

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**“Evaluación de los Principios Activos de Senecio Calvus
en la Formación de Biopelículas de Pseudomonas
Aeruginosa”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magister en Microbiología

AUTOR

Jesús Christian Guillermo Florian Carrillo

ASESOR

Débora Alvarado Iparraguirre

Lima – Perú

2014

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra Lucy Ibañez Vasquez por el apoyo recibido con sus conocimientos, materiales y metodologías que me hubieran sido difíciles de obtener y comprender en su totalidad.

A la bióloga MSc. Débora Alvarado Iparraguirre por su guía y paciencia para poder finalmente completar este trabajo.

Al Dr. Cesar Fuertes Ruitón que me dio su ayuda en los primeros indicios sobre el material vegetal que podría utilizar para probar mi hipótesis.

A mi madre, mi padre y familia por su apoyo y darme fuerzas durante los obstáculos e inconvenientes que tuve durante el desarrollo de la tesis.

A mi colega biólogo Stephanie Montero Trujillo que me daba ánimos y aliento en momentos en que los necesitaba.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
Situación problemática	8
Justificación	9
Hipótesis	9
Objetivos	9
Variables	10
II. MARCO TEÓRICO	11
Biopelículas	11
Formación de una biopelícula	12
Resistencia intrínseca de las biopelículas bacterianas	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Extractos vegetales	19

Metabolitos secundarios	21
El género <i>Senecio</i>	21
Clasificación botánica de <i>Senecio calvus</i>	23
III. MATERIALES Y METODOS	24
Material biológico	24
Recolección	24
Tratamiento del material vegetal	24
Preparación de extractos	25
Fraccionamiento de extractos	25
Identificación de compuestos de los extractos	26
Pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI)	26
Pruebas de inhibición de formación de la biopelícula	28
Análisis de datos	28
IV. RESULTADOS	30
Extracción con solventes	30
Actividad antimicrobiana de los extractos	31
Pruebas de inhibición de biopelículas	31
Fracciones cromatográficas	33

Porcentaje de inhibición de las biopelículas	35
Identificación de metabolitos	37
Análisis de datos	38
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
IX. ANEXOS	63

RESUMEN

Los *biofilms* o biopelículas, comunidades complejas de microorganismos, se encuentran colonizando diferentes ambientes bióticos como abióticos; los problemas generados por estos son diversos en diferentes actividades humanas. Ya que las biopelículas son de difícil erradicación, se han planteado diversas formas de control en cada una de las etapas del ciclo de una biopelícula. Una de ellas es la interrupción de las moléculas de señalización del *quorum sensing*, sistema que regula el proceso de la formación de biopelículas, para tal efecto se están buscando actualmente tanto antagonistas sintéticos como de origen natural.

La presente investigación utiliza el *Senecio calvus*, una planta de uso medicinal, nativa del Perú. Se han expuesto extractos etanólico, butanólico, acuoso, metanólico y de diclorometano además de fracciones cromatográficas de *Senecio calvus* contra *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria oportunista muy utilizada debido a que es una bacteria que forma rápidamente biopelículas.

Se mezclaron los cultivos de *P. aeruginosa* en fase de crecimiento junto a los extractos y fracciones de *S. calvus* para determinar el grado de inhibición de las biopelículas; para tal efecto se usaron concentraciones subinhibitorias, previa prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI).

Los resultados arrojaron una inhibición de 92.9 y 76.4% en dos de los extractos y de hasta 88% en las fracciones cromatográficas, lo cual indica que *Senecio calvus* es un buen candidato para el aislamiento de una molécula inhibidora de biopelículas con potencial patentable.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, *Senecio calvus*, inhibición de biopelículas.

ABSTRACT

Biofilms are complex microorganisms communities; they are found colonizing different environments biotic as well as abiotic. Problems generated by these biofilms are diverse in all the different human activities. Since biofilms are difficult to eradicate, many different ways of control in each part of a biofilm cycle has been proposed. One of them is the disruption of signaling molecules of quorum sensing, a system that regulates the process of biofilm formation, to achieve that goal synthetic and natural antagonists are being searching currently.

This current research uses *Senecio calvus*, a traditional medicinal plant native of Peru. Extracts and chromatographic fractions of *Senecio calvus*, were exposed against *Pseudomonas aeruginosa* an opportunistic bacteria widely used in biofilm research because is a rapid forming biofilm organism, on which most initial studies have been made and the biggest breakthroughs have been achieve in that field.

Briefly, cultures of *P. aeruginosa* in growth phase were mixed with extracts and fractions of *S. calvus* to determine the degree of inhibition of biofilms, subinhibitory concentrations were used where corresponded as previously established by a minimum inhibitory concentration test (MIC).

Results indicate an inhibition of 92.9% and 76.4% en two of the extract and up to 90.9% in one of the fractions which indicates that *Senecio calvus* is a good candidate for isolation of an inhibitory molecule of biofilms with patenting potential.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Senecio calvus*, biofilms inhibition.

INTRODUCCIÓN

El estado de crecimiento bacteriano conocido como biopelícula o *biofilm* es la forma más común en que se les encuentra colonizando los diferentes nichos ecológicos que ocupan. Siendo este estado de crecimiento que usualmente adoptan, es también común encontrarlos de la misma manera en los procesos infecciosos donde participan ¹.

La manera en que se enfrentan las infecciones causadas por bacterias están actualmente diseñadas desde un punto de vista planctónico es decir, que han sido pensadas para atacar a las bacterias como si se trataran de individuos libres y no asociados, lo cual en algunos casos limita la terapia ². Las infecciones causadas por biopelículas comparten algunas características clínicas. Se desarrollan preferentemente en superficies inertes o en tejido muerto y aparecen comúnmente en dispositivos médicos implantados, también pueden formarse en tejido vivo como en el caso de la endocarditis. Las biopelículas crecen lentamente, en uno o más lugares y este tipo de infecciones a menudo no producen una mejora de síntomas. Las bacterias planctónicas secretan antígenos y estimulan la producción de anticuerpos, pero los anticuerpos no son efectivos para eliminar las bacterias dentro de la biopelícula, incluso en personas con un excelente estado inmunológico celular y humoral, la biopelícula no puede ser combatida eficazmente por los mecanismos de defensa ¹.

Pseudomonas aeruginosa, es una bacteria oportunista gramnegativa y patógeno intrahospitalario en pacientes con defensas inmunológicas deficientes o con brechas en las defensas físicas del cuerpo como heridas, quemaduras o úlceras de la córnea. Puede hallársele formando biopelículas en dispositivos médicos internos como prótesis, catéteres de las venas,

catéteres urinarios, válvulas cardíacas mecánicas, siendo también agente causal de la fibrosis quística en los pulmones ³.

El presente estudio tiene como objetivo encontrar una fracción cromatográfica de una planta nativa como es *Senecio calvus*, que sea capaz de inhibir la forma de crecimiento en biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria ampliamente utilizada en el estudio de biopelículas e importante patógeno oportunista intrahospitalario.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Situación problemática

En la naturaleza y en diferentes ámbitos de la actividad humana se pueden encontrar asociadas las biopelículas¹. Se sabe que estas causan un gran problema en la industria, se les puede hallar en las tuberías que conducen agua u otros líquidos, en tal caso las biopelículas que se forman pueden ser tan gruesas que llegan a colapsarlas y en el caso de superficies de metal, incluso aquellas de acero inoxidable, pueden acelerar el proceso de corrosión. Se sabe que durante los procesos industriales las biopelículas pueden interferir en el intercambiador de calor al reducir el flujo del enfriador e interferir con su función de enfriamiento de las maquinarias. Otro de los ambientes susceptibles a la contaminación con biopelículas es la industria alimenticia, en esta actividad, donde se utilizan una gran cantidad de nutrientes, casi todas las áreas son afectadas por las biopelículas como son las mesas de trabajo con alimentos o materia primas, maquinarias, pisos, ductos de ventilación entre otros por lo que la limpieza debe ser minuciosa⁴.

En el ámbito hospitalario están relacionadas a catéteres, implantes, tuberías de agua y heridas de pacientes con quemaduras, estas biopelículas adquieren gran importancia porque son una fuente de contaminación que pueden originar brotes intrahospitalarios, poniendo en riesgo la salud de los pacientes⁵.

Las biopelículas causan un problema en diferentes actividades y al ser altamente resistentes a diferentes tipos de antimicrobianos es que se buscan diferentes enfoques para su prevención y erradicación.

Justificación

En la actualidad se busca erradicar las biopelículas sin la necesidad de contar con un antibiótico u otro antimicrobiano que pueda generar resistencia a largo plazo, por tal motivo se necesitan encontrar inhibidores de biopelículas que no eliminen a las células en estado planctónico, sino que eviten o interrumpen la asociación en una biopelícula. Por tal motivo los productos de origen natural son una de las fuentes donde se vienen realizando investigaciones y que aun necesita explorarse extensamente.

Hipótesis

Existen compuestos en la asterácea *Senecio calvus* que son capaces de inhibir la formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos

O. General

Evaluar los principios activos de *Senecio calvus* en la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

O. Específicos

- ❖ Recolectar *Senecio calvus* y preparar extractos con diferentes solventes.
- ❖ Determinar la actividad antimicrobiana y capacidad inhibitoria de formación biopelículas de los extractos de *Senecio calvus* contra *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❖ Fraccionar los extractos con mayor efecto inhibitor y agruparlos en un *pool* de fracciones similares.

- ❖ Evaluar la capacidad antimicrobiana y de inhibición de la formación de biopelículas de las fracciones cromatográficas de *Senecio calvus* contra *Pseudomonas aeruginosa*

Variables

Variables dependientes: Concentración mínima inhibitoria, absorbancias, porcentaje de inhibición.

Variables independientes: Extractos crudos, diluciones.

II. Marco Teórico

Biopelículas

En la naturaleza los microorganismos existen en dos formas, una como células libres o planctónicas, la cual es la forma de crecimiento que es la que usualmente se nos viene a la cabeza y otra como células adheridas a un sustrato formando una comunidad o biopelícula. Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos adheridos a una superficie viva o inerte, encerradas en una matriz de exopolisacárido, dando origen a una asociación que involucra una o muchas especies, cuya organización asemeja a aquellas formadas por microorganismos multicelulares ¹.

La habilidad para formar biopelícula está presente en casi todas las bacterias conocidas, existen diferencias con respecto al periodo necesario para su formación, así como en la forma en que la biopelícula se organiza estructuralmente, sin embargo es necesario como requisito indispensable que exista una superficie adecuada y la presencia de nutrientes para que el proceso de formación de una biopelícula se inicie ^{6, 7}. En la naturaleza existen biopelículas de una sola especie y de dos o más especies, siendo estas últimas las biopelículas más comunes y extendidos, pudiendo formar una capa simple o una estructura tridimensional, siendo también este último caso la forma más frecuente de conformación ⁶.

La estructura de una biopelícula es altamente compleja en la que básicamente se distinguen dos componentes principales, una parte formada por los microorganismos y el exopolisacárido, y otra parte compuesta por canales por donde circulan agua, nutrientes y desechos. En esta conformación, donde se

encuentran microcolonias encapsuladas en una matriz y comunicadas por minúsculos canales, se evita que los factores ambientales externos como por ejemplo anticuerpos o antimicrobianos tengan poco acceso para alcanzar a los microorganismos y ejercer su acción. Además de otorgar resistencia ante factores externos la forma de organización de una biopelícula brinda facilidades para el intercambio genético horizontal y la formación de un cometabolismo entre las diferentes especies que la integran ⁸.

Formación de una biopelícula

La transición del estado planctónico al de agregación de una biopelícula ocurre a través de pasos más o menos definidos. En resumen la primera fase depende de la superficie, esta debe estar condicionada para recibir al microorganismo, una superficie lisa y sin ningún tipo de molécula adsorbida en ella es una superficie con poca probabilidad para dar inicio al proceso de formación de biopelículas, una superficie con moléculas en ella brindará las condiciones a la superficie para que el microorganismo colonizador pueda adherirse, no obstante esta adhesión es débil y puede ser revertida fácilmente. En la segunda fase el microorganismo utiliza estructuras de adhesión (*pili* y fimbrias) para adherirse irreversiblemente a la superficie condicionada; una vez adheridas ingresa a una tercera fase, donde los microorganismos empiezan a dividirse y a sintetizar y liberar moléculas de señalización o moléculas de quórum sensing (QS) para que atraiga a más microorganismos y así alcanzar un número crítico y dar inicio a la producción del exopolisacárido que será la matriz que las contendrá, las fases cuarta y quinta son similares a las de un organismo multicelular, en la cuarta fase tenemos el crecimiento y maduración de la biopelícula hacia los tres ejes del espacio, alcanzando un tamaño tanto cuanto lo permita la disponibilidad de

nutrientes y en la fase final con la biopelícula ya madura empieza la fase de desprendimiento de células en las capas más cercanas a la superficie donde estas se liberan al medio exterior en forma de microorganismo planctónico⁸⁻¹⁰ (Figura 1).

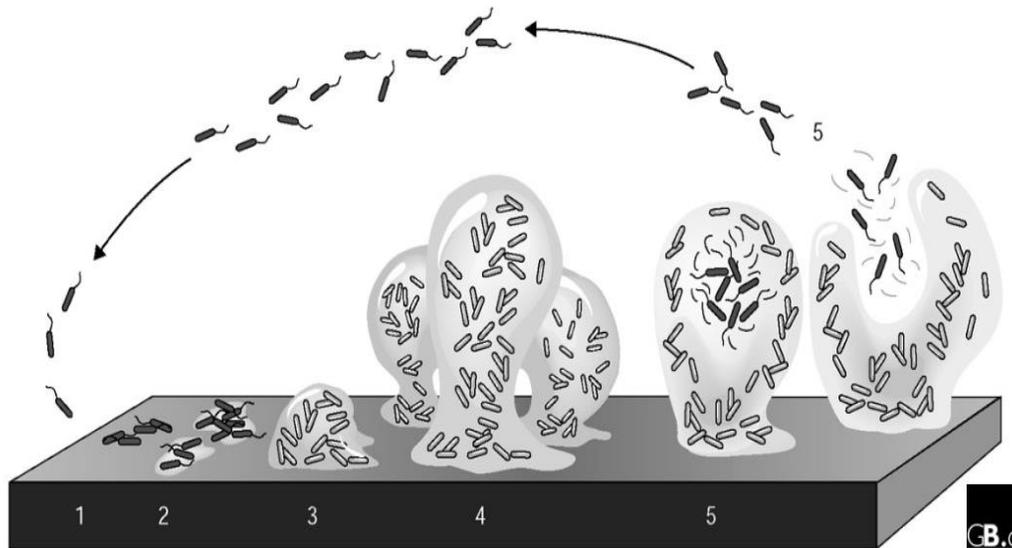


Fig 1. Proceso de formación y maduración de una biopelícula. (1) las bacterias se adhieren reversiblemente a una superficie. (2) las células se adhieren irreversiblemente y debido a la excreción del exopolisacárido y pierden sus flagelos (3) se desarrolla la forma de biopelícula. (4) la biopelícula alcanza la madurez con su arquitectura característica. (5) fase de dispersión con células saliendo de la biopelícula a colonizar otros espacios. Tomado de Sauer (2003)¹¹.

En *Pseudomonas aeruginosa* las señales de QS son muchas, podemos hallar las acil homoserina lactonas (AHL) que son autoinductores tipo 1 (AI1) del tipo furanona, también en mucho menor medida se hallan los autoinductores tipo 2 (AI2) derivados de tetrahydrofurano, estas dos señales son tipos de lactonas y también se encuentran los derivados de quinolina y de indol¹².

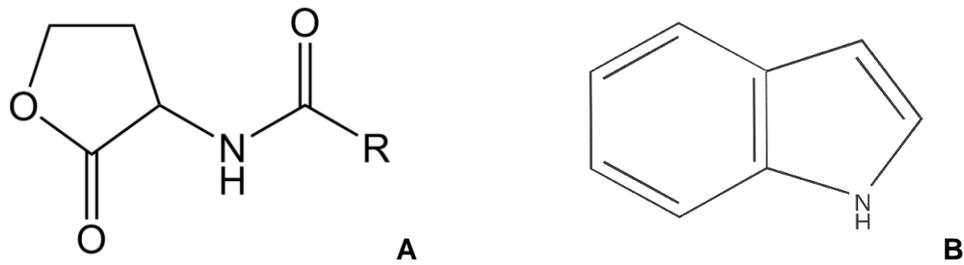


Fig 2. Dos de las principales moléculas señal en bacterias gramnegativas, el esqueleto de una acil-homoserina lactona con su parte variable R (A) y una molécula de indol (B). Fuente Google Imagenes.

La síntesis de moléculas y el control del sistema de QS están regulados en *Pseudomonas aeruginosa* por los sistemas genéticos *lasI-lasR* y *rhlI-rhI*. *LasI* está involucrado en la síntesis del autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL), esta molécula se une al receptor de membrana LasR en un ciclo que incluye la activación de otros genes *las* que participan en la virulencia como son elastasa, proteasas y exotoxina A y la formación de biopelículas y la propia síntesis del receptor. Este sistema de genes *las* y genes *rhl* están conectados de una manera jerárquica, siendo el sistema *lasI-lasR* el principal. El segundo sistema *rhlI-rhI* funciona de manera similar y sintetiza autoinductores muy parecidos al anterior, los cuales son N-butiril-L-homoserina lactona y en menor medida N-hexanoil-L-homoserin lactona que son sintetizadas por *rhlI* y que es controlado también por LasR y estos AI se unen al receptor RhIR que activa genes que sintetizan elastasa, proteasas, sideróforos y pociarina^{12 - 16}. Adicionalmente *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza otra molécula señal, la 2-heptil-hidrixi-4(1H)-quinolona llamada señal quinolona de *Pseudomonas* (PQA), un tercer sistema de señal que es producido por PqsA, PqsB, PqsC y PqsH y detectado por el regulador PqrS, este sistema activa también al sistema *rhlI-rhI*¹⁷.

Resistencia intrínseca de las biopelículas microbianas

Durante mucho tiempo se han utilizado agentes antimicrobianos para combatir infecciones asociadas a bacterias, como efecto secundario al uso de los antibióticos se ha observado el incremento de la resistencia a estos, dando como resultado la búsqueda de nuevos antibióticos que puedan combatir las infecciones resistentes, existen varios mecanismos de resistencia bacteriana, no obstante recientemente se ha incluido una nueva forma que no había sido considerada por mucho tiempo, la formación de biopelícula se ha reconocido como un factor de virulencia para patógenos oportunistas y verdaderos patógenos ¹⁸.

Los agentes antimicrobianos usados frecuentemente frente a las infecciones bacterianas actúan ejerciendo un efecto bacteriostático o bactericida a diferentes niveles. Uno de los problemas principales relacionados es que las bacterias obtienen resistencia frente estos efectos por medio de diferentes mecanismos, lo cual resulta en cambios en el genoma bacteriano produciendo bacterias resistentes, las cuales transmite esta información a otras bacterias generándose rápidamente una población resistente que representa un serio problema de farmacoterapia ^{19,20}. De otro lado en una biopelícula la tasa de crecimiento de las poblaciones es diferente, siendo en su interior más reducida, lo que también contribuye a su resistencia a fármacos ²¹. Otro mecanismo de resistencia relacionado con las células de las biopelículas es la diferencia en los ciclos celulares y metabolismos de los microorganismos que lo conforman. Como se sabe los antibióticos actúan eficazmente frente a células en división y crecimiento, en una biopelícula el crecimiento es lento sobretodo en las capas más profundas. De otro lado el metabolismo también varía verticalmente en la biopelícula debido a una gradiente de nutrientes y oxígeno disponibles, al ser una

gradiente desde las capas superiores a las inferiores, se generan fenotipos distintos, con lo cual algunos microorganismos entran en un estado de dormancia o estrés en el que varias funciones celulares son suprimidas ²².

Con respecto a las poblaciones celulares al interior de la biopelícula se ha de señalar la existencia de células persistentes que comprenden a una fracción del total que exhiben una resistencia a antibióticos sin sufrir ningún tipo de cambio genético, se cree que estas células entran en este estado de resistencia por medio del arresto de la síntesis de proteínas controladas por toxinas propias de la bacteria ²⁰.

El exopolisacárido es una matriz consistente en una mezcla de polisacáridos, proteínas y ADN extracelular que se encarga de mantener la integridad de la biopelícula ²³, es el elemento que se cree es el principal responsable de la resistencia de esta y en efecto, la presencia de esta capa protectora que cubre a la población microbiana de la biopelícula es una barrera física que debe cruzar cualquier agente antimicrobiano, se cree que actúa de tres formas distintas; como barrera de difusión, como tamiz de moléculas y como adsorbente ^{8, 24, 25}, de allí el hecho de su diferencia metabólica en los diferentes niveles de la biopelícula. Esta matriz está constituida en *Pseudomonas aeruginosa* por una mezcla de tres polisacáridos que son Psl, Pel y alginato, cuya proporción varía según el origen de la cepa. Psl es un polisacárido rico en manosa y galactosa, Pel es rico en glucosa, pero también posee otros carbohidratos aun no bien determinados y alginato que es el principal en aislados de pacientes con fibrosis quística ^{23, 25}.

Pseudomonas aeruginosa

Una de las bacterias de mayor capacidad de adaptación y con un metabolismo muy versátil es *Pseudomonas aeruginosa*. Es una bacteria Gram negativa, bacilar, móvil con flagelo polar, aeróbica; aunque puede crecer a muy bajas concentraciones de oxígeno; se le puede hallar en una gran diversidad de ambientes naturales y artificiales ^{26, 27}.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista altamente virulenta, que causa infecciones crónicas y agudas, es una de las más aisladas del ambiente hospitalario sobretodo en las salas de cuidados intensivos y con una alta tasa de mortalidad asociada a ella entre pacientes inmunosuprimidos e inmunodeprimidos ²⁸. Posee una alta resistencia inherente al calor y desinfectantes, así como también a varios agentes antimicrobianos y en la actualidad las cepas multidrogasresistentes (MDR) se ha incrementado notablemente. No solamente es un problema en ambientes intrahospitalarios, recientemente se le ha encontrado asociado a infecciones pulmonares en la comunidad, así como también se ha reportado la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* MDR en suelos contaminados con hidrocarburos ²⁹.

Las personas más susceptibles a *Pseudomonas aeruginosa* son aquellas que están con el sistema inmune comprometido o con la barrera de defensa primaria como la piel dañada debido a una herida extensa o a una quemadura grave, siendo este último caso bastante especial y de cuidado puesto que la infección local da un ambiente húmedo y caliente que facilita la penetración de la bacteria hacia el torrente sanguíneo y esto se desarrolla rápidamente en una septicemia. Además de otras infecciones como infecciones urinarias, del tracto respiratorio y pulmonares, la importancia de una infección por *Pseudomonas*

aeruginosa radica en su dificultad a ser tratada por antibióticos, que como se dijo anteriormente es debido a su capacidad inherente de resistencia a estos agentes y también en que tiene una gran facilidad para cambiar del modo de vida planctónico al de estado de biopelícula ³⁰⁻³².

Las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa existe en la naturaleza ya sea como bacteria en estado libre o como asociada a un sustrato formando una biopelícula. Este último es un estado que todas las bacterias asumen para protegerse de las condiciones medioambientales adversas. Debido a que *Pseudomonas aeruginosa* tiene la habilidad de adherirse a una gran cantidad de sustratos, se le puede encontrar tanto en rocas y plantas como en catéteres y membranas de diálisis. La remoción de las biopelículas de estas superficies es muy difícil y resulta en la persistencia del microorganismo en los instrumentos y en la posterior infección de los pacientes.

La formación de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* ha atraído mucha atención, especialmente en relación a los pacientes que sufren de fibrosis quística, donde se le ha visto estrechamente relacionada y también por estar involucrada en los casos de otitis media. Forma biopelículas en los pulmones de los pacientes de fibrosis quística causando daño el colapso posterior del órgano. El peligro con las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* es que son extremadamente difíciles de erradicar con los tratamientos convencionales de antibióticos debido al doble mecanismo de resistencia que poseen ³³.

Una característica importante de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* es que esta depende mucho de su motilidad, la cual define no solo su

capacidad de establecerse en ambientes diferentes, sino en la forma en que las biopelículas conforman su estructura interna, lo cual junto a su flexibilidad metabólica lo hacen un colonizador eficaz de diferentes nichos ecológicos ³⁴.

Extractos Vegetales

El uso de plantas como medicina tradicional en el tratamiento de varias enfermedades data de mucho antes del descubrimiento de la existencia de los microorganismos. Actualmente los productos vegetales han hallado una amplia aplicación como alternativas a la terapia convencional y a la preservación de alimentos. Generalmente los aceites esenciales de las plantas se han usado ampliamente para el tratamiento de una gran cantidad dolencias, es por ello que muchas plantas aromáticas han atraído sobre si bastante interés científico. La utilización de extractos vegetales ha ganado popularidad también debido a los diferentes compuestos bioactivos cuyas propiedades antimicrobianas tienen una amplia aplicación en la industria farmacéutica. Los extractos vegetales de una variedad de especies, incluyendo hierbas comunes están bajo un extenso estudio en un esfuerzo para aislar y caracterizar sus compuestos bioactivos. Las hierbas culinarias y de infusiones poseen propiedades que se han explotado tradicionalmente en el tratamiento de diversos males en la medicina popular de todas las culturas. Sin embargo hay poca evidencia científica de algún beneficio específico de estas plantas, además de ello muchos estudios científicos parecen contradecirse y los resultados no son comparables ³⁴.

La medicina tradicional se ha valido de diferentes especies de plantas para el tratamiento de malestares desde tiempos remotos y es parte de la tradición de todas las culturas y en la actualidad se vienen rescatando estas tradiciones como un retorno al uso de lo natural por encima de la medicina de síntesis ³⁵. En nuestro

país está bien documentado el uso de plantas medicinales desde épocas pre-colombinas y en la actualidad se reconocen más de 1400 plantas de uso curativo en el Perú ³⁶.

Las plantas medicinales son fuentes naturales de compuestos que pueden ser utilizados contra muchas enfermedades en la actualidad. Varios estudios se han realizado para el descubrimiento de drogas antimicrobianas o en la dilucidación de las propiedades medicinales de diferentes plantas, no obstante estos estudios no bastan para cubrir la integridad de la biodiversidad de las especies usadas en la medicina tradicional ³⁷.

Se han realizado diferentes estudios con plantas, algas y hongos en todo el mundo, que inhiben la formación de biopelículas. El estudio pionero es el uso de lactonas halogenadas de un alga roja *Delisea pulchra* ³⁸ a partir de esa experiencia los investigadores han estado en búsqueda de inhibidores naturales de biopelículas de diversas especies de plantas, algas y hongos y en el transcurso se han encontrado de que no solamente las lactonas pueden ser inhibidoras, sino también moléculas como flavonoides y polifenoles ^{16, 39}. Dentro de las especies que se han estudiado se hallan jengibre o kión (*Zingiber officinalis*) cuyo extracto de tolueno inhibe entre 39-56% la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ⁴⁰, *Betula pendula* con una inhibición entre 42.8-80% en biopelículas de *Escherichia coli* ⁴¹.

En nuestro país, el estudio de plantas es realizado desde hace mucho tiempo, como consecuencia de esto se han hallado diferentes efectos de plantas por ejemplo en el campo médico como antitumorales, actividad citotóxica a células cancerígenas, antiinflamatorios, actividad cicatrizante, entre otros; asimismo las investigaciones van dirigidas a otros campos como por ejemplo el

control de plagas agrícolas ^{42 - 46}. En el presente estudio, las propiedades antimicrobianas de *Senecio calvus*, una hierba en particular que se utiliza en la medicina tradicional peruana (en forma de infusión), es investigada contra la forma bacteriana planctónica y en el de *biopelícula* de *Pseudomonas aeruginosa*, como candidato para su control.

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que se generan en las plantas como productos del metabolismo normal, sin embargo estos compuestos no intervienen en funciones principales como el crecimiento, reproducción o fotosíntesis; lo que si se conoce es que poseen una función ecológica, es decir toman parte en la interrelación con otros organismos. Una de las funciones más reconocidas de los metabolitos secundarios es la de actuar como un sistema de defensa contra insectos, bacterias, virus y parásitos como también contra plantas que le son una competencia directa. La acumulación de metabolitos secundarios se realiza en diferentes partes de la célula y de la planta ^{47, 48}.

Con respecto a los metabolitos secundarios del género *Senecio*, se han podido encontrar diversos compuestos tales como lactonas, flavonoides, taninos, terpenos, etc, salvo las antocianinas y antracenos, este género parece tener todos los demás tipos de metabolitos descritos en plantas ^{43, 49}.

El género *Senecio*

Las especies de la familia de las asteráceas son conocidas por presentar lactonas en su composición e incluso fueron usadas anteriormente como marcadores en estudios evolutivos ^{50, 51}. El género *Senecio* agrupa a una gran

cantidad de especies cuyo mayor número se encuentran en el Perú ⁵², se considera al género *Senecio* como la más distribuida y amplia de todas las asteráceas con interés ecológico y económico ⁵³. Las especies presentes en el Perú muestran gran diversidad y una distribución que abarca diferentes altitudes entre la costa y la sierra en diferentes nichos ecológicos, alcanzando su mayor variabilidad en hábitats andinos; variando desde hierbas anuales a perennes rizomatosas, arbustos sufrutescentes o arbustos. Las hojas son basales, caulinares, o ambos tipos ⁵¹.

Estas especies que se hallan en la costa y sierra del Perú son denominadas comúnmente bajo el mismo nombre común de “Huamanrripa” o “Huirahuirah” y comparten características morfológicas similares (*Senecio calvus*, *S. tephrosioides*, *S. comosus*, *S. rhizomattus*, *S. klatti*, etc). Existen unas 106 especies del género en nuestro país que representa aproximadamente el 60% de la diversidad de *Senecio* en Sudamérica. Su empleo está relacionado principalmente como antitusígeno y para procesos respiratorios en forma de infusión, en general las plantas de este género son utilizadas también como antiinflamatorios, antimicrobianos y analgésicos ^{54, 55}. Entre las especies de *Senecio* que se han descrito como utilizadas en la medicina tradicional se hallan *Senecio canescens*, *S. chionogeton*, *S. mathewsii*, *S. rudbeckiaefolius* y *S. tephrosioides* ⁵⁶.

Senecio calvus es una planta de la familia de las asteráceas (Compositae), es un arbusto de hojas lanceoladas-lineales con flores amarillas o blancas con una altura media de aproximadamente 30 cm. La especie *Senecio calvus* ha sido descrito hasta la fecha solamente en el Perú en el departamento de Ancash, de allí la importancia de su estudio ⁵⁷.

Clasificación botánica de *Senecio calvus*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub Clase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Senecio*

Especie: *calvus*

Según el sistema de clasificación taxonómica de Cronquist.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, una cepa estándar que se usa para probar actividad antimicrobiana y con capacidad de formar biopelículas.

El material vegetal usado correspondió a *Senecio calvus*, utilizada en la medicina folclórica.

Recolección

La colecta se realizó en las inmediaciones de la ciudad Huaraz a 3500 msnm durante el mes de abril del año 2010 al final del periodo de lluvias, se colectaron aproximadamente 8.3 kg de *Senecio sp.*, y se procedió a la identificación taxonómica. Del total recogido 4.9 kg pertenecieron a *Senecio calvus* y el resto a otras especies del mismo género.

La identificación fue realizada por el biólogo especialista en botánica José Campos, miembro del equipo del herbario del Museo de Historia Natural Javier Prado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo A).

Tratamiento del material vegetal

El material identificado como *Senecio calvus* fue lavado con agua destilada, llevado a un horno a 35°C por un día y luego dejado al aire libre por tres semanas más hasta quedar completamente seco. Luego de ese tiempo, se utilizaron todas las partes aéreas que fueron pasadas por un molino mecánico para triturar el material, se repitió el procedimiento nuevamente con el material triturado por primera vez hasta obtener un polvo más o menos fino y este polvo fue

tamizado con una rejilla de 0.5 mm de malla para separar el material más grueso y obtener finalmente el material reducido a polvo fino ^{58, 59}.

Preparación de extractos

Los extractos fueron procesados según Adebajo *et al.* ⁶⁰, con una variación en la cantidad y tipo de solventes, manteniendo la proporción, esto es considerando que otros estudios con el género *Senecio* y otras asteráceas usan proporciones solvente-material seco distintas ^{43, 59, 61, 62}. Brevemente, el polvo fino fue pesado y se obtuvo 970 g, se repartió 200 g en sendas botellas oscuras para ser tratado con 1 L de metanol, diclorometano, butanol, etanol (1:5 w/v) y 170 g en agua (1:5.8 w/v). Las botellas fueron dejadas por cinco días en oscuridad y fueron agitadas suavemente 2 veces diariamente durante 15 minutos a lo largo del lapso transcurrido (Anexo B). Transcurrida la semana se extrajo el líquido de cada mezcla, filtrando primero a través de una tela fina nueva para separar la parte más espesa de la mezcla y luego pasando el líquido filtrado a través de papel filtro Whatman, este procedimiento se realiza para deshacerse de la mayor parte de partículas que hayan quedado. Los filtrados se extendieron en placas Petri y se dejaron secar al ambiente y en incubadora a 40 °C durante el tiempo necesario hasta que hayan quedado completamente secos ⁵⁹. Finalmente se rasparon las placas y se pesaron para ser transferidas a viales con tapa rosca donde se disolvieron con DMSO para poder realizar las pruebas microbiológicas respectivas.

Fraccionamiento de extractos

El proceso de fraccionamiento fue llevado a cabo por el laboratorio de Medicina Tradicional y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad

San Martín de Porres (USMP), para tal efecto se utilizó una columna de silica gel 60 (Anexo C), sugerido por la Dra Lucy Ibañez (comunicación personal), por la que se fraccionaron 1 g de los extractos seleccionados (diclorometano y metanólico) con un sistema de solventes de n-hexano:diclorometano:metanol (2:2:1). Luego se realizó una cromatografía en capa fina cada cantidad de eluato y observar los patrones de corrida y de esa manera poder agrupar de mejor manera las fracciones que se iban a utilizar para las pruebas posteriores, de acuerdo a su perfil de corrida, de esta manera se aseguraba de que la separación fuera lo mejor segregada posible^{63,64}.

Identificación de compuestos de los extractos

Las fracciones que lograron algún efecto significativo fueron usadas para realizar pruebas de identificación de metabolitos que usualmente son inhibidores de biopelículas, mediante las pruebas bioquímicas de Shinoda (flavonoides), cloruro férrico (compuestos fenólicos), Luz ultravioleta y Baljet (lactonas) e hidroximato (cumarinas)⁶⁵.

Pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Antes de iniciar con las pruebas de inhibición de las biopelículas, se realizaron pruebas de CMI para verificar hasta que concentración los extractos poseen, si la tienen, efecto antimicrobiano para poder trabajar a subconcentraciones en las pruebas de inhibición. Las pruebas se realizaron con el método de microdilución en placas. Se sembraron microplacas con cultivos frescos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en caldo tripticasa de soya (TSB) a la densidad 1 de MacFarland⁶⁶. Cada pocillo fue llenado con 100 µL de

cultivo y se le enfrentó con la misma cantidad de extracto en DMSO (dimetilsulfóxido) a concentraciones de 200 mg/mL respectivamente para los extractos acuoso, butanólico, metanólico, de diclorometano y etanólico por triplicado en la primera fila y de allí se hicieron las diluciones respectivas, dejando una última fila como control sin extractos. Se llevó a incubar toda la noche a 37°C y las lecturas se hicieron observando los pocillos, se tomó por concentración inhibitoria aquella que clarificó los pocillos en comparación a los pocillos de control. Las fracciones que tenían un ligero color terroso se comparó por la claridad que se puede apreciar cuando existe la inhibición con respecto a un pocillo no inhibido donde se observa opacidad⁶⁷.

Pruebas de Inhibición de formación de la biopelícula

Las pruebas de inhibición de biopelícula se realizaron de manera muy similar a las de CMI, pero se hicieron desde concentraciones subinhibitorias o desde la concentración total del extracto si es que la CMI no fue obtenido en las pruebas previas.

Para analizar el efecto de extractos y fracciones del material vegetal, se realizaron ensayos adaptados del utilizado por O'Toole y Kolter. Se dejaron las microplacas en incubación durante 24 hrs antes de ser leídas, para realizar las lecturas primero se eliminó el contenido de toda la placa y se lavó con agua destilada tres veces, luego se llenaron los pocillos con 100 µL de cristal violeta al 0.8% y se dejó reposando durante 30 minutos, transcurrido ese tiempo se volvieron a lavar las placas y se le añadió 100 µL de DMSO a los pocillos para solubilizar el cristal violeta contenido en las biopelículas que se han formado en los pocillos, se dejó reposar la placa por lo menos durante 30 minutos antes de poder ser leído para darle tiempo al cristal violeta a que se solubilice. Finalmente las

placas se llevaron al lector de placas y se midieron a 598 nm de longitud de onda con una agitación previa de 5 segundos en modo de lectura *end-point* (punto final)⁶⁸.

Las placas podían ser releídas 24 horas después del tratamiento siempre y cuando hayan sido conservadas en oscuridad y tapadas a temperatura ambiente, dando resultados casi idénticos a los obtenidos en la primera lectura, pasado ese tiempo la lectura iba variando poco a poco conforme los días pasaban. Este experimento se realizó para conocer si la lectura podría esperar por más tiempo si es que no se podía realizar la inmediatamente por algún motivo (Anexos D-G).

Análisis de datos

Los análisis de datos se realizaron midiendo el porcentaje de inhibición de las biopelículas a partir de los pocillos de control que son tomados como el 100% de formación y 0% de inhibición:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = (\text{Abs de pocillo evaluado}/\text{Abs de control}) \times 100$$

No fue necesario tomar los datos del DMSO para establecer la absorbancia de fondo, porque los valores del DMSO son casi idénticos al valor de referencia de un pocillo limpio y vacío, el valor de una lectura de un pocillo vacío osciló entre 0.001 y 0.005 mientras que un pocillo llenado con 100 µL de DMSO puro el valor es entre 0.003-0.008 aproximadamente, debido a que se está tomando para cálculos solamente las primeras 2 décimas de los valores de absorbancia, no fue necesario tomarlo en consideración ya que solo influye en aproximadamente 0.25 y 1% en el porcentaje final. Todos los valores fueron por triplicado y se realizó un promedio de los valores para obtener el porcentaje de inhibición.

Las pruebas estadísticas que se aplicaron fueron el test de Kruskal-Wallis para la comparación entre diversas fracciones utilizándose un valor alfa=0.95 y las prueba de Mann-Whitney para la comparación entre grupos de fracciones inhibitorias versus no inhibitorias.

Para el procesamiento de datos y diseño de cuadros se utilizaron los programas STATA 12.0 y Microsoft Excel 2010.

IV. RESULTADOS

Las pruebas con los extractos y filtrados cromatográficos de *Senecio calvus* llevó al aislamiento de algunas fracciones que contienen inhibidores de la formación de biopelículas, las cuales en las concentraciones en las que fueron trabajadas no permiten sospechar que los resultados de las pruebas de inhibición se hayan debido a la disminución de la población por efecto antimicrobiano ya que las concentraciones usadas fueron menores a las halladas durante las pruebas de CMI. Antes de dar los valores de este resultado final, se presentarán los resultados de las actividades previas que llevaron a los datos del objetivo principal del presente estudio.

Extracción con solventes

Una vez totalmente secadas las placas Petri que contenían los extractos, se procedió a pesarlos y guardarlos antes de ser utilizados, la cantidad resultante del peso seco de los extractos y el rendimiento de la extracción se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Pesos finales de los extractos secos de *Senecio calvus* y porcentajes correspondientes de los extractos obtenidos.

Solvente	Peso final del extracto seco (g)	Porcentaje de extracto obtenido
Agua	1.91	1.12
Metanol	2.75	1.37
Etanol	2.53	1.27
Butanol	2.80	1.40
Diclorometano	3.15	1.58

Actividad antimicrobiana de los extractos.

Los extractos en suspensión fueron utilizados para realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) en microplacas, todos los extractos fueron guardados a 4°C antes y después de su uso, los resultados del CMI se dan en la tabla 2. Se observa que todos los extractos a excepción del butanólico, no tuvieron actividad mínima inhibitoria a la mayor concentración trabajada. Las concentraciones fueron diluciones seriadas de 100, 50, 25 y 12,5, 6,25, 3.125 y 1.56 mg/mL.

Tabla 2: Valores MIC de los extractos de *Senecio calvus* enfrentados a *Pseudomonas aeruginosa*

Extracto	Valor del CMI en mg/mL
Acuoso	>100
Metanólico	>100
Etanólico	>100
Butanólico	100
Diclorometano	>100

Los valores de CMI de la tabla 2 fueron utilizados como referencia para luego ser usados en el siguiente paso que es el de prueba inhibición de formación de biopelículas.

Pruebas de Inhibición de formación de biopelículas.

De los cinco extractos preparados, solamente cuatro tuvieron efecto inhibitor sobre la formación de biopelícula (el extracto etanólico no tuvo efecto significativo), y solamente dos fueron los que tuvieron una inhibición mínima significativa los extractos de diclorometano y de metanol, se tomó como inhibición

importante a un valor porcentual de alrededor del 50% a más siguiendo el modelo de Persson y colaboradores ¹⁴, siendo el extracto metanólico el que tuvo la mayor inhibición (92.9%) a la máxima concentración probada de 100 mg/mL y fue bastante significativa hasta una concentración de 12.5 mg/ml.

De otro lado en el caso del extracto con diclorometano la inhibición más alta se obtuvo desde los 100 mg/mL (76.4% de inhibición) hasta los 50 mg/mL (41.2%), en la tabla 3 se observan los promedios de las inhibiciones expresados en porcentajes para cada concentración. Cada una de las concentraciones fue medida por triplicado y se obtuvo el promedio de estas para los valores de inhibición. Los valores de medición de todas las absorbancias se encuentran en las tablas de los anexos, correspondientes a los extractos realizados.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* por extractos de *Senecio calvus*. Los valores en negativo son valores de no inhibición, esto es con valores de absorbancia superiores a los controles.

Concentración					
(mg/ml)	Acuoso	Etanólico	Metanólico	Diclorometano	Butanólico
100	19.8%	6.6%	92.9%	76.4%	-
50	22.2%	4.6%	72.6%	41.2%	20.4%
25	20.4%	9.4%	50.7%	29.3%	18.1%
12.5	20.9%	-4.1%	44.0%	-9.43%	7.5%
6.25	-8.1%	-3.0%	22.4%	-14.8%	-2.5%
3.125	-12.3%	-18.6%	-15.2%	-18.5%	-5.1%
1.562	-4.9%	-19.0%	-9.03%	-20.5%	-9.6%
0.781	-	-	-	-	-4.6%

Fracciones cromatográficas

Los extractos metanólico y de diclorometano fueron pasados por una columna de silica gel 60 como se ha descrito más arriba y se agruparon las fracciones de acuerdo a un patrón de separación en capa fina, dando como resultado las fracciones que se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna

Fracciones metanólicas	Fracciones de diclorometano
M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8	D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D15 y D16.

Estas fracciones fueron puestas a prueba para realizar CMI y las pruebas de inhibición, en los siguientes cuadros se observan las cantidades obtenidas de las fracciones cromatográficas una vez secas (Tablas 5 y 6) y las respectivas concentraciones iniciales con las que se realizaron las pruebas de inhibición.

Tabla 5. Peso de las fracciones cromatográficas del extracto metanólico secado para eliminar los solventes.

Fracciones de extracto metanólico			
Vial	Código	Peso	Concentración
1	M1	4.4 mg	1.46 mg/mL
2	M2	7.3 mg	2.43 mg/mL
3	M3	14.1 mg	4.70 mg/mL
4	M4	5.4 mg	1.80 mg/mL
5	M5	8.73 mg	1.74 mg/mL
6	M6	9.9 mg	2.91 mg/mL
7	M7	10.4 mg	3.46 mg/mL
8	M8	11.8 mg	3.93 mg/mL

Tabla 5. Peso de las fracciones cromatográficas del extracto diclorometano secado para eliminar los solventes.

Fracciones de extracto de diclorometano			
Vial	Código	Peso	Concentración
1	D1	0.02 mg	No se realizó
2	D2	6.5 mg	2.17 mg/mL
3	D3	3.2 mg	1.06 mg/mL
4	D4	9.3 mg	3.10 mg/mL
5	D5	1.0 mg	0.33mg/mL
6	D6	2.0 mg	0.67 mg/mL
7	D7	1.8 mg	0.60 mg/mL
8	D8	0.5 mg	0.17 mg/mL
9	D9	0.6 mg	0.20 mg/mL
10	D10	1.6 mg	0.53 mg/mL
11	D11	0.7 mg	No se realizó
12	D12	0.5 mg	0.17 mg/mL
13	D13	1.0 mg	0.33 mg/mL
14	D14	1.5 mg	0.5 mg/mL
15	D15	0.5 mg	0.33 mg/mL
16	D16	0.3 mg	0.10 mg/mL

Todas las fracciones se solubilizaron en 3 mL de DMSO, de esa manera las concentraciones no quedaban muy bajas y podría alcanzar para realizar las pruebas posteriores. La fracción D1 se desechó por tener una cantidad demasiado baja para realizar pruebas a menores diluciones, razón por la cual podría dar

como resultado un falso negativo y la fracción D11 se perdió en el transcurso de los experimentos por una rotura del vial durante su manipulación.

Porcentaje de inhibición de las fracciones

Las fracciones que dieron un buen efecto inhibitor fueron, en primer lugar, para las de diclorometano, las fracciones cromatográficas 12, 13 y 14. Mientras que para el caso de las fracciones provenientes de metanol, los mejores resultados dieron las fracciones cromatográficas 5, 6, 7 y 8. En las tablas 7 y 8 se pueden apreciar los porcentajes de inhibición de las fracciones mencionadas. El resto de fracciones no tuvo ningún efecto o por lo menos ninguno que sea significativo sobre la inhibición del biopelícula ya que la diferencia entre los controles y los cultivos expuestos no superaban en la buena parte de las lecturas ni siquiera el 10% de diferencia, solo se tomaron en cuenta para identificación de metabolitos, aquellas en las que las pruebas de inhibición llegaran o superasen el 50% de inhibición en alguna de sus diluciones.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de las fracciones del extracto metanólico de *Senecio calvus* sobre biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, el valor negativo indica sobrecrecimiento. El promedio es de la media de todas las diluciones.

Fracción	Porcentaje de inhibición	Valor más alto de la inhibición, dilución
M1	-12.35	-3.70, 0.36 mg/mL
M2	-14.91	-2.85, 0.61 mg/mL
M3	-6.69	4.74, 2.35 mg/mL
M4	-10.33	8.54, 0.45 mg/mL
M5	51.5	90.96, 0.73 mg/mL
M6	63.1	90.22, 0.83 mg/mL
M7	64.4	88.23, 0.49 mg/mL
M8	62.2	88.58, 0.98 mg/mL

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de las fracciones del extracto de diclorometano de *Senecio calvus* sobre biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, el valor negativo indica sobrecrecimiento. El promedio es de la media de todas las diluciones.

Fracción	Promedio del porcentaje de inhibición	Valor más alto de la inhibición (%), concentración
D2	-11.53	-4.48, 0.36 mg/mL
D3	-10.07	-6.42, 0.18 mg/mL
D4	-7.77	-4.06, 0.13 mg/mL
D5	-5.58	2.85, 0.78 mg/mL
D6	-8.30	-6.63, 0.01 mg/mL
D7	-7.52	-4.17, 0.17 mg/mL
D8	-12.96	-8.22, 0.02 mg/mL
D9	-11.32	-7.73, 0.03 mg/mL
D10	5.71	9.38, 0.27 mg/mL
D12	32.37	58.49, 0.08 mg/mL
D13	53.52	69.59, 0.17 mg/mL
D14	46.18	65.45 0.27 mg/mL
D15	6.87	14.77, 0.04 mg/mL
D16	0.83	6.93, 0.03 mg/mL

Identificación de metabolitos

La identificación de los metabolitos se realizó para las fracciones que tuvieron efecto posteriormente a los resultados de inhibición, de esta manera se evitó tener el riesgo de sesgo en las pruebas, estos compuestos fueron identificados como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Caracterización fitoquímica en términos cualitativos de las fracciones de *Senecio calvus* seleccionadas por su mayor capacidad inhibitoria de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. (+)= poca cantidad, (++) cantidades intermedias y (+++)= abundante cantidad.

Fracciones	Metabolitos
Diclorometano	Cumarinas (++) , lactonas (++)
Metanólica	Flavonoides (+++), compuestos fenólicos (++)

Análisis de datos

Para el análisis se usaron los datos de las absorbancias para comparar los diferentes tratamientos con las fracciones, en este caso se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que es el equivalente a la prueba paramétrica de ANOVA.

La hipótesis nula (H_0) asume igualdad en las medias, por lo contrario la hipótesis alternativa (H_A) asume que las medias son diferentes.

Los resultados de la prueba para las fracciones metanólicas se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis entre las diferentes fracciones, $\alpha=0.05$.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

fraccion	Obs	Rank Sum
1	7	289.00
2	7	273.00
3	7	308.50
4	7	319.50
5	7	116.00
6	7	92.00
7	7	90.00
8	7	108.00

chi-squared = 42.204 with 7 d.f.
 probability = 0.0001

chi-squared with ties = 42.206 with 7 d.f.
 probability = 0.0001

Como se puede observar existe evidencia estadística ($p < 0.05$) de que los grupos son diferentes por lo que se puede afirmar que las muestras tienen una media diferente en al menos una de ellas.

Para explorar mejor las fracciones se realizaron las pruebas en dos grupos definidos de fracciones inhibitorias versus fracciones no inhibitorias, se espera una consistencia en la prueba en las que cada conjunto de fracciones tengan la misma media y por lo tanto similares entre ellas. Para tal efecto se realizó una prueba de Mann-Whitney (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de Mann-Whitney entre las fracciones agrupadas como no inhibitoras (1) e inhibitoras (2), $\alpha=0.05$.

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

fraccion	obs	rank sum	expected
1	28	1190	798
2	28	406	798
combined	56	1596	1596

unadjusted variance 3724.00

adjustment for ties -0.13

adjusted variance 3723.87

Ho: abs(fraccion==1) = abs(fraccion==2)

z = 6.424

Prob > |z| = 0.0000

Se observa que los grupos organizados en dos categorías de fracciones con efecto inhibitor y con poco o sin efecto inhibitor son estadísticamente diferentes.

De manera similar se utilizó la estadística para analizar los datos de las fracciones de diclorometano, la prueba de Kruskal-Wallis dio como resultado una disparidad en los grupos (Tabla 12):

Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis entre las diferentes fracciones de diclorometano

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

fraccion	Obs	Rank Sum
2	7	395.00
3	7	276.50
4	7	389.50
5	7	327.50
6	7	420.50
7	7	636.00
8	7	591.50
9	7	562.50
10	7	299.00
12	7	112.00
13	7	52.00
14	7	69.00
15	7	242.50
16	7	477.50

chi-squared = 80.288 with 13 d.f.
 probability = 0.0001

chi-squared with ties = 80.292 with 13 d.f.
 probability = 0.0001

Se observa pues que la hipótesis nula de que las fracciones son iguales estadísticamente no se mantiene ($p < 0.05$) por lo que al menos una de las fracciones es diferente a las demás.

Continuando la evaluación se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las fracciones con efecto inhibitor las que no tuvieron efecto inhibitor (Tabla 13):

Tabla 13. Prueba de Mann-Whitney entre las fracciones agrupadas como no inhibitoras (1) e inhibitoras (2), $\alpha=0.05$.

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

fraccion	obs	rank sum	expected
1	77	4618	3811.5
2	21	233	1039.5
combined	98	4851	4851

unadjusted variance 13340.25

adjustment for ties -0.68

adjusted variance 13339.57

Ho: abs(fraccion==1) = abs(fraccion==2)

z = 6.983

Prob > |z| = 0.0000

La hipótesis nula de que las fracciones poseen una media similar es rechazada, dado que $p < 0.05$, por lo que son estadísticamente distintas.

V. DISCUSIÓN

En la actualidad el problema generado por las biopelículas en los campos médico e industrial solo es atacado mediante la aplicación de más antibióticos (medicina) o de potentes antimicrobianos en combinación con métodos físicos (industria), no existe ninguna otra forma de eliminar el problema.

Algunos investigadores creen que si bien los inconvenientes generados por las biopelículas son inevitables, estos pueden retrasarse o disminuir su impacto mediante el uso de sustancias que puedan interferir de alguna manera en el proceso del desarrollo de una biopelícula, especialmente a nivel de las señales de QS⁶⁹.

Se puede controlar una biopelícula a lo largo de todo su ciclo, desde su inicio como célula planctónica hasta su madurez. El control más simple y utilizado es al inicio del ciclo con el uso de antibióticos o antimicrobianos, para evitar que las bacterias se establezcan en la superficie y proliferen. Otro punto de control en este estado es el de evitar la adherencia a la superficie con péptidos, anticuerpo u otros agentes que se unen a las adhesinas u otros receptores, inhibiendo su crecimiento en una superficie con cubiertas antimicrobianas en la superficie como triclosán o clorhexidina en algunos casos combinado con sulfatos de plata, en este caso es útil para superficies expuestas a un flujo. El siguiente control en el ciclo es la de inhibir las señales de QS, en ese caso lo que se busca es evitar la maduración de una biopelícula y finalmente el control en una biopelícula formada y madura donde se busca desagregar las células por medio de enzimas que rompen la matriz de polisacárido liberándolas el medio y rompiendo con toda la biopelícula⁷⁰.

Dentro de las propuestas realizadas se encuentran: (1) interferir en la expresión genética de las moléculas involucradas en las rutas de señales que disparan el proceso de formación de biopelícula, en este sentido el bloqueo puede darse sobre el promotor de la activación de una de las señales en el DNA; otro (2) es mediante la interferencia directa sobre la molécula que naturalmente se une a este promotor, de otro lado también se ha propuesto que una molécula antagónica bloquee los receptores a nivel de la superficie bacteriana para evitar la interiorización de las moléculas señales o *quorum sensing* de las bacterias.

Los resultados avalan la hipótesis del trabajo, esta fue establecida a partir de la observación que se realizó con respecto a la presencia de lactonas en asteráceas, de allí que para su investigación se haya utilizado no solamente una asterácea de uso medicinal, sino que también sea nativa de nuestro país. Asimismo la otra observación para avalar la hipótesis vino del conocimiento de las moléculas de comunicación en *Pseudomonas aeruginosa* y otras Gram negativas, las cuales son en su naturaleza clasificadas como homoserin-lactonas, un tipo de lactona, que son cruciales para la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante las inhibiciones mayores fueron aquellas donde se pudo identificar flavonoides y compuestos fenólicos, si bien esto se va en concordancia con hallazgos previos de otras investigaciones, no se esperaba un porcentaje tan alto ⁷²⁻⁷³.

Actualmente se busca inhibir la formación de biopelículas por medio del bloqueo de las señales de *quorum sensing* de las bacterias, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y otras, este mecanismo está regulado por una molécula llamada homoserin lactona, la cual es la desencadenante de la señal celular de este mecanismo, esta molécula es del tipo furanona que es una clase

de lactona. Dentro de los tipos moleculares que se han hallado con distintos grados de inhibición se encuentran principalmente las lactonas, seguidas de compuestos fenólicos y flavonoides. Pocas investigaciones han reportado lactonas que promuevan la formación de biopelículas ⁷⁴.

Existe una tendencia a recuperar los productos naturales para varios tipos de industrias, la tendencia “verde” se ha expandido a muchas industrias y la industria farmacéutica no es ajena a inclinarse por ella. Por tal motivo se viene trabajando en encontrar no solamente nuevos antibióticos y demás tipos de medicamentos, sino que, como en el caso que nos incumbe ahora, el de prevención de la formación de biopelículas. Entre las especies naturales que se han utilizado para la búsqueda de competidores de la homoserin lactona se encuentran el alga roja *Delisea pulchra*, las plantas terrestres *Annonea cherimolia*, *Enydra anagalis*, *Mentha piperita*, *Allium sativum*, *Acanthospermum hispidum*, entre otras ⁷⁵⁻⁷⁷. De la misma manera se han ensayado inhibidores con compuestos purificados como el ácido elágico (derivado del ácido gálico) y EDTA. Todos estos compuestos han tenido éxito relativo con mayor o menor porcentaje inhibitorio ³⁹.

La especie que se ha utilizado tiene el doble mérito de ser una asterácea, las cuales se conoce que contienen en casi su totalidad lactonas como metabolitos secundarios, asimismo es una planta nativa de la sierra peruana en la vertiente occidental de la cordillera. *Senecio calvus* es una planta de las muchas del género *Senecio* que son conocidas en su conjunto “Huamanripa” o “Huirahuirá”, las cuales se utilizan como antitusígeno y en procesos de las vías respiratorias. Esta es la primera vez que se busca un inhibidor de biopelículas en esta especie, siendo *Senecio formosus*, una planta del mismo género la única otra especie de

características similares donde se ha realizado la *búsqueda*, esta especie es nativa de Centroamérica y tiene un éxito moderado (36-43%) en la inhibición de biopelículas ⁷⁸.

La presencia de lactonas y cumarinas en la planta fue determinada de antemano (datos no mostrados) en un extracto de diclorometano mucho antes de que fuera pasado por una columna de fraccionamiento y por las pruebas de inhibición y de concentración mínima inhibitoria, ese paso previo fue el que determinó la inclinación del estudio por esta planta.

Los resultados avalaron la hipótesis de que las lactonas son un buen candidato para inhibición de formación de biopelículas, en este caso la inhibición puede estar dado como un mecanismo de control genético o como un competidor con la homoserin lactona por los sitios de unión a receptores, para tal caso tampoco es posible determinar si es simplemente una o una sinergia de moléculas las que actúan para este propósito. Es poco factible de que ocurra toxicidad a las bacterias ya que se han trabajado con concentraciones subinhibitorias, probablemente *Senecio calvus* tenga poco efecto antibacteriano, debido a que las concentraciones fueron relativamente altas (hasta 100 mg/ml) de extracto versus cultivo planctónico y no se han trabajado con concentraciones mayores tal y como se hace en algunos ensayos. A modo de ejemplo, una investigación realizada en *Mentha piperita*, utilizó como máximo 8 miligramos por mililitro de extracto con un CMI variable entre 0.75 a 2.5 miligramos por mililitro ⁷⁷, mientras que otros estudios con diferentes plantas tienen rangos variables de MIC con valores de alrededor de 100 mg/ml o más para diferentes bacterias incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* ^{79, 80} e incluso ninguna inhibición a concentraciones aún mayores ⁸¹. Cabe señalar que un estudio con varias plantas del norte del Perú tuvo resultados

variables de CMI según la planta estudiada, dentro de ellas se evaluó a la huamanripa (*Senecio sp.*) dando como resultado un CMI de 64 mg/ml para *Escherichia coli* y entre 32 y 64 para *Staphylococcus aureus* e incluso valores más altos para otras asteráceas ⁸².

Fue un resultado poco esperado de que los metabolitos identificados como flavonoides y compuestos fenólicos dieran un porcentaje de inhibición alto ya que en trabajos similares para este tipo de compuestos las inhibiciones no son generalmente superiores al 30% ³⁹. Probablemente este hecho se deba a que hayan trazas de lactonas en la muestra que podrían estar haciendo una sinergia con los otros tipos de metabolitos, sin embargo en un reporte de *Candida albicans* realizada con compuestos fenólicos, el porcentaje de inhibición alcanzó el 60% ⁷³. También en algunos ensayos realizados con extractos ya sean acuosos, metanólicos u otros, se han encontrado variabilidad entre los resultados, sin embargo en este caso el hecho de que las fracciones pasadas por columna mostraran individualmente menor actividad por separado nos estaría indicando una sinergia de los compuestos. De otro lado también se ha observado que algunos extractos parecen favorecer la biopelícula (valores negativos de inhibición), esto probablemente porque favorecen la adhesión celular, no obstante este punto aún no se ha dilucidado, pero se conocen que algunas sustancias o compuestos favorecen la adherencia a superficies como son la albumina y la gelatina ⁹ ⁸³.

Estudios similares ^{77, 78} muestran que en algunos casos una buena actividad antimicrobiana planctónica de extractos no siempre se corresponde con una buena actividad inhibidora de formación de biopelículas, sino más bien lo contrario. En el presente estudio por ejemplo, *Senecio calvus* no tiene una buena

actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo su actividad inhibidora de biopelículas es notable, Además, este hecho merece una mayor atención en la búsqueda de compuestos inhibidores de biopelículas en otras especies nativas, considerando de que en la actualidad la industria farmacéutica está a la búsqueda de estos compuestos, hecho que se traduce en el incremento del número de patentes en los últimos años ⁷⁰.

Se observa que ninguna dilución separada de cada fracción de diclorometano llega a tener los mismos valores de inhibición del extracto del cual provino, por lo que podría estar ocurriendo una sinergia entre dos o más compuestos. Lo contrario ocurre con las fracciones metanólicas cuyos valores de inhibición son similares a las obtenidas por el extracto crudo.

Ya que se ha determinado que casi no existe actividad antimicrobiana y de que tampoco sea muy probable la existencia de una enzima, podemos inferir que la inhibición de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* por parte de los compuestos de *Senecio calvus* ocurre a nivel de maduración de la biopelícula, esto es en el periodo de alta actividad de liberación de moléculas señales de QS, por lo tanto existiría un antagonista de las AHL en *Senecio calvus*.

VI. CONCLUSIONES

1- Se obtuvieron extractos de *Senecio calvus* con diferentes solventes, los cuales demostraron tener un CMI elevado (100 mg/ml) o ninguna actividad antimicrobiana, por lo que los resultados de las pruebas de inhibición de la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*, no serían consecuencia directa de una acción antimicrobiana.

2- Se comprueba la presencia de uno o varios componentes inhibidores de la formación de biopelículas en *Senecio calvus* que presentan una buena actividad, los tipos de compuestos que parecen estar involucrados son lactonas, así como también flavonoides y compuestos fenólicos; la inhibición obtenida es bastante alta.

3- La separación cromatográfica de las extracciones con solventes que alcanzaron los criterios mínimos preestablecidos pudieron ser agrupadas para realizar las pruebas de CMI y de inhibición de formación de biopelículas.

VII. RECOMENDACIONES

Senecio calvus es una especie que debe estudiarse más detalladamente para aislar e identificar las moléculas o molécula implicada en inhibición de la formación de biopelículas, en este caso para las especies que utilizan las señales de quorum sensing con homoserin lactonas como Pseudomonadales, Vibrionaceas, *Salmonella spp*, entre otras gramnegativas. Se hace especial hincapié en este tipo de señal por ser la más extendida entre las gramnegativas.

El siguiente paso que se debe realizar es un estudio más fino con ensayos genéticos y el uso de genes reporteros como luciferasa, gfp o β -galactosidasa para confirmar la acción a nivel de QS.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costerton J, Stewart P y Greenberg E. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infection. *Science*. 1999; 284(5418): 1466-1477.
2. Schachter B. Slimy business - the biotechnology of biofilm. *Nat Biotechnol*. 2003; 21(4): 361-365.
3. Wilson R y Dowling R. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* 1998; 53(3): 213-219.
4. Kiskó G y Szabó-Szabó. Biofilm removal of *Pseudomonas* strains using hot water sanitation. *Acta Univ Sapientiae Alimentaria*. 2011; 4: 69-79.
5. Lindsay D y von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 2006, 64(4): 313-325.
6. Donlan R. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002, 8: 881-890.
7. Kokare C, Chakraborty S, Khopade A y Mahadik K. Biofilm: Importance and applications. *Indian J Biotechnol*. 2007, 8: 159-168.
8. Dunne W. Focus. Bacterial Adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15 (2): 155-166.
9. An Y, Dickinson R y Doyle R. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections en *Handbook of*

- bacterial infections: Principles, methods, and applications, An Y y Friedman R (ed). Humana Press, Totowa, NJ; 2000 p 1-27.
10. Watnik R y Kolter P. Biofilm: City of microbes. *J Bacteriol.* 2000, 182(10): 2675-2679.
 11. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 2003, 4: 219.-219.5.
 12. Shpakov A. QS-type bacterial signals of nonpeptide origin. *Microbiology.* 2009, 78 (2): 133-143. Artículo original en ruso en *Microbiologiya.* 2009, 78 (2): 165-177.
 13. March J y Bentley W. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotech.* 2004, 15: 495-502.
 14. Persson T, Givskov M y Nielsen J. Quorum sensing inhibition: targeting chemical communication in gram-negative bacteria. *Curr Med Chem.* 2005, 12(26): 3103-3115.
 15. Kievit T. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol.* 2009, 11(2): 279-288.
 16. Nazzaro F, Fratianni F y Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals. *Int J Mol Sci.* 2013, 14(6): 12607-12619.
 17. Rutherford S y Bassler B. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities in its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012, 1;2(11), pii: a012427.

18. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B *et al.* Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol.* 2006, 44 (8): 2721-2727.
19. Levy S. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002, 49(1): 25-30.
20. Kwan B, Valenta J, Benedik M y Wood T. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2013, 57(3): 1468-1473.
21. Florian C, Alvarado D y Cocha J. Evaluación in vitro de la resistencia a ciprofloxacina en biopelículas y poblaciones planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. *Anal Fac Med.* 2006, 67(4): 290-297.
22. Fux C, Costerton JW, Stewart P y Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005, 13(1): 34-40.
23. Wei Q y Ma L. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 2013, 14(10): 20983-21005.
24. Høiby N. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2002, 49(2): 235-238.
25. López D, Vlamakis H y Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010, 2(7): a000398.
26. Yahr T y Parsek M. *Pseudomonas aeruginosa* en *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria* vol 6, Dworkin M, Falkow S,

Rosenberg E, Schleifer K y Stackebrandt E (eds). Springer Science+Business Media, LLC. Singapore, 2006 p 704-703.

27. Luján-Roca D, Ibarra-Trujillo J y Mamani-Huamán E. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. Rev Biomed. 2008, 19(3):156-160.
28. Zambrano A y Herrera N. Susceptibilidad microbiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el laboratorio del Hospital regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. Rev Chil Infectol. 2004, 21(2): 117-124.
29. Kaszab E, Kriszt B, Atzél B, Szabó I, Harkai P, Szoboszlay S. The occurrence of multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* on hydrocarbon contaminated sites. Microb Ecol. 2010, 59 (1): 37-45.
30. Kennedy P, Brammah S, Wills E. Burns. Biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis. Burns. 2010, 36: 49-56
31. Kirketerp-Møller K, Zullkowsky K, James G. Chronic wound colonization, infection and biofilms en Biofilm Infections, Bjarnsholt T, Jensen P, Moser C, Høiby N (eds). Springer-Verlag, Berlin, 2011 p 11-24.
32. Fluit A, Verhoff J, Schmitz F. Antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of Interscience Conference on Antimicrobial Therapy. 1999.

33. Tart A y Wozniak D. Shifting paradigms in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm research en Current Topics in Microbiology and Immunology Vol 322: Bacterial Biofilms, Romeo T (ed). Springer-Verlag, Berlin; 2008 p 193-206
34. Shan B, Cai Y, Brooks J, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int J Food Microb. 2007, 117(1): 112-119.
35. OPS/ESSALUD. Manual de Fitoterapia. Villar M y Villavicencio O (eds.), Lima; 2001 p 405.
36. Alarcón G, Espinoza L y Pamo-Reyna O. Medicina y reumatología peruanas: Historia y aportes. Comité Organizador PANLAR, Lima; 2006 p 156.
37. Vital P, Velasco R, Demigillo J, Rivera W. Antimicrobial activity, citotoxicity and phytochemical screening of *Ficus septic* Burm and *Sterculia foetida* L. leaf extracts. J Med Plant Res. 2010, 4(1): 58-63.
38. Hentzer, M., K. Riedel, T. B. Rasmussen, A. Heydorn, J. B. Andersen, M. R. Parsek, S. A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Høiby, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiology. 148(1):87-102.
39. Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum sensing. Z Naturforsch. 2003, 58: 879-884.

40. Kim H y Park H. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. PLoS ONE. 2013, 8(9): e76106 doi:10.1371/journal.pone.0076106.
41. Wojnicz D, Kucharska A, Sokół-Łętowska A, Kicia M y Tichaczek-Goska D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. Urol Res. 2012. 40 (6): 683-697.
42. Castillo J y Lino E. Efecto de los extractos vegetales, goma natural y aceite vegetal sobre el control del “cogollero del maíz”, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*) en La Libertad, Perú. Rev Per Ent. 2003, 43: 107-112.
43. Soriano M, Bonilla P, Arroyo J, Pereyra S. Actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de *Senecio culcitosides* Weed. Folia Dermatol Peru. 2004; 15(3): 155-159.
44. Arroyo J, Prashad M, Vásquez Y, Li E, Tomás G. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005, 22(4): 247-253.
45. Suárez J, Villanueva C, Rodríguez C, Lavado K, Barbieri M et al. Efecto antitumoral del extracto acuoso de *Bomarea cornígera* (*Alstroemeriaceae*) en sarcomas inducidos en ratones. Rev Peru Biol. 2010, 17(3): 385-388.

- 46.Zaa C, Valdivia A, Marcelo A. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petivera alliacea*. Rev Peru Biol. 2012, 19(3): 329-334.
- 47.Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing H y Rocha-Sosa M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Rev Mex Fitopatol. 2003; 21(3): 355-363.
- 48.Wink M. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites en Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews volume 2, Wink M (ed.), Sheffield Academic Press, Sheffield, 2001; p 1-17.
- 49.Sudha J, Kanti S y Devendra B. Secondary metabolite variation ins some species of *Senecio* L. from Nepal Himalaya. The Pharma Innovation. 2013; 2(1): 70-76.
- 50.Seaman F. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae. Bot Rev. 1982; 48(2): 121-595.
- 51.Emerenciano V, Kaplan M, Gottlieb O, Bonfanti M, Ferreira Z y Comegno L. Evolution of sesquiterpene lactones in asteraceae. Biochem Syst Ecol. 1986; 14(6): 585-589.
- 52.López M, Xifreda C, Poggio L y Wulff A. Deep cytogenetics analysis reveals meiotic recombination depletion in species of *Senecio* (Asteraceae). Bot Stud 2013; 54(1):20 doi:10.1186/1999-3110-54-20
- 53.Vision T y Dillon M. Sinopsis de *Senecio* L. (Senecionae, Asteraceae) para el Perú. Arnaldoa. 1996; 4(1): 23-46.

54. Deuschle R, Camargo T, Francescato L, Laves S, Heinzmann B. Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). *Acta Farm Bonaerense*. 2006, 25(3): 356-359.
55. Shi J, Yang L, Wang C, Chou G, Wang Z. A new lactone from *Senecio scandens*. *Biochem Syst Ecol*. 2007, 35(12): 901-904.
56. Mostacero J. Plantas medicinales del Perú. Taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica. ANR, Lima, 2011; p 909.
57. Cano A, Mendoza W, Castillo S, Morales M, La Torre M, Aponte H *et al*. Flora y vegetación de suelos crioturbados y hábitats asociados en la cordillera blanca, Ancash, Perú. *Rev Peru Biol*. 2010, 17(1): 95-103.
58. Cyrus W, Gakuya D, O Nanyigi M, Njonge F, Mbaria J. Antibacterial and cytotoxic activity of Kenyan medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008, 103(7): 650-652.
59. Obeidat M, Shatnawi M, Al-alawi M, Al-Zu'bi E, Al-Dmoor H, *et al*. Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Res J Microbiol*. 2012, 7(1): 59-67.
60. Adebajo C, Fumuyiwa F y Aliyu F. Properties for sourcing Nigerian larvicidal plants. *Molecules* 2014; 19(6): 8363-8372.
61. Villanueva C. Caracterización estructural de los metabolitos secundarios de *Senecio polypodioides*. [Tesis]. Instituto Politécnico Nacional. México, 2010; p 69.

62. Vega E y López E. Concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del Parque Nacional del Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico. REBIOLEST 2013; 1(2):e43-e49.
63. Gonzales J. Apuntes del tema de técnicas de separación cromatográfica. Universidad Carlos III de Madrid - OpenCourseWare. 2008, disponible en: <http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-o/in/caracterizacion-de-materiales/material-de-clase> Acceso 21 de setiembre de 2014.
64. Castañeda B, Loja B, Puebla P, Gamarra F, Alvarado A et al. Estudio Botánico y fotoquímico de las hojas secas de maca de la Meseta de Bombón, Junín-Perú. Horiz Med. 2010, 10(1): 13-22.
65. Manual de pruebas de laboratorio. Universidad San Martín de Porres. Facultad de Medicina Humana, Laboratorio de Medicina Tradicional y Farmacognosia. 2009; p 35.
66. Parasa L, Tumati S, Prasad C y Kumar C. In vitro antibacterial activity of culinary spices aniseed, star anise and cinnamon against bacterial pathogens of fish. Int J Pharm Pharm Sci. 2012; 4(3): 667-670.
67. Suffradini I, Sader H, Goncalves A, Reis A, Gales A, et al. Screening of antibacterial extracts from plant native to the Brazilian Amazon rain forest and atlantic forest. Braz J Med Biol Res. 2007, 37(3): 379-384.

68. O'Toole G y Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic. *Mol Microbiol*. 1998; 28(3): 449-461.
69. Kievit T. e Iglewski B. Quorum sensing and microbial biofilms en Medical implications of biofilms, Wilson M y Devine D (eds). Cambridge University Press, New York, 2003 p 18-35.
70. Kaplan J. Methods for the treatment and prevention of bacterial biofilms. *Expert Opin Ther Patents*, 2005, 15(8): 955-965.
71. Bozic D, Milenkovic M, Ivkovic B. y Cirkovic I. Newly-synthesized chalcones inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol*, 2014; 45(1): 245-263.
72. Lee J, Reqmi S, Kim J, Cho M, Yun H, Lee C y Lee J. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infect Immun*. 2011; 79(12): 4819-4827.
73. Jagani S, Chelikani R y Kim D. Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*. 2009; 25(4): 321-324.
74. Cartagena E, Alvarez O, Neske A, Valdez JC, Bardón A. Effects of plant lactones on the production of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Pharm Bull*. 2007, 55 (1): 22-25.

75. Adonizio K, Kong K, Mathee K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2008, 52(1): 198-203
76. Evensen N y Braun P. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can J Microbiol.* 2009; 55(9):1033-1039.
77. Sandasi M, Leonard C, van Vuuren S, Viljoen A. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. *South African J Botany.* 2011; 77(1): 80-85.
78. Huerta V, Mihalik K, Crixell S, Vatter D. Herbs, spices and medicinal plants used in Hispanic traditional medicine can decrease quorum sensing dependent virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J App Res Nat Prod.* 2008; 1(2): 9-15.
79. Fuselli S, García de la Rosa S, Gende L, Eguaraz M y Fritz R. Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38(2): 89-92.
80. Adegoke A, Iberi A, Akinpelu D, Aiyegoro O y Mbotto C. Studies on phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Phyllanthus amarus* against multiple antibiotic resistant bacteria. *Int J Appl Res Nat Prod.* 2010, 3(3): 6-12.
81. Shami A, Philip K y Muniandy S. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected

plant mixture. BMC Complem Alter M. 2013; 13:360
doi:10.1186/1472-6882-13-360

82. Bussman R, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol.* 2010; 132(1): 101-108.
83. Schinabeck M y Ghannoum M. Biofilm-related indwelling medical device infections en *Biofilm Infections and Antimicrobial Therapy*, Pace J, Rupp M, Finch R (eds). Taylor & Francis group, Boca Raton, 2006; p 39-50.

IX. ANEXOS

Fig A. Identificación taxonómica realizada por un botánico certificado de reconocida experiencia.



Certifica:

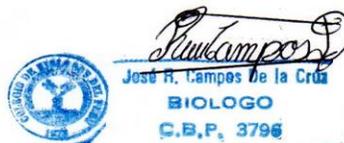
Que, el *Biol. Colegiado*, **JESSÚS CHRISTIAN GUILLERMO FLORIAN CARRILLO**, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “**humanripa**”; la misma que ha sido estudiada y determinada como: ***Senecio calvus*** Cuatrec. En base al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981 se ubica en las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	<i>Senecio</i> L.
ESPECIE	:	<i>Senecio calvus</i> Cuatrec.

Nombre vulgar: “**humanripa**”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 11 de mayo del 2010



Calle Sánchez Silva N° 156. Urb. Santa Luzmila -Lima 07
Teléfono 659 02 23, celular 980 170 139

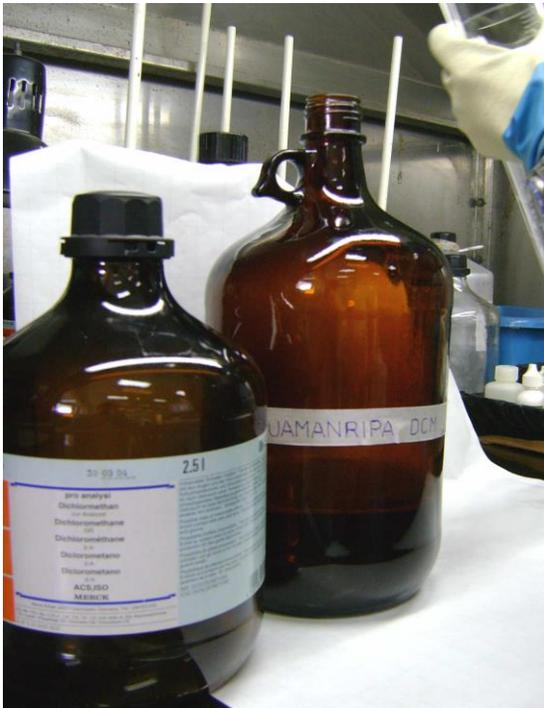


Fig B. Preparación de los extractos, con los diferentes solventes en cada botella, el material fue previamente molido y cernido para obtener un polvo muy fino.

Fig C. El fraccionamiento de los extractos fue realizado en una columna de silica gel 60. Foto cortesía Dra. Lucy Ibañez – Lab. De Medicina Tradicional y Farmacognosia, Facultad de Medicina Humana, USMP.



Fig D Pocillos inoculados con caldo tripticasa de soya conteniendo el cultivo planctónico a 1 en escala McFarland, sin enfrentar.

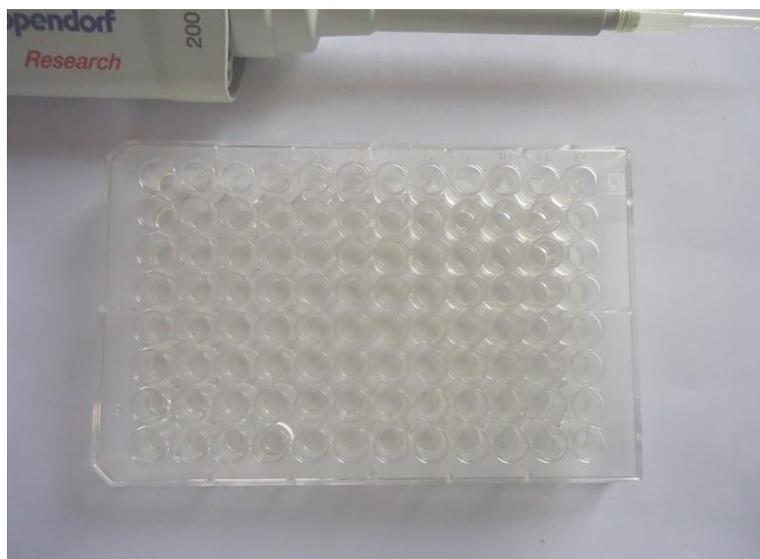


Fig. E Microplaca con cultivos, enfrentadas a las fracciones cromatográficas, repetición de fracciones cada 3 pocillos y diluidas 1:2 de manera vertical, excepto la última fila de abajo que son los controles. Todas las placas se trabajaron de la misma forma.

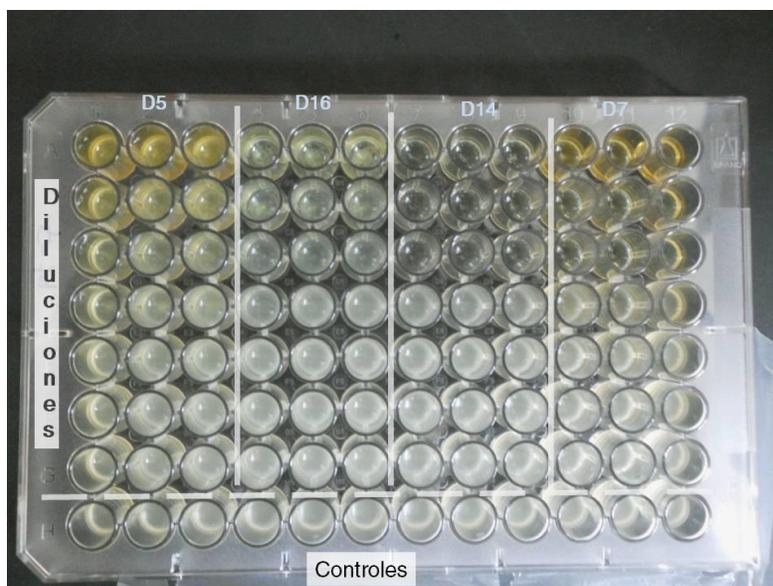


Fig F. Luego de eliminar el cultivo, lavar la placa, teñirlo con cristal violeta al 0.8% y volver a lavarla, quedan solamente las bacterias que han permanecido adheridas formando biopelículas en los pocillos.

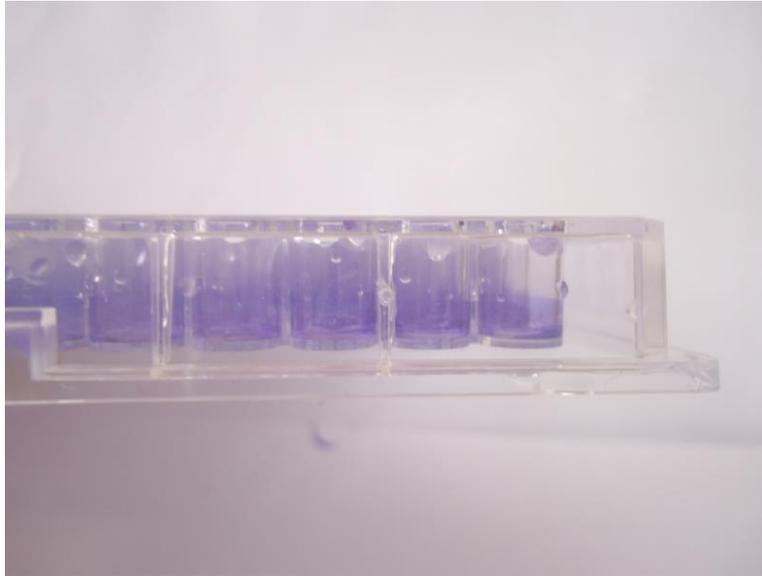
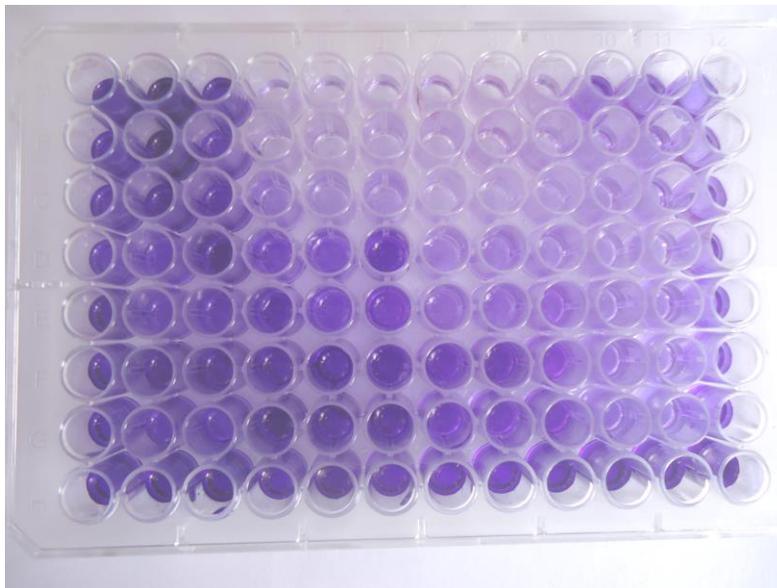


Fig. G Para recuperar el cristal violeta se usó DMSO, luego esta placa es leída a una longitud de onda de 598 nm de absorbancia, usando como controles a la última fila.



M1			M2			M3			M4		
1.002	1.109	0.975	0.903	0.972	1.010	1.073	0.972	1.047	1.106	1.005	0.981
1.013	1.097	0.986	1.203	0.875	0.979	0.991	1.071	1.106	0.984	1.014	1.010
1.202	1.108	1.100	1.160	1.216	0.983	1.215	1.002	1.023	1.127	1.111	0.972
0.919	1.199	1.078	1.215	1.034	0.988	1.290	1.155	1.317	1.304	1.428	1.329
1.210	1.241	0.998	1.240	1.187	1.002	1.286	1.123	1.099	1.452	1.259	1.311
1.110	1.206	1.198	1.293	1.129	1.022	1.349	1.176	1.249	1.290	1.406	1.228
1.013	1.321	1.404	1.216	1.132	1.105	1.249	1.337	1.076	1.200	1.578	1.341
0.973	1.003	1.010	1.117	0.927	0.822	1.158	0.966	1.132	1.136	1.127	1.033
M5			M6			M7			M8		
0.126	0.157	0.137	0.147	0.108	0.132	0.117	0.077	0.152	0.124	0.039	0.053
0.085	0.067	0.073	0.079	0.086	0.058	0.085	0.108	0.076	0.074	0.097	0.121
0.104	0.064	0.061	0.060	0.110	0.113	0.063	0.081	0.113	0.057	0.313	0.402
0.671	0.526	0.343	0.781	0.528	0.520	0.571	0.382	0.780	0.515	0.611	0.898
0.758	0.600	0.612	0.324	0.225	0.326	0.247	0.289	0.363	0.246	0.241	0.373
1.008	0.587	0.262	0.134	0.266	0.368	0.173	0.190	0.392	0.180	0.376	0.529
1.013	0.459	0.561	0.702	0.359	0.521	0.327	0.361	0.594	0.298	0.480	1.112
0.607	1.063	1.246	0.744	0.732	0.835	0.668	0.51	1.132	0.463	1.027	1.371

Tablas con los datos de las absorbancias de las diferentes fracciones del extracto con metanol, probadas para evaluar la capacidad inhibitoria de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

D2			D3			D4			D5		
1.123	1.279	1.033	1.074	1.068	1.092	1.003	1.203	1.405	1.204	1.015	0.991
1.164	1.056	1.027	1.083	1.142	1.116	1.275	1.302	1.186	1.069	1.033	1.000
1.271	1.315	1.054	1.141	1.208	1.100	1.163	1.175	1.036	1.121	1.016	0.983
1.392	1.122	1.111	1.001	1.219	1.288	1.098	1.250	1.113	1.200	1.199	1.024
1.219	1.091	1.084	0.987	1.047	1.215	1.311	1.039	1.020	1.253	1.241	1.131
1.308	1.208	0.988	1.079	1.130	1.124	1.172	1.211	1.021	1.219	1.227	1.247
1.210	1.317	1.100	1.063	1.125	1.102	1.213	1.187	1.113	1.133	1.035	1.270
0.997	1.172	0.959	1.037	1.009	0.994	0.987	1.125	1.152	1.102	0.994	1.105

D6			D7			D8			D9		
1.210	1.152	1.213	1.179	1.256	1.308	1.258	1.309	1.289	1.228	1.201	1.412
1.219	1.111	1.285	1.256	1.195	1.296	1.241	1.351	1.225	1.283	1.210	1.328
1.145	1.172	1.222	1.287	1.407	1.321	1.291	1.364	1.218	1.210	1.189	1.209
1.089	1.179	1.213	1.303	1.289	1.297	1.287	1.268	1.301	1.251	1.208	1.227
1.210	1.166	1.131	1.295	1.242	1.313	1.199	1.223	1.184	1.188	1.222	1.312
1.236	1.077	1.184	1.309	1.305	1.210	1.172	1.399	1.132	1.236	1.140	1.258
1.154	1.217	1.186	1.388	1.175	1.416	1.092	1.313	1.283	1.277	1.261	1.246
1.117	1.043	1.109	1.208	1.119	1.274	1.056	1.279	1.025	1.159	1.092	1.100

D10			D12			D13			D14		
1.000	1.002	0.998	0.512	0.459	0.538	0.372	0.385	0.298	0.416	0.404	0.377
1.003	0.955	1.285	0.601	0.588	0.503	0.402	0.403	0.302	0.603	0.402	0.403
1.281	1.152	1.050	0.872	0.909	0.831	0.441	0.489	0.441	0.610	0.441	0.489
1.009	1.179	1.213	0.921	0.873	0.859	0.603	0.527	0.502	0.809	0.603	0.527
1.088	1.100	1.131	0.971	0.988	0.902	0.558	0.634	0.607	0.902	0.558	0.634
1.236	1.077	1.098	1.008	0.978	0.999	0.751	0.663	0.700	0.999	0.833	0.623
1.175	1.217	1.186	1.016	0.905	1.010	0.712	0.711	0.723	0.987	0.768	0.711
1.119	1.052	1.144	1.212	1.259	1.174	1.130	1.279	1.057	1.202	1.127	1.136

D15			D16		
0.976	0.995	0.991	1.145	1.082	1.174
1.012	0.983	0.954	1.103	1.114	1.176
0.986	1.007	1.076	1.143	1.230	1.159
1.049	1.106	1.112	1.201	1.243	1.202
1.125	1.111	1.131	1.218	1.267	1.278
1.207	1.048	1.098	1.255	1.236	1.300
1.175	1.227	1.176	1.238	1.239	1.292
1.200	1.127	1.134	1.202	1.181	1.263

Tablas con los datos de las absorbancias de las diferentes fracciones de diclorometano, probadas para evaluar la capacidad inhibitoria de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

