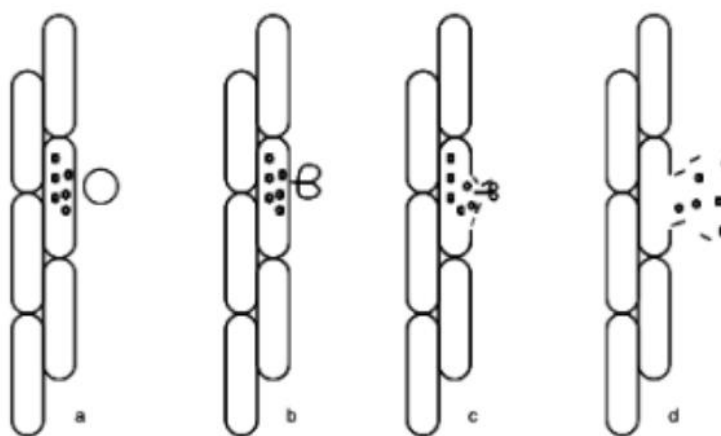
#### **✓ Ultrasonido**

El método de extracción por ultrasonido es un método eficaz para la extracción de compuestos vegetales, ya que ha demostrado una eficiencia de extracción en comparación a las técnicas ya conocidas. (50)

Este método consiste en la dispersión de ondas mecánicas el cual está conformada por un conjunto de ciclos constantes, que combinan altas y bajas presiones, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente. (51)(52)

La cavitación acústica es la principal fuerza del presente método, en el cual se forman burbujas de cavitación que colapsan en el ciclo de la compresión liberando así energía que permite el contacto con las paredes celulares del

material vegetal, obteniéndose el contenido celular en el medio utilizado.(53)



**Figura 3.** Mecanismo de la burbuja de cavitación con el material vegetal. Fuente: Jiménez L. (2023)(53)

### 1.5.8 Métodos de evaluación antimicrobiana

✓ Método de difusión en pozo de agar

Es también conocido como método de Kirby-Bauer modificado, y este método se usa ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos vegetales. Presenta sensibilidad similar a las técnicas como las bioautográficas, por lo cual proporciona condiciones más adecuadas para el crecimiento microbiano.(54)

El método consiste en realizar pozos de 6 a 8 mm utilizando un perforador de agar estéril en la placa de petri, previamente a esto la bacteria patógena debió ser sembrada en el medio. Luego de esto se ubican los volúmenes correspondientes al extracto y se incuban las placas por 24 horas a 37°C.(55)

✓ Método de evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

El método de dilución en caldo es una técnica utilizada para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobiano frente a un microorganismo específico. La CMI se define como la concentración más baja del agente que inhibe el crecimiento visible del microorganismo después de un período de incubación.

El método de dilución en caldo se basa en la presencia o ausencia de crecimiento de un microorganismo en un caldo en presencia de una concentración de antimicrobiano. Para ello se comprueba visualmente si los tubos de ensayo presentan turbidez.(56)

## II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 2.1. Tipo, nivel y diseño de la investigación

#### 2.1.1. Tipo de investigación

Básica

#### 2.1.2. Nivel de investigación

Explicativo

#### 2.1.3. Diseño de investigación

Experimental cuali-cuantitativo

### 2.2. Lugar de investigación

- ❖ Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.
- ❖ Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.
- ❖ Laboratorio del Instituto de Investigación de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga”.

### 2.3. Materiales de trabajo

#### 2.3.1. Material vegetal

- Hojas de *orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL

#### 2.3.2. Material microbiológico

- *Staphylococcus aureus*
- *Enterococcus faecalis*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*

#### 2.3.3. Materiales de laboratorio

- Placa Petri
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Papel film
- Tubos de ensayo de 10 ml y 3 ml
- Algodón estéril
- Marcador
- Micropipeta de 100 ul, 200 ul y 1000 ul
- Tips
- Viales de vidrio

- Hisopos estériles
- Gorros desechables
- Guantes estériles y descartables
- Mascarillas simples
- Vaso precipitado de 50 ml, 100 ml, 250 ml y 1000 ml
- Papel Kraft
- Bandas de goma (Ligas)
- Luna de reloj
- Pinzas metálicas
- Espátula de acero pequeña
- Matraz de 50 ml y 100 ml
- Encendedor
- Papel toalla
- Gradilla
- Sacabocado
- Pera de bromo
- Trípode
- Tijeras
- Bolsas de papel Kraft
- Papel filtro
- Embudo
- Frascos ámbar
- Bandeja de porcelana (plato)
- Tiras de pH
- Bagueta de vidrio
- Placa Mazzini
- Pipetas de 1 ml, 2 ml y 5 ml
- Propipetas
- Porta embudos
- Aro metálico
- Probeta de 10 ml y 100 ml
- Frascos de vidrio
- Papel aluminio

#### 2.3.4. Equipos de laboratorio

- Cabina de seguridad biológica (Marca Esco)
- Estufa (Marca Binder)

- Autoclave (Marca Gemmy)
- Cocinilla
- Incubadora (Marca Digisystem USA)
- Turbidímetro (Marca Ezodo)
- Ultrasonido (Marca Qsonica 500)
- Balanza analítica (Marca Boeco)
- Refrigeradora
- Lámpara ultravioleta

#### 2.3.5. Reactivos

- Diclorometano
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Hidróxido de amonio
- Limaduras de magnesio
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Alcohol 96°
- Cloruro de sodio 0.9% (NaCl)
- Cloruro férrico
- Agua estéril
- Agua destilada
- Ninhidrina

#### 2.3.6. Medios de cultivo

- Agar Tríptica Soya
- Agar Mueller Hinton
- Caldo Triptica Soya

### 2.4. Hipótesis y variables

#### 2.4.1. Hipótesis general

- El extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL presenta metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y gram negativas

#### 2.4.2. Hipótesis específica

- Existe presencia de diversos grupos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico total de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL.
- El extracto etanólico total de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias gram positivas y gram negativas a una concentración de 20mg/40ul mediante el método de difusión en pozos.
- Existen fracciones muy activas del tamizaje fitoquímico con actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias gram positivas y gram negativas a una concentración de 20mg/40ul del extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL.
- Se determinó exitosamente la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico total y de las fracciones más activas del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL.

### 2.4.3. Variables

<b>V. Independiente</b>		
Variable	Indicador	Índice
Extracto etanólico de hojas de <i>orthopterygium huaucui</i> (A. Gray) HEMSL		
<b>V. Dependiente</b>		
Tamizaje fitoquímico	Método de cribado fitoquímico de Olga Lock	Reacciones de coloración y precipitación
Actividad antimicrobiana	Método de difusión en pozo	Halos de inhibición
	Método de difusión en caldo	Grado de turbidez

## 2.5. Población y muestra

### 2.5.1. Población

Hojas secas de la especie vegetal *orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL y bacterias gram negativas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y gram positivas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028).

### 2.5.2. Muestra

Extracto etanólico obtenido a partir de 1100 g de las hojas de *orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL

## **2.6. Métodos, técnicas y procedimientos para la recolección de datos**

### **2.6.1. Recolección del material vegetal**

Las hojas de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL fueron recolectadas con una similitud de tamaño de diferentes árboles en horas de la mañana en la zona de Cruz Verde, provincia de Yauca del Rosario, departamento de Ica, en el mes de abril del 2024 con una altitud de 1929.0 msnm, latitud de -14.17332 msnm y longitud de -75.35546 msnm. Las muestras recolectadas se colocaron en bolsas de papel kraft para mantener sus propiedades físicas y evitar daños en el transporte, asimismo se usaron tijeras de podar para tener muestras correctamente recolectadas.(57)

Una vez recolectada la muestra vegetal, ésta fue trasladada al laboratorio de Química Farmacéutica de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” para su posterior tratamiento. Es importante destacar que el material vegetal desarrollaba necrosis foliar cuando permanecía por períodos prolongados en las bolsas de papel kraft. Por esta razón, se optó por trasladarlo con cuidado y en pequeñas cantidades sin ocupar el límite de las bolsas de papel kraft.

### **2.6.2. Tratamiento de la muestra vegetal**

#### **a) Selección, limpieza, secado y trituración (58)(59)**

La selección del material vegetal se llevó a cabo una vez teniendo el material vegetal en el laboratorio, donde se escogieron las hojas en óptimas condiciones y se eliminaron las que presentan manchas, quemaduras, daño de insectos, daño de agroquímicos y daño de tejido por hongos o bacterias. Este procedimiento se llevó a cabo en una superficie plana donde estuvo en contacto directo la muestra vegetal con el papel kraft para evitar contaminaciones con la superficie.

Las hojas fueron limpiadas con ayuda de un papel absorbente para eliminar el exceso de polvo y/o humedad.

Para el proceso de secado, la muestra vegetal se colocó sobre una superficie plana cubierta con papel kraft y se dejó a temperatura ambiente durante cinco días. Durante este período, las hojas fueron volteadas interdiariamente, alternando el haz y el envés para garantizar un secado uniforme.

La muestra seca fue triturada de forma manual con el fin de obtener partículas más pequeñas de la muestra vegetal y así lograr una mejor

extracción, esto permitió obtener 1100 g del material vegetal seco y triturado. Posteriormente esto fue almacenado en un lugar fresco y seco.

**b) Extracción por ultrasonido (53)(51)**

La especie vegetal *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL, en una cantidad de 1100 g, fue sometida a un proceso de extracción mediante ultrasonido. Para ello, se colocaron 100 g de muestra triturada en un vaso precipitado con 1 litro de alcohol al 96°, introduciendo el sonicador durante un periodo de tiempo de 2 horas. Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta procesar todo el material vegetal disponible. Posteriormente, se llevó a cabo la filtración para separar la extracción alcohólica del residuo vegetal.

Se utilizaron fuentes de porcelana para depositar el filtrado y se dejaron reposar a temperatura ambiente, en un lugar sombreado, para facilitar la evaporación del solvente utilizado, obteniéndose así 155 g de extracto crudo.

**c) Tamizaje fitoquímico (60)**

Se realizó el tamizaje fitoquímico descrito por Olga Lock de Ugaz, el cual consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Es importante destacar que, durante el proceso, se realizaron a cabo algunas modificaciones en la metodología empleada. Estas modificaciones se realizaron en función del comportamiento observado del extracto, con el objetivo de optimizar su manejo y garantizar la mayor obtención de las fracciones.

❖ Obtención de la fracción A

El procedimiento consistió en aislar 8 g del extracto total seco, considerado como la fracción A y al extracto remanente se le adicionó 100 ml de HCl al 1%. Esto se filtró y formó 2 fases, una insoluble y otra ácida.

❖ Obtención de la fracción B

Esto está conformado por los residuos que quedaron en el papel filtro, por ello es conocido como fase insoluble, el cual se llevó a secar a temperatura ambiente, una vez pasado el tiempo de secado, se lavó constantemente con agua destilada hasta obtener un pH neutro, los papeles de filtro con los residuos fueron nuevamente puestos a secar para finalmente disolverlos en 1 litro de diclorometano.

❖ **Obtención de la fracción C**

A la solución ácida, después de la filtración, se le agregó 9 ml de amoníaco con la finalidad de obtener un pH alcalino, la solución se pasó a una pera de bromo y se empezó a extraer con diclorometano (250 ml), obteniéndose dos fases nuevamente. Se procedió a filtrar y la fase orgánica o diclorometánica se llevó a secar.

❖ **Obtención de la fracción D**

La solución restante o fase acuosa se mantuvo en una pera de bromo y se le agregó una solución de diclorometano con alcohol en una proporción de 3:2 (1500ml:1000ml) y se obtuvieron 2 fases nuevamente. Posteriormente, se procedió a filtrar y secar la fase diclorometánica-etanólica.

❖ **Obtención de la fracción E**

La fase acuosa remanente se le denominó como la fracción E, asimismo, esta solución fue secada a temperatura ambiente.

**d) Identificación de metabolitos secundarios (60)**

Tras realizar el fraccionamiento a partir del extracto etanólico seco total, se llevaron a cabo reacciones de precipitación y coloración en cada fracción obtenida (Fracciones A, B, C, D y E) con el fin de identificar los metabolitos secundarios y los grupos funcionales presentes en cada una de ellas.

❖ **Fracción A**

Para la presente fracción se realizaron las siguientes identificaciones.

• **Taninos (+)**

Reacción de gelatina – sal

Se tomaron 4 tubos de ensayo y se agregaron pequeñas cantidades de la fracción con en 1 ml de agua destilada, esto se disolvió y luego se procedió a realizar lo siguiente:

1° tubo: El presente tubo se consideró como el control, en el cual se filtró la solución antes realizada.

2° tubo: En este tubo se agregó 1 ml de gelatina al 1%.

3° tubo: En el presente caso se adicionó 1 ml de NaCl al 5%.

4° tubo: En este tubo se agregó 0.5 ml de gelatina y 0.5 ml de NaCl al 5%.

La precipitación del reactivo gelatina – sal o con los tubos 2° y 3° indica la presencia de taninos, pero si solamente ocurre precipitación con el 3° tubo, podría ser un falso positivo.

#### Reacción de Tricloruro férrico

Una pequeña cantidad del extracto seco de la fracción A, se disolvió en etanol y se depositó 1 mL en un tubo de ensayo, se le agregó dos gotas de FeCl<sub>3</sub> 1%.

Si se observa la aparición de colores azul – negro, verde o azul verdoso, indica que la reacción es positiva.

- Aminoácidos

#### Reacción de Ninhidrina (+)

Se disolvió una pequeña cantidad de la fracción A en etanol, y luego en 2 tiras de papel de filtro se colocaron 1 gota de la muestra, en tal motivo se tendrá lo siguiente:

1° Papel filtro: En la gota de la muestra se le adiciona una gota del reactivo de Ninhidrina 2%

2° Papel filtro (Blanco): A la presente muestra se le adicionará una gota de solución etanólica de ninhidrina 2%

Las 2 tiras de papel de filtro se pusieron a secar a temperatura ambiente para luego colocarlos en la estufa a 110 – 120 °C hasta observar la aparición de un color azul violácea en el blanco, que se comparó con el color de la muestra. Si tienen la misma coloración, la reacción era positiva.

- Flavonoides

#### Reacción de Shinoda

Una pequeña cantidad de los extractos secos de la fracción A se disolvieron en etanol esto con ayuda de una placa excavada, en el cual se agregó 0.5 mL de la disolución en 2 pozos, luego se adicionó 5 limaduras de magnesio y 2 a 3 gotas de HCl concentrando.

La reacción será positiva cuando aparecen tonos de colores rojo, anaranjado y violeta.

### ❖ Fracción B

Para la presente fracción se realizaron las siguientes identificaciones.

- Triterpenoides y/o esteroides  
Reacción de Liebermann- Burchard  
En 3 placas excavadas se disolvió una pequeña cantidad de los extractos secos de la fracción en diclorometano, luego se añadieron 4 gotas de anhídrido acético y 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.  
La reacción es positiva si aparecen colores desde verde, azul verdoso (vías rojo o azul).
- Antraquinonas (-)  
Reacción de Borntrager  
Se tomó una pequeña cantidad de la fracción B en un tubo de ensayo y se le agregó 4 ml de NaOH al 5%, luego se agitó de manera ligera el tubo de ensayo y se dejó reposar hasta que se observó la separación de dos fases.  
La reacción se interpreta como positiva si la fase acuosa se torna de un color rojo.

#### ❖ Fracción C

Para la presente fracción se realizaron las siguientes identificaciones.

- Triterpenoides y/o esteroides  
Reacción de Liebermann- Burchard  
Para la presente identificación se realizó el mismo procedimiento de la fracción B.
- Alcaloides  
En tubos de ensayos, los extractos secos de la fracción fueron disueltos por separado en HCl 1% y luego filtrados. En cada tubo se añadió 2 a 3 gotas de los reactivos de Mayer, Dragendorff y Wagner.  
Las reacciones serán positivas si se observa:  
Reacción de Mayer: Precipitado blanco cremoso  
Reacción de Dragendorff: Precipitado anaranjado  
Reacción de Wagner: Precipitado marrón

#### ❖ Fracción D

Para la presente fracción se realizaron las siguientes identificaciones.

- Flavonoides  
Reacción de Shinoda

Para la presente identificación se realizó el mismo procedimiento de la fracción A.

- Leucoantocianidinas y catequinas

Reacción de Rosenheim

A 1ml de la fracción, se le agregó 0,5 mL de HCl concentrado, lo llevamos a baño maría durante 10 min. Dejamos enfriar y agregamos 2 mL de agua destilada y 1 mL de alcohol amílico, agitamos y observamos el color que toma la fase amílica.

Si se torna de un color rojo indica la presencia de leucoantocianidinas. Si se torna de un color marrón indica la presencia de catequinas.

- Triterpenoides y/o esteroides

Reacción de Liebermann- Burchard

Para la presente identificación se realizó el mismo procedimiento de la fracción C.

- Alcaloides

Para la presente identificación se realizó el mismo procedimiento de la fracción C.

#### ❖ **Fracción E**

Para la presente fracción se realizaron las siguientes identificaciones.

- Flavonoides

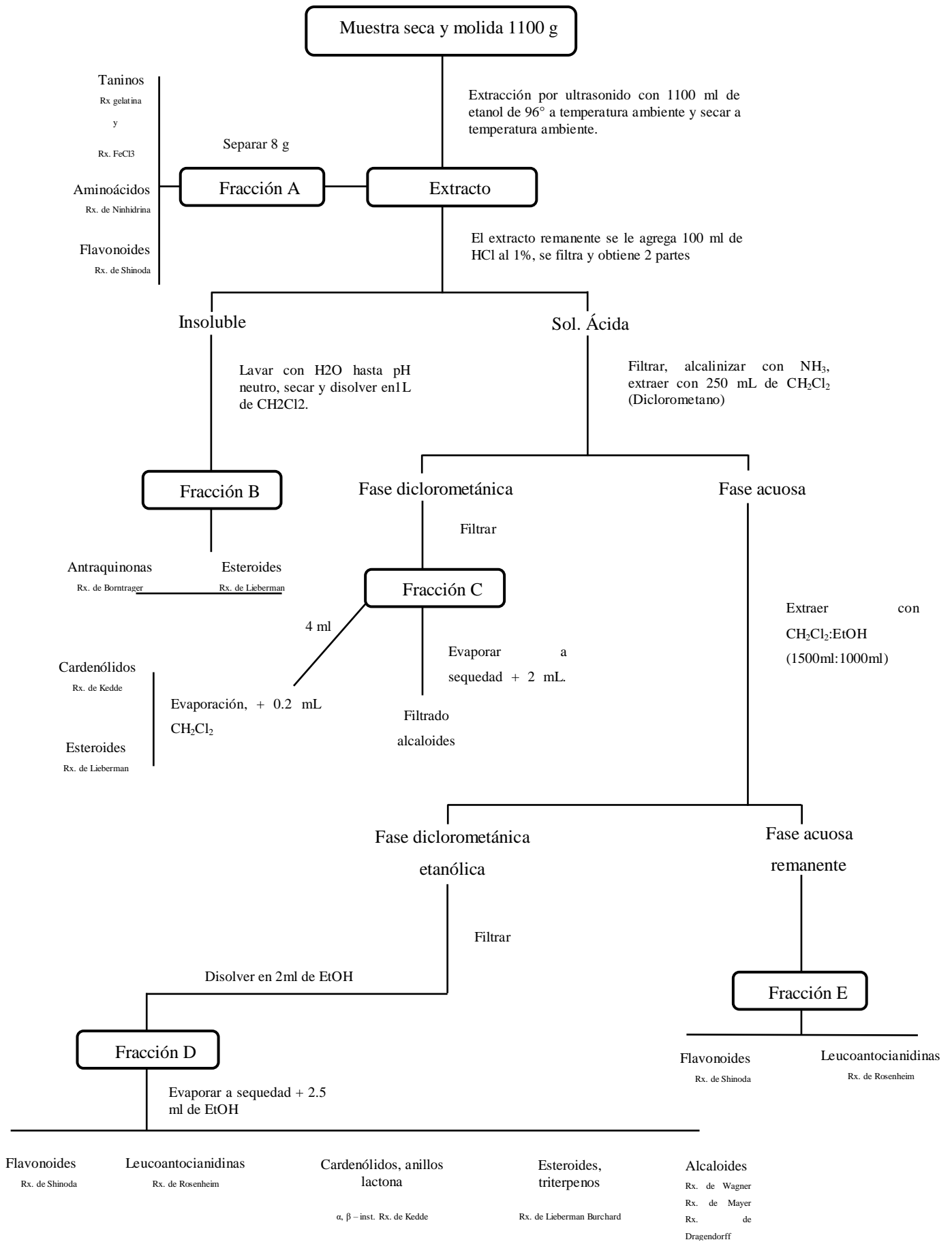
Reacción de Shinoda

Para la presente identificación se realizó el mismo procedimiento de la fracción A.

- Leucoantocianidinas y catequinas

Reacción de Rosenheim

Para la presente identificación se realizó el mismo procedimiento de la fracción D.



**Figura 4.** Figura de Screening fitoquímico de *Orthopterygium huaucai* (A. Gray) HEMSL

### 2.6.3. Actividad antimicrobiana

#### a) Materiales y procesos previos a los ensayos de evaluación

##### ➤ Obtención de cepas bacterianas

Para el presente estudio, las cepas bacterianas correspondientes a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) fueron donados por el laboratorio Rizoagrum S.A.C. de la ciudad de Ica.

##### ➤ Activación de las cepas bacterianas (61)

Las cepas bacterianas se encontraban correctamente almacenados en viales con medio de agar Tripticasa Soya (TSA).

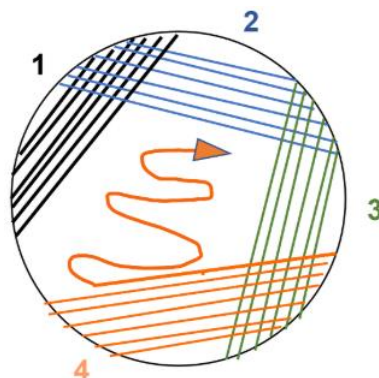
Para su activación, se preparó caldo Tripticasa Soya siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, en tubos de ensayo estériles se añadió una cantidad adecuada del caldo preparado, a los cuales se incorporó una alícuota de las bacterias contenidas en los viales. Luego, los tubos fueron incubados a 37 °C durante 18 a 24 horas.

Es importante destacar que todo este procedimiento, así como los siguientes, se llevaron a cabo dentro de una cabina de seguridad biológica.

##### ➤ Preparación de las cepas madres (62)

Una vez finalizado el tiempo de activación de las bacterias, se preparó agar Tripticasa Soya (TSA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se vertieron aproximadamente 20 ml de TSA en placas Petri, dejándolas enfriar durante 15 minutos.

Luego, se realizó la siembra de las bacterias activadas mediante el método de estría escocesa. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.



**Figura 5.** Siembra por estría escocesa. Fuente: Universidad Miguel Hernández (2023)(62)

➤ **Preparación de los extractos a evaluar**

Se disolvió 1g de cada fracción (A, B, C, D y E) en 1 mL de alcohol de 96° con la finalidad de obtener una proporción de 1:1. Esto se utilizó para la evaluación de difusión en pozo.

En el caso de la evaluación del CMI se realizó el mismo procedimiento con los extractos, pero solo con las fracciones que mostraron un mayor efecto de inhibición en el método de difusión en pozo, y se utilizó agua estéril como disolvente.

➤ **Preparación de los controles**

En el presente estudio, para la evaluación de difusión en pozo se utilizó los siguientes controles:

Control negativo: Alcohol 96°

Control positivo: Gentamicina 10ug/40ul (63)

Y para el caso del método del CMI se utilizó:

Control negativo 1: caldo tripticasa soya con extracto

Control negativo 2: caldo tripticasa soya sin bacteria

Control negativo 3: caldo tripticasa soya con bacteria

Control positivo: Gentamicina 80ug/mL (64)

**b) Evaluación del método de difusión en agar (65,66)**

Esta técnica actualmente se encuentra estandarizada y recomendada por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS, de los Estados Unidos para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales.

La metodología desarrollada corresponde a la de difusión en pozo, esta metodología de evaluación es más sensible que el método de difusión en disco y aunque presenta sensibilidad similar a las técnicas como las bioautográficas, proporciona condiciones más adecuadas para el crecimiento microbiano

➤ **Preparación de la suspensión del inóculo (67)**

Se prepararon tubos de ensayo con solución salina fisiológica al 0.9% (NaCl), los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, utilizando un asa de Kolle, se tomaron colonias bacterianas de las placas madre y se suspendieron en los tubos con solución salina hasta alcanzar una turbidez de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, esto con

ayuda de un turbidímetro y un vortex para homogenizar correctamente la suspensión.

➤ **Preparación de los medios de cultivos inoculados (67)**

Se procedió a preparar el Agar Mueller Hinton según indicaciones del fabricante en una cantidad correspondiente a 700 ml con ayuda de un matraz estéril, para luego ser llevado a la autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C, al retirar de la autoclave se deja enfriar hasta una temperatura de 40 a 45 °C para luego verter aproximadamente 20 ml en 32 placas Petri. Para los ensayos, se trabajó con 5 repeticiones por muestra, en donde se utilizó 1 placa por bacteria y por extracto y/o control a evaluar.

Posteriormente se procedió a realizar un sembrado por superficie con ayuda de un hisopo estéril, en el cual se empapó el hisopo en la bacteria suspendida previamente a una turbidez de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL y se realizó la siembra en 4 diferentes direcciones, hasta cubrir completamente la superficie. Luego con ayuda de un sacabocado de 7 mm se procedió a realizar 5 pozos por placa, en el cual se le agregó 40 ul de cada fracción a evaluar y para el control negativo se utilizó alcohol de 96°. Finalmente, se procedió a llevar las placas a la incubadora durante 24 horas.

➤ **Lectura e interpretación de resultados (63)**

La lectura de los resultados se interpretó mediante la lectura de los diámetros (Halos) de inhibición que presentó cada extracto frente a las diferentes bacterias evaluadas.

Asimismo, se tomó como referencia orientativa los diámetros de inhibición para las cepas bacterianas evaluadas en el presente estudio contra gentamicina, según lo indicado por el Instituto Nacional de Salud (INS).

El INS categoriza la sensibilidad de la cepa bacteriana como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

**Tabla 1.** Diámetros de inhibición referenciales de gentamicina del Instituto Nacional de Salud (INS) (63)

	Diámetro en mm		
	Resistente	Intermedio	Sensible
<i>Staphylococcus spp</i>	≤ 12	13-14	≥ 15
<i>Enterococcus spp.</i>	≤ 6	7-9	≥ 8
<i>Enterobacterias</i>	≤ 12	13-14	≥ 15

**c) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)(64)**

Se utilizó el método de dilución en caldo, el cual se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en un medio de cultivo. Este método evalúa la presencia o ausencia de crecimiento del microorganismo, para ello se comprueba visualmente si los tubos presentan turbidez o no.

➤ **Preparación de la suspensión del inóculo**

Se prepararon tubos de ensayo con solución salina fisiológica al 0.9% (NaCl), los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, utilizando un asa de Kolle, se tomaron colonias bacterianas de las placas madre y se suspendieron en los tubos con solución salina hasta alcanzar una turbidez de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL.

➤ **Preparación del caldo inoculado (68)**

A diferencia de la evaluación de difusión en pozo, en este caso se procedió a preparar el caldo tripticasa soya en una proporción de 1:20 del inóculo preparado previamente, para así obtener  $5 \times 10^6$  UFC/mL de caldo inoculado con la bacteria a evaluar.

Para el presente caso se utilizaron tubos de ensayos de 3 ml, en el cual se trabajó la actividad en intervalos de 0,5 de 1% hasta el 5%, esto en razón de 3 repeticiones. Asimismo, se consideraron tubos de ensayo con caldo TS más extracto que ayudaron como control negativo N° 1, caldo TS sin aditivos como parte del control negativo N° 2, caldo TS más el inóculo como parte del control negativo N° 3, y caldo inoculado más gentamicina como control positivo. Una vez inoculadas los tubos de ensayo más los extractos a evaluar, estas fueron incubadas a temperatura de 37 °C durante 24 horas.

En los casos en que no se evidenció crecimiento bacteriano macroscópico en los tubos de ensayo evaluados, se procedió a realizar una siembra escocesa del contenido de dichos tubos sobre placas con Agar Mueller Hinton. Esta técnica permitió verificar si existía un crecimiento bacteriano no detectable a simple vista.

Las placas fueron incubadas durante 24 horas, tras lo cual se realizó una nueva observación para determinar la presencia o ausencia de colonias bacterianas.

➤ **Lectura e interpretación de resultados**

La lectura de resultados se interpretó mediante la evaluación del crecimiento bacteriano y se reportó como crecimiento (Presencia) o inhibición total (Ausencia) para el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria.

#### **2.1.4. Técnicas del procedimiento de la información**

##### **a) Recolección de datos analíticos:**

Esto se realizó con ayuda de cuadernos de trabajo donde se procedió a registrar todos los datos y resultados de los métodos aplicados para su posterior procesamiento.

##### **b) Procesamiento, interpretación y análisis de datos:**

Los ensayos fueron analizados por el software estadístico Minitab 18 donde se realizó un análisis de varianza mediante el método Tukey con una significancia de 0.05, lo que permitirá obtener una información más confiable y sintetizada. Asimismo, algunos datos fueron tratados por métodos estadísticos paramétricos a través del programa Microsoft Excel.

#### **2.1.5. Aspectos éticos**

##### **c) Recolección de datos analíticos:**

A lo largo del desarrollo de esta investigación, se han seguido rigurosamente los principios éticos que rigen toda investigación académica y científica. Se ha garantizado el respeto a los conocimientos de diversos autores, citándolos de manera adecuada y conforme a las normas establecidas.

Asimismo, se estableció un acuerdo ético entre el asesorado y los asesores durante la práctica y ejecución del trabajo. Además, el equipo de investigación de esta tesis declara no tener ningún conflicto de interés de ningún tipo.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Marcha fitoquímica

Durante el proceso de fraccionamiento del extracto vegetal se obtuvieron las siguientes cantidades: fracción A: 9 g, fracción B: 42 g, fracción C: 550 mg, fracción D: 9 g y fracción E: 66 g. Estas cantidades ayudaron para la identificación de los metabolitos secundarios de la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huauacui*

Fracciones	Metabolitos	Reacciones	Resultado
A	Rx. Shinoda	Flavonoides	+
	Rx. Gelatina	Taninos gálicos	+
	Rx. Cloruro Férrico	Grupos fenólicos libres	+
	Rx. Ninhidrina	Aminoácidos	+
B	Rx. Liebermann Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+
	Rx. Borntrager	Antraquinonas	-
C	Rx. Liebermann Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+
	Rx. Kedde	Cardenólidos	-
	Rx. Dragendorff		-
	Rx. Mayer	Alcaloides	-
	Rx. Wagner		-
D	Rx. Kedde	Cardenólidos	-
	Rx. Shinoda	Flavonoides	+
	Rx. Rosenheim	Leucoantocianidinas/Catequinas	+
	Rx. Liebermann Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+
	Rx. Dragendorff		-
	Rx. Mayer	Alcaloides	-
	Rx. Wagner		-
E	Rx. Shinoda	Flavonoides	+
	Rx. Rosenheim	Leucoantocianidinas/Catequinas	+

Leyenda: Presencia (+); Ausencia (-)

### 3.2. Actividad antimicrobiana

En la medición de los halos de inhibición observados en el método de difusión en pozo, se registraron halos de hasta 30 mm de diámetro. Asimismo, se identificaron ensayos que no presentaron actividad antimicrobiana, evidenciada por la ausencia de halos de inhibición.

**Tabla 3.** Lectura de los halos de inhibición de la fracción A en el método de difusión en pozo

<b>Fracción A</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>				<b>Promedio</b>	
<i>E. coli</i>	15.0	15.0	15.0	15.0	18.0	17.6
<i>S. Typhimurium</i>	18.0	18.0	17.0	18.0	17.0	17.6
<i>S. aureus</i>	24.0	24.0	24.0	24.0	23.0	23.8
<i>E. faecalis</i>	22.0	22.0	23.0	23.0	23.0	22.6

**Tabla 4.** Lectura de los halos de inhibición de la fracción B en el método de difusión en pozo

<b>Fracción B</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>				<b>Promedio</b>	
<i>E. coli</i>	0.90	0.90	0.90	0.90	0.85	8.90
<i>S. Typhimurium</i>	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
<i>S. aureus</i>	15.0	14.5	15.5	15.0	12.0	14.4
<i>E. faecalis</i>	18.5	18.0	18.0	18.0	18.0	18.1

**Tabla 5.** Lectura de los halos de inhibición de la fracción C en el método de difusión en pozo

<b>Fracción C</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>				<b>Promedio</b>	
<i>E. coli</i>	16.0	16.5	16.5	16.5	18.0	16.7
<i>S. Typhimurium</i>	21.0	21.0	20.0	20.0	21.0	20.6
<i>S. aureus</i>	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
<i>E. faecalis</i>	23.0	16.0	16.0	18.0	16.0	17.8

**Tabla 6.** Lectura de los halos de inhibición de la fracción D en el método de difusión en pozo

<b>Fracción D</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>				<b>Promedio</b>	
<i>E. coli</i>	14.0	14.0	13.0	14.0	13.5	13.7
<i>S. Typhimurium</i>	28.0	29.5	29.0	29.0	30.0	29.1
<i>S. aureus</i>	29.5	28.0	30.0	29.0	30.0	29.3
<i>E. faecalis</i>	20.5	21.0	19.0	21.0	20.0	20.3

**Tabla 7.** Lectura de los halos de inhibición de la fracción E en el método de difusión en pozo

<b>Fracción E</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>					<b>Promedio</b>
<i>E. coli</i>	23.0	23.5	23.0	23.5	24.0	23.4
<i>S. Typhimurium</i>	13.5	14.0	14.0	14.0	13.0	13.7
<i>S. aureus</i>	26.5	26.5	25.5	23.0	24.5	25.2
<i>E. faecalis</i>	23.0	22.0	22.0	23.0	24.0	22.8

**Tabla 8.** Lectura de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina) en el método de difusión en pozo

<b>C+</b> <b>(Gentamicina)</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>					<b>Promedio</b>
<i>E. coli</i>	21.5	22.0	21.0	22.0	21.0	22.0
<i>S. Typhimurium</i>	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5
<i>S. aureus</i>	21.0	21.0	21.0	22.0	21.0	21.0
<i>E. faecalis</i>	13.0	13.0	13.0	13.5	14.5	13.0

**Tabla 9.** Lectura de los halos de inhibición del control negativo (Alcohol) en el método de difusión en pozo

<b>C-</b> <b>(Alcohol)</b>	<b>Lecturas por quintuplicado (mm)</b>					<b>Promedio</b>
	<b>F. A</b>	<b>F. B</b>	<b>F. C</b>	<b>F. D</b>	<b>F. E</b>	
<i>E. coli</i>	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
<i>S. Typhimurium</i>	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
<i>S. aureus</i>	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
<i>E. faecalis</i>	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00

En la tabla 9 del control negativo se observaron medidas de 7 mm, lo cual corresponde al diámetro del pozo en el que se agregó el control. Esto indica que dicho control no presentó ningún efecto sobre los halos de inhibición generados por los extractos evaluados frente a las diferentes bacterias evaluadas.

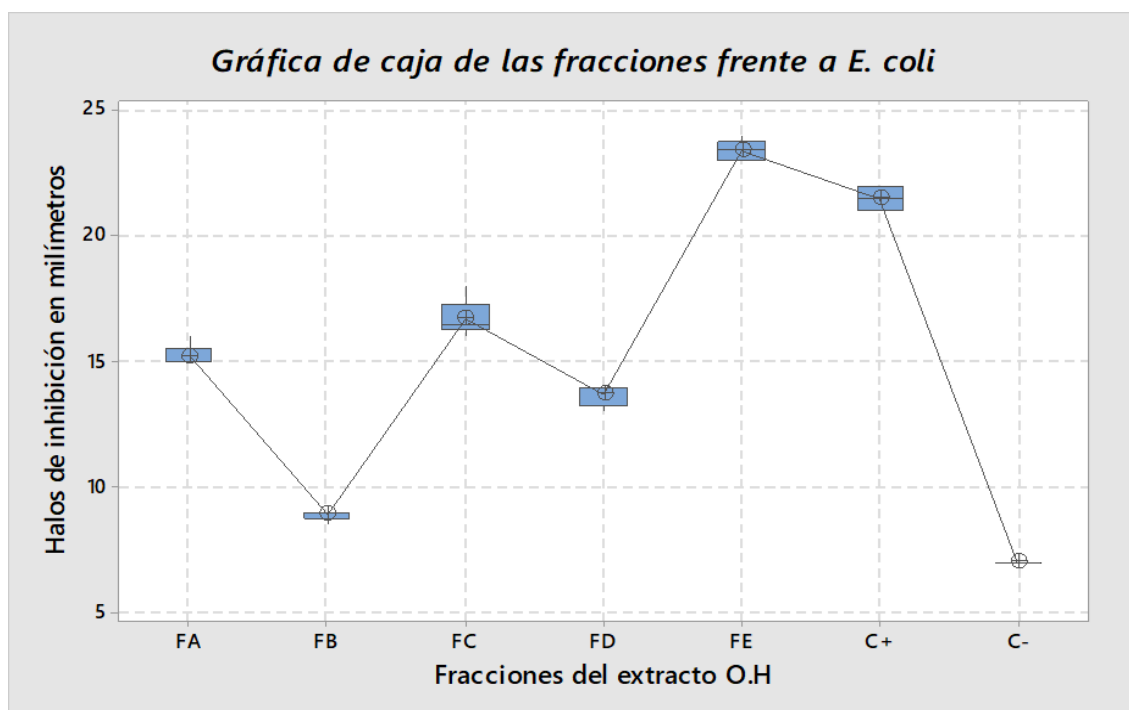
**Tabla 10.** Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a *E. coli*

<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>FA</b>	5	15.2	0.447	(14.783; 15.617)
<b>FB</b>	5	8.90	0.224	(8.483; 9.317)
<b>FC</b>	5	16.7	0.758	(16.283; 17.117)
<b>FD</b>	5	13.7	0.447	(13.283; 14.117)
<b>FE</b>	5	23.4	0.418	(22.983; 23.817)
<b>C+</b>	5	21.5	0.500	(21.083; 21.917)
<b>C-</b>	5	7.00	0.000	(6.583; 7.417)

**Desv.Est. agrupada = 0.455129**

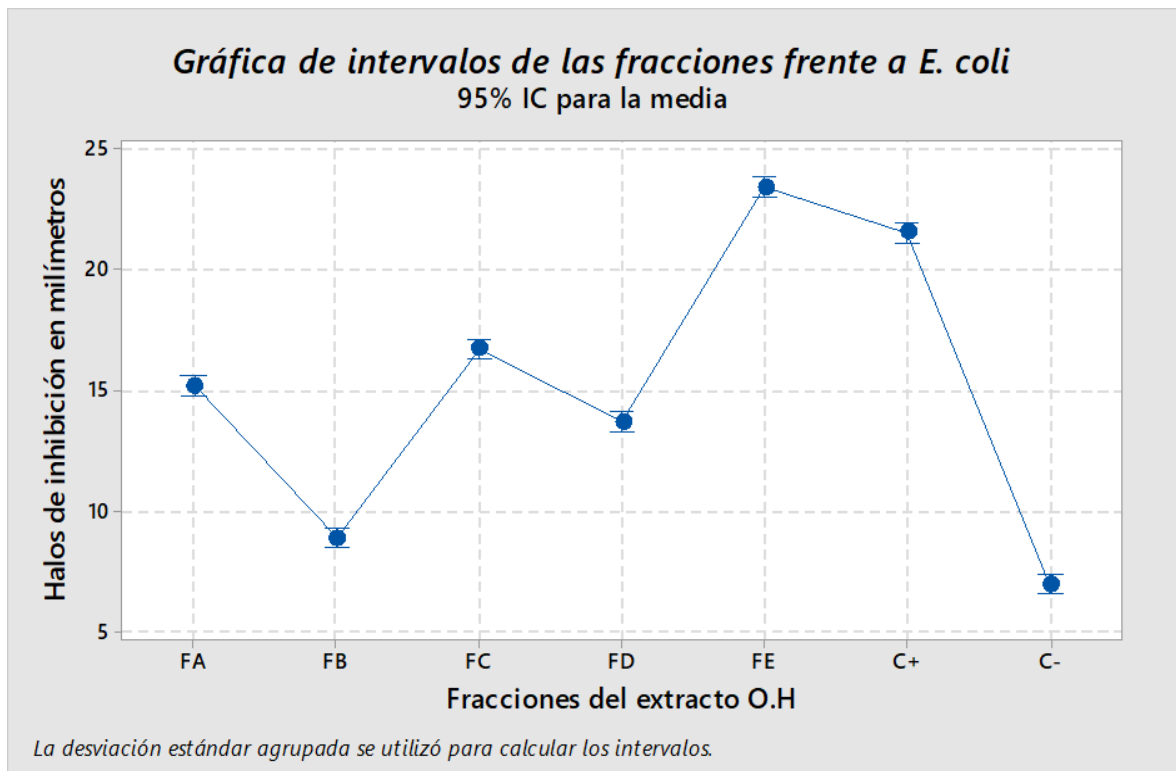
**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Desv. Est.: Desviación Estandar, IC de 95%: Intervalo de confianza

En la Tabla 10 se observó que la fracción E presentó un promedio de inhibición superior al del control positivo, mientras que la fracción B mostró una actividad considerablemente baja. Ambos resultados corresponden a ensayos realizados frente a *Escherichia coli*.



**Figura 6.** Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a *E. coli*

En la figura 6 se puede observar gráficamente los promedios de inhibiciones que presentó cada fracción y control frente a *E. coli*.



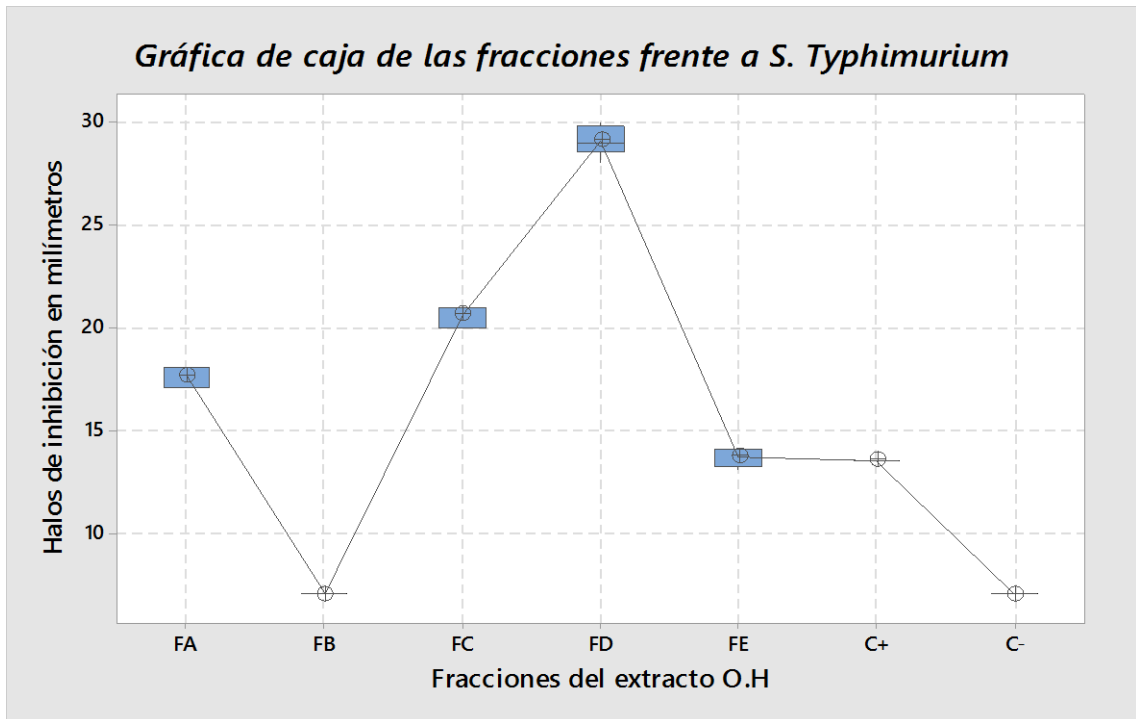
**Figura 7.** Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a *E. coli*

**Tabla 11.** Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a *S. typhimurium*

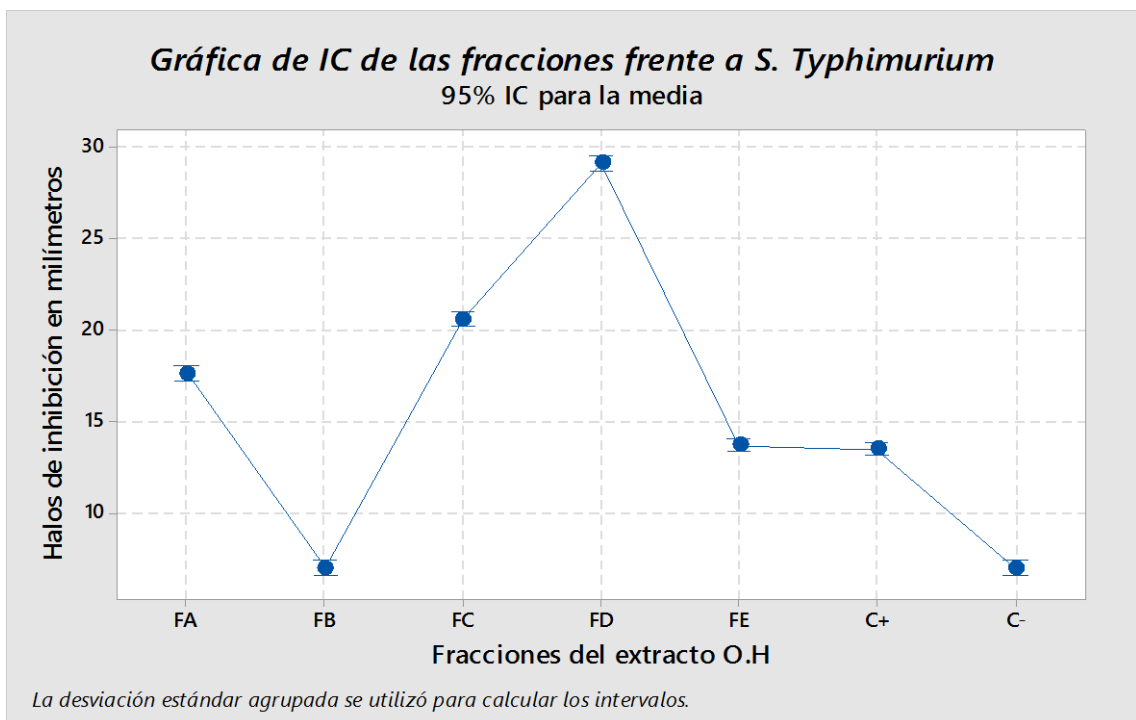
<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>FA</b>	5	17.6	0.55	(17.198; 18.002)
<b>FB</b>	5	7.00	0.00	(6.598; 7.402)
<b>FC</b>	5	20.6	0.55	(20.198; 21.002)
<b>FD</b>	5	29.1	0.74	(28.698; 29.502)
<b>FE</b>	5	13.7	0.45	(13.298; 14.102)
<b>C+</b>	5	13.5	0.00	(13.10; 13.90)
<b>C-</b>	5	7.00	0.00	(6.598; 7.402)

**Desv.Est. agrupada = 0.439155**

En la Tabla 11 se observó que la fracción D presentó un promedio de inhibición significativamente superior al del control positivo. Las fracciones A y C también mostraron una actividad mayor que la del control, mientras que la fracción E presentó un efecto similar. En contraste, la fracción B no evidenció halos de inhibición. Estos resultados corresponden a ensayos realizados frente a *S. typhimurium*.



**Figura 8.** Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a *S. typhimurium*



**Figura 9.** Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a *S. typhimurium*

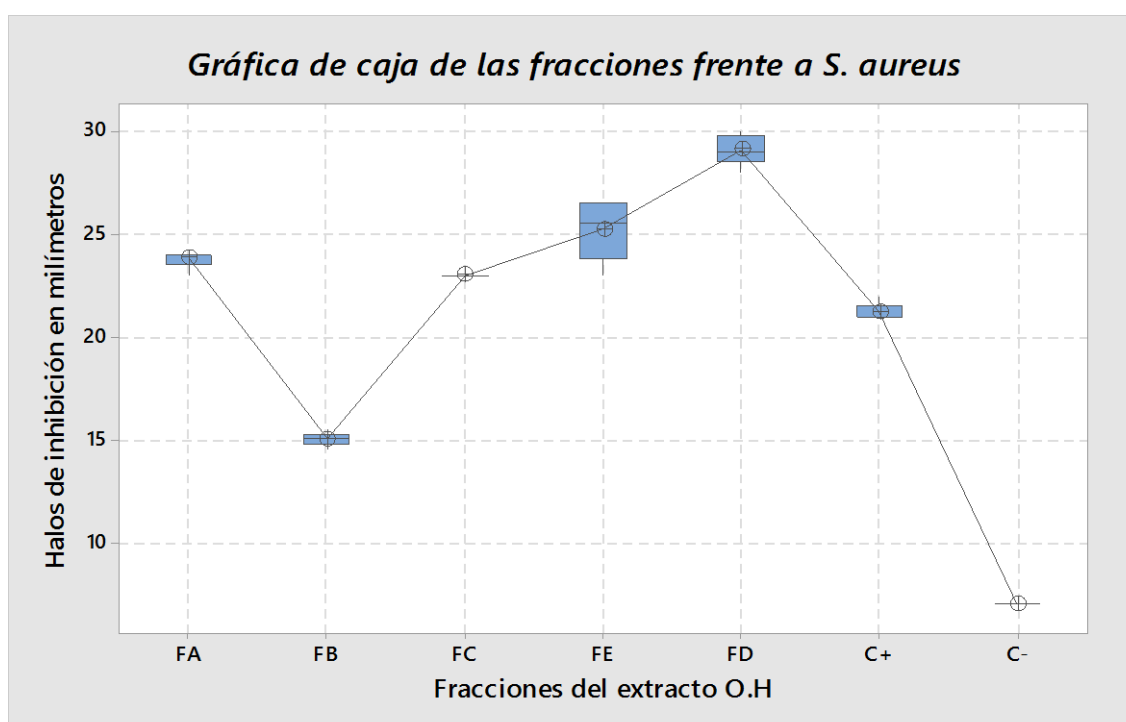
En las figuras 8 y 9 se pueden observar gráficamente los promedios de inhibiciones que presentó cada fracción y control frente a *S. typhimurium*

**Tabla 12.** Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a *S. aureus*

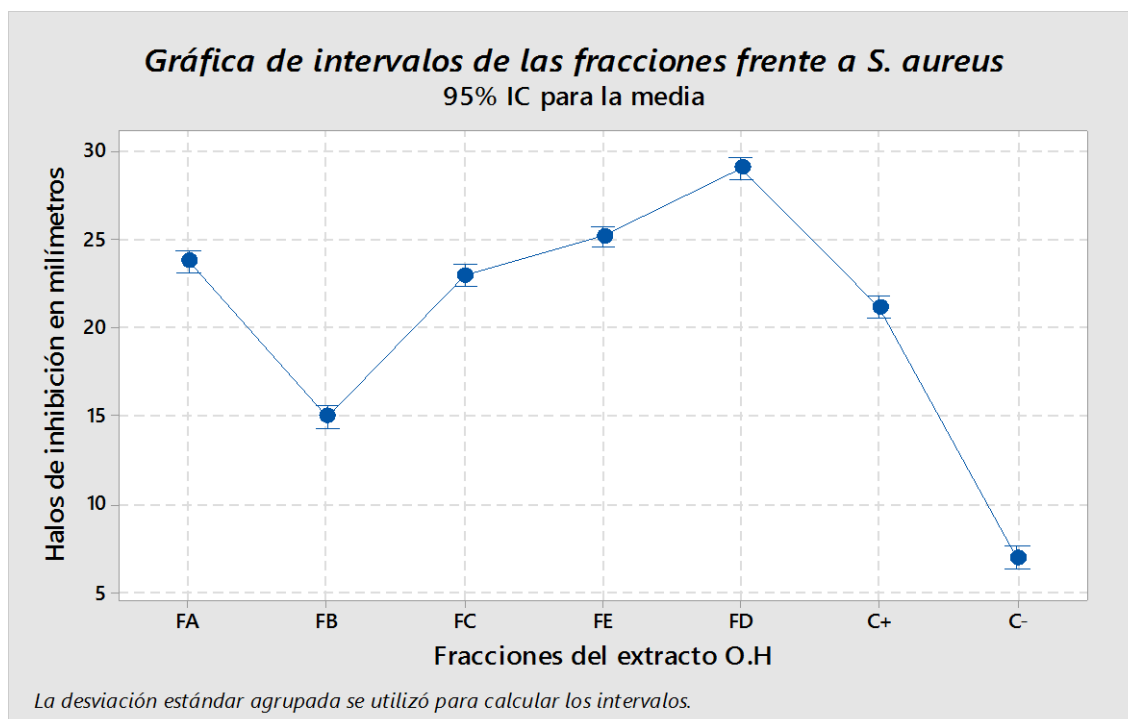
<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>FA</b>	5	23.8	0.447	(23.173; 24.427)
<b>FB</b>	5	15.0	0.354	(14.373; 15.627)
<b>FC</b>	5	23.0	0.000	(22.37; 23.63)
<b>FE</b>	5	25.2	1.483	(24.573; 25.827)
<b>FD</b>	5	29.1	0.742	(28.473; 29.727)
<b>C+</b>	5	21.2	0.447	(20.573; 21.827)
<b>C-</b>	5	7.00	0.000	(6.373; 7.627)

*Desv.Est. agrupada = 0.684001*

En la Tabla 12 se observó que la fracción D presentó un promedio de inhibición significativamente superior al del control positivo, seguida por las fracciones A, C y E, las cuales mostraron una actividad mayor que la del control, mientras que la fracción B presentó un efecto mínimo. Estos resultados corresponden a ensayos realizados frente a *S. aureus*



**Figura 10.** Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a *S. aureus*



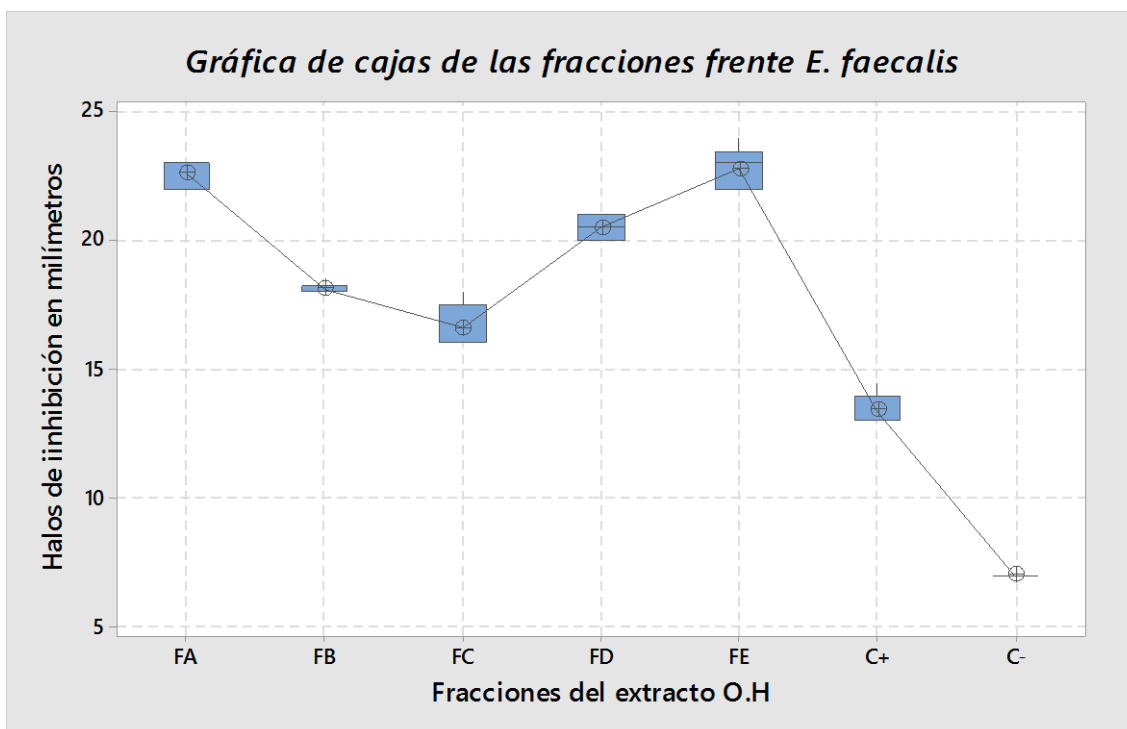
**Figura 11.** Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a *S. aureus*

**Tabla 13.** Datos agrupados según Tukey de las fracciones y controles evaluados frente a *E. faecalis*

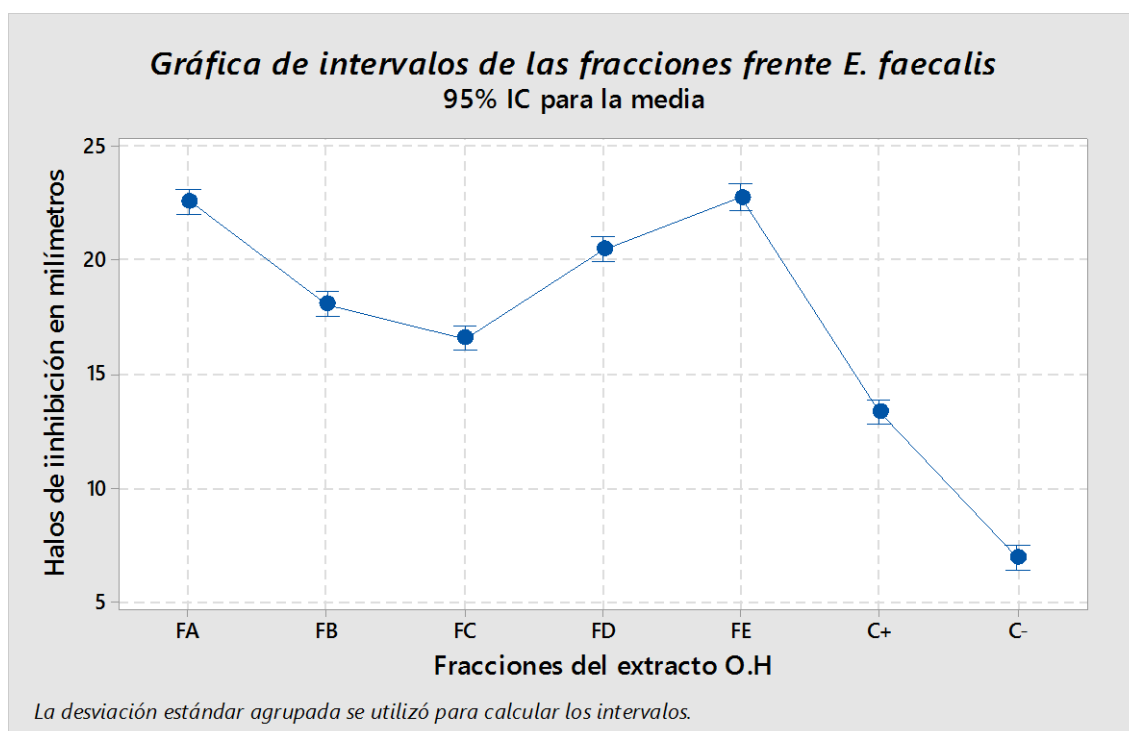
<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>FA</b>	5	22.6	0.548	(22.050; 23.150)
<b>FB</b>	5	18.1	0.224	(17.550; 18.650)
<b>FC</b>	5	16.6	0.894	(16.050; 17.150)
<b>FD</b>	5	20.5	0.500	(19.950; 21.050)
<b>FE</b>	5	22.8	0.837	(22.250; 23.350)
<b>C+</b>	5	13.4	0.652	(12.850; 13.950)
<b>C-</b>	5	7.00	0.000	(6.450; 7.550)

**Desv.Est. agrupada = 0.600595**

En la Tabla 13 se observó que todas las fracciones presentaron un promedio de inhibición superior al del control positivo, aunque las fracciones más representativas corresponden a las fracciones A y E. Estos resultados corresponden a los ensayos realizados frente a *E. faecalis*



**Figura 12.** Gráfica de cajas de las fracciones y controles frente a *E. faecalis*



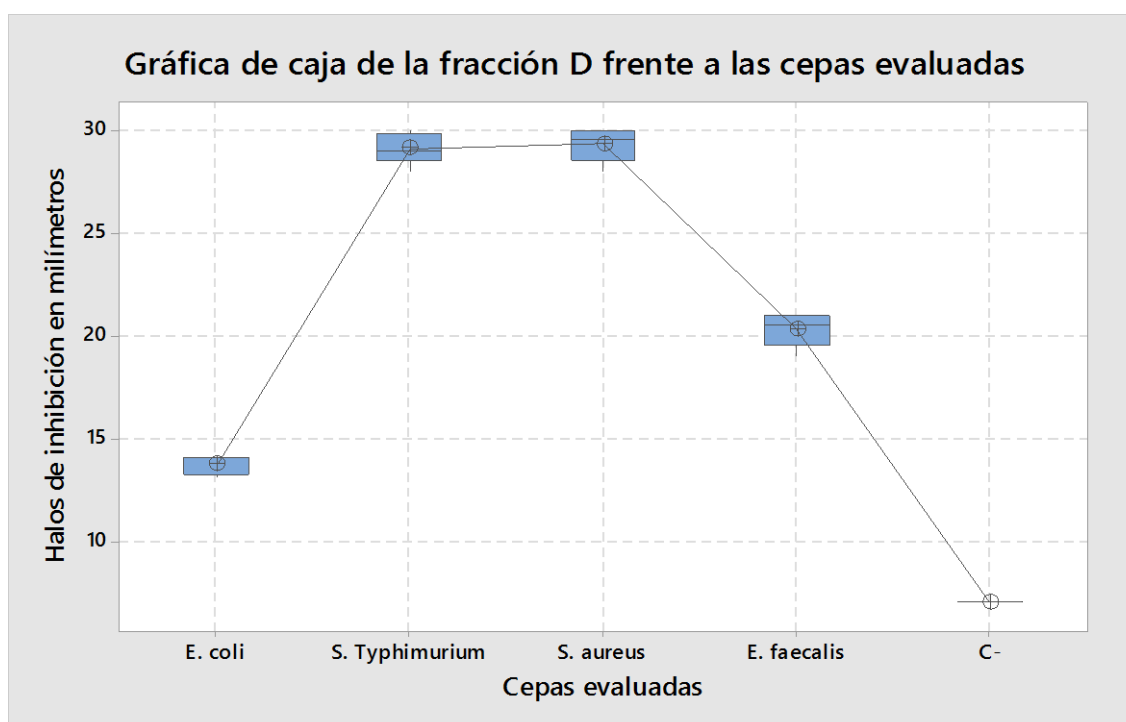
**Figura 13.** Gráfica de intervalos de las fracciones y controles frente a *E. faecalis*

**Tabla 14.** Efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas

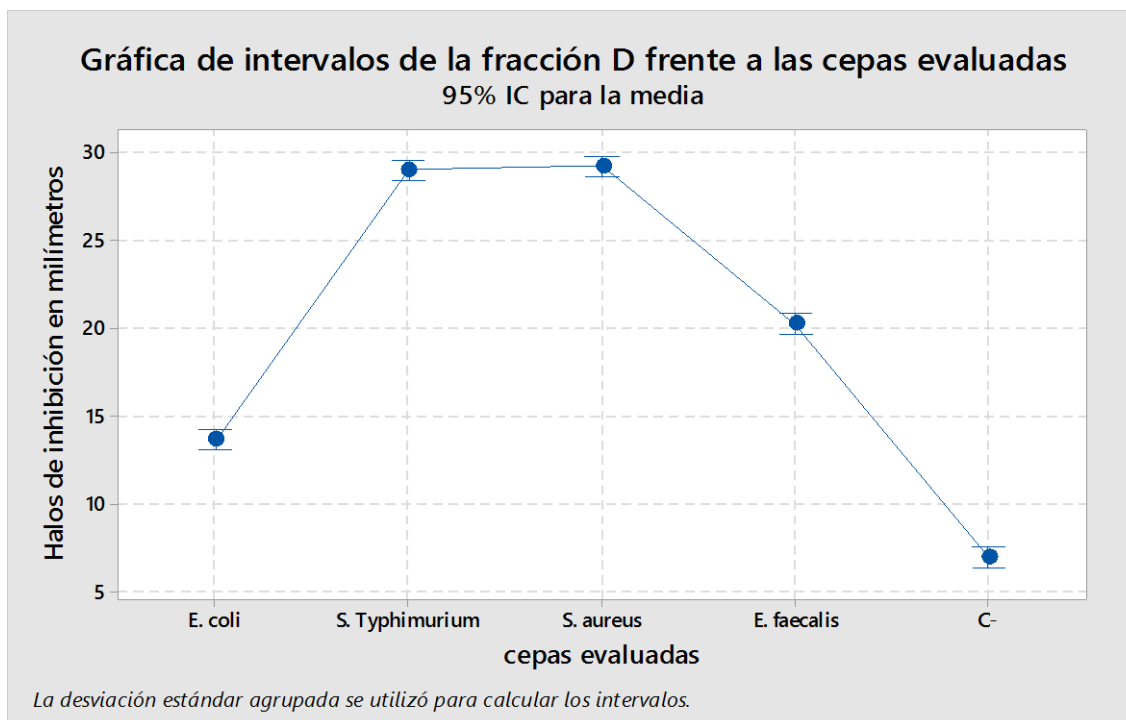
<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<i>E. coli</i>	5	13.7	0.447	(13.088; 14.312)
<i>S. Typhimurium</i>	5	29.1	0.742	(28.488; 29.712)
<i>S. aureus</i>	5	29.3	0.837	(28.688; 29.912)
<i>E. faecalis</i>	5	20.3	0.837	(19.688; 20.912)
<b>C-</b>	5	7.00	0.000	(6.388; 7.612)

*Desv.Est. agrupada = 0.655744*

En la Tabla 14 se observa el efecto antimicrobiano de la fracción D frente a todas las bacterias evaluadas, en el cual se aprecia un efecto significativo frente a *S. typhimurium* y *S.aureus*. mientras que el efecto frente a *E. coli* no fue muy marcado



**Figura 14.** Representación en gráfica de cajas del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas



**Figura 15.** Representación en gráfica de intervalos del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas

**Tabla 15.** Diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas.

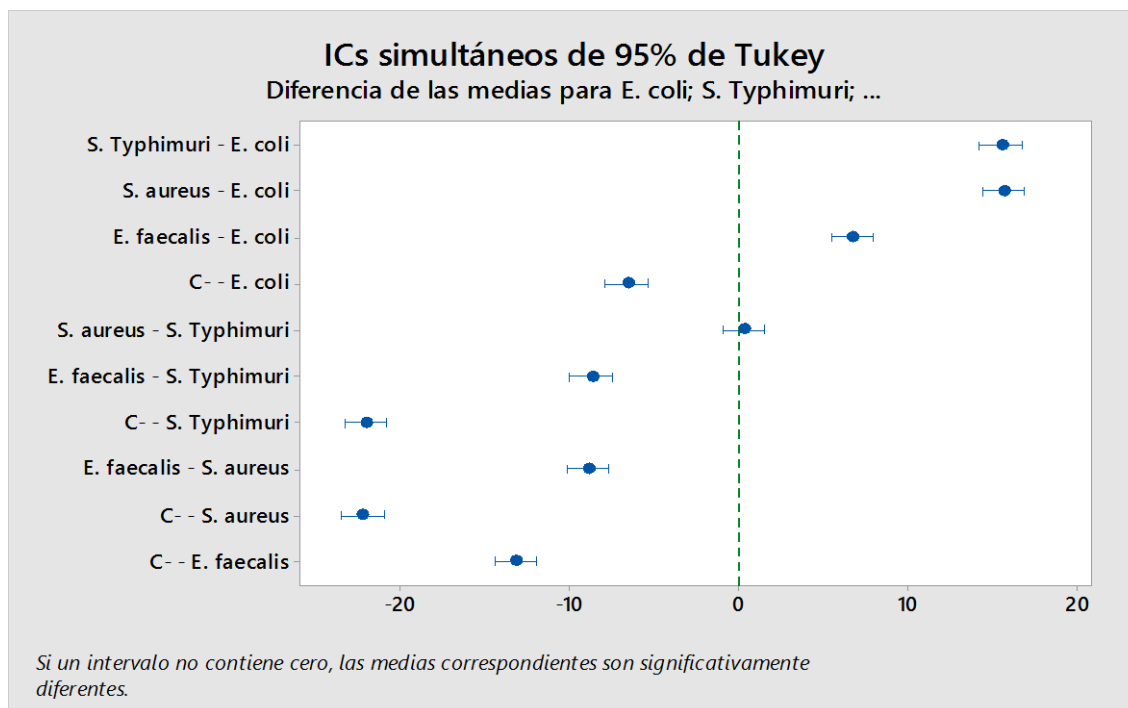
**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

Factor	N	Media	Agrupación
<i>S. aureus</i>	5	29.3	A
<i>S. Typhimurium</i>	5	29.1	A
<i>E. faecalis</i>	5	20.3	B
<i>E. coli</i>	5	13.7	C
C-	5	7.00	D

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 15 se puede observar una comparación entre todas las medias de la lectura de los halos de inhibición en mm de todos los tratamientos evaluados. Las medias con la letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) según el método de Tukey. Es por ello que, las lecturas en *S. aureus* y *S. typhimurium* son iguales, por otro lado, todas las demás medias son significativamente diferentes al control -, lo cual se observa con la diferenciación en las letras.



**Figura 16.** Representación gráfica de las diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción D frente a las bacterias evaluadas

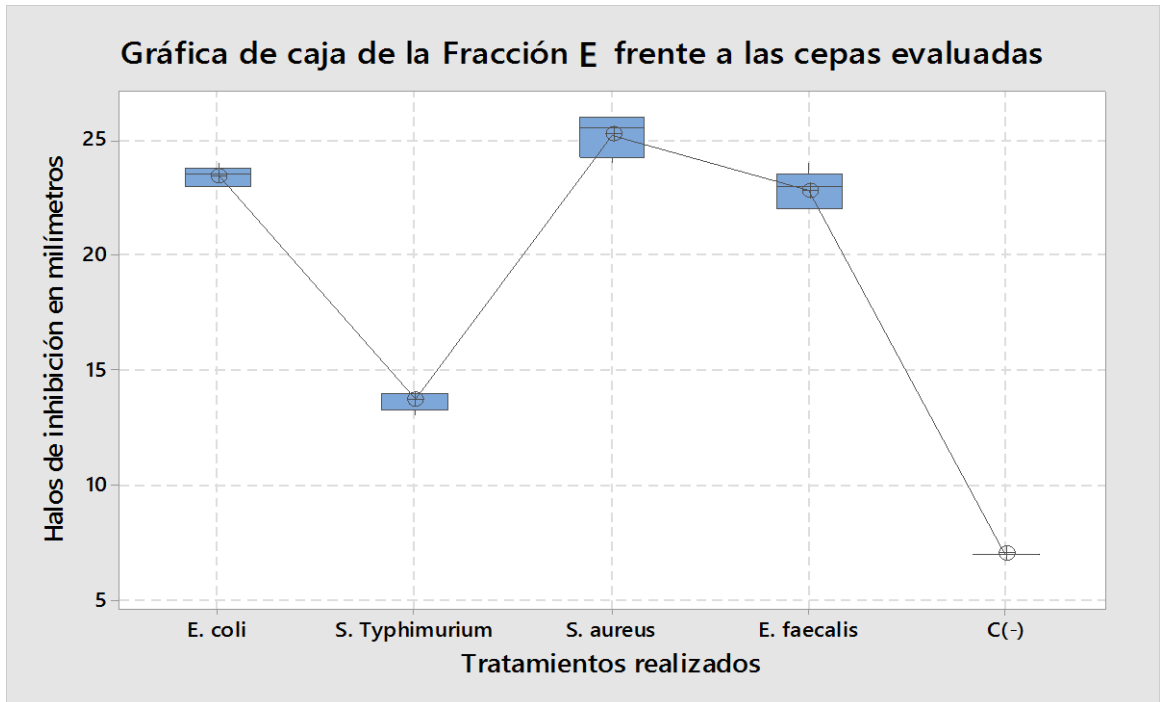
En la figura 16 se representa gráficamente la comparación establecida en la tabla 15 donde sí un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes, es así que se corrobora la agrupación de la tabla anterior, donde el tratamiento con la fracción D en *S. aureus* y *S. typhimurium*, son significativamente iguales, a diferencia de los demás tratamientos que se encuentran fuera del intervalo 0, representando así las diferencias entre resultados con el control negativo.

**Tabla 16.** Efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas

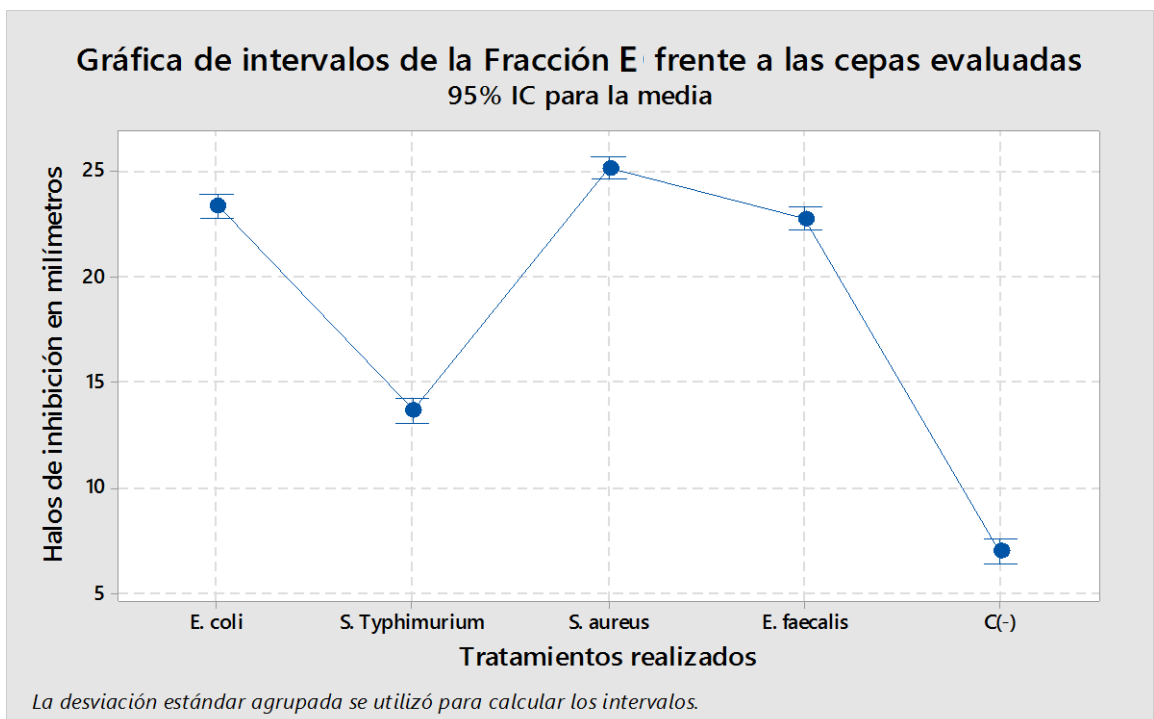
<b>Medias</b>				
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
<i>E. coli</i>	5	23.40	0.42	(22.825; 23.975)
<i>S. Typhimurium</i>	5	13.70	0.45	(13.125; 14.275)
<i>S. aureus</i>	5	25.20	0.91	(24.625; 25.775)
<i>E. faecalis</i>	5	22.80	0.84	(22.225; 23.375)
<b>C(-)</b>	5	7.00	0.00	(6.425; 7.575)
<b><i>Desv.Est. agrupada = 0.616441</i></b>				

En la tabla 16 se observa que la fracción E tuvo un buen efecto antibacteriano frente a *S. aureus* con halos de inhibición por encima de los 25 mm, lo cual fue un buen candidato para la evaluación

de la CMI. Asimismo, se puede apreciar que el control negativo no tuvo un efecto inhibitorio, lo cual es indicador que el solvente no influye en los halos de inhibición de las diferentes fracciones.



**Figura 17.** Representación en gráfica de cajas del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas



**Figura 18.** Representación en gráfica de intervalos del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas

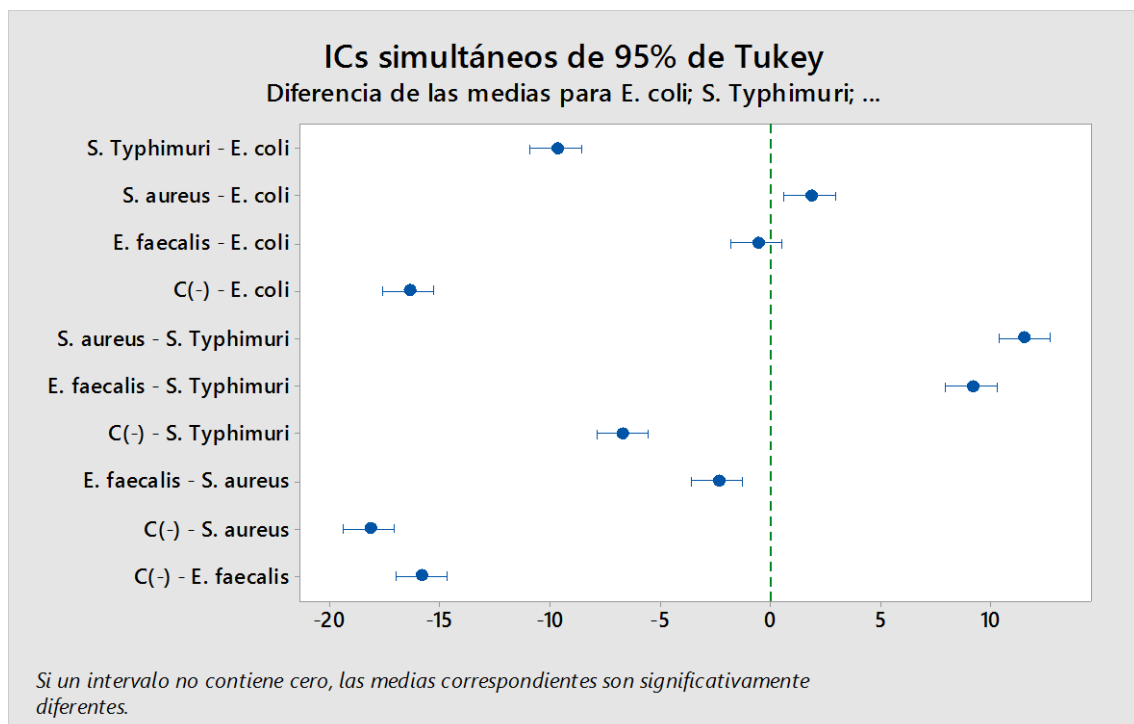
**Tabla 17.** Diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Factor	N	Media	Agrupación
<i>S. aureus</i>	5	25.2	A
<i>E. coli</i>	5	23.4	B
<i>E. faecalis</i>	5	22.8	B
<i>S. Typhimurium</i>	5	13.7	C
C(-)	5	7	D

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Legenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 17 se puede observar una comparación entre todas las medias de la lectura de los halos de inhibición en mm de todos los tratamientos evaluados. Las medias con la letra común (B) no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) según el método de Tukey. Es por ello que, las lecturas en *E. coli* y *E. faecalis* son iguales, por otro lado, todas las demás medias son significativamente diferentes al control -, lo cual se observa con la diferenciación en las letras.



**Figura 19.** Representación gráfica de las diferencias significativas en los promedios de los diámetros de inhibición del efecto antimicrobiano de la fracción E frente a las bacterias evaluadas.

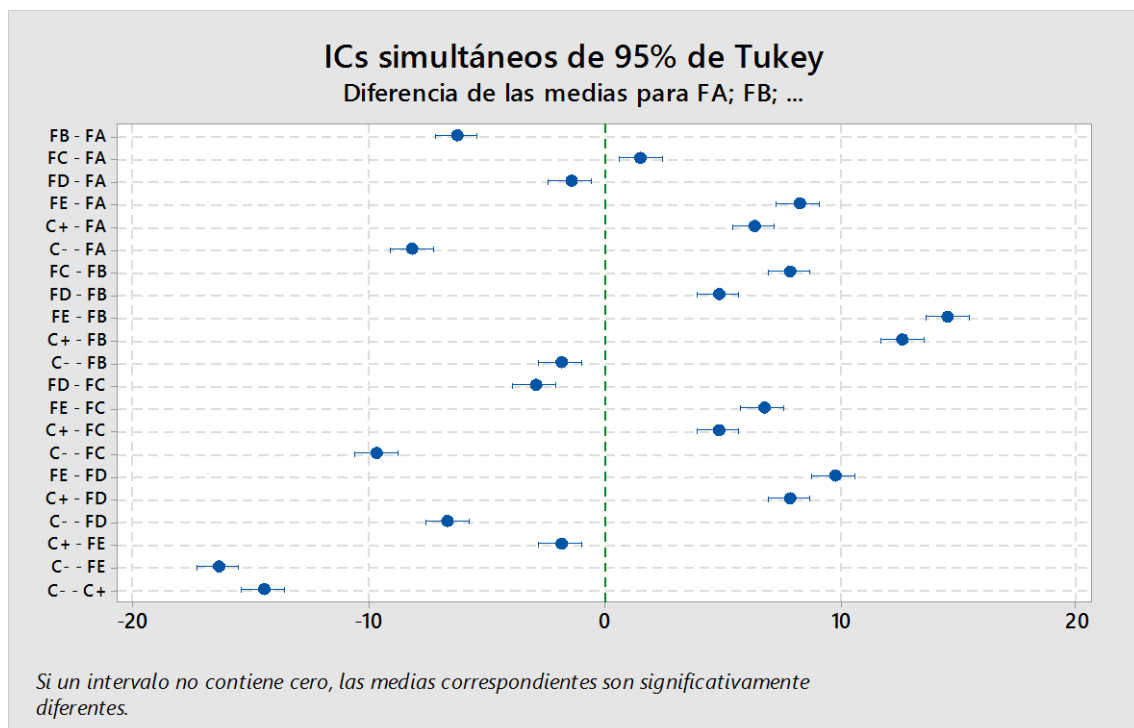
**Tabla 18.** Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *E. coli*

<b>Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%</b>			
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>FE</b>	5	23.4	A
<b>C+</b>	5	21.5	B
<b>FC</b>	5	16.7	C
<b>FA</b>	5	15.2	D
<b>FD</b>	5	13.7	E
<b>FB</b>	5	8.90	F
<b>C-</b>	5	7.00	G

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 18 se observa una clara diferencia entre todas las fracciones evaluadas frente a *E. coli*, siendo la fracción E la de mayor efecto antimicrobiano, incluso siendo un efecto mayor al del control +. Asimismo, en el presente cuadro se muestra en la parte inferior al control negativo el cual no guarda similitud a ninguno de los tratamientos, lo cual demuestra un efecto inhibitorio de cada fracción superior a dicho control.



**Figura 20.** Representación gráfica de las diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *E. coli*

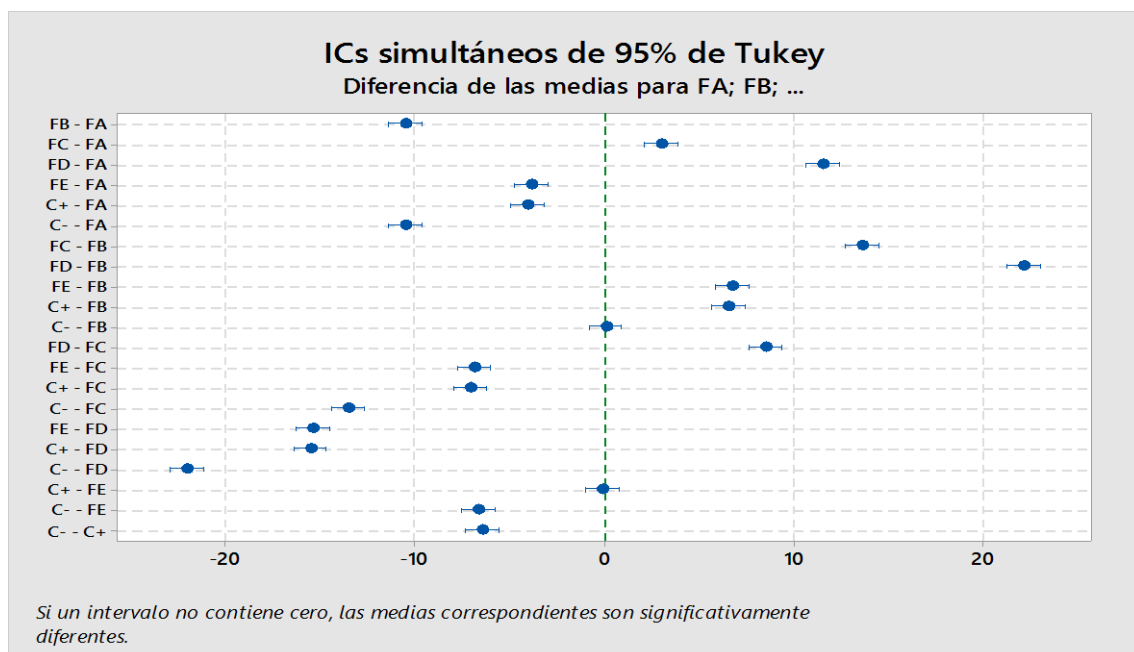
**Tabla 19.** Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *S. typhimurium*

<b>Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%</b>			
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>FD</b>	5	29.1	A
<b>FC</b>	5	20.6	B
<b>FA</b>	5	17.6	C
<b>FE</b>	5	13.7	D
<b>C+</b>	5	13.5	D
<b>C-</b>	5	7.00	E
<b>FB</b>	5	7.00	E

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 19 se observa una similitud entre la fracción E y el control + frente a *S. typhimurium*, lo cual indica una sensibilidad de la bacteria frente a esta fracción, por otro lado, se observa una similitud entre el control – y la fracción B, lo que representa en este caso una ausencia de efecto antimicrobiano por parte de la fracción. Asimismo, en el presente cuadro se muestra que todas las fracciones a excepción de la B muestran un efecto inhibitorio superior al control +.



**Figura 21.** Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *S. typhimurium*

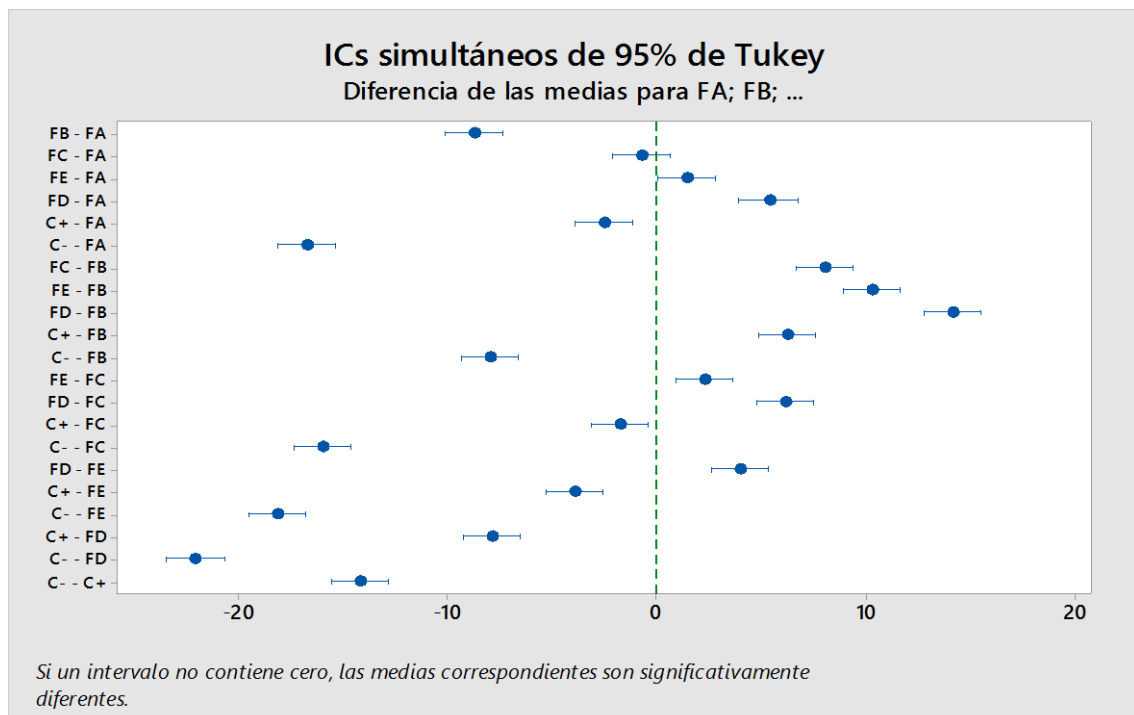
**Tabla 20.** Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *S. aureus*

<b>Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%</b>			
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>FD</b>	5	29.1	A
<b>FE</b>	5	25.2	B
<b>FA</b>	5	23.8	C
<b>FC</b>	5	23.0	C
<b>C+</b>	5	21.2	D
<b>FB</b>	5	15.0	E
<b>C-</b>	5	7.00	F

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 20 se agrupan las medias observadas de los diferentes tratamientos frente a *S. aureus*, en el cual se observa un efecto por encima de los 25 mm de la fracción D y E, así como también una similitud de efecto de la fracción C y A en comparación con los otros tratamientos en los cuales se observan diferencias significativas. En el presente cuadro se puede observar que la fracción B tiene un efecto menor al control +, pero mayor al control – en comparación con el efecto que se mostró frente a las bacterias gram negativas.



**Figura 22.** Representación gráfica de las diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *S. aureus*

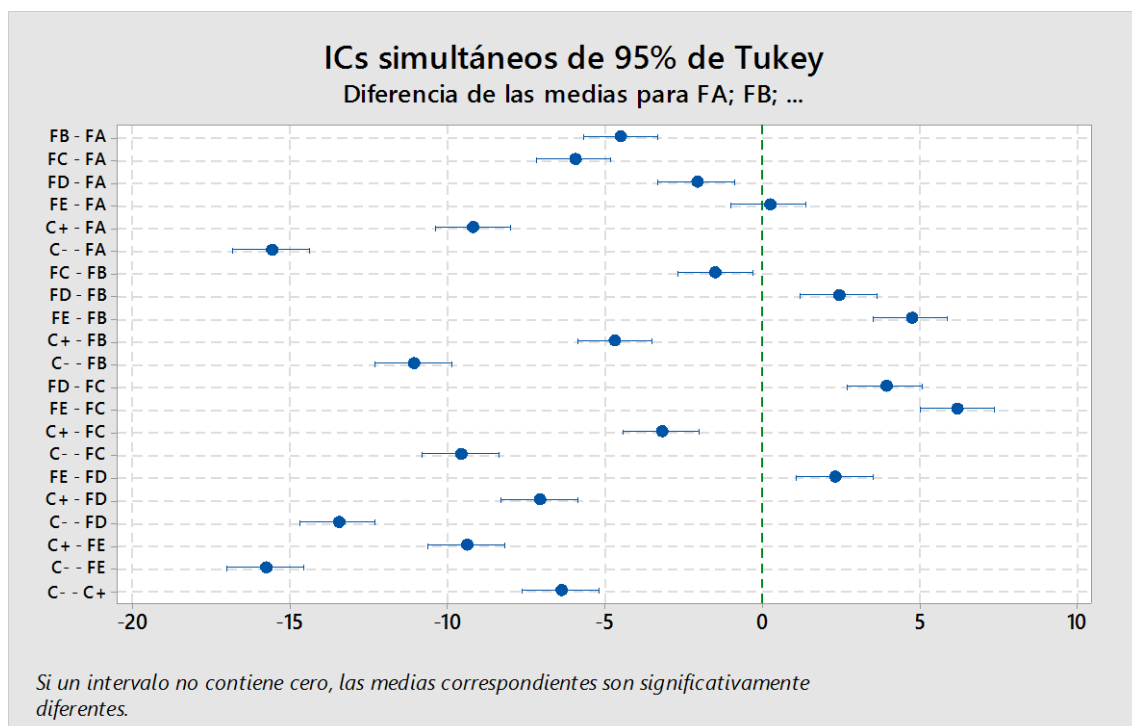
**Tabla 21.** Diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *E. faecalis*

<b>Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%</b>			
<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>FE</b>	5	22.8	A
<b>FA</b>	5	22.6	A
<b>FD</b>	5	20.5	B
<b>FB</b>	5	18.1	C
<b>FC</b>	5	16.6	D
<b>C+</b>	5	13.4	E
<b>C-</b>	5	7.00	F

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 21 se puede observar igualdades significativas entre la fracción A y E frente a *E. faecalis*. Así también, se puede observar que las demás fracciones presentan un efecto antimicrobiano mayor al control + y ninguno es similar al control -, lo cual indica que *E. faecalis* es sensible a las diferentes fracciones en comparación al control +.



**Figura 23.** Representación gráfica de las diferencias significativas de las fracciones y controles evaluados frente a *E. faecalis*

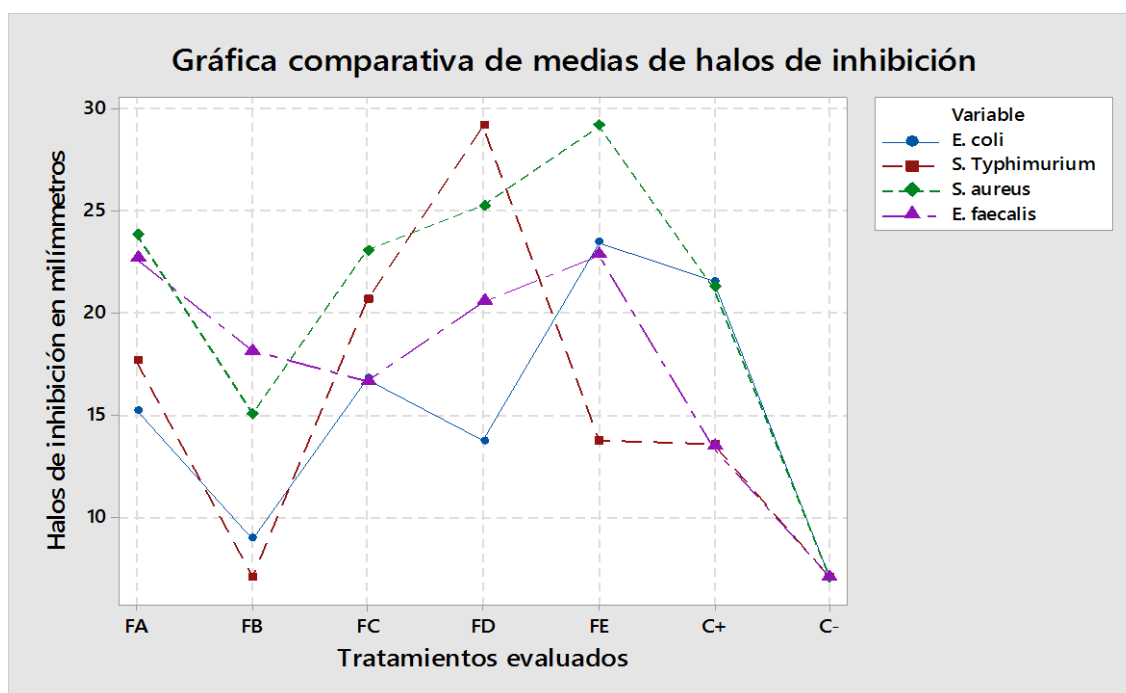
**Tabla 22.** Promedios de inhibición de las fracciones A, B, C, D y E frente a las bacterias evaluadas en comparación con el control positivo y control negativo

	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<b>FA</b>	15.2	17.6	23.8	22.6
<b>FB</b>	8.90	7.00	15.0	18.1
<b>FC</b>	16.7	20.6	23.0	16.6
<b>FD</b>	13.7	29.1	25.2	20.5
<b>FE</b>	23.4	13.7	29.1	22.8
<b>C+</b>	21.5	13.5	21.2	13.4
<b>C-</b>	7.00	7.00	7.00	7.00

**Leyenda:** Factor: Tratamientos, N: Número de repeticiones, Media: Promedio de las repeticiones, Agrupación: Letra de diferenciación.

En la tabla 22 se observa los promedios evaluados de los diferentes tratamientos con las diferentes bacterias. Entre todas las fracciones, la fracción E presentó los mayores halos de inhibición frente a *E. coli* (23.4 mm) y *S. aureus* (29.1 mm), superando incluso al control positivo. Por su parte, la fracción D mostró una actividad destacada frente a *S. typhimurium* y *S. aureus* (29.1 mm). La fracción C también evidenció buenos niveles de inhibición frente a *S. typhimurium* (20.6 mm) y *S. aureus* (23.0 mm), mientras que la fracción B fue la que presentó la menor actividad en comparación con las otras fracciones, pero esto no indica que la fracción no presenta un efecto antimicrobiano, sino que el efecto a la cantidad evaluada (20mg/40ul) presenta una menor actividad, asimismo se puede apreciar que el efecto de la fracción B frente a Gram negativas es aún menor que el efecto presentado con las gram positivas, en donde los valores se acercan al control positivo o incluso superan a este, como en el caso de *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente. En comparación con el control positivo (C+), las fracciones D y E demostraron ser incluso más efectivas frente a ciertas cepas, especialmente *S. aureus* y *S. typhimurium*. El control negativo (C-) no mostró actividad significativa, confirmando que los efectos observados son atribuibles a los compuestos presentes en las fracciones.

Con base en lo analizado en la Tabla 20 y en contraste con los valores referenciales establecidos por el INS en la Tabla 1, se puede considerar que *Escherichia coli* presenta una respuesta sensible frente a las fracciones A, B, C y E, mientras que frente a la fracción D se clasificaría como efecto intermedio. En el caso de *Salmonella typhimurium*, se clasificaría como sensible frente a las fracciones A, C y D, intermedio para la fracción E, y resistente frente a la fracción B. Por su parte, *Staphylococcus aureus* se consideraría sensible frente a todas las fracciones evaluadas. Finalmente, *Enterococcus faecalis* también se catalogaría como sensible frente a todas las fracciones.



**Figura 24.** Representación gráfica de los promedios de inhibición de las fracciones A, B, C, D y E frente a las bacterias evaluadas en comparación con el control positivo y control negativo

En la Figura 24 se representa gráficamente la información contenida en la Tabla 22, lo que permitió visualizar de forma comparativa el efecto antimicrobiano de cada una de las fracciones evaluadas. En el gráfico destacan los picos de inhibición más altos correspondientes a la fracción D frente a *S. typhimurium* y a las fracciones D y E frente a *S. aureus*. A partir de estos resultados, y considerando como criterio los halos de inhibición superiores a 25 mm, se seleccionaron estas fracciones para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En este contexto y con el objetivo de complementar los resultados obtenidos en el método de difusión en pozo, se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones D y E, los cuales fueron las fracciones más activas (Halos de inhibición mayor a 25 mm), mediante el ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI). Cabe destacar que, este método permite determinar la menor concentración a la cual el extracto es capaz de inhibir visiblemente el crecimiento bacteriano en un medio líquido. Las evaluaciones se realizaron frente a las cepas *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, utilizando caldo Mueller-Hinton e identificando visualmente la presencia o ausencia de turbidez como indicador de crecimiento bacteriano. Los resultados se detallan en los siguientes cuadros.

**Tabla 23.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a *S. aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>									
Porcentajes evaluados (%)									
F. D	1%	1,5%	2%	2,5%	3%	3,5%	4%	4,5%	5%
1°	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2°	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3°	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Leyenda:  Ausencia (A);  Presencia (P)

Los resultados mostrados en la Tabla 23 indican que la fracción D logró inhibir completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en todas las concentraciones evaluadas, desde el 1% hasta el 5%. En las tres repeticiones realizadas, se registró ausencia de turbidez, lo que confirma que no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las concentraciones.

Este hallazgo sugiere que la fracción D posee una alta potencia antimicrobiana frente a *S. aureus*, siendo eficaz incluso a concentraciones bajas. El hecho de que la inhibición ocurra desde el 1% indica que la CMI real es  $\leq 1\%$ , lo que posiciona a esta fracción como una de las más activas dentro del estudio. Este comportamiento ya había sido anticipado por los resultados obtenidos en el método de difusión en pozo, en el que la fracción D también mostró los halos de inhibición más amplios frente a esta bacteria. Por tanto, ambos métodos coinciden en señalar que la fracción D contiene metabolitos con buen efecto antimicrobiano frente *Staphylococcus aureus*.

**Tabla 24.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a *S. typhimurium*

<i>Salmonella Typhimurium</i>									
Porcentajes evaluados (%)									
F. D	1%	1,5%	2%	2,5%	3%	3,5%	4%	4,5%	5%
1°	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2°	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3°	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Leyenda:  Ausencia (A);  Presencia (P)

En la Tabla 24 se observa que la fracción D también inhibió completamente el crecimiento de *Salmonella typhimurium* (Figura 49) en todas las concentraciones evaluadas, tal como la evaluación frente a *S. aureus*. En las tres repeticiones realizadas, se registró ausencia de

crecimiento bacteriano, lo que demuestra una inhibición total. Estos resultados reflejan que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a *S. typhimurium* es igual o inferior al 1%, lo cual indica una fuerte actividad antimicrobiana también frente a bacterias Gram negativas.

**Tabla 25.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción E frente a *S. aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>									
Porcentajes evaluados (%)									
F. E	1%	1,5%	2%	2,5%	3%	3.5%	4%	4,5%	5%
1°	P	P	A	A	A	A	A	A	A
2°	P	P	A	A	A	A	A	A	A
3°	P	P	A	A	A	A	A	A	A

Leyenda:   Ausencia (A);   Presencia (P)

A diferencia de la fracción D, los resultados obtenidos para la fracción E frente a *Staphylococcus aureus* muestran una inhibición parcial a bajas concentraciones. En las tres repeticiones del ensayo, se evidenció presencia de turbidez en las concentraciones de 1% y 1.5%, lo que indica que en ese rango la fracción no logró inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, a partir del 2% hasta el 5%, todas las muestras mostraron ausencia de crecimiento, lo que marca una inhibición clara y constante. Este comportamiento sugiere que la CMI de la fracción E frente a *S. aureus* se encuentra en un punto intermedio, es decir, entre el 1.5% y el 2%. Aunque efectiva, su potencia es menor en comparación con la fracción D, que logró inhibición total desde el 1%.

Pese a ello, el hecho de que la fracción E logre inhibir completamente el crecimiento bacteriano a partir del 2% sigue siendo un resultado relevante, que respalda su potencial antimicrobiano, especialmente si se considera que fue efectivo de forma consistente a partir de una baja concentración.

#### IV. DISCUSIÓN

En la actualidad, la búsqueda de recursos naturales que puedan ofrecer alternativas para la prevención, el tratamiento e incluso la posible cura de diversas enfermedades, tanto en el ámbito de la salud como en el cuidado del medio ambiente, se ha convertido en una tarea científica exigente. Esta labor es llevada a cabo por numerosos grupos de investigación alrededor del mundo, quienes contribuyen al progreso científico mediante el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. En ese sentido, *Orthopterygium huaucui*, una especie endémica del Perú, representa un recurso vegetal poco explorado, cuyas hojas podrían albergar compuestos de interés farmacológico, como lo evidencian los resultados obtenidos en la presente investigación.

La caracterización fitoquímica cualitativa del extracto etanólico de las hojas de *Orthopterygium huaucui*, obtenida mediante extracción asistida por ultrasonido, reveló la presencia de diversos metabolitos secundarios, los cuales se indicaron en la tabla 2. Estos hallazgos se alinean en gran medida con lo reportado por diversos estudios previos tanto a nivel nacional como internacional.

En ese sentido, Hernández et al. (13) reportaron en el perfil fitoquímico la presencia de flavonoides, chalconas, terpenoides, procianidinas, taninos y entre otros, hallazgos que coinciden con los identificados en el presente estudio respecto a la presencia de flavonoides, terpenoides y taninos. Esta concordancia refuerza la idea de que las hojas constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos, con potencial aplicación en el desarrollo de productos con propiedades terapéuticas.

De manera similar, Molina et al. (14) identificaron en hojas de *O. huaucui* metabolitos como flavonoides, taninos, triterpenos y catequinas, utilizando una metodología basada también en una marcha fitoquímica. Estos resultados respaldan los obtenidos en nuestro estudio y evidencian la consistencia en la composición química de esta especie vegetal, especialmente cuando se emplean solventes polares como el etanol para la extracción.

Por otro lado, estudios cuantitativos como los realizados por Amaro (10) y Gonzales et al. (12) (11) no solo confirmaron la presencia de triterpenos y esteroides en *Orthopterygium huaucui*, sino que incluso aislaron y caracterizaron estructuralmente varios compuestos nuevos pertenecientes a estos grupos. Nuestros resultados cualitativos coinciden con estas investigaciones, dado que también se identificaron triterpenos y/o esteroides, lo cual refuerza la relevancia de estos metabolitos dentro del perfil químico característico de la especie.

En conjunto, los metabolitos detectados en esta investigación confirman el potencial bioactivo de las hojas de *Orthopterygium huaucui*, y validan su relevancia etnofarmacológica. A futuro,

sería de interés profundizar en estudios cuantitativos y en el aislamiento individual de los compuestos detectados para una mejor comprensión de sus propiedades farmacológicas.

Respecto a la actividad antimicrobiana, es importante señalar que hasta la fecha no se han reportado estudios previos relacionados con esta actividad en el género *Orthopterygium*, considerando que *Orthopterygium huaucui* es el único representante conocido de su género y especie. En este contexto, se ha procedido a establecer una posible relación del efecto antimicrobiano observado con otros representantes de la familia Anacardiaceae, a la cual pertenece. En tal sentido, en la investigación realizada por Baptista et al. (69) indican que en diferentes representantes de la familia Anacardiaceae muestran una actividad antimicrobiana. Un ejemplo comparable es el extracto hidroalcohólico de la corteza de *Anacardium occidentale* (Anacardo), cuyo efecto frente a *S. aureus* ha sido atribuido a la presencia de taninos, incluso en bajas concentraciones. De manera análoga, el tamizaje fitoquímico realizado en el presente estudio reveló la presencia de taninos, triterpenos y grupos fenólicos libres en *O. huaucui* en la fracción A, lo cual permite inferir que estos compuestos podrían estar relacionados con la actividad antimicrobiana observada (Tabla 3). Además, la actividad registrada frente a *Escherichia coli*, de *orthopterygium huaucui*, también se encuentra alineado con investigaciones previas en las que extractos de cajú (también miembro de Anacardiaceae) mostraron eficacia frente a bacterias Gram negativas. Estas propiedades han sido asociadas a la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides. Si bien en *O. huaucui* no se detectaron alcaloides, la acción de taninos y triterpenos podría ser clave en la actividad antimicrobiana.

La fracción D destacó por presentar los diámetros de inhibición más altos frente a *S. typhimurium* (29.1 mm) y *S. aureus* (29.3 mm), superando incluso al control positivo (gentamicina). Este perfil relevante se presentó también para la fracción E, especialmente frente a *E. coli* (23.4 mm) y *S. aureus* (25.2 mm), superando al control positivo en ambos casos. Esta fracción comparte con la D la presencia de flavonoides y leucoantocianidinas/catequinas, lo cual posiblemente podría explicar su efectividad, aunque la fracción E mostró menor actividad frente a *S. typhimurium* (13.7 mm).

Respecto a la fracción B evaluada frente a las diferentes bacterias, se observa que presentó un efecto de inhibición menor o incluso nulo frente a la mayoría de los microorganismos. En el caso específico de *Salmonella typhimurium*, no se registraron halos de inhibición, ya que durante el ensayo no se evidenció una adecuada difusión del extracto a través del medio sólido (agar). Este fenómeno podría atribuirse a las propiedades físicoquímicas de la fracción B. Según Bubonja et al. (70), en los métodos de difusión en agar, la efectividad del compuesto evaluado puede verse condicionada por factores como su solubilidad, peso molecular y capacidad de difusión. En particular, los compuestos de naturaleza menos polar o con mayor masa molecular

tienden a difundirse con mayor dificultad en el agar, lo que puede dar lugar a resultados poco representativos de su verdadera actividad antimicrobiana.

En este contexto, la limitada o nula actividad observada en la fracción B podría explicarse por la predominancia de triterpenos, compuestos conocidos por su baja polaridad, lo cual dificultaría su correcta difusión en el medio y, en consecuencia, su capacidad de ejercer un efecto inhibitorio visible.

En este orden de ideas, se podría relacionar la sinergia de los metabolitos secundarios presentes en cada fracción de *orthopterygium huaucui* con la actividad antimicrobiana, ya que según Laiju et al. (71) Los taninos permiten secuestrar el hierro, inhibir la síntesis de la pared celular e interrumpir la continuidad de las membranas celulares. Además, pueden inhibir vías biosintéticas y evitar la formación de biopelícula en bacterias gramnegativas y grampositivas. Asimismo, indican que los flavonoides interactúan con la membrana bacteriana, donde interrumpen las bicapas de fosfolípidos e inhiben la cadena respiratoria y la síntesis de ATP. Además, se ha reportado que los flavonoides derivados de las hojas de nuez son efectivos contra *E. faecalis*, y *S. aureus* resistente a la meticilina.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) evidencian diferencias importantes en la capacidad antimicrobiana de las fracciones D y E frente a las bacterias evaluadas.

La fracción D demostró una alta eficacia frente a *S. aureus*, ya que inhibió completamente el crecimiento bacteriano desde la concentración más baja evaluada (1%) hasta la más alta (5%) en todas las repeticiones. Este resultado confirma lo observado previamente en los ensayos por difusión en pozo, donde la fracción D también mostró una actividad destacada frente a esta bacteria. La inhibición completa en todo el rango de concentraciones sugiere una alta potencia antimicrobiana, lo que posiciona a esta fracción como una de las más prometedoras dentro del estudio. Por otro lado, la fracción E frente a *S. aureus* presentó inhibición parcial, ya que se observó crecimiento bacteriano en las concentraciones de 1% y 1.5%, mientras que a partir del 2% en adelante, el crecimiento fue inhibido de forma consistente. En ese sentido, los datos obtenidos en el CMI refuerzan los resultados presentados en el método por difusión en pozo, en el cual se pudo observar que la fracción D tuvo un mayor efecto inhibitorio frente a *S. aureus* con un halo de inhibición en promedio de hasta 29.3 mm en comparación a la fracción E el cual tuvo un halo de inhibición promedio de 25.2 mm.

## V. CONCLUSIONES

En base al presente trabajo de investigación, se puede concluir con lo siguiente:

1. Los metabolitos secundarios identificados en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL en la mayoría de fracciones corresponden a: Triterpenos y/o esteroides, taninos gálicos, flavonoides, grupos fenólicos libres, aminoácidos y leucoantocianidinas y/o catequinas.
2. De acuerdo a la evaluación antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico total de hojas *orthopterygium huaucui* frente a *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* y *S. aureus* a una concentración de 20mg/40ul por pozo se obtuvieron halos de inhibición en promedios de 17.6 mm para *E. coli*, 17.6 mm para *S. typhimurium*, 23.8 mm para *S. aureus* y 22.6 mm para *E. faecalis*.
3. Según el método de difusión en pozo, las fracciones con mayor actividad antimicrobiana frente a las bacterias evaluadas, corresponden a la Fracción D y Fracción E debido a los promedios de sus halos de inhibición en el cual la fracción D inhibió 29.1 mm para *S. typhimurium* y 25.2 mm para *S. aureus* y en el caso de la fracción E inhibió 29.1 mm frente a *S. aureus*.
4. De acuerdo a la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones D y E, se determinó que la fracción D no presentó crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *S. typhimurium* en ninguna escala porcentual evaluada y la fracción E contra *S. aureus* resultó con crecimiento en el rango de 1.5% hasta 2%

## VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las evaluaciones antimicrobianas, realizando extractos con diferentes solventes, evaluar frente a otras bacterias de gran interés público y a diferentes concentraciones.
2. Realizar la identificación y el aislamiento del metabolito secundario presente en el extracto etanólico de hojas de *Orthopterygium huaucui* responsable de la actividad antimicrobiana reportado en el presente trabajo.
3. Evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la fracción D a concentraciones menores al 1%. Asimismo, evaluar el CMI de las fracciones A, B y C.
4. Se recomienda evaluar el extracto etanólico de hojas de *orthopterygium huaucui* en ensayos *in vivo* con el fin de determinar las posibles interferencias de agentes físicos y químicos que puedan alterar la actividad antimicrobiana reportada en el presente estudio.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Diversidad de especies [Internet]. [citado el 18 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.midagri.gob.pe/portal/marco-legal/47-sector-agrario/recurso-biodiversidad/345-diversidad-de-especies>
2. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2022 [citado el 18 de marzo de 2025]. p. 1–2 Estudio incrementa la flora de Ica con 83 registros nuevos de plantas. Disponible en: <https://museohn.unmsm.edu.pe/docs/descubrimientos/Nota%20de%20Prensa%202022-09-Botanica%20rev%20ACE.pdf>
3. EsSalud. Vida y Salud Integral [Internet]. 2019 [citado el 18 de marzo de 2025]. Disponible en: [https://www.essalud.gob.pe/downloads/BOLETIN\\_MC\\_2019\\_MAY\\_A\\_JUN.pdf](https://www.essalud.gob.pe/downloads/BOLETIN_MC_2019_MAY_A_JUN.pdf)
4. Ávalos A, Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal [Internet]. 2009 [citado el 19 de marzo de 2025];2(3):119–45. Disponible en: <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/26b94db5-92de-4aaf-8822-8f063c180904/content>
5. Organización Mundial de Salud. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 [Internet]. 2024 [citado el 19 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>
6. Organización Panamericana de la Salud. La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2021 [citado el 19 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
7. Instituto de Métricas y Evaluación de la Salud. La resistencia antimicrobiana (RAM) representa una amenaza en los 35 países de las Américas [Internet]. 2023 [citado el 19 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.healthdata.org/sites/default/files/2023-08/Spanish%20AMR%20PAHO%20news%20release.pdf>
8. Ministerio de Salud. Estado Peruano. 2021 [citado el 5 de abril de 2025]. Impacto post pandemia: la resistencia a los antimicrobianos se perfila al 2050 como la primera causa de muerte - Noticias - Ministerio de Salud - Plataforma del Estado Peruano. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/558045-impacto-post-pandemia-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-se-perfila-al-2050-como-la-primera-causa-de-muerte>

9. Ministerio de Salud. Plan multisectorial para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2019-2021 [Internet]. Lima: República del Perú; 2019. Disponible en: [https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/315424/Decreto\\_Supremo\\_010-2019-SA.PDF?v=1558565650](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/315424/Decreto_Supremo_010-2019-SA.PDF?v=1558565650)
10. Amaro J. Metabolitos secundarios de dos especies de la flora medicinal peruana; *Orthopterygium huancuy* y *Maytenus octogona* [Internet]. Instituto Universitario de Química Orgánica; 1984 [citado el 19 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/25994/TD201.pdf?sequence=1>
11. González A, Amaro J, Fraga B, Luis J, Fayos J, Perales A, et al. Minor triterpenes from *Orthopterygium huancuy*. *Phytochemistry* [Internet]. el 21 de agosto de 1984 [citado el 19 de marzo de 2025];23(9):2079–80. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200849821>
12. González A, Amaro J, Fraga B, Luis J. 3-oxo-6 $\beta$ -hydroxyolean-18-en-28-oic acid from *orthopterygium huancuy*. *Phytochemistry* [Internet]. el 1 de enero de 1983 [citado el 19 de marzo de 2025];22(8):1828–30. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200802848>
13. Hernández M, Castañeta G, Simirgiotis M, Sepulveda B, Areche C. Comprehensive Phytochemical Profile of Leaves, Stems and Fruits from *Orthopterygium huacui* (A. Gray) Hemsl. and their Antioxidant Activities. *Chem Biodivers*. el 25 de septiembre de 2024;1–11.
14. Molina A, Chávez S, Ferreyra C, Revatta L, Ramos R. Evaluation of the antioxidant activity of ethanolic extract of *Orthopterygium huacui* (A. gray). Hemsl. En: II Simposio Internacional em Investigações Químico-Farmacéuticas [Internet]. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí; 2019 [citado el 19 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://simposioiiqf.com.br/2019/anais/FMG-11.pdf>
15. Whaley O, Orellana A, Pérez E, Tenorio M, Quinteros F, Mendoza M, et al. Plantas y vegetación de Ica, Perú [Internet]. 1a ed. Lima; 2010 [citado el 23 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/read/14786136/plantas-y-vegetacion-de-ica-peru-pdf-royal-botanic-gardens-kew>
16. Palacios S, Barrantes D, Móstiga M, León B. Germinación ex situ del endemismo peruano *Orthopterygium huacui* (Anacardiaceae). *Revista Forestal del Perú* [Internet]. 2023 [citado el 19 de marzo de 2025];38(2):332–40. Disponible en: <https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/rfp/article/view/2161/2921>

17. Jiménez V. Diversidad genética y relaciones filogenéticas de *Orthopterygium* Huaucui (A. Gray) Hemsley, una Anacardiaceae endémica de la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014 [citado el 19 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/backend/api/core/bitstreams/fef52ab0-f277-4492-86bd-6cdce87c8aef/content>
18. Jimenez V, León B, Ramírez R, Cuevas X. Análisis morfológico comparativo de las estructuras reproductivas masculinas de los géneros *Orthopterygium* y *Amphipterygium* (Anacardiaceae). *Rev Peru Biol* [Internet]. el 1 de julio de 2017 [citado el 19 de marzo de 2025];24(2):199–204. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/318643324\\_Analisis\\_morfologico\\_comparativo\\_de\\_las\\_estructuras\\_reproductivas\\_masculinas\\_de\\_los\\_generos\\_Orthopterygium\\_y\\_Amphipterygium\\_Anacardiaceae](https://www.researchgate.net/publication/318643324_Analisis_morfologico_comparativo_de_las_estructuras_reproductivas_masculinas_de_los_generos_Orthopterygium_y_Amphipterygium_Anacardiaceae)
19. León B, Monsalve C. Anacardiaceae endémicas del Perú. 2a ed. Romero L, editor. Vol. 13. Lima: Revista Peruana de Biología; 2006.
20. Montenegro A, Vega N, Linares R. Plant diversity and structure in desert communities of the Andean piedmont in Ica, Peru. *Vegetation Classification and Survey* [Internet]. el 7 de marzo de 2022 [citado el 19 de marzo de 2025];3:53–66. Disponible en: <https://vcs.pensoft.net/article/68006/>
21. Hemsley B. The Royal Society. 1907 [citado el 20 de marzo de 2025]. On the Julianiaceae : a new natural order of plants / by W. Botting Hemsley. Disponible en: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=hvd.32044107232399&seq=24&view=1up>
22. Panorama Actual del Medicamento. Farmacología de los antibacterianos. 2017 [citado el 20 de marzo de 2025];41(400):145–7. Disponible en: <http://www.portalfarma.com/inicio/formacioncontinuada>
23. Consejo General de Colegios Farmacéuticos. Panorama Actual del Medicamento. 2017 [citado el 21 de marzo de 2025]. Farmacología de los antibacterianos. Disponible en: [https://www.farmaceuticos.com/pam\\_revista/400/](https://www.farmaceuticos.com/pam_revista/400/)
24. Clínica Universidad de Gamarra. Universidad de Gamarra. [citado el 20 de marzo de 2025]. Gentamicina. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/medicamentos/gentamicina>
25. Centro de Información de Medicamentos Autorizados de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha Técnica [Internet]. 2024 [citado el 20 de

- marzo de 2025]. Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/63854/fichatecnica\\_63854.html.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/63854/fichatecnica_63854.html.pdf)
26. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Asociación Española de Pediatría. 2020 [citado el 21 de marzo de 2025]. Gentamicina . Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/gentamicina>
  27. Clínica Universidad de Navarra. Universidad de Navarra. 2023 [citado el 21 de marzo de 2025]. Gram-negativo. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/gram-negativo>
  28. Organización Mundial de la Salud. E. coli [Internet]. [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
  29. Molina N, Oderiz S, López M, Basualdo J, Sparo M. Caracterización molecular de *Escherichia coli* diarreogénica proveniente de población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en dos hospitales de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2024 [citado el 21 de marzo de 2025];56:8–15. Disponible en: [https://panel.aam.org.ar/img\\_up/20032024.2.pdf](https://panel.aam.org.ar/img_up/20032024.2.pdf)
  30. Cabal A. Distribución, cuantificación y caracterización de genes de virulencia de *Escherichia coli* en reservorio de animales, humanos y medioambientales. Universidad de Castilla-La Mancha; 2016.
  31. Molina N, Oderiz S, López M, Basualdo J, Sparo M. Caracterización molecular de *Escherichia coli* diarreogénica proveniente de población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en dos hospitales de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. el 1 de enero de 2024 [citado el 24 de marzo de 2025];56(1):8–15. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754123000536>
  32. Mayo Clinic [Internet]. 2022 [citado el 26 de marzo de 2025]. Infección por salmonela. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/salmonella/symptoms-causes/syc-20355329>
  33. Díaz M, Díaz P, Rodríguez E, Montañó L, Medina M, González G, et al. Caracterización fenotípica y genotípica de *Salmonella Typhimurium* variante 5- asociada a un brote de enfermedad transmitida por alimentos en el municipio de Paz de Río, Boyacá, 2010. *Revistas Científicas de América Latina* [Internet]. enero de 2014 [citado el 26 de marzo de 2025];27(1):23–30. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1805/180529791003.pdf>

34. Cuenca P, Montaña L, Villarreal J, Wiesner M. Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de *Salmonella Typhimurium* variante monofásica (1,4,[5],12:i:-) recuperados en Colombia. *Biomédica* [Internet]. el 11 de diciembre de 2020 [citado el 26 de marzo de 2025];40(4):722–33. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572020000400722&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572020000400722&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
35. Gonzalez J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Revista Salud Uninorte* [Internet]. junio de 2014 [citado el 26 de marzo de 2025];30(1):73–94. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-55522014000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
36. Barreto M, Castillo M, Retamal P. *Salmonella enterica*: una revisión de la trílogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología* [Internet]. el 1 de octubre de 2016 [citado el 26 de marzo de 2025];33(5):547–57. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182016000500010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000500010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
37. Clínica Universidad de Navarra. Universidad de Navarra. 2023 [citado el 26 de marzo de 2025]. Gram-positivo. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/gram-positivo>
38. Viera C, Taddei A, Amedei A. The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. el 26 de junio de 2018 [citado el 26 de marzo de 2025];11. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1756284818783606>
39. Vergara J. Determinación de la presencia de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* Y *Enterococcus faecium* como microorganismos trazadores de resistencia a agentes antimicrobianos en plantas de beneficio [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2022 [citado el 26 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://apidspace.javeriana.edu.co/server/api/core/bitstreams/fc6938e2-7594-4b2d-bb43-ea5ca36c9a14/content>
40. Mi Ah K, Vinicius R, Kyung S. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. *Sci Rep* [Internet]. el 14 de diciembre de 2020 [citado el 26 de marzo de 2025];10(1):1–8. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78998-5>

41. Garza R, Hernández K, Mejía A. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. Universidad Nacional Autónoma de México [Internet]. marzo de 2002 [citado el 27 de marzo de 2025];14(1). Disponible en: [https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/1397/mod\\_resource/content/1/8Enterococcus.pdf](https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/1397/mod_resource/content/1/8Enterococcus.pdf)
42. Zendejas G, Avalos H, Soto Y. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica* [Internet]. septiembre de 2014 [citado el 27 de marzo de 2025];25(3):129–43. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
43. Cervantes E, García R, Salazar PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. el 24 de febrero de 2014 [citado el 27 de marzo de 2025];61(1):28–40. Disponible en: [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
44. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos [Internet]. 2020 [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
45. Natalia T, Molina N. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana [Internet]. 2022 [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: [https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
46. Dueñas D. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3 [Internet]. [Bogotá]: Pontificia Universidad Javeriana; 2019 [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/43199/Diana%20Due%c3%b1as%20-%20Annona%20muricata.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
47. Azwanida N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants (Los Angel)* [Internet]. 2015 [citado el 1 de abril de 2025];4(3):1–6. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-29456.html>
48. Roopashree K, Ghananjay N. Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *J Pharmacogn Phytochem* [Internet]. el 6 de abril de 2019 [citado el 1

- de abril de 2025];8(3):1829–42. Disponible en: <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartX/8-1-577-767.pdf>
49. Shen L, Pang S, Zhong M, Sun Y, Qayum A, Liu Y, et al. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrason Sonochem* [Internet]. el 1 de diciembre de 2023 [citado el 5 de abril de 2025];101. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417723003589#:~:text=Ultrasonic%20technique%20is%20a%20proven,consumption%20and%20produce%20higher%20yields.>
50. Picó Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Internet]. el 1 de febrero de 2013 [citado el 21 de marzo de 2025]; 43:84–99. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016599361200369X>
51. Awad T, Moharram H, Shaltout O, Asker D, Youssef M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International* [Internet]. el 1 de octubre de 2012 [citado el 21 de marzo de 2025];48(2):410–27. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399691200141X?via%3Dihub>
52. Dassoff E, Li Y. Mechanisms and effects of ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. el 1 de abril de 2019 [citado el 21 de marzo de 2025]; 86:492–501. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418305624>
53. Jiménez L. Extracción por ultrasonido de compuestos bioactivos de ajos (*Allium sativum*) para su aplicación como antioxidante natural en carne para hamburguesa [Internet]. [Cuautitlán Izcalli]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2023 [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000837726/3/0837726.pdf>
54. Zapata M. "Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro de los aceites esenciales de muna (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a aislados patogénicos de *Aeromonas* spp procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú [Internet]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022 [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en:

[https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/12961/Evaluacion\\_AparicioZapata\\_Maria.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/12961/Evaluacion_AparicioZapata_Maria.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

55. Ramirez V, Prieto A. Evaluación del halo de inhibición de la planta *Otholobium mexicanum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [Internet]. [Bogotá]: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales; 2019 [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/server/api/core/bitstreams/e8e54267-1962-4d66-81af-66a007b619c2/content>
56. Cavalieri S, Harbeck R, McCarter Y, Ortez J, Rankin I, Sautter R, et al. Organización Panamericana de Salud. 2005 [citado el 28 de marzo de 2025]. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Disponible en: <https://www.paho.org/sites/default/files/2021-03/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
57. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Guía para la toma, transporte y envío de muestras para análisis del laboratorio de microbiología [Internet]. Bogotá; 2025 ene [citado el 21 de marzo de 2025]. (FOR-RMD-ANL-LEM-043). Report No.: 2. Disponible en: [https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/for-rmd-anl-lem-043\\_guia\\_para\\_la\\_toma\\_transporte\\_y\\_envio\\_de\\_muestras\\_para\\_analisis\\_del\\_laboratorio\\_de\\_microbiologia.pdf](https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/for-rmd-anl-lem-043_guia_para_la_toma_transporte_y_envio_de_muestras_para_analisis_del_laboratorio_de_microbiologia.pdf)
58. Geisseler D, Lazicki P, Horwath W. Muestreo de Tejidos Vegetales [Internet]. California; 2017 ene [citado el 21 de marzo de 2025]. Disponible en: [http://geisseler.ucdavis.edu/Guidelines/Muestreo\\_de\\_tejidos\\_vegetales.pdf](http://geisseler.ucdavis.edu/Guidelines/Muestreo_de_tejidos_vegetales.pdf)
59. Castelló M, Barrera C, Pérez É, Betoret N. Reducción del tamaño de partículas y tamizado de sólidos. Valencia; 2017.
60. Lock O. Investigación Fitoquímica. 1a ed. Perú: Fondo editorial, editor. Vol. XVII. 1994.
61. Calle W, Gutierrez V. Evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Maytenus octogona* (L' Héritier) DC [Internet]. [Ica]: Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2015 [citado el 28 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/server/api/core/bitstreams/f71b0262-7d70-4961-aef4-946106a132aa/content>

62. Peñafiel A, Climent A. Universidad Miguel Hernández. 2023 [citado el 22 de marzo de 2025]. Estrías escocesas. Disponible en: <https://docenciamicrobiologia.umh.es/indice-de-practicas/3-tecnicas-de-aislamiento-y-recuento/estrias-escocesas/>
63. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [Internet]. Ministerio de Salud Leonid Lecca García; feb, 2002. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/417394/439893732843877347520191106-32001-1v6txak.pdf?v=1573077224>
64. Vega E, López E. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico. *Revista Científica de Estudiantes*. 2013;1(2).
65. Sánchez E, Castillo S, García P. Actividad Antimicrobiana [Internet]. Nuevo León; 2016 [citado el 22 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/97/410/816-1?inline=1>
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. enero de 2020 [citado el 22 de marzo de 2025];30. Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
67. García J, Cantón R, García E, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica* [Internet]. 2000 [citado el 22 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
68. Barnes L, Heithoff D, Mahan S, House J, Mahan M. Antimicrobial susceptibility testing to evaluate minimum inhibitory concentration values of clinically relevant antibiotics. *STAR Protoc* [Internet]. el 15 de septiembre de 2023 [citado el 10 de abril de 2025];4(3). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10448204/>
69. Baptista A, Reggiani V, Bressan J, Gouveia M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts and Fractions of Cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*), and Pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. el 18 de abril de 2018 [citado el 13 de abril de 2025];2018(3753562). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5932493/>

70. Bubonja M, Knezevic S, Abram M. Challenges to Antimicrobial Susceptibility Testing of Plant-derived Polyphenolic Compounds. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [Internet]. el 1 de diciembre de 2020 [citado el 16 de abril de 2025];71(4):311. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7968511/>
71. Kuzhuppillymy L, Martínez A, Cruz F. Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. *Biología y Sociedad* [Internet]. junio de 2023 [citado el 13 de abril de 2025];6(12):33–40. Disponible en: <https://biologiaysociedad.uanl.mx/index.php/b/article/view/94/86>

## VIII. ANEXOS

### 8.1. Clasificación taxonómica

## **CERTIFICACIÓN BOTÁNICA**

### **'AÑO DEL BICENTENARIO, DE LA CONSOLIDACIÓN DE NUESTRA INDEPENDENCIA, Y DE LA CONMEMORACIÓN DE LAS HEROICAS BATALLAS DE JUNÍN Y AYACUCHO'**

El Blgo. Que suscribe determina que, la muestra biológica presentada por el bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" **EFRAIN JEAMPIERE SUICA SARAVIA** con DNI N° 75998602 para su determinación, pertenece al nombre científico de *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) HEMSL "pate", según Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist, (1988).

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: ANACARDIACEAE

GÉNERO: **Orthopterygium**

ESPECIE: ***Orthopterygium huaucui*** (A. Gray) HEMSL

N.V: "pate"

Se emite la presente certificación a solicitud del interesado para fines de estudio.

Ica 01 de febrero 2024

  
.....  
Dr. Miranda Huaman David Máximo  
 BIÓLOGO  
CBP. 3681

## 8.2. Recolección y tratamiento de la muestra vegetal



**Figura 26.** Ubicación de recolección de *Orthopterygium huacui*



**Figura 25.** Ladera cubierta de la especie *Orthopterygium huacui*



**Figura 28.** Recolección de la especie vegetal



**Figura 27.** Secado de la especie vegetal



**Figura 30.** Muestra vegetal secada



**Figura 29.** Muestra vegetal triturada manualmente

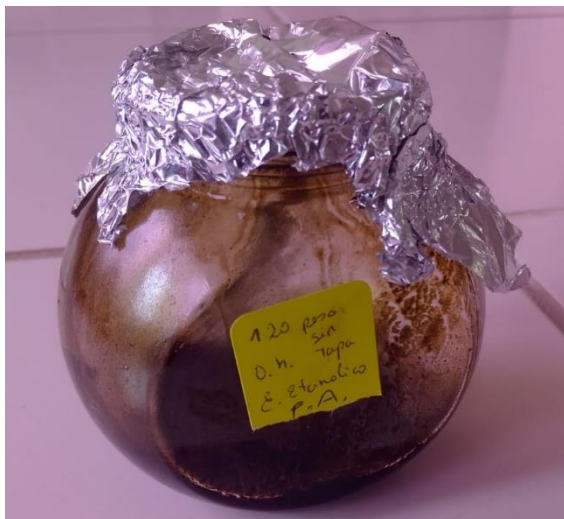


**Figura 31.** Método de extracción por ultrasonido



**Figura 32.** Secado a temperatura ambiente del extracto obtenido por ultrasonido

### 8.3. Marcha fitoquímica



**Figura 33.** Obtención de la Fracción A



**Figura 34.** Obtención de la Fracción B



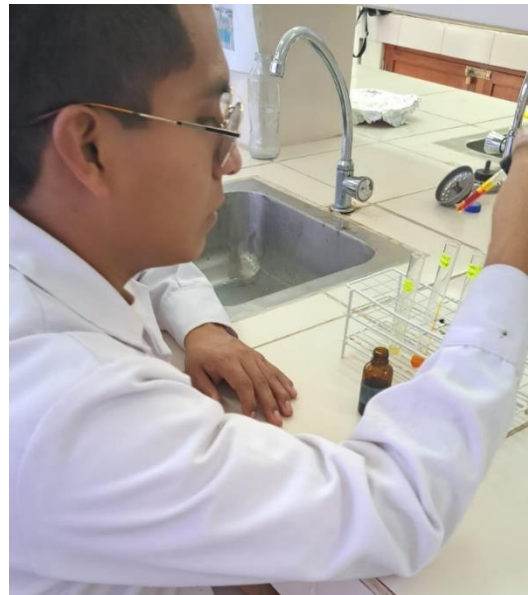
**Figura 35.** Obtención de la Fracción C



**Figura 36.** Obtención de la Fracción D



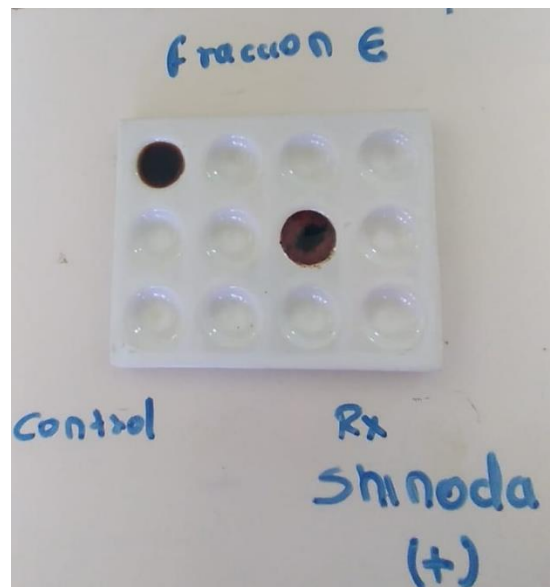
**Figura 37.** Obtención de la Fracción E




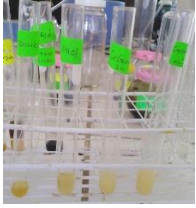



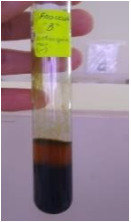

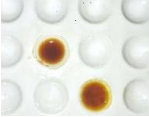
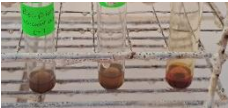

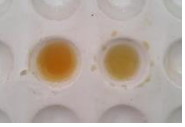





**Figura 38.** Reacción de identificación para alcaloides en la fracción C



**Figura 40.** Reacción de identificación para triterpenos y esteroides en la fracción C



**Figura 39.** Reacción de Shinoda para identificar flavonoides en la Fracción E

Fracción A	Rx. Shinoda 	Rx. Gelatina Sal 	Rx. FeCl <sub>3</sub> 	Rx. Ninhidrina 	
Fracción B	Rx. Libermann Burchard 			Rx. Borntrager 	
Fracción C	Rx. Libermann Burchard 	Rx. Kedde 	Rx. Dragendorff, Mayer y Wagner 		
Fracción D	Rx. Dragendorff, Mayer y Wagner 	Rx. Kedde 	Rx. Shinoda 	Rx. Rosenheim 	Rx. Liberman Burchard 
Fracción E	Rx. Shinoda 			R. Rosenheim 	

#### 8.4. Actividad antimicrobiana



**Figura 42.** Placas de agar Mueller Hinton inoculadas para la evaluación antimicrobiana



**Figura 41.** Lectura de halos de Inhibición en el método de difusión en pozo



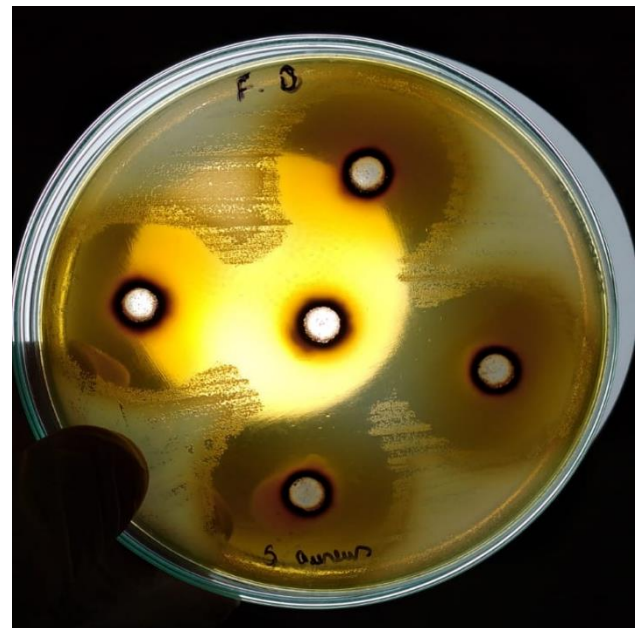
**Figura 43.** Halos de inhibición de la fracción A contra *S. aureus*



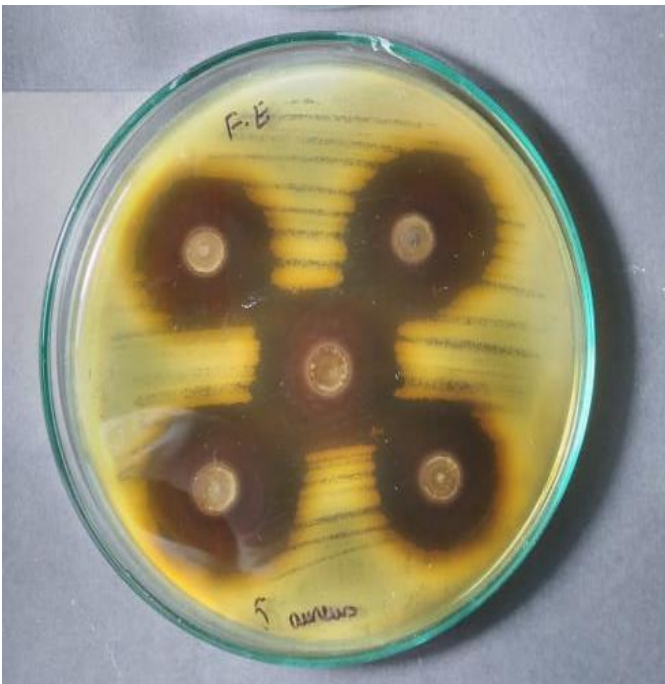
**Figura 44.** Halos de inhibición de la fracción B frente *S. aureus*



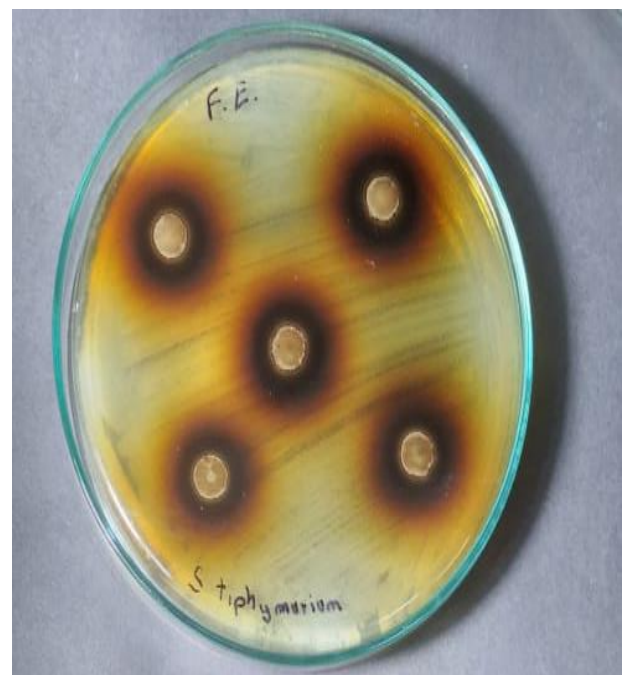
**Figura 46.** Halos de inhibición de la fracción C frente *S. aureus*



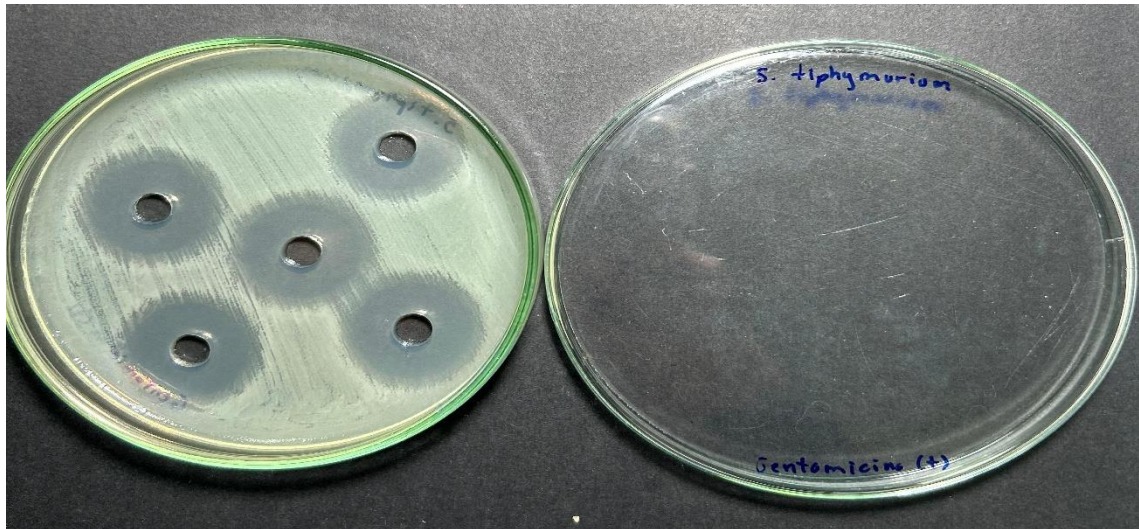
**Figura 45.** Halos de inhibición de la fracción D frente *S. aureus*



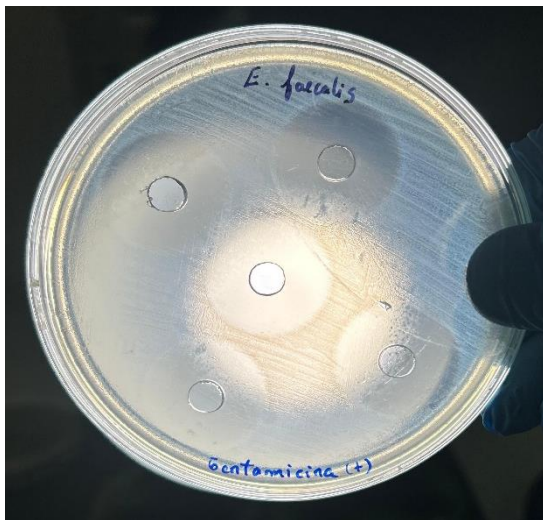
**Figura 47.** Halos de inhibición de la fracción E frente *S. aureus*



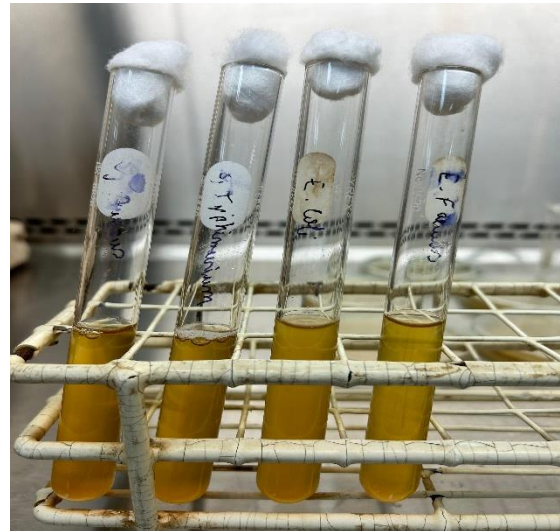
**Figura 48.** Halos de inhibición de la fracción E frente *S. typhimurium*



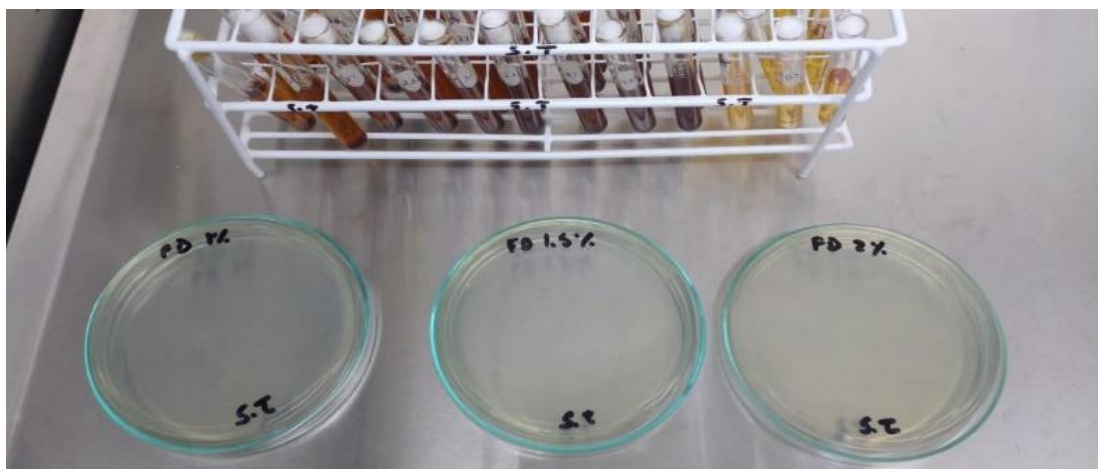
**Figura 49.** Halos de inhibición del control positivo frente *S. typhimurium*



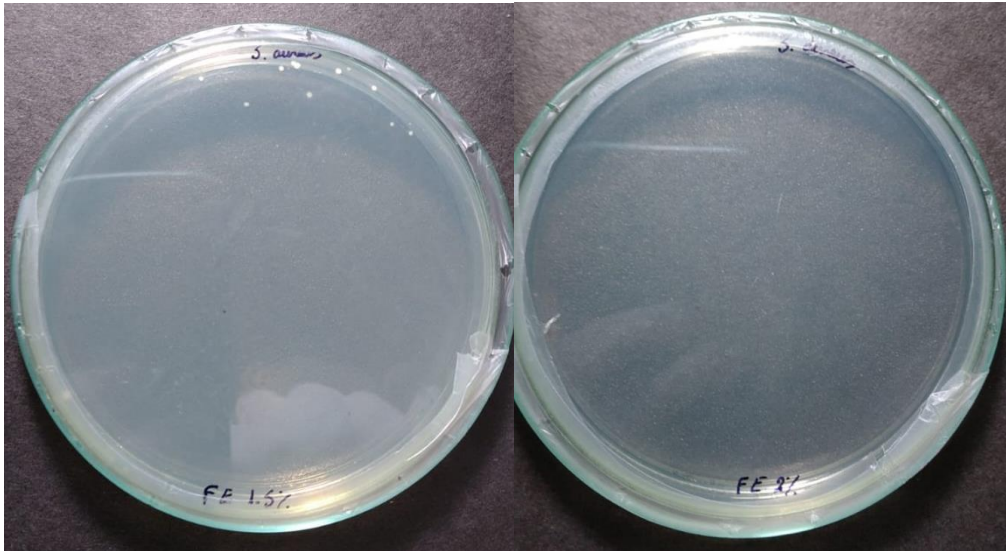
**Figura 51.** Halos de inhibición del control positivo frente a *E. faecalis*



**Figura 50.** Bacterias gram positivas y gram negativas suspendidas en caldo tripticasa soya para ser activadas y evaluadas en la actividad antimicrobiana



**Figura 52.** Replicación en agar Mueller Hinton de los caldos evaluados en el CMI para verificar el crecimiento de bacterias a la concentración de 1%, 1,5% y 2% de la fracción D frente a *S. typhimurium*



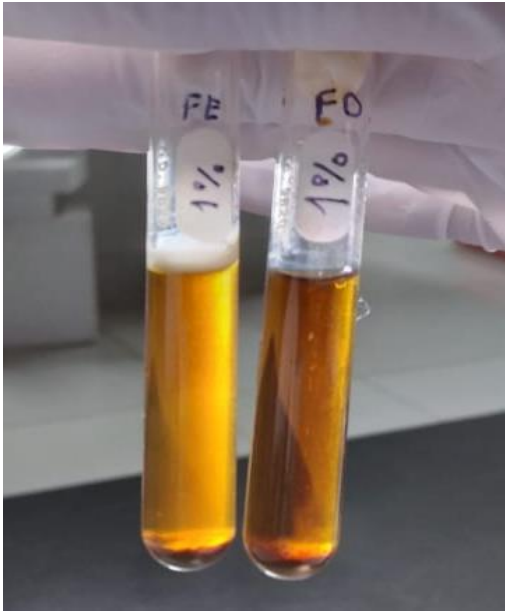
**Figura 53.** Replicación en agar Mueller Hinton de los caldos evaluados en el CMI para verificar el crecimiento de bacterias a la concentración de 1,5% y 2% de la fracción E frente a *S. aureus*



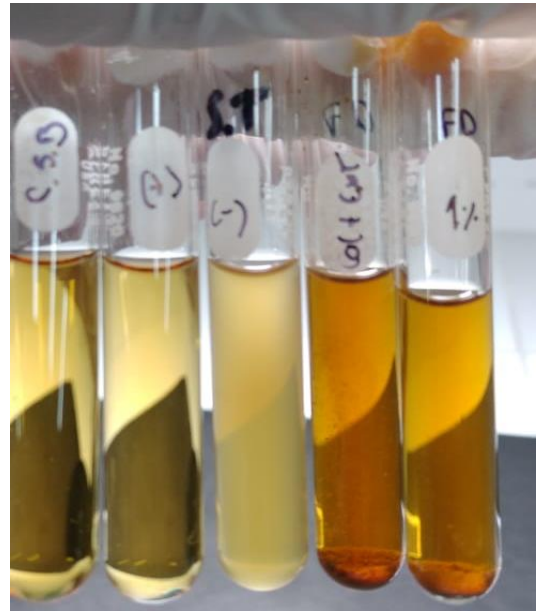
**Figura 54.** Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la fracción D frente a *S. typhimurium*



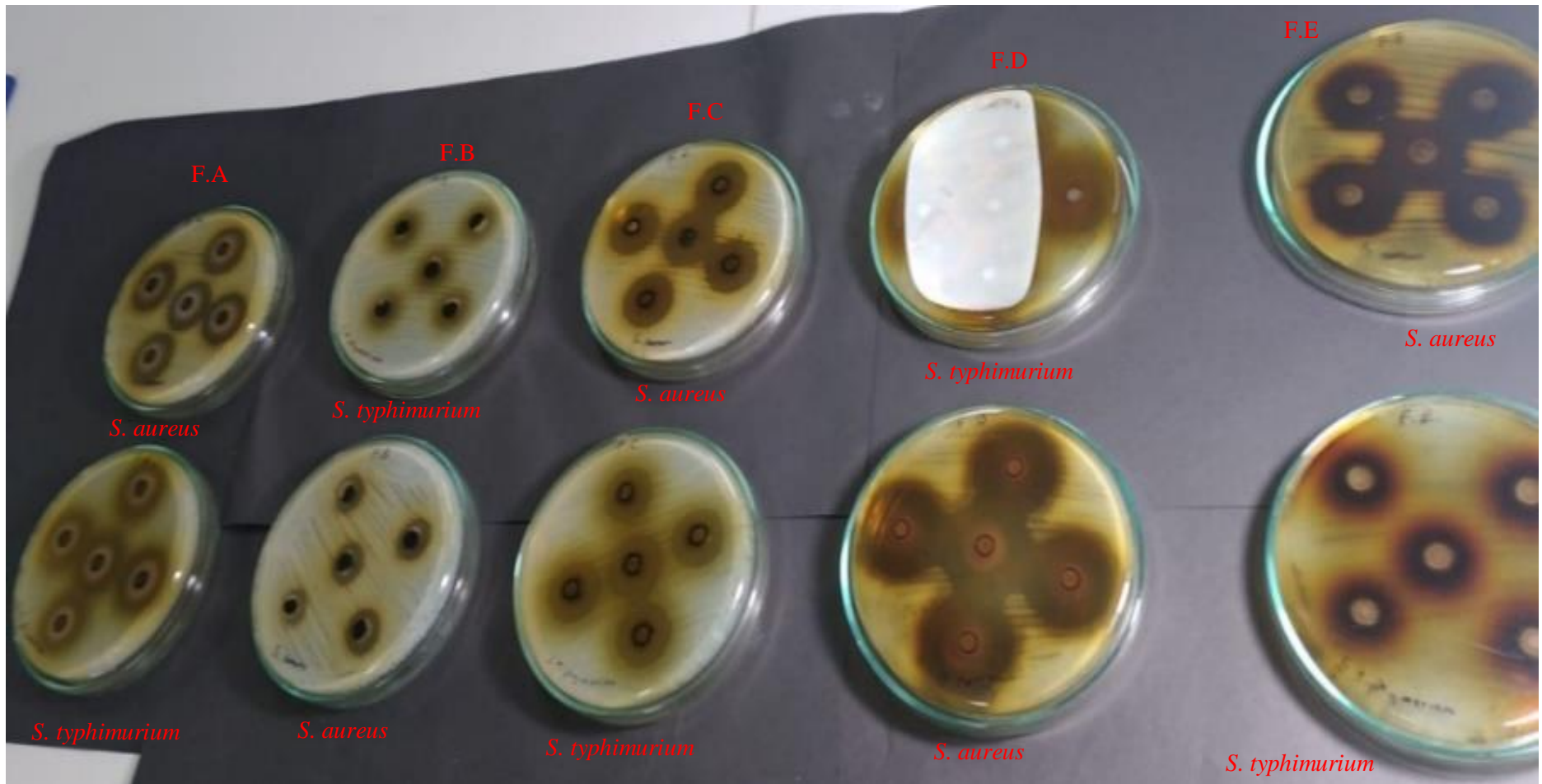
**Figura 55.** Lectura de resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a las 24 horas de la fracción D frente a *S. typhimurium*



**Figura 57.** Comparación de crecimiento bacteriano al 1% en la evaluación del CMI de las fracciones D y E frente a *S. aureus*



**Figura 56.** Comparación de los controles del CMI con la fracción D al 1% frente a *S. typhimurium*



**Figura 58.** Halos de inhibición en el método de difusión en pozo a las 24 horas de las fracciones A, B, C, D y E frente a *S. aureus* y *S. typhimurium*