

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS I

Determinación de fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera y su efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

AUTORES :

Marcos Rodríguez, Akemy Matilde

Mendieta Franco, Lizbeth Catherine

ASESOR :

Mg. Q.F. Soto Vásquez, Marilú Roxana

COASESOR :

Mg. Soto Vásquez, Karina

TRUJILLO – PERÚ

2015

JURADO DICTAMINADOR

Mg. Virginia González Blas

(Presidente)

Dr. Julio Campos Florián

(Miembro)

Mg. Marilú Soto Vásquez

(Miembro)

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

PRESENTACIÓN

Estimados Señores Miembros del Jurado:

En cumplimiento con las disposiciones vigentes emanadas del reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a vuestra consideración y elevado criterio, la presente Tesis I titulada: Determinación de fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera y su efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Esperando que el jurado se sirva a calificar este trabajo según su criterio establecido a pesar de la existencia de alguna deficiencia encontrada durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Trujillo, Junio del 2015

MENDIETA FRANCO, Lizbeth C.

MARCOS RODRIGUEZ, Akemy M.

AUTOR

AUTOR

DEDICATORIA

A nuestros padres por su comprensión y apoyo incondicional que nos han impulsado y enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Son el pilar fundamental en todo lo que hoy somos, nos dieron la vida, valores, principios, educación y sabios consejos para conseguir nuestros objetivos. Todo ello con su gran amor y sin pedir nunca algo a cambio. Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTO

Primero y antes que nada, al creador de todas las cosas, a DIOS, por darnos la fortaleza para continuar y estar con nosotros en cada paso que damos, por los triunfos y momentos difíciles vividos, por iluminar nuestras mentes y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido una gran soporte y compañía durante todo este periodo de formación profesional.

A nuestros maestros

Gracias por su tiempo, por su apoyo así como por su sabiduría que nos transmitieron en el desarrollo de tesis I, en especial: A la Dra. Soto Vásquez Marilú Roxana, por ser la asesora de este trabajo de investigación, por su esfuerzo y dedicación, su orientación, su persistencia y sobre todo su paciencia y su motivación, han sido fundamentales a lo largo de este periodo. Que Dios la bendiga siempre y la cuide; y que le siga brindando ese talento de enseñar y apoyar a los alumnos.

Los Autores

ÍNDICE

JURADO DICTAMINADOR.....	i
PRESENTACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	01
II. MATERIAL Y MÉTODO.....	10
III. RESULTADOS.....	24
IV. DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES.....	33
VI. REFERENCIAS.....	34
VII. ANEXOS.....	41

RESUMEN

El empleo de plantas con fines curativos es una práctica utilizada desde tiempos inmemoriales. Estas han sido por mucho tiempo el principal e incluso el único recurso al alcance de la población, por lo que existe un gran interés en la búsqueda de nuevas especies vegetales con propiedades medicinales. En este sentido, la finalidad del presente trabajo fue determinar los fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera y evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El material vegetal fue recolectado del Cerro Campana, distrito de Huanchaco, región La Libertad. Se preparó el extracto hidroetanólico de las hojas mediante el método de Soxhlet con etanol al 70%. El tamizaje fitoquímico se realizó mediante el método de Martínez y Cuellar, mientras que la actividad antibacteriana *in vitro*, se determinó mediante el método de difusión en agar con pozos según Kirby- Bauer. Se encontraron una gran variedad de fitoconstituyentes como azúcares reductores, lactonas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, aminoácidos, flavonoides, antocianidinas y alcaloides. Las concentraciones de 5% p/v, 15% p/v y 30% p/v del extracto hidroetanólico, inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas estudiadas, siendo la concentración de 30% p/v, la que presentó un mayor porcentaje de inhibición con 81.9% para *Staphylococcus aureus* y 69.3%, para *Escherichia coli*, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

Palabras claves: Extracto hidroetanólico, *Senecio truxillensis*, efecto antibacteriano.

ABSTRACT

The use of plants for medicinal purposes is a practice used since ancient times. These have for a long time the main or even the only recourse available to the population, so there is great interest in finding new species with medicinal properties. In this sense, the purpose of this study was to determine the phytoconstituents of the hydroethanolic extract from the leaves of *Senecio truxillensis* Cabrera and evaluate *in vitro* antibacterial effect against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Plant material was collected from the Cerro Campana, district of Huanchaco, La Libertad region. The hydroethanolic extract of the leaves was prepared by the method of Soxhlet with ethanol 70 %. The phytochemical screening was performed using the method of Martinez and Cuellar, while the *in vitro* antibacterial activity was determined by the agar diffusion method with wells according to Kirby-Bauer. Phytoconstituents found were reducing sugars, lactones, triterpenes, steroids, saponins, tannins, amino acids, flavonoids, anthocyanins and alkaloids . The concentrations of 5% w / v, 15% w / v and 30% w / v of the extract inhibited the growth of bacterial strains studied, the concentration of 30% w / v had the highest percentage of inhibition with 81.9% for *Staphylococcus aureus* and 69.3% for *Escherichia coli*. Significant differences with $p < 0.05$ were found.

Key words: hydroethanolic extract, *Senecio truxillensis*, antibacterial effect

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo del desarrollo de las culturas humanas, la relación del hombre y su medio vegetal ha sido íntima y vital. En realidad el hombre ha vivido con las plantas y ha dependido de ellas para alimentarse y satisfacer muchas de sus necesidades, incluyendo las medicinales ¹.

El empleo de remedios naturales y sobre todo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizada desde tiempo inmemorial y que ha crecido continuamente en años recientes, las plantas medicinales han sido por mucho tiempo el principal e incluso el único recurso que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizará en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen ².

Es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha reconocido la necesidad de incorporar los recursos y técnicas de la medicina tradicional, para contribuir en la solución de los distintos problemas de salud, de alto costo y difícil adquisición de medicamentos hechos a base de insumos químicos importados los que han remplazado a muchas de las antiguas y bien establecidas drogas vegetales ^{3, 4, 5}.

Se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial, sobre todo en los países en vía de desarrollo dependen y confían en las plantas medicinales para satisfacer sus principales necesidades de atención primaria de salud. De esta forma, el uso de las especies vegetales con fines terapéuticos, que se ha venido

haciendo en forma empírica y basada en la tradición, busca tener hoy una base científica ^{2,5}.

La fitoterapia, entonces, es un pilar para la farmacoterapia, es la ciencia que estudia la utilización de productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico ⁶.

Paracelso, el padre de la Farmacología Química, fue el primero en señalar que las propiedades medicinales de las plantas radican en sus principios activos aislables por técnicas alquímicas, motivo que constituye la base de la Farmacología Moderna. Luego y gracias al desarrollo de la síntesis química, en la que el hombre lograra copiar núcleos básicos de moléculas exitosas de la naturaleza para mejorarlas y haciéndolas más selectivas y seguras ^{7,8}.

Es así como nuestra realidad terapéutica hoy en día, está regida por la química sintética, pero lo que pocos saben es que estas exitosas moléculas que curan no son sino copias mejoradas de sustancias químicas que la naturaleza en forma espontánea creó, llamados metabolitos secundarios ⁸.

Sin embargo, la actividad terapéutica no sólo se puede conseguir luego de procesos de extracción y purificación de principios activos, sino de algunos extractos relativamente simples de obtener o directamente de la planta misma ya que éstos se hallan biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que, no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados ⁹.

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir

y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo primario se denominan metabolitos secundarios y son, por lo general alcaloides, esteroides, glucósidos, flavonoides, terpenos, resinas, aceites esenciales, aceites grasos y gomas los cuales pueden encontrarse distribuidos por toda la planta: Látex, jugos, etc. ^{10,11}.

Los metabolitos secundarios se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros ¹¹.

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas medicinales como fuente de agentes anti-infectivos y ha sido ampliamente estudiada debido a que las enfermedades infecciosas causan el 26% de todas las muertes en el mundo, principalmente por cepas patógenas de bacterias resistentes, motivo por lo cual es considerado un problema de salud a nivel mundial ¹².

La resistencia bacteriana es la capacidad de un microorganismo de tolerar o resistir ciertas condiciones físico-químicas y biológicas adversas. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad bacteriana provocado por un agente que ha sido poco efectivo en contra de cierto microorganismo, éste se considera como resistente. Muchos microorganismos han sido siempre no susceptibles y por lo tanto intrínsecamente resistentes a un agente en particular por su naturaleza fisiológica o bioquímica, los microorganismos susceptibles pueden volverse insensibles por mutaciones o por la incorporación de información genética que codifica a la resistencia ¹³.

La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha sido paralela a la incorporación de los mismos al arsenal terapéutico. La industria farmacéutica fue modificando la estructura química de las moléculas de antibióticos ya conocidos y buscó, así mismo, nuevos antibióticos que fuesen esquivando los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias ¹⁴.

Sin embargo, aunque estas nuevas moléculas fueron eficaces durante unos años, las bacterias nuevamente desarrollaban nuevos mecanismos que incluían la resistencia a estos nuevos antibióticos ¹⁴.

Ya en el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) apuntaba hacia el aspecto global de la resistencia a los antimicrobianos, definiéndolo como un problema complejo, impulsado por múltiples factores que exigía la búsqueda de respuestas multisectoriales ¹⁴.

La resistencia a los antibióticos supone un problema clínico, pero también se traduce en un problema económico. Según un informe del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades y la Agencia Europea del Medicamento, se estima que en Europa se producen alrededor de 25.000 muertes al año causadas por un grupo seleccionado de bacterias multirresistentes (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*), y las infecciones causadas por estos microorganismos podrían suponer alrededor de 1,5 billones de euros al año ¹⁵.

En los Estados Unidos de América se calcula un gasto anual como consecuencia de la resistencia bacteriana, de aproximadamente 4 billones de dólares. Por otra parte, para poder contener el problema y evitar las consecuencias, el uso prudente de los agentes antimicrobianos y el adecuado control en la infecciones

intrahospitalarias parecen ser las mejores herramientas de combate contra la diseminación de la resistencia bacteriana ¹⁶.

En el Perú los microorganismos más frecuentemente reportados como aislados en pacientes hospitalizados son la *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*. Esta frecuencia es más o menos similar en comparación entre los servicios de hospitalización y la unidad de cuidados intensivos (UCI). En el análisis por edad y sexo, las frecuencias son diferentes dependiendo de la frecuencia de determinados tipos de infecciones en cada grupo ¹⁷.

Escherichia coli, es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gran negativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda ¹⁸.

La resistencia de la *Escherichia coli* procedente de pacientes hospitalizados a la cefotaxima es 28.1%, sin embargo, los aislamientos procedentes de pacientes hospitalizados en UCI es más alta, 85.3%. Esta prevalencia puede estar relacionada también a la producción de betalactamasas de espectro extendido. La resistencia a otros antibióticos también es importante: 75% a aztreonam, 72.2% a cefepime, 62.3% a ciprofloxacino ^{17,18}.

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, gram-positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella. Agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, infección del sistema nervioso central y del tracto genitourinario. Por su ubicuidad y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se confiere especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales ^{19,20}.

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos ²⁰.

La prevalencia de la resistencia del *Staphylococcus aureus* procedente de pacientes hospitalizados a la metilina (u oxacilina) es de 66.7%. Esta prevalencia es mucho mayor cuando sólo se analiza los aislamientos procedentes de pacientes hospitalizados en UCI (82.1%). En los aislamientos procedentes de pacientes que son manejados ambulatoriamente esta es de 48.9% ^{17,20}.

Al parecer todas estas alertas no tuvieron los efectos esperados y sigue siendo una cuestión de flagrante actualidad. Debido a los efectos adversos de algunas drogas antibacterianas utilizadas actualmente, a que son poco efectivas e inducen

frecuentemente resistencia, muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de plantas, pues de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas y son consideradas como la fuente principal de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su alto contenido de fitoconstituyentes y a su poco o nulo efecto tóxico ^{14, 17}.

El Perú es considerado el tercer país mega diverso del planeta, lo que implica que en nuestro territorio existe un gran potencial de estudio gracias a los diversos pisos ecológicos y microclimas que presenta, contando con 84 zonas de vida de las 103 conocidas donde habría 50 mil especies vegetales (20% de las existentes en la Tierra), de las que 2,000 han sido utilizadas con fines curativos y tan sólo menos del 10% de ellas han sido estudiadas. Es por esto que numerosos investigadores han encaminado sus trabajos hacia la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos que exhiban efectos secundarios mínimos ²¹.

Las Asteraceae ocupan el segundo lugar entre las familias más diversas de la flora peruana. Uno de los géneros con una mayor cantidad de especies perteneciente a esta familia es el género *Senecio*. Este género incluye alrededor de 250 especies con un amplio espectro de formas de vida que se encuentran en todo el mundo y se caracteriza por tener buena actividad en el tratamiento del asma bronquial y también se han reportado resultados óptimos de efecto antiinflamatorio, antimicrobiano, analgésico y antioxidante ^{22, 23}.

Se han registrado 98 especies endémicas de *Senecio* en el Perú, pero se continúan describiendo especies nuevas. Una de estas plantas medicinales andina y endémica del Perú es la especie *Senecio truxillensis* **Cabrera**, esta nueva especie arbustiva se conoce solamente de una sola localidad, la cual se halla cerca de la

ciudad de Trujillo. Se extiende en distribución de las lomas costeras a las laderas occidentales ubicadas en Cerro Campana, Huanchaco - La Libertad ²³.

Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias, derivado de sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Los metabolitos responsables de las actividades antibacterianas y antifúngicas de algunas plantas podrían ser flavonoides, fenoles, alcaloides, saponinas, según Osbourn 1996 ²⁴.

Referente al posible efecto antibacteriano y antifúngico del género *Senecio* encontramos algunos trabajos de investigación como: Tamariz (1998), Lizarraga (2008), Matta (2009) y Ochoa (2012) en el cual mencionan que los extractos hidroetanólicos muestran actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ^{25,26,27,28}.

Ante todo lo anteriormente expuesto se planteó los siguientes problemas: ¿Cuáles son los fitoconstituyentes presentes en el extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera? y ¿Cuál es el efecto del extracto hidroetanólico frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

Para responder a este problema se empleó la marcha fitoquímica preliminar de Martínez y Cuellar; y el método de difusión en agar con pozos según Kirby- Bauer.

Los objetivos fueron los siguientes:

1. Determinar los fitoconstituyentes presentes en el extracto hidroetanólico de las hojas de ***Senecio truxillensis* Cabrera**.
2. Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de la hojas de ***Senecio truxillensis* Cabrera** frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
3. Determinar el porcentaje de inhibición del extracto hidroetanólico de las hojas de ***Senecio truxillensis* Cabrera** frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1.MATERIAL.

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

2.1.1.1. Material Vegetal: Se utilizó 1 kg de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera, recolectadas del Cerro Campana, distrito de Huanchaco - La Libertad.

2.1.1.2. Material Microbiológico: Dos cepas de bacterias: *Escherichia coli* (ATCC 25992) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) que fueron proporcionadas por el Hospital Belén de Trujillo.

2.1.2. MATERIAL DEL LABORATORIO:

2.1.2.1. Material de Vidrio:

- 01 Fiolas 100 mL.
- 03 Fiolas de 25 mL.
- 03 Cápsula de porcelana.
- 01 Mortero de porcelana.
- 04 Balones de 50 mL.
- 02 Probetas de 100 mL
- 02 Vasos de precipitación de 50 mL.
- 02 Vasos de precipitación de 100 mL.
- 02 Vasos de precipitación de 250 mL.
- 02 Pipetas de 1 mL.
- 02 Pipetas de 5 mL.
- 02 Pipetas de 10 mL.

- 15 Tubos de ensayo.

2.1.2.2. Equipos :

- Balanza analítica.
- Balanza triple brazo.
- Equipo de Soxhlet.
- Incubadora Microbiológica.
- Baño María.
- Estufa.
- Refrigeradora.

2.1.3. REACTIVOS Y SOLVENTES:

- Ácido clorhídrico
- Ácido nítrico
- Ácido pícrico
- Ácido sulfúrico
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético
- Bicloruro de mercurio
- Carbonato de sodio
- Cloruro férrico
- Hidróxido de potasio
- Hidróxido de sodio
- Ninhidrina
- Nitrato de plata
- Pentacloruro de antimonio

- Subnitrito de Bismuto
- Sudán III
- Sulfato cúprico
- Tricloruro de antimonio
- Tricloruro férrico
- Yoduro de potasio
- Agua destilada
- Etanol 96°

2.1.4. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Mueller Hinton
- Agar Mc Conkey
- Agar Tripticasa de Soya

2.1.5. FÁRMACO

- Cloranfenicol 5 µg/mL

2.1.6. OTROS

- Asa de platino
- Calibrador de Vernier
- Mechero
- Alcoholímetro.
- Cocina eléctrica.
- Placas petri descartables
- Puntas estériles
- Hisopos
- Franela
- Algodón

- Cinta masking tape
- Guantes estériles
- Papel filtro
- Gradilla
- Etiquetas
- Plumones de tinta indeleble
- Detergente

2.2. MÉTODO.

2.2.1. Recolección de la especie

La especie de *Senecio truxillensis* Cabrera fue recolectada de las lomas costeras del Cerro Campana del distrito de Huanchaco, provincia de Trujillo, región La Libertad, en las coordenadas geográficas de 7° 58' 36.98" latitud sur y 79° 06' 16.18" longitud oeste y a 700 m.s.n.m. durante el mes de setiembre²⁹.

La recolección de la especie se realizó por el método convencional o clásico de herborización, seleccionando el material en el campo y verificando que esté en buenas condiciones.

2.2.2. Identificación y determinación taxonómica de la especie

Se llevó un ejemplar de la especie de *Senecio truxillensis* Cabrera al Herbarium Tuxillense (HUT) para su verificación taxonómica y luego fue registrada y depositada con el código N° 50978 (Anexo 1).

2.2.3. Preparación del material vegetal

- Selección y lavado de las hojas

Se seleccionaron las hojas que estaban en buenas condiciones, eliminando las hojas marchitadas, oscuras y con ataque de hongos.

Luego se lavaron con agua destilada estéril y se secaron la superficie con papel toalla.

- **Secado de las hojas**

Una vez lavadas las hojas, se procedió a secar a temperatura ambiente y posteriormente se adecuaron estas en papel Kraft con orificios, y fueron secadas en una estufa a 40°C por 48 horas.

- **Pulverización y tamizaje de las hojas**

Las hojas desecadas se pulverizaron con la ayuda de un mortero y luego se pasaron a través de un tamiz N° 22.

- **Almacenamiento de las hojas**

El polvo de hojas obtenidas, se guardó en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha y en un lugar sin humedad y luz directa, hasta su posterior utilización (anexo 02).

2.2.4. Preparación del extracto hidroetanólico:

Se pesó 50 g de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera previamente desecadas, pulverizadas y tamizadas. Luego se colocaron en un cartucho de papel de filtro Whatman N°1, introduciendo este en el extractor Soxhlet. Se realizó la extracción por 2 horas, utilizando 250 ml de etanol al 70 % en un balón de fondo plano de 500 ml y controlando la temperatura hasta obtener 8 ciclos por hora. Al cabo de este tiempo se filtró el extracto hidroetanólico con papel Whatman N°1. Posteriormente se llevó a evaporar en baño maría hasta 20 mL, y luego se continuó la evaporación en una estufa a 40°C hasta obtener un extracto seco. El extracto seco se pesó y se guardó en refrigeración a 4°C en frasco de vidrio de color ámbar estéril ³⁰.

2.2.5. Determinación de fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico:

La determinación de los fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera se llevó a cabo siguiendo el método de marcha fitoquímica de Miranda y Cuellar, el cual permitió identificar los fitoconstituyentes a través de reacciones químicas, mediante cambios de coloración o formación de precipitados, destinadas a determinar la presencia de: catequinas, resinas, azúcares reductores, lactonas, triterpenos y esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, aminoácidos, quinonas, cardenólidos, flavonoides, antocianidina y alcaloides (anexo 03).

2.2.6. Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera:

Se utilizó el método de difusión en agar con pozos, según Kirby-Bauer³¹.

2.2.6.1. Preparación de las concentraciones

A partir del extracto hidroetanólico seco de las hojas de *S. truxillensis*, se pesaron por separado 0,5 g; 1,5 g y 3 g, y se redisolviéron con 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniéndose las siguientes concentraciones 5%, 15% y 30% p/v.

2.2.6.2. Reactivación de las cepas y estandarización.

Las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que estuvieron en reserva criogénica mantenidas a -80 °C fueron reactivadas en caldo Mueller Hinton y se incubaron durante 18 horas a 37°C. Luego se tomó una asada de cada microorganismo y se ajustó con solución salina fisiológica al Patrón de Turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10⁸ UFC/mL).

2.2.6.3. Cultivo de los microorganismos

- **Cultivo de *Staphylococcus aureus***

En diez placas de Petri se colocaron 20 mL de Agar Trypticase de Soya. Solidificado el agar se sembró sobre su superficie el cultivo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) anteriormente estandarizado (10^8 UFC/mL) utilizando hisopo estéril en la suspensión bacteriana. Se hisoparon uniformemente, girando cada placa 30 grados por 10 veces aproximadamente. Las placas recién sembradas fueron colocadas en una estufa a 37°C de temperatura durante 10 minutos.

- **Cultivo de *Escherichia coli***

En diez placas de Petri se colocaron 20 mL de Agar Mc Conkey. Solidificado el agar se sembró sobre su superficie *Escherichia coli* (ATCC 25992) anteriormente estandarizado (10^8 UFC/mL) utilizando hisopo estéril en la suspensión bacteriana. Se hisoparon uniformemente, girando cada placa 30 grados por 10 veces aproximadamente. Las placas recién sembradas fueron colocadas en una estufa a 37°C de temperatura durante 10 minutos.

2.2.6.4. Aplicación de los extractos y del blanco

En cada ocho placas cultivadas con los microorganismos respectivos, se realizaron cuatro perforaciones de 11mm de diámetro, con un sacabocado y se sellaron con 0,1mL del mismo agar, para evitar la dispersión de los extractos y del blanco. Luego se colocaron en cada perforación 200 μ L del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera a las

concentraciones de 5%, 15%, 30% p/v y del blanco (dimetilsulfóxido). Se dejó reposar por unos minutos a temperatura ambiente, se selló con parafilm y se incubó las placas a 37 °C, por un periodo de 24h.

2.2.6.5. Aplicación del control

En cada dos placas cultivadas con los microorganismos respectivos, se realizaron cuatro perforaciones de 11mm de diámetro, con un sacabocado y se sellaron con 0,1mL del mismo agar. Luego se colocaron en cada perforación 200 µL de Cloranfenicol (5µg/mL). Se dejó reposar por unos minutos a temperatura ambiente, se selló con parafilm y se incubó las placas a 37 °C, por un periodo de 24h.

2.2.6.6 .Lectura de las placas

La lectura de las placas se realizó después de 24 horas. Se midieron los diámetros en milímetros de cada halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos empleando un vernier. Los valores obtenidos de las ocho repeticiones se promediaron.

2.2.6.7. Determinación del porcentaje del efecto inhibitorio

El cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control, se procedió aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro promedio de la muestra (mm)} - \text{Diámetro promedio del blanco (mm)}}{\text{Diámetro promedio del control (mm)} - \text{Diámetro promedio del blanco (mm)}} \times 100$$

Donde:

Muestra: Extracto hidroetanólico

Control: Cloranfenicol 5 µg/mL

Blanco: Dimetilsulfóxido

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SSPS v. 20 para el análisis estadístico, reportándose la media aritmética y desviación estándar para cada variable; y a la vez se realizó la comparación entre los cuatro grupos a través del test de ANOVA con un nivel de significancia menor a 0.05.³²

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

III. RESULTADOS

Tabla 1: Fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera, procedentes del distrito de Huanchaco - La Libertad.

Fitoconstituyentes	Ensayos	Intensidad	Identificación
Catequinas	Catequinas	+	+
Resinas	Resinas	-	-
Azúcares Reductores	Fehling	+	+
Lactonas	Baljet	++	+
Triterpenos y esteroides	Liebermann - Burchard	+	+
Saponinas	Espuma	++	+
Compuestos fenólicos y taninos	Cloruro férrico	+++	+
Aminoácidos	Ninhidrina	+	+
Quinonas	Bornträger	-	-
Cardenólidos	Kedde	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+
Antocianidina	Antocianidinas	++	+
Alcaloides	Dragendorff	+++	+
	Mayer	++	+
	Wagner	+	+

Leyenda:

Intensidad: + Baja
 ++ Moderada
 +++ Alta

Identificación: + Positivo
 - Negativo

Tabla 2: Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25992). Halo a las 24 horas

MICROORGANISMOS	HALO DE INHIBICIÓN (mm)				
	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO			CONTROL	BLANCO
	5% $\bar{X} \pm D.E$	15% $\bar{X} \pm D.E$	30 % $\bar{X} \pm D.E$	Cloranfenicol 5 μ g/mL $\bar{X} \pm D.E$	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14.9±0.27	18.5±0.39	23.9±0.27	29.2±0.38	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12.7±0.49	15.3±0.31	18.3±0.37	26.4±0.38	0

P<0.05 comparado con el grupo control (test de ANOVA)

$\bar{X} \pm D.E$: Promedio del halo de inhibición y desviación estándar, n=8.

DMSO: dimetilsulfóxido

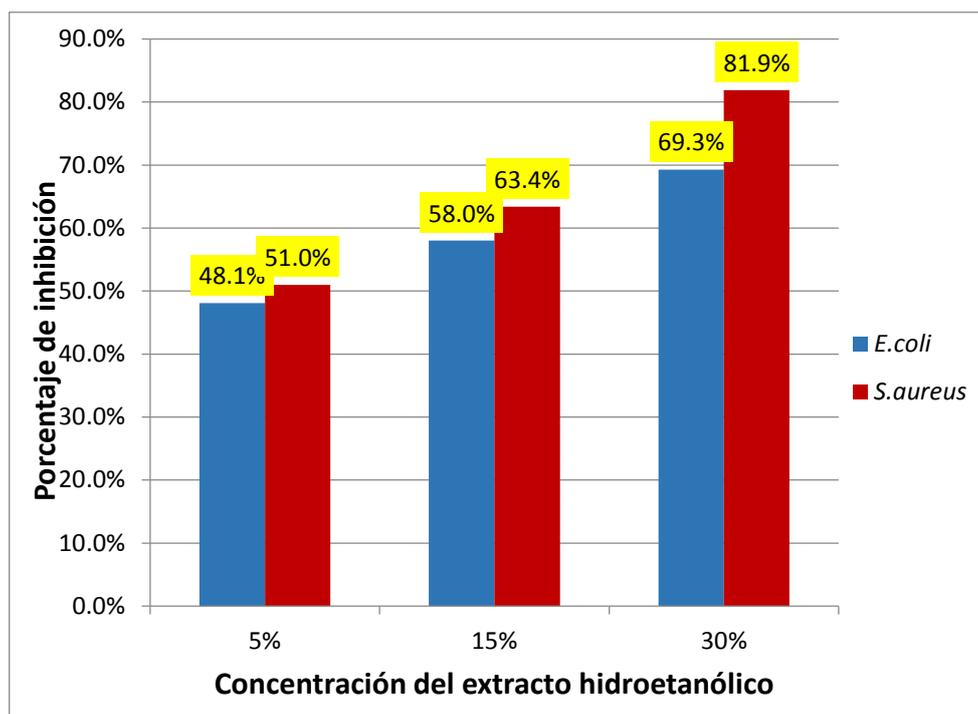


Fig.1 Porcentaje de inhibición del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25992).

IV. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios, a menudo, desempeñan un papel importante en la planta, tales como defensa contra depredadores, microorganismos, estrés, etc; estos componentes han sido utilizados como drogas durante milenios. Por lo tanto, la detección de fitoconstituyentes sirve como primer paso en la predicción de tipos de potenciales compuestos activos de las plantas ³³.

La tabla 1 muestra, según la marcha fitoquímica, que el extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* contiene cualitativamente fitoconstituyentes como catequinas, azúcares reductores, lactonas, triterpenos y esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, aminoácidos, flavonoides, antocianidinas y alcaloides. Estos resultados al comparar con otras especies del género *Senecio*, tales como *Senecio clavus*, *Senecio comosus* y *Senecio klatti* coinciden con la presencia de metabolitos tales como compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides. Asimismo la especie de *Senecio culcitoides* presenta glicósidos, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, lactonas y esteroides y/o terpenoides metabolitos encontrados en la especie en estudio ²⁵.

Baldoceda (1996), realizó la marcha fitoquímica según Lock, de tres muestras de *Senecio rhizomatus* colectados en diferentes partes del país donde reporta la presencia de alcaloides y flavonoides, y ausencia de quinonas, resultados que concuerdan con este trabajo ³³.

La Tabla 2 se muestra el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera, donde se observa los promedios de los halos de inhibición del extracto a concentraciones crecientes (5, 15 y 30 %),

del control (cloranfenicol 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y del blanco (DMSO) frente a dos bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los extractos de *Senecio truxillensis* Cabrera a diferentes concentraciones al difundirse en el medio producen un gradiente de concentración, suprimiendo el crecimiento bacteriano en una zona circular alrededor del pozo, la medida del diámetro del halo se considera como poder inhibitor del extracto contra las bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y que dicho efecto aumenta a medida que se incrementa la concentración, con diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ (ANOVA). Es así que el extracto a la mayor concentración (30%) presenta mayores promedios de halos de inhibición de 23.9 ± 0.27 mm y 18.3 ± 0.37 mm frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente.

Asimismo, el control (Cloranfenicol 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) presenta halos de inhibición de 29.2 ± 0.38 y 26.4 ± 0.38 frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente, que según el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) para este antibiótico frente a estos microorganismos ensayados, estaría catalogado como sensible; mientras que el blanco (DMSO) no presenta halos de inhibición, lo que indica la inocuidad del solvente frente a estos microorganismos³⁴.

En la figura 1, muestra los porcentajes de inhibición del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillense* Cabrera, los cuales fueron de 51%, 63.4% y 81.9% para *Staphylococcus aureus*; 48.1%, 58% y 69.3% para *Escherichia coli* a las concentraciones de 5%, 15% y 30% p/v respectivamente. Una acción antibacteriana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición relativo es $>70\%$, intermedia entre el 50-70% y baja cuando es $<50\%$ ³⁵.

En consecuencia, la dosis de 1.5 mg/ml (30%) en el extracto presento actividad alta para *Staphylococcus aureus* e intermedia para *Escherichia coli*.

Si bien es cierto, no existen trabajos previos de índole antibacteriana con respecto a *Senecio truxillense* Cabrera, pero existen otros trabajos de investigación de especies de plantas del mismo género en estudio, tales como el de Tamariz (1998) en la cual menciona que las especies de *Senecio calvus* Cuatr., *S. comosus* Schultz - *Bipontinus* var. *comosus*, *S. klattii* Greenm y *S. rhizomatus* Rusby presentan actividad citotóxica y antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* con CMI de 6387 mg/mL (*S. rhizomatus*), CMI de 4000 mg/mL (*S. calvus*) y 4000 mg/mL (*S. comosus*)²⁵.

Matta (2009) menciona que el género *Senecio* representado por *Senecio nutans*, *Senecio adenophyllus* y *Senecio trifurcifolius* mostraron actividad antimicrobiana de amplio espectro, tanto para microorganismos Gram (+) como Gram (-)²⁷.

También Ochoa (2012) menciona la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. graveolens* Wedd (Wiskataya) obtenido de las hojas y tallos, encontrando actividad antibacteriana marcada y moderada, para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente, observándose formación de halos de inhibición para concentraciones del aceite esencial a 80, 90 y 100 %²⁸.

Muchos de los metabolito secundarios identificados en el extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera son los que le confieren el efecto antibacteriano. Esto es debido a que, los flavonoides que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipitan

las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos ³⁶.

Otro mecanismo propuesto por el que los flavonoides muestran actividad antibacteriana, es que provocan la muerte bacteriana al inhibir la síntesis de ADN o ARN debido a que tienen una estructura plana similar a la de las bases púricas y pirimídicas, por lo tanto se pueden intercalar formando puentes de hidrogeno con las bases de la doble hélice y de esta forma las flavonas alteran la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, impidiendo su adecuada síntesis de Novo, además de provocar errores de lectura durante la transcripción ³⁶.

También los taninos, son grupos de metabolitos secundarios importantes. Estos conforman un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de precipitar gelatina en solución, una propiedad conocida como astringente. Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. Los taninos condensados llamados proantocianidinas son compuestos fenólicos estables que pueden prevenir la expresión de las fimbrias P de *E. coli* como parte de su actividad antibacteriana ³⁷.

Otros investigadores mencionan que la actividad antimicrobiana de los taninos incluyen, la posible inhibición de las enzimas microbianas extracelulares, la privación de los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano o la acción directa sobre el metabolismo microbiano mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa, y por último se sabe de un mecanismo de privación de hierro; pero muchos microorganismos pueden superar las defensas de las plantas

sobre la base de taninos y a través de la síntesis de complejos tanino- polímeros, oxidación, biodegradación de taninos o de síntesis de sideróforos ³⁸.

Asimismo, las saponinas son un grupo de sustancias glicosídicas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Se cree que la toxicidad de las saponinas es debido a su capacidad de formar complejos con esteroides de las membranas celulares produciendo grandes poros en las mismas que alteran su permeabilidad y la célula se lisa, ocasionando la ruptura de las membranas bacterianas ^{39,40}.

Por otro lado, los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se cree que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica, dejando a merced de un choque osmótico ⁴¹.

Uno de los principales mecanismos de acción como antibióticos propuestos para los terpenoides, consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos tres efectos produce la muerte en la célula bacteriana ⁴².

También se ha demostrado que las lactonas y cumarinas, inhiben enzimas bacterianas como la DNA polimerasa y la timidilatosintetasa ⁴³.

En el caso de la acción de los fenoles y polifenoles, se debe, presumiblemente, a la inhibición enzimática por acción sobre los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos de cisteína, o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas ⁴³.

Asimismo los alcaloides pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas bacterianas debido al cambio de polaridad que altera la resistencia de la pared celular, inhibición de síntesis de ADN, ARN y proteínas⁴⁴.

Es así, que el presente trabajo se constituye en el primero en reportar el efecto antibacteriano de *Senecio truxillensis* Cabrera, contribuyendo así, a la necesidad mundial de encontrar nuevas fuentes naturales con potencial farmacológico.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

V. CONCLUSIONES

- El extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera, presenta los siguientes fitoconstituyentes: catequinas, azúcares reductores, lactonas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, aminoácidos, flavonoides, antocianidinas y alcaloides.
- El extracto hidroetanólico las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera a las concentraciones de 5%, 15% y 30% p/v presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con diferencias estadísticamente significativas.
- El porcentaje de inhibición del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera, frente a *Staphylococcus aureus* al 30% p/v es de 81.9% mientras que para *Escherichia coli* a la misma concentración es de 69.3%.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con la investigación de esta especie vegetal, sobre otras partes de la planta con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre su actividad antimicrobiana.
- Realizar el aislamiento y elucidación de las estructuras químicas de los componentes químicos presentes en la especie vegetal *Senecio truxillensis*, como la espectrometría (U.V., I.R., R.M.N.H+), H.P.L.C y electroforesis.
- Desarrollar estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo* de *Senecio truxillensis*

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2da, ed. Pontifica. Lima. Universidad Católica del Perú. Ed. Fondo. 1994; 1-6, 23-24, 393, 404.
2. Domínguez C. Fitoterapia. Medicina Natural. 2006. [Artículo en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Disponible en: <http://personal.redestb.es/martin/PFITO.HTM>
3. Organización Mundial de la Salud. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. Ginebra: OMS; 2002.
4. Akerele O. Plantas Medicinales y Atención Primaria de Salud: Un Calendario para la Acción. Boletín de medicamentos esenciales. 1990. pp. 8-9.
5. Sagrer S. Enciclopedia de la Medicina Natural .1era, ed. Vol.III. Ed. Zamora Editores S.A. Colombia. 1991. pp. 401,415-416.
6. Bueno M. Fitoterapia. Biosalud. Instituto Europeo de Biomedicina. 2012. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Disponible en: <http://www.biosalud.org/archivos/noticias/4311fitoterapia.pdf>
7. Avello M. Fitoterapia I. sus orígenes. características y situación en Chile. Rev. Med. chile. 138(10). 2010. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014
8. Montes M, Wilkomirskyy T. Compendio de Fitoterapia. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 1996. p. 4-9.
9. Araujo J, Salas R. Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. [Pages04-05]. Disponible en: http://www.ucsur.edu.pe/documentos/cientifica_06.pdf

10. Avalos A, Pérez E. Metabolismo secundario de las plantas. Educa (Biología). 2009. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. 2 (3). Disponible en: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
11. Bruenton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2 da, ed. Ed. Acriba S.A. España. 2001. pp. 306-307,405-406,776-778.
12. Torres C. y col. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de Farmacia “Reino de Aragón”. 2012. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. vol. 01: [Pages15-28]. Disponible en: <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>
13. Pérez C. Resistencia Bacteriana. Médicos Infectólogos de Bogotá. 2007. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. [Pages08-10]. Disponible en: http://www.susmedicos.com/art_Resistencia_Bacteriana.htm
14. Benavides L. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Organización Mundial de la Salud. 2011. [Acceso 15 de agosto del 2014]. [Pages01-03]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>
15. Greca A. La Resistencia Bacteriana y los nuevos Antibióticos. X Jornada de Medicina Interna. 2005. [Acceso 15 de agosto del 2014]. vol. 01. [Pages01-07]. Disponible: <http://www.amir.org.ar/ExPresidentes/Greca%20Resistencia%20bacteriana%20y%20nuevos%20atb.pdf>
16. Lujan C. Actividad Antibacteriana de Extractos Vegetales en Cepas Hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2006. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. [Pages 0110]. Disponible: <http://click.infospace.com/ClickHandler.ashxdu=dialnet.unirioja.es>.

17. Aland B. y col. Informe de la resistencia antimicrobiana en Hospitales en Perú. Instituto Nacional de Salud. 2007 [Acceso 15 de agosto del 2014]. vol. 4: [Pag 28]. Disponible:http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/Informe_Resistencia_2007.pdf
18. López J. *Escherichia coli*: Mecanismos de patogenicidad. 2005. [Artículo en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. [Pages15-28]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf>
19. Gil M. *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. 2000. Rev. Chile Infect. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014].17(2).Disponible:http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53_n3/pdf/A04v53n3.pdf
20. Bustos J. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. 2006. Rev. Biomed. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. vol. 17. [Pages 287-305]. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>
21. Li E. El futuro de los productos andinos en la región alta y en los valles centrales de los andes. Plantas medicinales .Informe Roadmapping Perú. 2006 (fecha de acceso: 14/08/2013). Disponible en: http://www.unido.org/fileadmin/import/69929_Informe_Informe_nacional_PERU.pdf
22. Beltrán H y col. Asteraceae endémicas del Perú. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. 2006. Rev. Peru. Biol. Ed. Blanca León et al. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. ISSN 1727-9933. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v13n2/pdf/a16.pdf>

23. Soriano M, Bonilla P, Arroyo J, Pereyra S. Actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de *Senecio culcitoides* Weed. Trabajo de investigación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2004. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/folia/vol15_n3/pdf/a04.pdf
24. Davicino R, Mattar M, *et al.* Actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en argentina. Rev. Perubiol. 2007. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. 14(2). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300011&lng=es&nrm=iso.ISSN 1727-9933
25. Tamariz C, Infantas D, Moreno P. Pruebas fitoquímicas y biológicas de algunas especies de *Senecio* del Parque Nacional Huascarán (Ancash-Peru). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima – Perú. 2001. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Disponible en: http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/123456789/540/2001_123.pdf?sequence=1
26. Lizarraga E, Catalán C, *et al.* Evaluación de la Actividad Antibacteriana de *Senecio nutans* Sch. Bip. (Asteraceae) sobre Estafilococos Coagulasa Negativa. XXV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Asociación de Biología de Tucumán. CONICET. Argentina. 2008. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Disponible en: http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?%20ames&id=27861&congreso_s=yes&detalles=yes&congr_id=790837

27. Matta La Hoz M. Screening fitoquímico, antimicrobiano y antioxidante de plantas pre-andinas y del altiplano chileno. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas departamento de Química Farmacológica y Toxicológica Laboratorio de Productos Naturales. 2009. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-matta_m/html/index-frames.html
28. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens Wedd* (*Wiskataya*). Universidad Nacional de Trujillo. Rev. Scientia Agropecuaria 2012. [Revista en Internet]. [Acceso 15 de agosto del 2014]. Vol. 3, núm. 4. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/90/22>
29. Quiroz C. Cerro Campana Trujillo - Perú. [Sede web]. La Libertad. 2008. [Acceso 11 mayo del 2015]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/avesentrujillo/>
30. Miranda M. y Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y productos naturales. Habana. Cuba. Universidad de la Habana. 2000. [Acceso 11 de mayo del 2015]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962009000300007&script=sci_arttext
31. Liu B. Evaluación de la Actividad Antibacteriana *in vitro* de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus sp.* “eucalipto”. 2010. [Acceso 15 de mayo del 2015]. [Pages 85-90]. Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art7_Vol2_N1-2.pdf
32. Miller JC, Miller JN. Estadística para Química Analítica. 2da, ed. Wilmington. Iberoamericana. 1993. p. 51.
33. Baldoceda. Marcha Fitoquímica de *Senecio rhizomatus*. 1996. [revista en internet] [acceso 11 de mayo del 2015]. disponible en: <http://aaa.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045388/?tool=pubmed>.

34. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptible testing. NCCLS approved standard M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. USA.
35. Ramírez, L. S. & H. E. Díaz. 2007. Actividad antibacteriana de extracto y fracciones de ruibardo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*. 13 (33):397-400.
36. Cushnie T. La actividad antimicrobiana de los flavonoides. [sciencedirect]* 2005 [acceso 11 de mayo del 2015]**; vol. 26: N° 5. [Pages 343-356]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857905002554>
37. Scalbert A. Propiedades antimicrobianas de taninos. [sciencedirect]* 2005 [acceso 11 de mayo del 2015]**; vol. 53: N° 2. [Pages 152-160]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229183426L>
38. Akiyama H. La acción antibacteriana de varios taninos contra *Staphylococcus aureus*. [Journal of Antimicrobial Chemotherapy]* 2001 [acceso 11 de mayo de 2015]**; vol. 48: N° 4. [Pages 487-491]. Disponible en: <http://jac.oxfordjournals.org/content/48/4/487.short>
39. Henao J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* H.B.K. Cultivada en el departamento del Quindío. [rev. invest. univ. quindio] [acceso 11 de mayo de 2015]**; vol. 19: [Pages 159-164]. Disponible en http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/f4d9_n1918.pdf
40. Díaz L. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. [Rev. Estudios Transdisciplinarios]* 2009 [acceso 11 de mayo del 2015]**; vol. 01: N° 2 [Pages 15-28]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1792/179214945004.pdf>

41. Molina L, Gómez M y Castañeda J. Contribucion al estudio fitoquimico de la especie *Sansevieria trifascia taprain* y su comportamiento frente a ensayos biológicos. Rev. Invest. Univ. Quimico. [revista en internet] [acceso 11 de mayo del 2015].disponible en:http://uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/b5c4_N22011.pdf.
42. Thoene A. Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). [Rev.Scielo]* 2008. [acceso 11 de mayo de 2015]**; vol. G13: N° 3. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000300006
43. Quesada I, Castañeda J y Bilbao M. Efecto antiparasitario de los extractos etanolicos y etereos de *Ficus obtusifolia Kunth* (moraceae) frente a parásitos de clase nematodos (toxocaracatis y toxocaracanis).Rev. Scielo.Infect. [revista en internet] [acceso 11 de mayo del 2015].disponible en: http://aaa.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922009000400004&script=sci_arttext.
44. Peña D. Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de *Siparuna sessiliflora*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá 2011 [acceso 08 de junio de 2015]. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8731/1/tesis672.pdf>

ANEXOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOTECNOLÓGICA

ANEXO 01

BOUCHER DEL EJEMPLAR DE HERBARIO DE LA ESPECIE DE

Senecio truxillensis Cabrera.

(Código HUT:50978)



ANEXO 02

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO



Fig 1. Ejemplar de *Senecio truxillensis*



Fig 2. Recolección de *Senecio truxillensis*



Fig 3. Secado de la muestra de *Senecio truxillensis*



Fig 4. Pulverización de hojas de *Senecio truxillensis*



Fig 5. Tamizaje de hojas de *Senecio truxillensis*



Fig 6. Tamizaje de hojas de *Senecio truxillensis*



Fig 7. Extracción en el equipo soxhelt

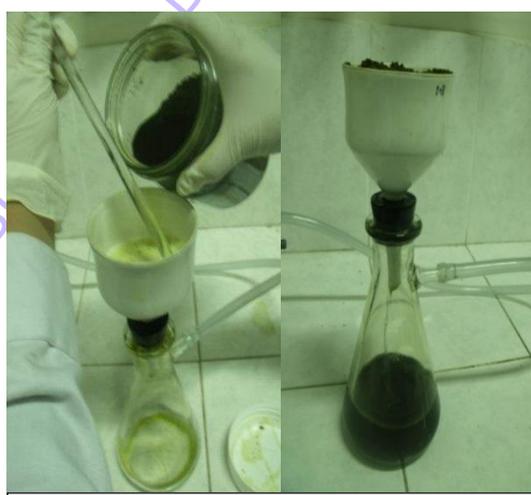


Fig 8 y 9. Filtración al vacío del extracto etanólico de las hojas de *S. truxillensis*.



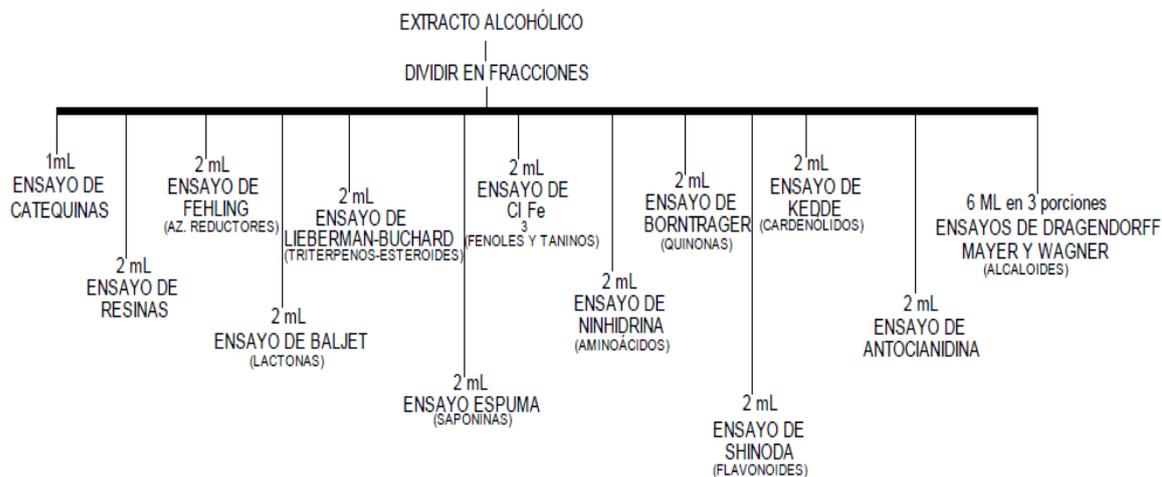
Fig 10. Extracto hidroetanólico seco de las hojas de *S. truxillensis*



Fig 11. Extractos hidroetanólicos de las hojas de *S. Tuxillensis*: 1.(5%),2.(15%),3.(30%).

ANEXO 03

Procedimiento del tamizaje fitoquímico según Miranda y Cuéllar



1. **Ensayo de catequinas:** Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.
2. **Ensayo de resinas:** Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.
3. **Ensayo de Fehling:** Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo.

Dicha mezcla es la que se adiciona a la lícua a evaluar.

4. **Ensayo de Baljet:** Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

5. **Ensayo de Lieberman-Burchard:** Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Importante: Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Lieberman-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

6. **Ensayo de la espuma:** Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

7. **Ensayo del cloruro férrico:** Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en

solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

8. **Ensayo de la ninhidrina:** Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua.

Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

9. **Ensayo de Borntrager:** Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

10. **Ensayo de Kedde:** Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos.

Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1- 2 horas. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

- Solución 1: Ácido 3.5 dinitrobenzónico al 2 % en metanol.
- Solución 2: Hidróxido de potasio al 5.7 % en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

11. **Ensayo de Shinoda:** Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

12. **Ensayo de antocianidinas:** Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

13. **Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en etanol, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

14. **Ensayo de Mayer:** Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2

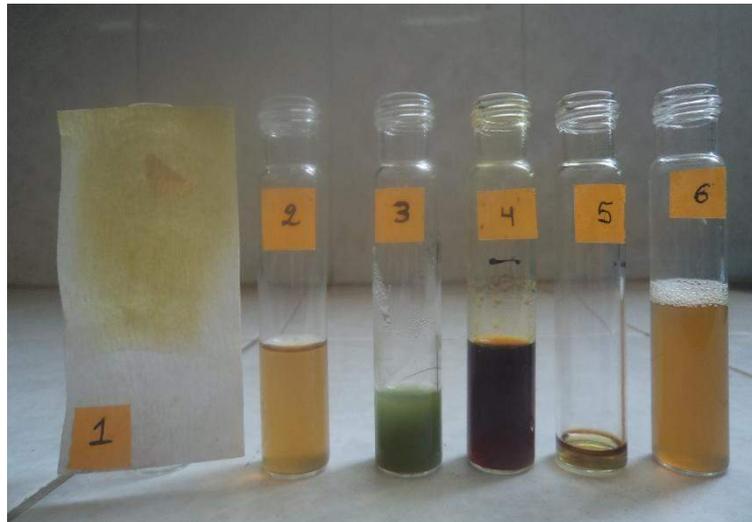
o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

15. Ensayo de Wagner: Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANEXO N° 04

MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *SENECIO TRUXILLENSIS* CABRERA.

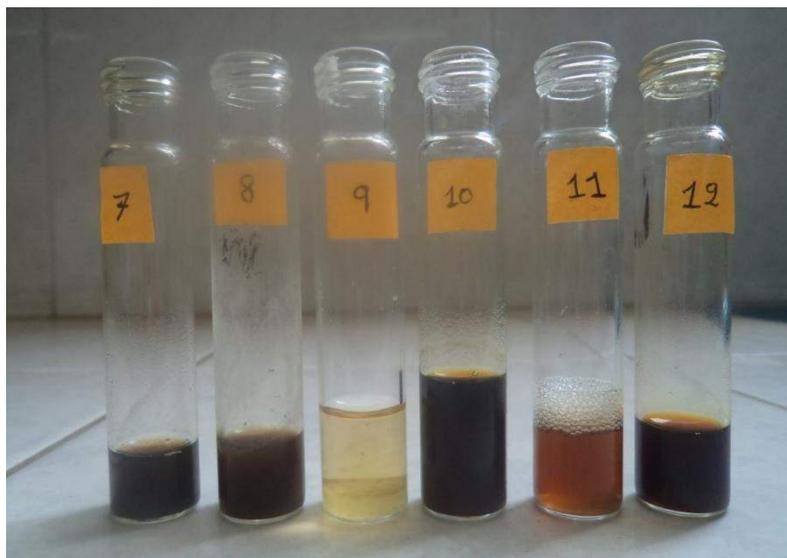


Reacciones químicas del extracto Hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera.

1. Catequinas (positivo); 2. Resinas (negativo); 3. Fehling (positivo); 4. Baljet (positivo); 5. Lieberman - Burchard (positivo); 6. Espuma (positivo).

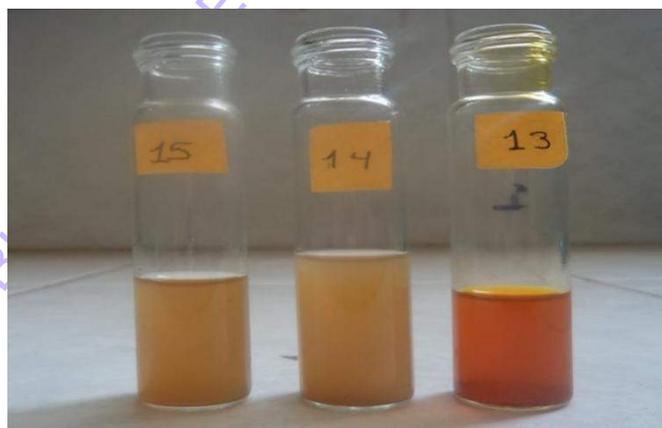


1. Catequinas (positivo): Presencia de fluorescencia del extracto hidroetanólico de *Senecio truxillensis* Cabrera, frente a luz UV(366nm)



Reacciones químicas del extracto Hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera.

7. Cloruro férrico (positivo); 8. Ninhidrina (positivo); 9. Bornträger (negativo). 10. Kedde (negativo); 11. Shinoda (positivo); 12. Antocianidinas (positivo).



Reacciones químicas del extracto Hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera.

13. Dragendorff (positivo); 14. Mayer (positivo); 15. Wagner (positivo)

ANEXO N° 05

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO



Fig 1. Cepas de bacterias Gram (-): *Escherichia coli* (ATCC 25992); bacteria Gram (+): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)



Fig 2. Cepas reactivadas en caldo Muller Hilton. Incubaron durante 18 h a 37°C.



Fig 3. Patrón de Turbidez de Mac Farland N° 0.5 (108 UFC/mL)

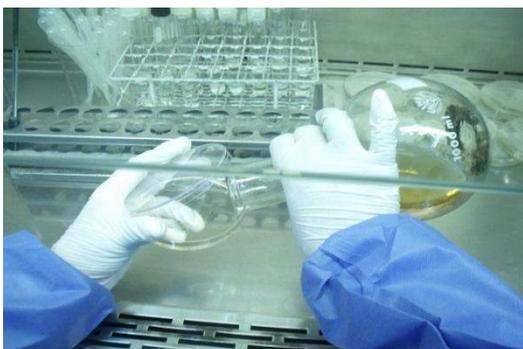


Fig 4. Sembrado de placas



Fig 5. Siembra de bacterias



Fig 6. Colocación de los extractos en las placas Petri con agar



Fig 7. Placas Petri con los extractos a las diferentes concentraciones



Fig 8. Incubación a 37 °C

ANEXO N° 06

ENSAYO MICROBIOLÓGICO

Escherichia coli (efecto antibacteriano *in vitro*)

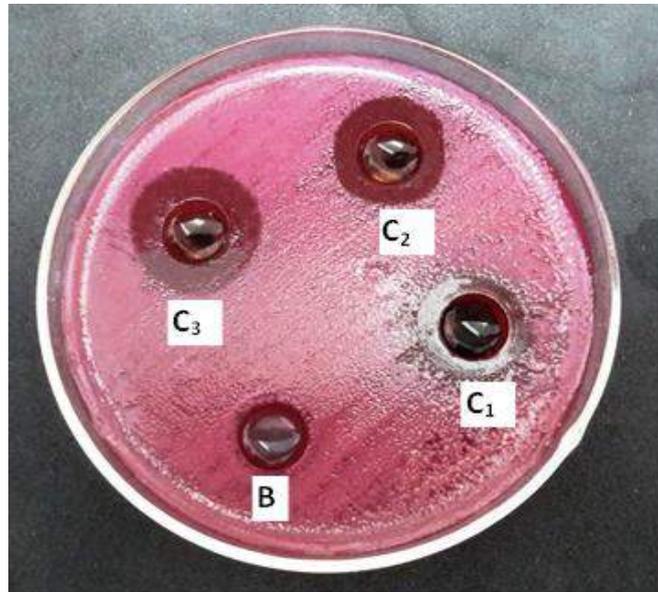


Fig. 1. B: Blanco; C₁: Concentración de *S. truxillensis* 5%; C₂: Concentración de *S. truxillensis* 15%; C₃: Concentración de *S. truxillensis* 30% frente a *Escherichia coli* (ATCC 25992). Agar Mc Conkey



Fig. 2. Halos de inhibición del cloranfenicol frente a *Escherichia coli* (ATCC 25992). Agar Mc Conkey

Staphylococcus aureus (efecto antibacteriano *in vitro*)

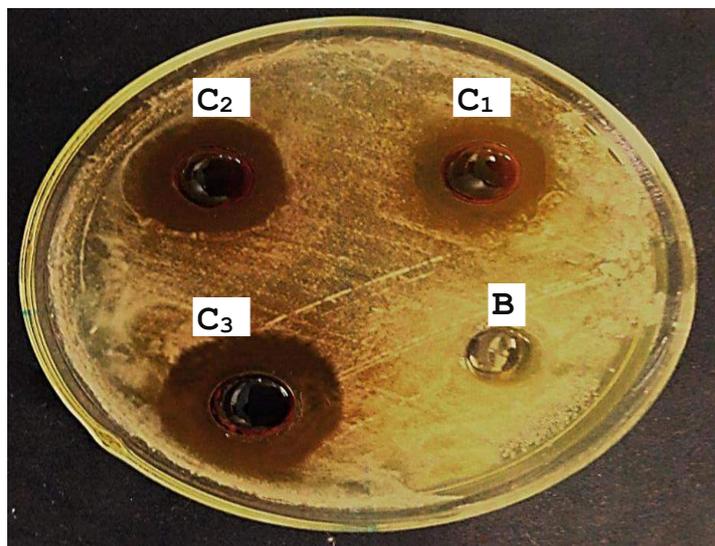


Fig. 3. B: Blanco; C₁: Concentración de *S. truxillensis* 5%; C₂: Concentración de *S. truxillensis* 15%; C₃: Concentración de *S. truxillensis* 30% frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Agar Tripticasa de Soya



Fig. 4. Halos de inhibición del cloranfenicol frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Agar Tripticasa de Soya

ANEXO N° 07

Tabla 1. Diámetro de halos de inhibición del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis*, del cloranfenicol y del dimetilsulfóxido.

Microorganismos	Halo de inhibición (mm)				
	Extracto hidroetanólico			Cloranfenicol 5 µg/mL	Dimetilsulfóxido
	5%	15%	30%		
<i>E.coli</i>	13.00	15	18.00	26.00	0
	12.00	15	18.50	26.30	0
	12.80	15.6	18.00	26.50	0
	13.30	15.5	19.00	26.50	0
	12.00	15.7	18.50	26.00	0
	12.50	15	18.00	26.00	0
	13.00	15.5	18.50	26.80	0
	13.00	15	18.00	27.00	0
<i>S.aureus</i>	15.00	18	23.90	29.60	0
	15.00	18	24.00	28.80	0
	15.00	18.5	23.80	29.50	0
	15.30	18.4	23.90	28.90	0
	15.00	18.3	23.40	29.60	0
	14.50	19	24.10	29.00	0
	15.00	19	23.80	29.60	0
	14.50	18.5	24.00	28.80	0

ANEXO N° 08

Datos estadísticos

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
<i>E.coli</i>	5%	8	12.7000	.48697	.17217	12.2929	13.1071	12.00	13.30
	15%	8	15.2875	.31368	.11090	15.0253	15.5497	15.00	15.70
	30%	8	18.3125	.37201	.13153	18.0015	18.6235	18.00	19.00
	Cloranfenicol	8	26.3875	.38336	.13554	26.0670	26.7080	26.00	27.00
	Total	32	18.1719	5.23809	.92597	16.2833	20.0604	12.00	27.00
<i>S.aureus</i>	5%	8	14.9125	.27484	.09717	14.6827	15.1423	14.50	15.30
	15%	8	18.4625	.38522	.13620	18.1404	18.7846	18.00	19.00
	30%	8	23.8625	.21339	.07545	23.6841	24.0409	23.40	24.10
	Cloranfenicol	8	29.2250	.38079	.13463	28.9067	29.5433	28.80	29.60
	Total	32	21.6156	5.52269	.97628	19.6245	23.6068	14.50	29.60

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>E. coli</i>	Inter-grupos	846.218	3	282.073	1817.208	.000
	Intra-grupos	4.346	28	.155		
	Total	850.565	31			
<i>S.aureus</i>	Inter-grupos	942.601	3	314.200	3032.351	.000
	Intra-grupos	2.901	28	.104		
	Total	945.502	31			