



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA
SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN
VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE
SASAHUI “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” FRENTE
A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia
coli* ATCC 25922, AREQUIPA 2015.**

TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER:
TURPO BALDARRAGO, EMERSON RICHARD

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AREQUIPA – PERÚ

2015

DEDICATORIA

“A Dios todopoderoso quien en su infinito amor me ha guiado cada día durante todos estos años, fortaleciéndome y enseñándome que con perseverancia, humildad y paciencia todo es posible.

A mis padres Rosa y Francisco. Por el gran apoyo que me brindaron durante toda la carrera, por sus sabios consejos y por su amor incondicional hasta en los momentos más difíciles.

A mis hermanas Olga y Nancy, que por su ayuda incondicional y sus enseñanzas en base a su experiencia en la vida me ayudaron a lograr cada meta.

A mis amigas Lizbeth y Susan con quienes crecí muy cercanamente todos estos años de universidad, gracias por enseñarme el verdadero valor de la amistad y por apoyarme a pesar de las situaciones de la vida.”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, las fuerzas necesarias para afrontar todo con sabiduría y por permitirme poder llegar hasta este momento y hacer realidad este sueño tan anhelado.

A la Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa, por darme la oportunidad de formar parte de esta casa de estudio y por darme la formación necesaria para poder ser una persona de bien para la sociedad.

A la Q.F. Alexandra Fernández Gambarini, directora de la escuela profesional de farmacia y bioquímica, por su apoyo y sabios consejos brindados a lo largo de la carrera.

A mi asesora la Q.F. Mariella Guerrero Benavides, por su dedicación, tiempo brindado, paciencia y su valiosa asesoría a lo largo de la realización de la presente investigación.

A mis maestros, gracias por su ayuda incondicional para resolver las interrogantes que se me planteaban, por su paciencia, por su tiempo y por su entusiasmo para transmitirme sus amplios conocimientos y sabios consejos, en el desarrollo de mi formación profesional.

A mis padres y hermanas, que me apoyaron incondicionalmente para lograr cada paso en este largo camino.

A mis amigas, por su gran apoyo y sus palabras de aliento; y a todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en la realización de la presente investigación.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, que se desarrolló en el laboratorio múltiple L-206 y el laboratorio de microbiología L-205 de la Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa entre los meses de marzo y agosto del 2015.

La muestra fue recolectada en la comunidad de Chivay, provincia de Caylloma, región Arequipa y se identificó taxonómicamente en el *Herbarium Arequipense* de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA). Se determinó un porcentaje de rendimiento de 24.44 % para el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" obtenido por el método de decocción. El análisis fitoquímico preliminar del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" evidenció la presencia de taninos, flavonoides, azúcares reductores y alcaloides; para el estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso se utilizó cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" se estimó en 12.5 mg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en 200 mg/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922. En la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" se estimó en 25 mg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en 400 mg/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922, validando de esta manera la actividad antibacteriana de la planta anteriormente mencionada para las dos bacterias de estudio.

Palabras claves: Actividad antibacteriana; sasahui; *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922.

ABSTRACT

In the present research it was evaluated in vitro antibacterial activity of leaf aqueous extract from sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922, it was developed in the multiple laboratory L-206 and microbiology laboratory L-205 at the Alas Peruanas University Subsidiary Arequipa between march and august 2015.

The sample was collected in Chivay, Caylloma province, Arequipa region; sample was taxonomically identified at the *Herbarium Arequipense* of San Agustin National University (UNSA). It was determined a 24.44% performance percentage for the leaf aqueous extract from sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" obtained by decoction method. The preliminary phytochemical analysis of leaf aqueous extract from sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" evidenced the presence of tannins, flavonoids, alkaloids and reducing sugars.

To study in vitro antibacterial activity of the aqueous extract were used *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The results of the minimum inhibitory concentration (MIC) of leaf aqueous extract from sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" was estimated at 12.5 mg/mL for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 200 mg/mL for *Escherichia coli* ATCC 25922. At the determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) of leaf aqueous extract from sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" was estimated at 25 mg/mL for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 400 mg/ml for *Escherichia coli* ATCC 25922, validating by this way the antibacterial activity of the plant before mentioned on these bacteria.

Keywords: Antibacterial activity; sasahui; *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922.

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de tablas	viii
Índice de cuadros	ix
Índice de gráficos	ix
Índice de figuras	x
Índice de anexos	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Introducción	xiv
CAPÍTULO I: Planteamiento del problema	17
1.1 Descripción de la realidad problemática	17
1.2 Delimitaciones y definición del problema	18
1.3 Formulación del problema	19
1.4 Objetivos de la investigación	20
1.5 Variables e indicadores	21
1.6 Justificación e importancia de la investigación.....	22
1.7 Limitaciones de la investigación	22
1.8 Tipo y nivel de investigación	23
1.9 Método y diseño de la investigación	23
1.10 Técnicas e instrumentos de recolección de información	43
1.11 Cobertura del estudio	44
CAPÍTULO II: Marco teórico	45
2.1 Antecedentes investigativos	45
2.2 Marco conceptual	46
CAPÍTULO III: Análisis e interpretación de los resultados	64
3.1 Población y muestra	64
3.2 Tamaño de la muestra.....	65
3.3 Análisis e interpretación de los resultados	66

CAPÍTULO IV: Conclusiones y recomendaciones	73
Conclusiones	73
Recomendaciones	75
Referencias bibliográficas	76
Bibliografía	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Rendimiento del extracto acuoso por decocción.....	66
Tabla N° 2: CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	69
Tabla N° 3: CMI frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	70
Tabla N° 4: CMB frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	71
Tabla N° 5: CMB frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Definición conceptual y operacional de las variables.....	21
Cuadro N° 2: Usos medicinales del sasahui.....	49
Cuadro N° 3: Análisis fitoquímico preliminar para el extracto acuoso.....	68

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Rendimiento de extracción por método de decocción.....	67
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Identificación y recolección del sasahui.....	25
Figura N° 2: Estabilización de las hojas de sasahui.....	26
Figura N° 3: Secado al aire de las hojas de sasahui.....	27
Figura N° 4: Pulverización de las hojas de sasahui	28
Figura N° 5: Filtración del extracto acuoso de sasahui.....	29
Figura N° 6: Liofilización del extracto acuoso de sasahui.....	30
Figura N° 7: Análisis fitoquímico para el extracto acuoso.....	31
Figura N° 8: Identificación de compuestos fenólicos.....	32
Figura N° 9: Identificación de compuestos taninos.....	33
Figura N° 10: Identificación de flavonoides.....	35
Figura N° 11: Identificación de saponinas.....	36
Figura N° 12: Identificación de alcaloides.....	37
Figura N° 13: Identificación de azúcares reductores.....	38
Figura N° 14: Estandarización del inóculo bacteriano.....	40
Figura N° 15: Incorporación del inóculo bacteriano.....	42
Figura N° 16: Inoculación de las placas para CMB.....	43
Figura N° 17: Morfología de la planta sasahui.....	48
Figura N° 18: Estructura básica de los flavonoides.....	51
Figura N° 19: Estructura química del ácido gálico.....	52
Figura N° 20: Clasificación de los métodos de extracción.....	54
Figura N° 21: Envoltura de una bacteria Gram positiva.....	56
Figura N° 22: Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Figura N° 23: Reacción de la enzima catalasa.....	59
Figura N° 24: Envoltura de una bacteria Gram negativa.....	60
Figura N° 25: Reactivación de las cepas ATCC.....	105

Figura N° 26: Cepas ATCC tras 24 horas de incubación.....	105
Figura N° 27: Preparación de la escala de Mc Farland 0.5.....	106
Figura N° 28: Escala 0.5 Mc Farland.....	106
Figura N° 30: Absorbancia del blanco.....	107
Figura N° 29: Absorbancia del BaSO ₄	107
Figura N° 31: CMI <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	108
Figura N° 32: CMB para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 100 a 200 mg/mL.....	108
Figura N° 33: CMI para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 200 a 400 mg/mL.....	109
Figura N° 34: CMB frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	110
Figura N° 35: CMI frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	110

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1: Solicitud de identificación de muestra botánica.....	90
Anexo N° 2: Muestra botánica <i>Leucheria daucifolia</i> (D. Don) Crisci.....	91
Anexo N° 3: Clasificación taxonómica emitida por la UNSA.....	92
Anexo N° 4: Cuadro de registro de datos de ensayos fitoquímicos.....	93
Anexo N° 5: Escala de Mc Farland 0.5.....	94
Anexo N° 6: Caldo peptonado.....	95
Anexo N° 7: Agar tripticasa soya.....	96
Anexo N° 8: Agar müeller hinton.....	97
Anexo N° 9: Tabla de registro CMI para <i>Staphylococcus aureus</i>	98
Anexo N° 10: Tabla de registro CMI para <i>Escherichia coli</i>	99
Anexo N° 11: Tabla de registros de datos de la CMB.....	100
Anexo N° 12: Certificado <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	101
Anexo N° 13: Certificado <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	103
Anexo N° 14: Reactivación de las cepas ATCC.....	105
Anexo N° 15: Preparación de la escala 0.5 Mc Farland.....	106
Anexo N° 16: Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	108
Anexo N° 17: Determinación de la concentración mínima bactericida.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	: American Type Culture Collection.
CMB	: Concentración mínima bactericida.
CMI	: Concentración mínima inhibitoria.
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute.
<i>et. al.</i>	: Y otros.
HUSA	: <i>Herbarium Arequipense</i> .
IBID	: Ibídem.
m.s.n.m.	: Metros sobre el nivel del mar.
OP. CIT.	: Citado en la obra.
UFC	: Unidad formadora de colonias.

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional desde los tiempos antiguos hasta la actualidad, ha estado íntimamente vinculada a los pueblos, pese al avance de la ciencia y tecnología, la población tiene una clara tendencia y preferencia por lo natural. Es por ello que existen numerosas plantas a las que la población atribuye diversas propiedades medicinales.

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces más células bacterianas que células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la mayor parte de nuestro organismo. Pese a contar con el efecto protector del sistema inmune que permite que muchas de estas bacterias sean inofensivas o incluso beneficiosas para nuestro organismo, algunas bacterias patógenas en determinadas circunstancias pueden desencadenar en enfermedades infecciosas.

En la medicina tradicional todas las enfermedades son consideradas como desequilibrios en el estado de salud. En el caso de enfermedades del tipo infeccioso, los microorganismos pueden llegar a comportarse como gérmenes patógenos con capacidad de producir enfermedades graves o persistentes en las personas.

Staphylococcus aureus es una de los microorganismos de mayor importancia en la práctica clínica, dada su alta virulencia que le permite actuar como agente etiológico de diferentes infecciones en el organismo humano. Al romperse las barreras mecánicas

tales como la piel, puede producir desde una simple infección de tejidos blandos de la piel hasta una infección más profunda de los tejidos.

Por otro lado, *Escherichia coli* al igual que *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes infecciosos de importancia clínica ya que puede infectar las vías respiratorias y las meninges, como consecuencia de una invasión a circulación sanguínea. Además de causar peritonitis ante una perforación intestinal, infecciones de las vías urinarias e inclusive se ha hecho referencia a que es la bacteria que produce más infecciones en heridas en los hospitales.

La resistencia bacteriana se ha convertido en problema crítico para la salud pública a nivel mundial, dado su exponencial crecimiento con el transcurrir de los años. Este problema surge en un momento en que la industria farmacéutica elabora muy pocos medicamentos nuevos para reemplazar a los que han perdido su eficacia, la generación de medicamentos nuevos se está estancando y son pocos los incentivos para elaborar antibacterianos nuevos que permitan combatir los problemas mundiales de la farmacoresistencia.

El Perú presenta una flora variada calculada aproximadamente en 80,000 especies gracias a los diferentes climas y microclimas presentes en el país. Dentro de esta biodiversidad muchas especies son ricas en moléculas activas de gran interés para la industria farmacéutica, pero lamentablemente la investigación sobre la flora silvestre ha sido poco desarrollada lo que ha limitado el conocimiento y el aprovechamiento racional de estos recursos.

Una de estas especies que es considerada una planta medicinal es el sasahui, cuyo nombre científico es *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci. Los pobladores locales por su uso empírico le atribuyen diferentes propiedades terapéuticas, entre las que destaca particularmente su uso para el tratamiento de infecciones respiratorias, de heridas, así como para infecciones diarreicas.

Teniendo en cuenta que el régimen de enfermedades infecciosas producidas por las dos bacterias mencionadas anteriormente presentan un alto grado de incidencia en la Región Arequipa y al no haber encontrado en nuestro medio trabajos de investigación que validen las propiedades antibacterianas que se le atribuye a la planta en estudio, es que en el presente estudio se tomó por objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci", frente a una cepa bacteriana Gram positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y otra

Gram negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922, y con ello demostrar que presenta actividad antibacteriana para que pueda utilizarse como una alternativa terapéutica, económica y eficaz para el tratamiento de las enfermedades producidas por las bacterias mencionadas anteriormente.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1 Descripción de la realidad problemática

La resistencia bacteriana plantea una amenaza cada vez mayor para la salud pública a nivel mundial, que afecta a todos los grupos poblacionales siendo más preocupante cuando se trata de la población infantil.¹ La farmacoresistencia nace en un momento en el que la falta de producción e investigación de nuevos medicamentos que cubran el vacío dejado por los antibióticos que han perdido su eficacia, origina que este problema se extienda a nivel mundial conllevando a un gran impacto en la salud pública.

La tasa de mortalidad de pacientes con infecciones graves tratados en hospitales duplica, aproximadamente, la tasa de pacientes con infecciones provocadas por bacterias no resistentes.² Dentro de las infecciones hospitalarias, los agentes infecciosos más importantes son el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa*

¹ INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Minsa 2012; p. 3.

² ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Nota descriptiva N°194: 2013 [citado el 20 de abril de 2015]. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

negativo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella* y otros. Las consecuencias de estas infecciones son fallas en la respuesta al tratamiento (enfermedad prolongada y mayor riesgo de muerte), periodos más largos de infectividad y rotación a drogas de segunda o tercera línea que son más caras y tóxicas.³

El porcentaje de resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina (MRSA) es de 84% en pacientes hospitalizados, los niveles de resistencia más altos son para la penicilina (99%), eritromicina (80%) y clindamicina (75%). En los aislamientos de *Escherichia coli*, la resistencia más alta se encuentra en la ampicilina (88.8%), igualmente la resistencia a cefalosporinas de tercera generación supera el 50%.⁴

En la región Arequipa, hasta el mes de Abril del año 2015, se reportó entre las enfermedades más frecuentes a las infecciones intestinales bacterianas, las infecciones respiratorias agudas e infecciones de vías urinarias.⁵

La especie *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci, comúnmente conocida como “sasahui”, es utilizada por los pobladores de zonas rurales para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias, infecciones diarreicas, heridas de la piel, entre otros usos. En la Región Arequipa no se han reportado estudios sobre la especie vegetal *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci, en lo referente a su acción antibacteriana, por lo que se planteó como objetivo la evaluación de la misma.

1.2 Delimitaciones y definición del problema

1.2.1 Delimitaciones

- | | |
|--------------------------|---|
| A. Delimitación Espacial | : Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa |
| B. Delimitación Temporal | : Marzo a agosto del 2015 |
| C. Delimitación Social | : Población con procesos de infección originados por las bacterias en estudio |

³ INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Minsa 2012; p. 3.

⁴ IBID, p. 6-8.

⁵ GERENCIA REGIONAL DE SALUD AREQUIPA. Morbilidad en consulta externa abril 2015 [Internet]. Arequipa: Ministerio de Salud [citado el 23 de abril de 2015]. Disponible desde: <http://www.saludenarequipa.gob.pe/pe>

D. Delimitación Conceptual

1. Área : Ciencias de la Salud
2. Campo : Farmacia y bioquímica
3. Línea : Microbiología
4. Tema general : Evaluación de la actividad de las plantas sobre bacterias
5. Tema específico : Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.2.2 Definición del problema

El sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" es utilizado por la población de forma empírica para el tratamiento de diferentes tipos de infecciones, entre los que destacan la infección al tracto respiratorio, infecciones a la piel e infecciones diarreicas.

En este plano, al no existir investigaciones que validen el uso terapéutico del sasahui como antibacteriano, nació la necesidad de evaluar la presencia de actividad antibacteriana en las hojas del sasahui, siendo ensayadas frente a dos de los agentes etiológicos bacterianos de mayor importancia clínica, como son: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.3 Formulación del problema

¿En qué medida el extracto acuoso de las hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" ejercerá actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922?

1.3.1 Sub problemas

- ¿Cuál será el rendimiento del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" elaborado por el método de decocción?
- ¿Qué metabolitos secundarios estarán presentes en el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci"?

- ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922?
- ¿Cuál será la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922?

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener el rendimiento del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" elaborado por el método de decocción.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci".
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.5 Variables e indicadores

Cuadro N° 1. Definición conceptual y operacional de las variables

Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Sub Indicador	Ítem	Escala	Categoría
Extracto acuoso de hojas de saahui " <i>Leucheria daucifolia</i> (D. Don) Crisci"	Preparación obtenida por contacto de la planta con el disolvente acuoso en presencia de calor.	Concentración del extracto	Miligramos por mililitro (mg/mL)	Conc. dobles decrecientes de 400 a 0.195	1	Razón	Independiente Cuantitativa Discreta
Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Es la capacidad de inhibir el crecimiento y/o la capacidad de destruir a las células bacterianas.	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	Turbidez	Ausencia	2	Razón	Dependiente Cuantitativa Discreta
				Presencia			
		Concentración mínima bactericida (CMB)	Unidades formadoras de colonia	Ausencia			
				Presencia			

Fuente: elaboración propia.

1.6 Justificación e importancia de la investigación

La especie *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci “sasahui” tiene una amplia utilización empírica entre los pobladores de las zonas altas de la región Arequipa; es usada por su propiedad curativa como antibacteriano en forma de decocción para infecciones bronquiales e infecciones diarreicas y como agua de lavado para infecciones cutáneas (tratamiento de heridas).

Por otro lado, un gran número de la población que padece infecciones de origen bacteriano utilizan a los antibióticos de forma inadecuada e irracional desencadenando un aumento en la resistencia bacteriana a diferentes antibióticos.

En este contexto teniendo en cuenta que el régimen de enfermedades infecciosas producidas por las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentan un alto grado de incidencia en la región Arequipa y que no se han reportado estudios referentes a la posible actividad antibacteriana del sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci”, se hizo presente la necesidad de validar las propiedades antibacterianas que se le atribuye tradicionalmente y de esta manera crear un punto de partida para su posterior estudio y utilización en la terapéutica e industria farmacéutica así como su aplicación para el tratamiento de infecciones originadas por las bacterias en estudio planteando así una alternativa terapéutica más accesible a la población de bajos recursos económicos.

1.7 Limitaciones de la investigación

En el desarrollo de la investigación se presentaron las siguientes limitaciones:

- Recolección de los ejemplares de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” en condiciones climatológicas adversas.
- Acceso a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ya que su producción por parte de la empresa Microbiologics Inc. estaba paralizada.

1.8 Tipo y nivel de investigación

1.8.1 Tipo de investigación

La presente investigación es descriptiva de acuerdo a su nivel de conocimiento, experimental de acuerdo al diseño de contrastación y transversal en el tiempo.

1.8.2 Nivel de investigación

De acuerdo al nivel investigativo, la presente investigación reúne todas las condiciones de una investigación de laboratorio.

1.9 Método y diseño de la investigación

1.9.1 Método de la investigación

La investigación se caracterizará por su naturaleza descriptiva y a la vez experimental de acuerdo a su diseño de contrastación. Con el objetivo de seguir las pautas de un nivel investigativo de laboratorio se proyectará en la realización de diferentes ensayos para su desarrollo metodológico.

En una primera etapa, la recolección del material vegetal representado por las hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" se llevará a cabo en el pueblo de Chivay en el mes de abril del año 2015. La certificación taxonómica de la especie vegetal recolectada se desarrollará a través de una institución calificada como es el *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa.

Para el procesamiento de las hojas del sasahui se realizará una estabilización por el método de calor seco en estufa, en condiciones controladas de tiempo y temperatura. A través del método de secado al aire en sombra, se continuará con el tratamiento de desecación hasta el secado completo de las hojas. En la fase final se pulverizarán las hojas en un mortero y se almacenarán en un envase oscuro correctamente rotulado y en condiciones adecuadas.

En la segunda etapa de la investigación, se obtendrá el extracto acuoso de las hojas de sasahui por el método de decocción y posteriormente será filtrado, envasado y almacenado en refrigeración hasta su uso. A través del método gravimétrico y aplicando

el tratamiento de liofilización sobre el extracto acuoso se establecerá el rendimiento de extracción por la diferencia de peso obtenida tras la evaporación del solvente.

En la tercera etapa, se dividirán pequeñas fracciones del extracto acuoso de hojas de sasahui sobre las que se trabajarán los ensayos de cloruro férrico, gelatina-sal, Shinoda, Wagner, espuma y Fehling para la identificación de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas y azúcares reductores respectivamente.

La cuarta etapa se iniciará con la obtención de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 a través del laboratorio GenLab del Perú. Las cepas bacterianas se reactivarán y a partir de ellas se prepararán inóculos estandarizados según lo establecido por el estándar de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

La etapa continuará con la preparación de las concentraciones dobles decrecientes del extracto acuoso de hojas de Sasahui para el ensayo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de macrodilución en tubo. Tras la incubación de las baterías de tubos para ambas bacterias de estudio se buscará el punto de ruptura de la turbidez.

En última etapa de la investigación, se realizará el ensayo de la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de la dilución en placa, donde pequeños volúmenes de cada tubo sin turbidez se sembrarán sobre placas. Transcurrido el tiempo de incubación se determinará la CMB por la ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC).

A continuación, se explican con detalle los métodos y procedimientos aplicados en cada etapa de la investigación en concordancia con el planteamiento anteriormente expuesto:

A. Recolección y acondicionamiento de la planta

A.1. Recolección

La especie en estudio se recolectó el día 05 de abril del año 2015 en el pueblo de Chivay (3.680 m.s.n.m), provincia de Caylloma, región Arequipa. Luego de recolectar el material biológico se seleccionaron las hojas en buen estado, sin ningún signo de contaminación o infección.⁶

⁶ KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 13-14.

Figura N° 1: Identificación y recolección del sasahui



Reconocimiento de las características morfológicas del sasahui para la recolección de los ejemplares vegetales.

Fuente: elaboración propia.

El material vegetal recolectado se envolvió en papel Kraf y se colocó en cajas de cartón para su traslado a los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa.

A.2. Identificación taxonómica

Se llevó un ejemplar completo de la planta hacia el *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, donde se realizó su respectiva identificación y verificación taxonómica según la constancia N° 06 – 2015 emitida por el director del HUSA: biólogo Leoncio Mariño Herrera. (anexo N°3)

A.3. Estabilización

Con el propósito de inactivar enzimas que pueden provocar un descarrilamiento enzimático afectando la estabilidad de sustancias activas presentes en las hojas, se procedió a la estabilización del material fresco mediante el método de calor seco.⁷

⁷ KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 16

La planta recolectada previamente se lavó a chorro con agua destilada esterilizada para eliminar los residuos presentes (polvo, tierra, etc.) y luego las hojas se dispusieron sobre láminas de papel Kraf, las que posteriormente se introdujeron a la estufa. Las hojas permanecieron en la estufa por un periodo de 3 minutos a una temperatura de 90°C.⁸

Figura N° 2: Estabilización de las hojas de sasahui



Finalización del tratamiento de las hojas de sasahui en la estufa de secado.

Fuente: elaboración propia.

A.3. Deseccación

Con el propósito de facilitar el posterior proceso de extracción y favorecer la conservación de las hojas de sasahui, una vez estabilizadas las hojas se procedió con la etapa de la desecación a través del método de secado al aire.

⁸ KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 16.

Para tal caso, las hojas se colocaron entre pliegos de papel Kraf que se cambiaron cada dos días. El proceso de secado se realizó en un ambiente ventilado, sin luz directa y a temperatura ambiente por un espacio de 10 días.⁹

Figura N° 3: Secado al aire de las hojas de sasahui



Hojas de sasahui tras la finalización del tratamiento de secado al aire.

Fuente: elaboración propia.

A.4. Molienda y almacenamiento

La pulverización se realizó con ayuda de un mortero (previamente lavado y desinfectado con alcohol) hasta la obtención de partículas uniformes¹⁰.

El pulverizado final de las hojas del sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar de boca ancha debidamente rotulado y cerrado hasta su posterior utilización para la preparación del extracto acuoso.

⁹ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 43.

¹⁰ KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 17.

Figura N° 4: Pulverización de las hojas de sasahui



Proceso de molienda en mortero de porcelana hasta la observación de uniformidad.

Fuente: elaboración propia.

B. Extracción por método de decocción

B.1. Fundamento

Se fundamenta en la extracción de los principios activos de un material vegetal utilizando como disolvente el agua. Consiste en la ebullición de la droga conjuntamente con el agua durante 15 a 30 minutos.¹¹

B.2. Procedimiento

Se procedió a pesar con exactitud 12 g del material vegetal previamente pulverizado y se colocó en un recipiente de vidrio resistente al calor. Seguidamente se añadieron 120 mL de agua destilada (proporción 1:10) al recipiente y se calentó la mezcla hasta ebullición por 15 minutos.

¹¹ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 159.

El extracto acuoso obtenido se filtró tres veces, primero con papel Munktel de filtración lenta, luego con papel Munktel de filtración rápida y por último con papel filtro Whatman N°41. Seguidamente se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar correctamente rotulado y se acondicionó en refrigeración.

Figura N° 5: Filtración del extracto acuoso de sasahui



Aspecto del extracto acuoso de hojas de sasahui tras su filtración final con el papel Whatman N°41.

Fuente: elaboración propia.

C. Determinación del rendimiento de extracción

C.1. Fundamento

El porcentaje de rendimiento de extracción (%RE) por el método gravimétrico, se fundamenta en la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto obtenido.

C.2. Procedimiento

Se sometió el extracto acuoso al proceso de liofilización hasta la obtención de un extracto seco. El extracto seco obtenido se pesó posteriormente para determinar su

porcentaje de rendimiento por diferencia de peso. El porcentaje de rendimiento se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%RE = \frac{\text{Peso del extracto seco} \times 100}{\text{Peso de las hojas secas.}}$$

Donde:

%RE: porcentaje de rendimiento de extracción.

Figura N° 6: Liofilización del extracto acuoso de sasahui



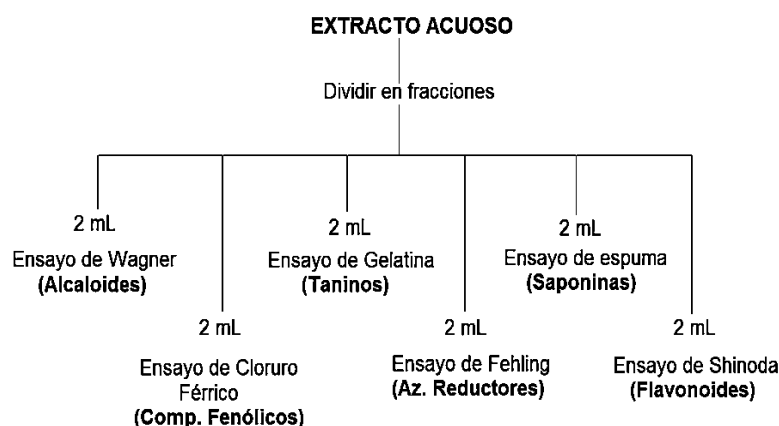
Acoplamiento de los frascos para liofilización que contenían el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci", al equipo liofilizador Labconco.

Fuente: elaboración propia.

D. Análisis fitoquímico preliminar

La metodología empleada para los ensayos preliminares en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto se basó según lo descrito por la Dra. Olga Lock de Ugaz.

Figura N° 7: Análisis fitoquímico para el extracto acuoso



Representación de las pruebas realizadas al extracto acuoso de hojas de sahuai para la identificación de metabolitos secundarios.

Fuente: elaboración propia a partir del libro de Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales de Lock de Ugaz.

D.1. Compuestos fenólicos

Para la identificación de la presencia de compuestos fenólicos en el extracto acuoso se utilizó el ensayo del cloruro férrico.

a. Fundamento

Este ensayo se fundamenta en la formación de complejos coloreados tras la reacción de sustitución aromática electrófila entre el ion fenóxido (fenoles) y el electrófilo hierro (cloruro férrico).¹²

Los taninos al ser mezclados con sales férricas, reaccionan dando lugar a la formación de coloraciones o precipitados que varían de azul a verde intensos, debido a la formación de tanato férrico.¹³

b. Procedimiento

- Se colocó en un tubo de ensayo una fracción de 2 mL del extracto acuoso.

¹² MORRISON R, BOYD R. Química orgánica. 5ª ed. México: Addison Wesley Longman de México; 1998, p. 999.

¹³ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 357.

- Seguidamente se agregó gota a gota la solución de cloruro férrico al 1% y se homogeneizó suavemente observando la formación de cambios de coloración y/o formación de precipitados.¹⁴
- El ensayo positivo puede dar la siguiente información general: ¹⁵
 - Desarrollo de una coloración rojo-vino: compuesto fenólicos en general.
 - Desarrollo de una coloración verde intensa: taninos condensados del tipo pirocatecólicos tales como el catecol.
 - Desarrollo de una coloración azul a negro: taninos hidrolizables del tipo pirogalotánicos tales como el pirogalol.

Figura N° 8: Identificación de compuestos fenólicos



A la izquierda el color azul violáceo obtenido tras el ensayo del extracto con FeCl_3 ; a la derecha el extracto sin ensayar.

Fuente: elaboración propia.

D.2. Taninos

Para la identificación y confirmación de la presencia de taninos en el extracto acuoso se utilizó el ensayo de la gelatina - sal.

¹⁴ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.

¹⁵ IBID, p. 208.

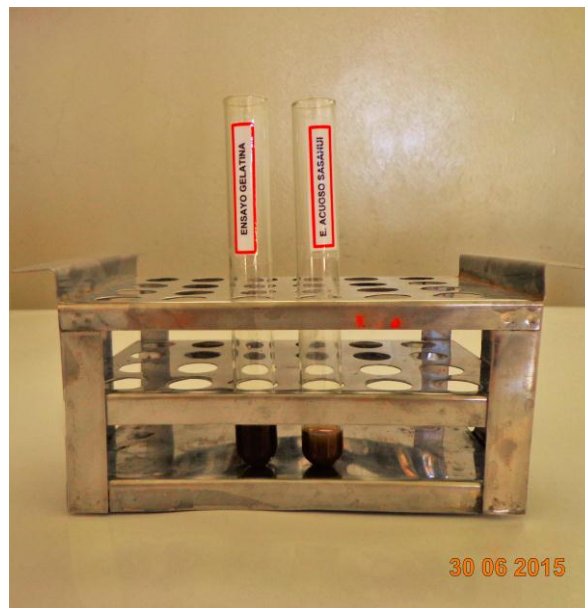
a. Fundamento

Este ensayo se fundamenta en la capacidad que poseen los taninos para ligarse a las proteínas provocando así el desarrollo de una opalescencia o la formación de precipitados en una solución.¹⁶

b. Procedimiento

- Se colocó en un tubo de ensayo una fracción de 2 mL del extracto acuoso.
- Seguidamente se agregó 1 mL de solución acuosa de gelatina-sal y se homogeneizó suavemente observando la formación de precipitados y/o cambios en la turbidez de la solución.¹⁷
- El desarrollo de una turbidez intensa en la muestra ensayada y/o presencia de precipitado se consideró como prueba positiva para taninos.¹⁸

Figura N° 9: Identificación de compuestos taninos



A la izquierda el precipitado obtenido tras el ensayo con el reactivo gelatina-sal; a la derecha el extracto sin ensayar.

Fuente: elaboración propia.

¹⁶ MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.

¹⁷ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 209.

¹⁸ IBID, p. 209.

D.3. Flavonoides

Para la identificación de la presencia de flavonoides en el extracto acuoso se utilizó el ensayo de Shinoda.

a. Fundamento

Este ensayo se fundamenta en la reacción producida por contacto del magnesio metálico y el HCl concentrado, en la que el magnesio es oxidado dando como productos el hidrógeno (H₂) que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio (MgCl₂) que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características.¹⁹

b. Procedimiento

- A 2 mL del extracto se le añadió un pequeño trozo de magnesio metálico.
- Seguidamente se añadió ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta un volumen de 0.5 mL y se agitó suavemente hasta la aparición de coloraciones características.²⁰
- Un ensayo positivo puede relacionarse con las siguientes estructuras:²¹
 - Desarrollo de color naranja a rojo: flavonas.
 - Desarrollo de color rojo carmín: flavonoles y flavononoles.
 - Desarrollo de color de carmín a magenta: flavononas.

¹⁹ MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.

²⁰ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 97.

²¹ IBID, p. 97.

Figura N° 10: Identificación de flavonoides



A la izquierda la coloración naranja obtenida tras el ensayo de Shinoda; a la derecha el extracto sin ensayar.

Fuente: elaboración propia.

D.4. Saponinas

Para la identificación de la presencia de saponinas en el extracto acuoso se utilizó el ensayo de la espuma.

a. Fundamento

Este ensayo se fundamenta en la propiedad que poseen las saponinas de poder disminuir la tensión superficial del agua, por lo que sus soluciones acuosas pueden llegar a producir espuma de manera similar al jabón.²²

b. Procedimiento

- Se tomó una fracción de 2 mL de extracto acuoso y se agitó durante 30 segundos, dejándose posteriormente en reposo.²³

²² MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.

²³ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.

- El ensayo se consideró positivo si se presenciaba la aparición espuma de más de 2 mm de altura en la superficie del líquido con una persistencia mayor a los 30 minutos.²⁴

Figura N° 11: Identificación de saponinas



A la izquierda la ausencia de burbujas obtenida tras el ensayo de la espuma; a la derecha el extracto sin ensayar.

Fuente: elaboración propia.

D.5. Alcaloides

Para la identificación de la presencia de alcaloides en el extracto acuoso se utilizó el ensayo de Wagner.

a. Fundamento

Este ensayo se fundamenta en la propiedad que tienen los iones complejos (generalmente inorgánicos) para formar sales insolubles con los alcaloides, precipitándolos en forma más o menos cuantitativa de sus soluciones en medio acuoso, ácido o neutro.²⁵

²⁴ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.

²⁵ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 305.

En el ensayo de Wagner el yodo-yoduro de potasio (ion complejo) reaccionará con el alcaloide en medio ácido, consecuentemente se formará la presencia de un yoduro doble del alcaloide (precipitado café).²⁶

b. Procedimiento

- Se colocó en un tubo de ensayo una fracción de 2 mL del extracto acuoso.
- Seguidamente se adicionaron 20 gotas de HCl concentrado, se calentó a baño maría suavemente y se dejó enfriar.²⁷
- Después de obtener la solución ácida se añadieron 3 gotas de la solución reactiva de Wagner y se agitó suavemente.²⁸
- El resultado para el ensayo de identificación de alcaloides se consideró positivo de acuerdo a los siguientes parámetros: opalescencia, turbidez definida o un precipitado de color marrón.²⁹

Figura N° 12: Identificación de alcaloides



A la izquierda el precipitado café obtenido tras el ensayo de Wagner; a la derecha el extracto sin ensayar.

Fuente: elaboración propia.

²⁶ MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32

²⁷ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 210.

²⁸ IBID, p. 210.

²⁹ IBID, p. 210.

D. 6. Azúcares reductores

Para la identificación de la presencia de azúcares reductores en el extracto acuoso se utilizó el ensayo de Fehling.

a. Fundamento

Este ensayo se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de los aldehídos, el cual se oxida a ácido y reduce la sal de cobre en medio alcalino a óxido de cobre formando un precipitado de color rojo ladrillo.³⁰

b. Procedimiento

- Se tomó una fracción de 2 mL del extracto acuoso y se le añadió 2 mL del licor de Fehling.
- Se sometió la mezcla a calor en baño maría por 10 minutos.³¹
- El ensayo se consideró positivo si la solución se coloreaba o si se presenciaba un precipitado rojo ladrillo.³²

Figura N° 13: Identificación de azúcares reductores



A la izquierda la coloración rojo ladrillo obtenida tras el ensayo de Fehling; a la derecha el extracto sin ensayar.

Fuente: elaboración propia

³⁰ MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.

³¹ LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 196.

³² IBID, p. 196.

E. Preparación del extracto madre

Inicialmente se preparó una solución madre con 2 g del extracto liofilizado *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci “sasahui”, los cuales se diluyeron en 10 mL de agua destilada obteniéndose de esa manera una concentración madre de 200 mg/mL.

Para ensayos posteriores se preparó una segunda solución madre con 4 g del extracto liofilizado *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci “sasahui”, los cuales se diluyeron en 5 mL de agua destilada obteniéndose de esa manera una concentración madre de 800 mg/mL.

F. Evaluación de la actividad antibacteriana

F.1. Obtención de las cepas de estudio

En el presente estudio se utilizaron cultivos liofilizados de las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, los cuales se obtuvieron de manera comercial a través del laboratorio GenLab del Perú S.A.C. con sede en la ciudad de Lima.

F.2. Preparación de los inóculos bacterianos

- Con un asa de Kollé estéril se tocaron las superficies de 4 a 5 colonias que se aislaron previamente a partir de un cultivo de 24 horas en el medio de cultivo agar tripticosa soya (TSA).^{33, 34}
- Se sumergió el asa de Kollé en un tubo que contenía 10 mL de suero fisiológico (NaCl 0.9%) para el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Se estandarizó el inóculo por comparación de turbidez con el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland, la que equivale aproximadamente a $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL.³⁵

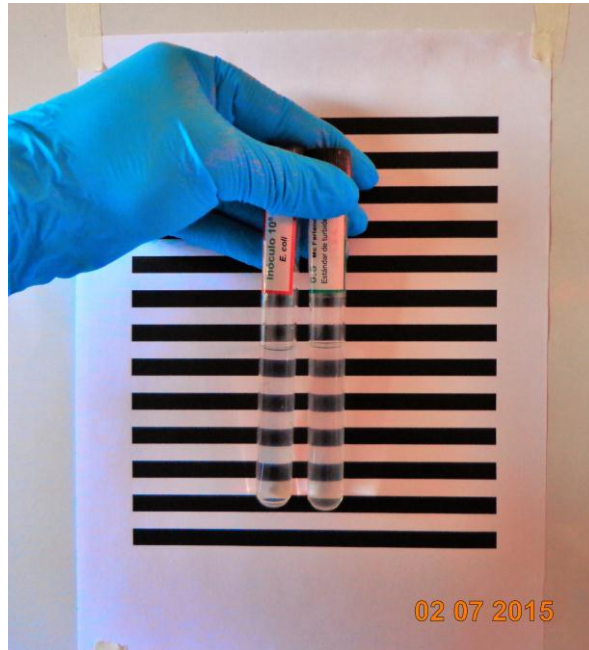
³³ CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 9th ed. 2012 Vol. 32 N^o2: 1-88, p. 17.

³⁴ URMENETA A. *et al.* Manual Práctico de Microbiología. 2^a ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 143.

³⁵ IBID, p. 17-18.

- La estandarización se realizó con luz apropiada, comparando los tubos contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Figura N° 14: Estandarización del inóculo bacteriano



Comparación del inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922 (izquierda), con la escala 0.5 de McFarland (derecha).

Fuente: elaboración propia.

F.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizó el método de la macrodilución en tubos.

a. Fundamento

Esta prueba se basa en la sensibilidad del microorganismo. Se realizan diluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo, después de lo cual se agrega una suspensión bacteriana estandarizada para luego determinar la concentración de la droga que inhibe el crecimiento bacteriano.³⁶

³⁶ INGRAHAM J, INGRAHAM C. Introducción a la microbiología. 1ª ed. Vol. II. Barcelona: Reverté; 1998, 494-495.

b. Procedimiento

- Se procedió a realizar una dilución de 1:100 del inóculo ya preparado para obtener de esta manera una solución 10^6 UFC/mL, es decir se hizo una dilución tomando 0.1 mL del inóculo de 10^8 UFC/mL y se agregó a 9.9 mL de suero fisiológico, repitiéndose el procedimiento para las dos bacterias en estudio; la preparación de las diluciones que se describen a continuación se siguieron bajo las pautas establecidas por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).³⁷
- Se trabajó con tres baterías de tubos para cada bacteria estudiada.
- Se colocó a cada tubo 1 mL de caldo peptonado (12 tubos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 14 tubos para *Escherichia coli* ATCC 25922).
- Al tubo N° 1 se le añadió 1 mL del extracto, se mezcló y se retiró 1 mL que se añadió posteriormente al tubo N° 2.
- Del tubo N° 2 se retiró 1 mL y se le añadió al tubo N° 3, se mezcló suavemente y se repitió el procedimiento hasta el tubo N° 10.
- Los tubos N° 11 y 13 sólo contuvieron caldo peptonado (control negativo).
- Los tubos N° 12 y 14 contuvieron caldo peptonado y suspensión bacteriana (control positivo).
- Posteriormente se añadió 1 mL de inóculo a la concentración de 10^6 UFC/MI a la serie de tubos desde el N° 1 al N° 10.
- Se incubaron las baterías de tubos por 24 horas a 37°C.
- Transcurridas las 24 horas se observó la turbidez de los tubos para hallar el punto de ruptura.³⁸

³⁷ CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 9ª ed. 2012. Vol. 32 N°2: 1-88, p. 17.

³⁸ IBID, p. 17-18.

Figura N° 15: Incorporación del inóculo bacteriano



Incorporación del inóculo 10^6 a las baterías de tubos con las concentraciones del extracto y al control positivo.

Fuente: elaboración propia.

F.4. Determinación de la concentración mínima bactericida

Para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método de la dilución en placa.

a. Fundamento

Este método se fundamenta en la aplicación de una suspensión que contiene bacterias y un antibiótico sobre la superficie de un medio de cultivo para la determinación de la menor concentración de la sustancia ensayada que produce la muerte de más del 99.9 % de las bacterias en estudio.³⁹

b. Procedimiento

- Se inocularon 3 placas de Petri con 0.1 mL de la suspensión de cada uno de los tubos en los que no se observó turbidez y se extendieron con el asa de Drigalski sobre la superficie del medio.⁴⁰

³⁹ URMENETA, A. *et al.* Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 141-142.

⁴⁰ IBID, p. 145.

- Se incubaron las placas invertidas a 37°C por un periodo de 24 horas.⁴¹
- Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la búsqueda de unidades formadoras de colonia (UFC) y luego se procedió a indicar la concentración del extracto en la que no se observó crecimiento bacteriano.

Figura N° 16: Inoculación de las placas para CMB



Inoculación de las placas Petri con el contenido de los tubos que no presentaron turbidez en el ensayo de la CMI.

Fuente: elaboración propia.

1.9.2 Diseño de la investigación

De acuerdo al contexto de la investigación se utilizó un diseño experimental.

1.10 Técnicas e instrumentos de recolección de información

1.10.1 Técnicas

La técnica que se utilizó en la presente investigación fue la observación científica, que a su vez se dividió en las siguientes modalidades:

- **Directa:** dado que se puso en contacto personalmente con el hecho o fenómeno que trata de investigar.

⁴¹ URMENETA, A. *et al.* Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 145.

- **Estructurada:** dado que la investigación se realizó con la ayuda de elementos técnicos apropiados tales como: fichas, cuadros, tablas.
- **De laboratorio:** dado que la investigación se realizó en un lugar preestablecido para el efecto como fueron los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa.

1.10.2 Instrumentos

Los instrumentos que se utilizaron en la presente investigación fueron:

- El cuadro de registro de ensayos fitoquímicos para el extracto acuoso (anexo N° 4).
- La tabla de registro para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (anexo N° 9 y 10).
- La tabla de registro para la determinación de la concentración mínima bactericida (anexo N° 11).

1.11 Cobertura del estudio

1.11.1 Universo

El universo se constituyó por todas las cepas bacterianas que corresponden a las especies *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.11.2 Muestra

La muestra se constituyó por el número de colonias que se emplearon para la preparación del inóculo bacteriano, la que osciló entre 3 a 4 colonias de tamaño y morfología similar.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

Dentro de las investigaciones que anteceden a la realización de la presente investigación se encontraron:

Crisci, Jorge.” Revisión del género *Leucheria* (Compositae: Mutisieae)”, 1976.

Esta investigación tuvo por objetivo realizar una revisión del género taxonómico *Leucheria* por la falta de una revisión sistemática en conjunto de este género y la enorme profusión de nombres específicos. Dentro de esta investigación se logró describir las características botánicas y distribución geográfica de un total de 46 especies pertenecientes al género *Leucheria*, citando por primera vez a la especie vegetal *Leucheria daucifolia* comúnmente denominada “sasahui”.⁴²

⁴² CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: Mutisieae). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 9-10.

Gallegos, Gorriti et al. “Evaluación de la capacidad antioxidante, determinación de polifenoles y antocianinas totales de la especie nativa *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci (sasahui)”, 2010.

Esta investigación tuvo por objetivo determinar la capacidad antioxidante, contenido fenólico, antocianinas y capacidad atrapadora del radical óxido nítrico a través de un extracto alcohólico. Los resultados que se obtuvieron muestran que *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci posee buena capacidad antioxidante con una óptima correlación entre los polifenoles y la capacidad antioxidante.⁴³

Linares, Eliana. “Etnobotánica del transecto Yura - Chivay, departamento de Arequipa, Perú”, 1995.

Este estudio tuvo por objetivo realizar una identificación de las principales especies vegetales encontradas en el transecto Yura – Chivay con el fin de establecer el uso de la flora nativa. Se presentan resultados respecto a 122 especies entre ellas se describe a *Leucheria daucifolia* “sasahui”, se entrega una descripción morfológica, antecedentes de su uso, fenología y tipo de hábitat donde fue encontrada.⁴⁴

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Aspectos generales

A. Planta medicinal

Una planta medicinal es aquel vegetal que elabora productos llamados *principios activos*, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo.⁴⁵

Las plantas medicinales tienen como utilidad primordial, a veces específica, el servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es

⁴³ GALLEGOS C. *et al.* Evaluación de la capacidad antioxidante, determinación de polifenoles y antocianinas totales de la especie nativa *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci (Sasahui). Sociedad Química del Perú 2010; p. 66.

⁴⁴ LINARES, E. Flora silvestre del transecto Yura-Chivay, Departamento de Arequipa. Boletín de Lima 1995; N° 100: 211-254, p. 211.

⁴⁵ MUÑOZ F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2002, p. 15.

decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que llega a ser la enfermedad. Además, las plantas medicinales constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies vegetales existentes.⁴⁶

B. *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci “sasahui”

Esta especie vegetal es conocida por su nombre vulgar “sasawi o sasahui”, tanto en el Perú como en otros países latinoamericanos. En la región Arequipa tiene una amplia distribución en la provincia de Caylloma.

B.1. Descripción botánica

Leucheria daucifolia (D. Don) Crisci “sasahui” es una hierba perenne de 9 a 25 cm de altura, cubierta de pelos glandulosos y una escasa lana blanca, rizomatosa. Rizoma oblicuo de hasta 2 cm de diámetro del que nacen rosetas de hojas amontonadas.⁴⁷

- **Hojas:** basales pecioladas, bipinnatipartidas, arrosetadas, cubiertas de pelos glandulosos, oblanceoladas, con segmentos lineares. Caulinares elípticas con ápice agudo, sésiles y semiabrazadoras en la base, cubiertas por pelos glandulosos.⁴⁸
- **Tallo:** escapiformes, ramificados hacia el ápice, hojosos en toda su longitud.⁴⁹
- **Fruto:** aquenios de 2 a 3 mm de longitud y 0,5 a 1 mm de diámetro, elíptico-oblongos, cubiertos de pelos, cortamente rostrados con disco epígino conspicuo. Pappus formado por 22 a 28 pelos de 7 a 9 mm de longitud, plumosos desde su base, blancuzcos, dispuestos en una serie y soldados irregularmente entre sí en la base.⁵⁰
- **Flores:** blancas, con corola de 5 a 8 mm de longitud, tubo de 4 a 6 mm de longitud y 0.1 mm de diámetro en la base y 1.5 mm en la parte superior, labio exterior ligulado, tetra nervado, de 2 a 3 mm de longitud y 2 mm laterales, ápice tridentado: dientes iguales y agudos; labio interior formado por 2 lacinias de hasta 2 mm de longitud. Anteras de base sagitada, glabras de alrededor de 3 mm de longitud, filamento cilíndrico glabro. Estilo bifido con ramas de alrededor de 1 mm de longitud.⁵¹

⁴⁶ MUÑOZ F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2002, p. 15.

⁴⁷ CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: Mutisieae). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 52.

⁴⁸ IBID, p. 52.

⁴⁹ IBID, p. 52.

⁵⁰ IBID, p. 54.

⁵¹ IBID, p. 52.

Figura N° 17: Morfología de la planta sasahui



Características morfológicas y aspecto general del sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci.

Fuente: Crisci, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20:9-126.

B.2. Clasificación taxonómica

- **Reino** : Plantae
- **División** : Angiospermae
- **Clase** : Dicotyledoneae
- **Orden** : Asterales
- **Familia** : Asteraceae
- **Género** : *Leucheria*
- **Especie** : *L. daucifolia*
- **Nombre Vulgar** : Sasahui, sasawi.⁵²

B.3. Hábitat

Original de América del Sur, se encuentra en los países de Perú, Bolivia, Chile y Argentina en mayor proporción; se desarrolla en cualquier época del año y habita en

⁵² SISTEMA NACIONAL DE DATOS BIOLÓGICOS DE LA ARGENTINA. Clasificación de Especies: *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci [internet]. Argentina [citado el 25 de marzo de 2015]. Disponible desde: <http://datos.sndb.mincyt.gob.ar/portal/species/browse/resource/111/taxon/7960595/>

suelos areno-arcillosos, pedregosos.⁵³ En el Perú se le puede encontrar en las regiones de Arequipa, Moquegua, Cusco y Puno.⁵⁴

Su hábitat depende de la elevación que oscila por sobre los 3,000 m.s.n.m. y florece desde agosto a abril.⁵⁵

B.4. Antecedentes terapéuticos tradicionales

El Sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" es una especie vegetal poco estudiada, tradicionalmente se le emplea con diferentes fines:

Cuadro N° 2: Usos medicinales del sasahui

Parte utilizada	Modo de uso	Afecciones
Hojas y raíz	Decocción	Dolor reumático, antiinflamatorio.
Hojas	Decocción	Tos, gripe, diarrea, diabetes.
Hojas	Macerado	Tos, bronquitis.
Hojas y tallo	Decocción	Parasitosis intestinal, sarna.
Hojas	Cataplasma	Heridas y llagas, dolor muscular.

Fuente: elaboración propia a partir de las aportaciones de Astete J. (2003), Linares E. (1995).

B.5. Composición química

Los componentes químicos de las plantas son generalmente abundantes y de estructura diversa. Poseen según su naturaleza, carácter orgánico e inorgánico. Los componentes químicos orgánicos pueden proceder del metabolismo primario o secundario del vegetal.⁵⁶

⁵³ CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: Mutisieae). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 54.

⁵⁴ SERVICIO NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS POR EL ESTADO. Reserva paisajística sub cuenca del Cotahuasi [internet]. Arequipa, Perú: Sernarp [citado el 25 de marzo de 2015]. Disponible desde: <http://www.sernarp.gob.pe/sernap/zonaturismo.jsp?ID=53&c=1>

⁵⁵ CRISCI OP.CIT. p. 54.

⁵⁶ KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 51.

En cuanto a la composición general de *Leucheria daucifolia*, algunos estudios han indicado que contiene:

a. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de una gran distribución en el reino vegetal y pueden estar presentes en todas las partes de las plantas.⁵⁷

En general, desde el punto de vista químico, se consideran como derivados de una secuencia C₆-C₃-C₆, donde los agrupamientos de 6 carbonos corresponden a anillos tipo bencenoide y la porción de 3 carbonos, en forma de heterociclo oxigenado, que en general es el más importante para definir su tipo de flavonoide, será de gran influencia en sus actividades biológicas.⁵⁸

En las plantas se encuentran fundamentalmente en forma de glicósidos, esto les infiere una alta solubilidad en agua y disolventes polares, lo cual se incrementa por la alta polaridad de sus estructuras.⁵⁹

Su actividad terapéutica se caracteriza por su capacidad como antibacteriano, antivírico, antifúngico, antihemorrágico, antihepatotóxico, antiinflamatorio, antioxidante, antiespasmódico, antiurémico, diurético antiarrítmico y protector de la pared vascular.⁶⁰

Los flavonoides se clasifican en base a sus variaciones estructurales:

- Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3, flavonas (con H en la posición 3), flavonoles (con OH en la posición 3).
- Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3, flavanonas (con H en la posición 3), flavonololes (con H en la posición 3).
- Chalconas (con el anillo C abierto).
- Isoflavonoides (con el anillo B en la posición 3, 3-fenil- γ -cromona).⁶¹

⁵⁷ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 261.

⁵⁸ IBID, p. 262.

⁵⁹ IBID, p. 262.

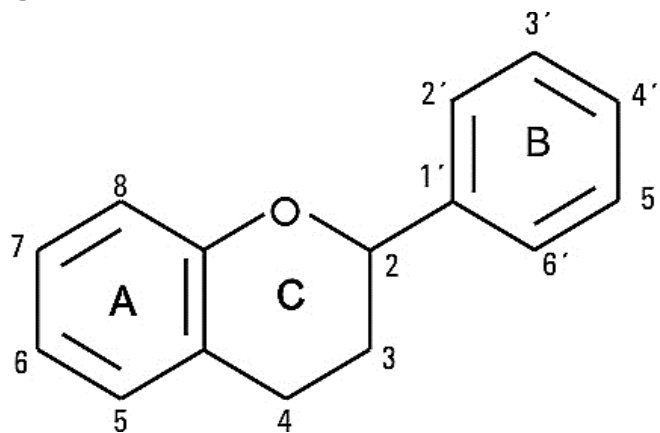
⁶⁰ KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 108.

⁶¹ IBID, p. 106-107.

Las flavonas son abundantes en familias herbáceas tales como: asteráceas, umbelíferas, labiadas, etcétera; su actividad frente a microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y también con las células de la pared bacteriana de forma similar a las quinonas. Por otro lado, los flavonoles abundan en las angiospermas leñosas.⁶²

En el sasahui se encuentra presente en un total de 3.9 gramos por litro de extracto metanólico, según antecedentes investigativos.

Figura N° 18: Estructura básica de los flavonoides



Comprende dos anillos aromáticos (A y B) que se encuentran unidos entre sí por un heterociclo (C).

Fuente: Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000.

b. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos cuya masa molecular oscila entre 500 y 3000 aproximadamente, en dependencia de la procedencia que son capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus dos propiedades: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente.⁶³

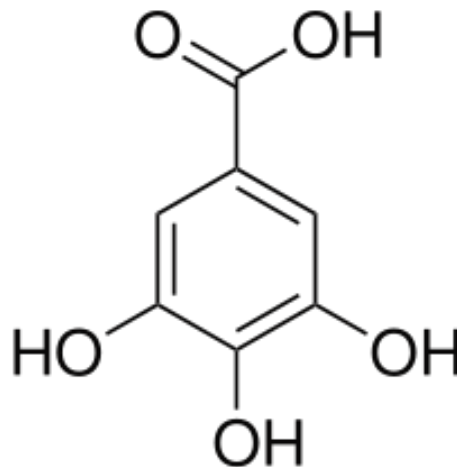
⁶² MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 265.

⁶³ IBID, p. 351.

Los taninos son capaces de reaccionar con las proteínas salivares y las glucoproteínas de la boca, por lo que la saliva pierde su poder lubricante y se obtiene un efecto astringente.⁶⁴

Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con los alcaloides, proteínas o celulosa.⁶⁵

Figura N° 19: Estructura química del ácido gálico



La mayoría de los taninos están constituidos por moléculas de ácido gálico unidas a moléculas de glucosa.

Fuente: Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000.

De acuerdo con su estructura molecular, los taninos se diferencian en dos tipos: los hidrolizables y los condensados.

- **Taninos hidrolizables:** Son característicos de dicotiledóneas. Se caracterizan por ser muy solubles en agua, sobre todo en agua caliente, formando soluciones coloidales. Son, por tanto, también más solubles en solventes orgánicos de relativa polaridad, en particular el metanol y etanol. Se hidrolizan tanto por hidrólisis ácida o básica como por hidrólisis enzimática. De ellos se reconocen dos tipos: los galotaninos y los elagitaninos.⁶⁶

⁶⁴ KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 112.

⁶⁵ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 352.

⁶⁶ KUKLINSKI OP.CIT., p. 113.

- **Taninos condensados:** Además de encontrarse en dicotiledóneas, también se hayan en helechos y gimnospermas. Tienen como una característica fundamental que producen antocianidinas y catequinas por calentamiento con ácidos diluidos. Se condensan con proteínas cuya estructura depende lógicamente de la masa molecular. De ellos se reconocen tres tipos: catequinas, leucoantocianidinas y biflavanos.⁶⁷

Las acciones farmacológicas de los taninos están relacionadas con sus principales propiedades. Sus principales acciones y usos son: antídoto en intoxicaciones por metales pesados y alcaloides, cicatrizante, antidiarreico, antibacteriano, antifúngico, analgésico, antihemorrágico, antioxidante, hipocolesterolémico.⁶⁸

Según los reportes de antecedentes investigativos, el sasahui presenta una concentración de 2.359 mg/mL de taninos por litro de extracto metanólico.

c. Alcaloides

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Tiene una estructura generalmente compleja y ejercen acciones fisiológicas diversas incluso a dosis muy bajas. Son tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos. Hay sin embargo, determinadas sustancias que se consideran alcaloides y que no cumplen con las características generales de los alcaloides.⁶⁹

En términos generales, los alcaloides resultan muy poco solubles en agua, disolviéndose con facilidad en alcoholes inferiores, acetona, éter etílico, cloroformo, acetato de etilo o combinaciones de estos solventes. Muchos alcaloides de masa molecular reducida, resultan solubles tanto en agua como la mayoría de los solventes orgánicos.⁷⁰

⁶⁷ KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 114.

⁶⁸ IBID, p. 115-116.

⁶⁹ IBID, p. 168.

⁷⁰ IBID, p. 169.

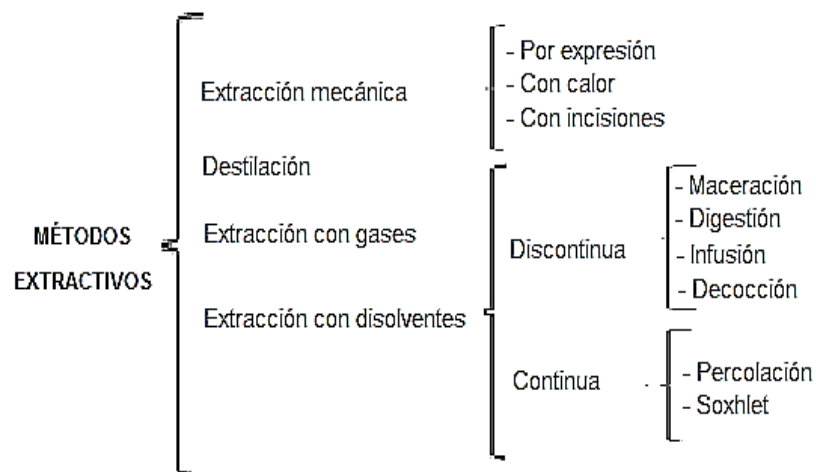
B.6. Toxicología

Aunque no se conoce con exactitud la biotoxicidad de esta planta, la etnomedicina la considera como una de las plantas medicinales que no produce efectos secundarios cuando se usa en la dosis adecuada.⁷¹

2.2.2 Extracción

La extracción es una operación que forma parte de un grupo importante de operaciones unitarias conocidas como operaciones difusionales o de transferencia de materia. Es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla o para aislarlo de sus fuentes naturales.⁷²

Figura N° 20: Clasificación de los métodos de extracción



Se observan los diferentes métodos de extracción aplicados para la extracción de principios activos.

Fuente: Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000.

A. Extracción por decocción

Es un método de extracción que utiliza el agua como disolvente, consiste en hervir la droga conjuntamente con el agua durante 15 a 30 minutos. El calentamiento se realiza

⁷¹ SERVICIO DE MEDICINA PRO-VIDA. Guía de plantas de uso medicinal. 1ª ed. Lima: Servicio de Medicina Pro-Vida; 1997, p. 26.

⁷² KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 32.

en baño de agua o vapor de agua, en un recipiente de cristal, esmaltado o de acero inoxidable cerrado adecuadamente. Una vez enfriado, se filtra y se exprime el residuo.⁷³

El tiempo de decocción depende de las características de la droga; es menor para las drogas blandas (hojas, flores, etcétera) y mayor para drogas vegetales duras (corteza, semillas, etcétera). El tiempo de decocción también depende de los principios activos que se desea extraer.⁷⁴

Este método elimina proteínas y enzimas que ayudan a la fermentación, pero los extractos son poco estables y se preparan para consumo rápido.⁷⁵

2.2.3 Descripción de bacterias en estudio

A. Bacterias Gram positivas

Se denominan bacterias gram positivas a aquellas bacterias que se tiñen de color violeta intenso después de haber realizado la tinción Gram, debido a la estructura de su pared celular.⁷⁶

En la mayoría de las bacterias Gram positivas la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida. Su pared contiene ácidos teicoicos, compuestos por un alcohol (glicerol o ribitol, etc.) y fosfato; estos ácidos contribuyen al desarrollo celular al prevenir la ruptura de la pared celular y reducir el riesgo de lisis.⁷⁷

⁷³ KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 35.

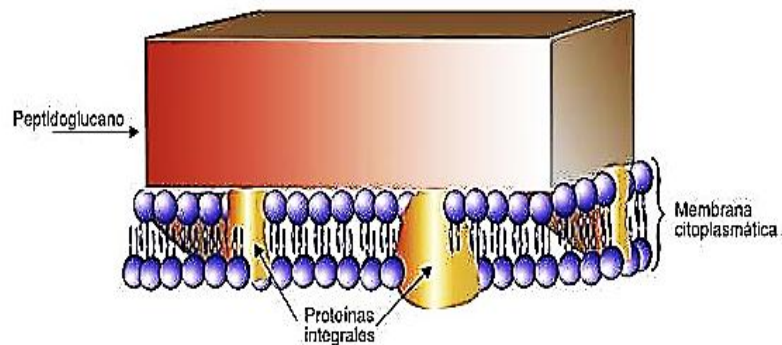
⁷⁴ IBID, p. 35.

⁷⁵ MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 160.

⁷⁶ GARCÍA V. Introducción a la microbiología. 2ª ed. Costa Rica: Euned; 2004, p. 47.

⁷⁷ TÓRTORA G. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 86.

Figura N° 21: Envoltura de una bacteria Gram positiva



La pared celular en las Gram positivas está conformada por capas de peptidoglucano, ácidos teicoicos y fosfato.

Fuente: Montoya, H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Medellín: Universidad de Antioquía; 2008.

A.1. *Staphylococcus aureus*

a. Características

Staphylococcus aureus es una especie bacteriana Gram positiva integrada por formas cocáceas de 0,8 a 1,0 μm de diámetro, que se dividen en más de un plano, por lo que se agrupan irregularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporos.⁷⁸

La morfología colonial es una característica muy útil que ayuda a diferenciar inicialmente la especie *Staphylococcus aureus* de las otras especies de estafilococos.⁷⁹

Tras 24 horas de incubación, *Staphylococcus aureus* crece formando colonias lisas, elevadas y brillantes y de bordes enteros. Típicamente las colonias presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada, debida a la producción de un pigmento carotenoide; casi todas las cepas tienen un halo de β – hemólisis o hemólisis completa alrededor de la colonia, cuando crecen en medios de cultivo con sangre.⁸⁰

⁷⁸ NEGRONI M. Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 1ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2009, p. 353.

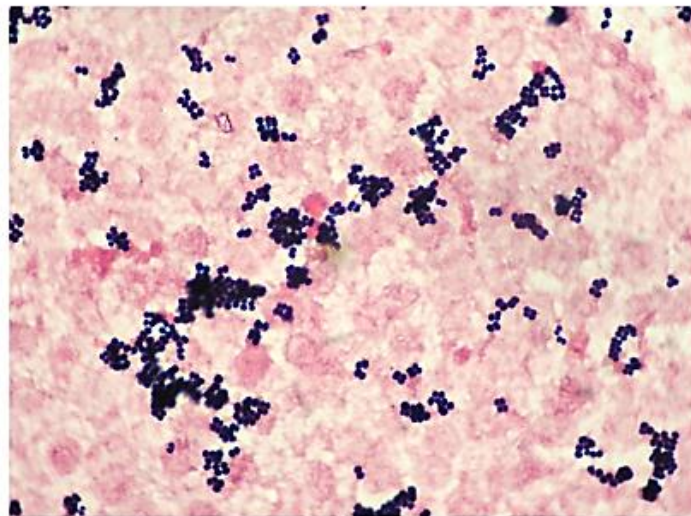
⁷⁹ PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 17.

⁸⁰ IBID, p. 17.

La principal característica que diferencia a *Staphylococcus aureus* de las demás especies de estafilococos es la producción de la enzima coagulasa, que permite a la bacteria coagular el plasma.⁸¹

Son bacterias muy resistentes al calor y la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad (7,5% de ClNa).⁸²

Figura N° 22: Gram de *Staphylococcus aureus*



De formas cocáceas, se agrupan en forma de racimos y al microscopio se observan con una coloración violácea.

Fuente: Pahissa, A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009.

b. Infección Clínica

La patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* es un fenómeno complejo debido principalmente al amplio arsenal de factores de virulencia que puede expresar esta bacteria.⁸³

Aproximadamente un 20% de la población es portadora de *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales y un 30% lo es de manera intermitente. *Staphylococcus aureus* puede además colonizar otras áreas tales como la piel y el tracto gastrointestinal. Cuando la

⁸¹ PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 17-18.

⁸² IBID, p. 18.

⁸³ IBID, p. 23.

integridad de las barreras mecánicas se rompe, estos microorganismos pueden alcanzar tejidos más profundos y producir infección.⁸⁴

Su acción patógena es debida fundamentalmente a la acción de antígenos de superficie (proteína A), toxinas (hemolisinas, leucocidinas, exfoliatina y enterotoxinas) y fermentos (coagulasas, fibrinolisinias, penicilinasas y otras).⁸⁵

c. Transmisión

Los pacientes con infecciones por *Staphylococcus aureus* suelen infectarse por la misma cepa que coloniza sus fosas nasales. La colonización también permite la transmisión entre individuos tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad.⁸⁶

d. Tratamiento

El tratamiento de opción para la infección por *Staphylococcus aureus* es la penicilina, aunque en muchos países ha desarrollado una resistencia a la penicilina debido a la producción de una enzima llamada penicilinasas. Debido a esto, la primera línea terapéutica está conformada por penicilinas resistentes a la penicilinasas como la oxacilina.⁸⁷

La terapia se da a menudo conjuntamente con aminoglucósidos como la gentamicina para infecciones más graves. La duración del tratamiento depende de la localización de la infección y de la severidad del cuadro.⁸⁸

e. Pruebas de identificación

El diagnóstico de enfermedad estafilocócica está sugerido por el hallazgo de cocos Gram positivos en racimos en el material patológico.⁸⁹ Además se pueden aplicar diferentes pruebas bioquímicas para la confirmación de su identificación.

⁸⁴ PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 24

⁸⁵ IBID, p. 24.

⁸⁶ IBID, p. 24.

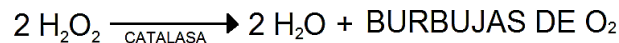
⁸⁷ IBID, p. 33.

⁸⁸ IBID, p. 34.

⁸⁹ IBID, p. 19.

- **Prueba de la catalasa:** Las bacterias que viven en un ambiente aerobio, necesitan un equipo enzimático capaz de neutralizar estas formas tóxicas. Entre estas enzimas se encuentra la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. La prueba de la catalasa es positiva cuando se ponen en contacto una bacteria con actividad catalasa con peróxido de hidrógeno al 3% y se producen burbujas de oxígeno.⁹⁰

Figura N° 23: Reacción de la enzima catalasa



El peróxido de hidrógeno es transformado por la catalasa en agua y oxígeno (burbujas).

Fuente: Urmeneta A. *et al.* Manual práctico de microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009.

- **Prueba de la coagulasa en tubo:** La coagulasa detectada por este método se segrega de forma extracelular y reacciona con una sustancia en el plasma llamado factor de la reacción coagulasa (CRF) para formar un complejo que, a su vez, reacciona con el fibrinógeno para formar fibrina (formación del coágulo).⁹¹
- **Fermentación del manitol:** El Agar manitol salado es un medio selectivo y diferencial muy utilizado para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*. La alta concentración de sal (ClNa al 7,5%) le proporciona su carácter selectivo. La producción de ácidos proveniente de la fermentación del manitol es detectada por un viraje del indicador de pH presente en el medio (rojo fenol) a amarillo. *Staphylococcus aureus*, fermentador del manitol, crecerá en el medio dando lugar a colonias grandes rodeadas de un halo amarillo, mientras que *Staphylococcus epidermidis*, que no fermenta el manitol, dará lugar a colonias pequeñas rodeadas de un halo de color púrpura.⁹²

⁹⁰ URMENETA A. *et al.* Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 62.

⁹¹ MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003, p. 100-101.

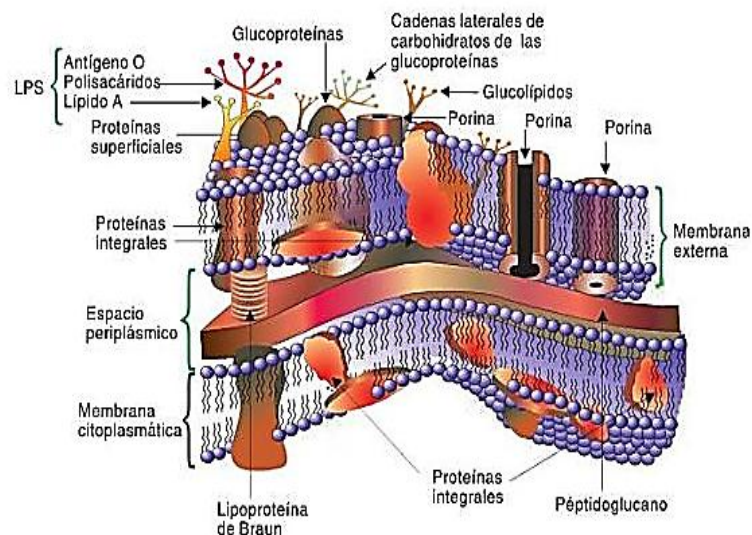
⁹² URMENETA OP.CIT., p. 54.

B. Bacterias Gram negativas

La pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por una capa o por muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana flexible. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática.⁹³

La pared celular de las bacterias Gram negativas no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica.⁹⁴

Figura N° 24: Envoltura de una bacteria Gram negativa



La pared celular en las Gram negativas está conformada por escaso peptidoglucano y carece de ácidos teicoicos.

Fuente: Montoya, H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Medellín: Universidad de Antioquía; 2008.

La membrana externa de las bacterias Gram negativas está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos. Constituye una barrera que impide el paso de ciertos antibióticos, de enzimas digestivas, de detergentes, de metales pesados, de sales biliares y de ciertos colorantes.⁹⁵

⁹³ TÓRTORA G. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 86.

⁹⁴ IBID, p. 86.

⁹⁵ IBID, p. 86.

A.1. *Escherichia coli*

a. Características

Escherichia coli es un bacilo corto Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobio facultativo. La mayoría de las cepas fermentan lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas. Típicamente, la especie es rojo metilo positiva, Voges-Proskauer negativa y no crece en el medio de citrato de Simmons, produciendo indol la mayoría de las cepas.⁹⁶

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente en relación a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Además, pueden hallarse fimbrias y estructuras emparentadas que desempeñan un papel en la patogenia.⁹⁷

b. Infección clínica

Escherichia coli es la bacteria más constantemente encontrada en las materias fecales del hombre y de muchas especies animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño. Sin embargo, al colonizar tejidos extraintestinales, *Escherichia coli* produce procesos inflamatorios piógenos similares a otras bacterias. Se ha mencionado que es la bacteria que produce más infecciones en heridas en los hospitales.⁹⁸

Puede infectar las vías respiratorias y las meninges, como consecuencia de una invasión a circulación sanguínea. Las septicemias por *Escherichia coli* son muy preocupantes por la gravedad de su pronóstico. Se pueden instalar en el hígado, vías respiratorias u otros órganos. Cuando hay una perforación intestinal, son las responsables de la peritonitis consecutiva a dicha lesión. Las infecciones urinarias son producidas por *Escherichia coli* en más del 70% de los casos, según algunas

⁹⁶ KONEMAN E. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2008, p. 225.

⁹⁷ IBID, p. 227.

⁹⁸ CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 753.

estadísticas, y puede ser el agente etiológico de la enteritis y la enterocolitis (diarreas del viajero).⁹⁹

c. Transmisión

La transmisión varía de acuerdo a sus mecanismos patogénicos, los que pueden ser: enteropatogénico, enterotoxigénico, enteroagregativo, enterocitotóxico, enteroinvasivo y difusamente adherente.

- En el mecanismo enteropatogénico, la transmisión es fecal-oral.
- En el mecanismo enterotoxigénico, la transmisión se da a través de agua y alimentos.
- En el mecanismo enterocitotóxico la transmisión más importante es por alimentos o agua, y de persona a persona.¹⁰⁰

d. Tratamiento

El tratamiento también varía según el tipo de mecanismo patogénico, indicándose lo siguiente:

- ***Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC):** Se inicia con la corrección de la deshidratación y se puede aplicar antibióticos como: aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol; y subsalicilato de bismuto.¹⁰¹
- ***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC):** Se inicia con un reemplazo de líquidos y electrolitos y se pueden aplicar trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina, ofloxacina y subsalicilato de bismuto.¹⁰²
- ***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC):** Se inicia con un reemplazo de líquidos y se continúa con la aplicación de una terapia antibiótica similar para casos de *Shigella*.¹⁰³

⁹⁹ CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 753.

¹⁰⁰ IBID, p. 768-771.

¹⁰¹ IBID, p. 754-755.

¹⁰² IBID, p. 756-758.

¹⁰³ IBID, p. 759-760

- ***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC):** Se aplica una terapia antibiótica con trimetoprim-sulfametoxazol que reduce la severidad y duración, y la fosfomicina que disminuye el riesgo de síndrome urémico hemolítico.¹⁰⁴

e. Pruebas de identificación

Dentro de las pruebas de identificación para *Escherichia coli* podemos encontrar:

- **Prueba del indol:** Esta prueba se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptófano a indol, que es el compuesto que se detecta en este ensayo a través de la formación de un anillo rojo.¹⁰⁵
- **Prueba de rojo de metilo:** Esta prueba busca probar la capacidad de un microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y para vencer la capacidad buffer del sistema.¹⁰⁶
- **Prueba de Voges-Proskauer:** Esta prueba sirve para determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (AMC), a partir de la fermentación de la glucosa.¹⁰⁷
- **Prueba de citrato:** Esta prueba busca determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante.¹⁰⁸

¹⁰⁴ CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 760-762.

¹⁰⁵ URMENETA A. *et al.* Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 64-66.

¹⁰⁶ MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003, p. 301-302.

¹⁰⁷ IBID, p. 411.

¹⁰⁸ IBID, p. 92.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Población y muestra

3.1.1 Población

La población se constituyó por las placas de agar Müller Hinton que contenían a las cepas reactivadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

A. Criterios de inclusión

Colonias bacterianas que fueron morfológicamente iguales e incubadas en un periodo no mayor a 24 horas.

B. Criterios de exclusión

Colonias bacterianas que no fueron morfológicamente iguales, con un periodo de incubación mayor a las 24 horas o con presencia de algún contaminante.

3.1.2 Muestra

La muestra se constituyó por el número de colonias que se emplearon para la preparación del inóculo bacteriano, la que osciló entre 3 a 5 colonias de tamaño y morfología similar.

3.2 Tamaño de la muestra

Considerando que la muestra se constituyó por el número de colonias que se emplearon en la preparación del inóculo bacteriano correspondiente a las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, el tamaño de la muestra se determinó empleando los estándares propuestos por la Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), en el que se establece la toma de 3 a 5 colonias para la preparación de inóculo bacteriano.

En el caso de los ensayos de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, para un adecuado ensayo, se realizaron tres repeticiones para cada concentración utilizada.

El total de tubos de ensayo y placas Petri que se utilizaron en la investigación, se determinó por el número de concentraciones que se usaron en el experimento. Estas concentraciones se dieron en un número de 12, incluyendo a los controles positivo y negativo para la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en un número de 14 para la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3 Análisis e interpretación de los resultados

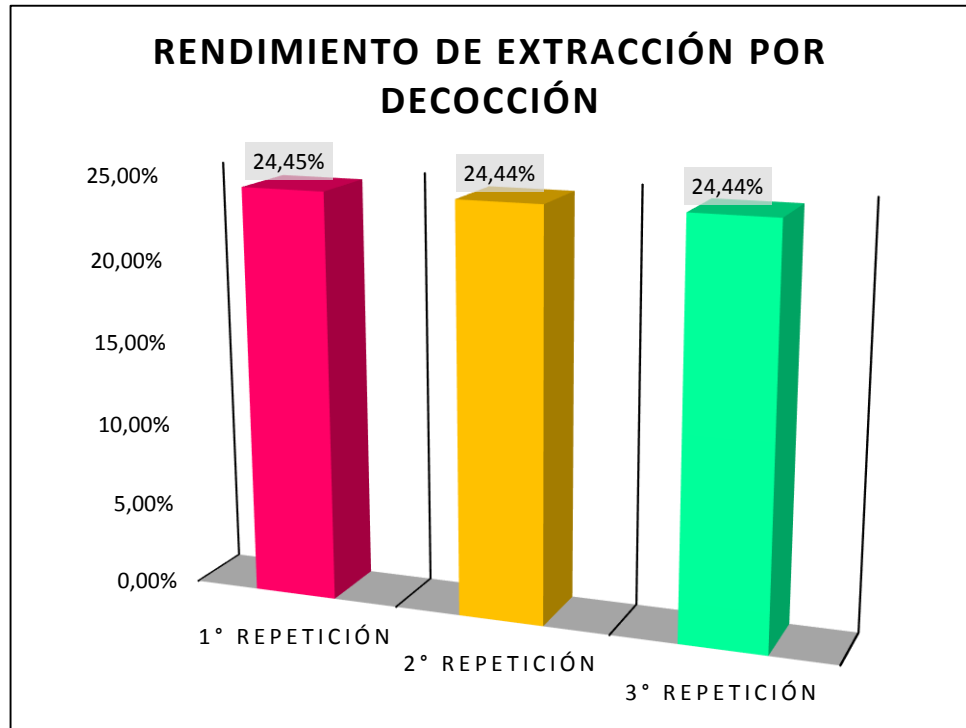
Tabla N° 1: Rendimiento del extracto acuoso por decocción

Repetición	Peso del material vegetal pulverizado	Peso del material vegetal liofilizado	Porcentaje de rendimiento
N° 1	12 g	2.9342 g	24.45%
N° 2	12 g	2.9331 g	24.44%
N° 3	12 g	2.9325 g	24.44%
Media	12 g	2.9333 g	24.44%

Fuente: elaboración propia.

En la tabla N° 1 se aprecia que para la determinación del porcentaje de rendimiento del extracto de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" se realizaron tres repeticiones partiendo de la misma cantidad de material vegetal pulverizado, estableciéndose un promedio de 24.44% como porcentaje de rendimiento para el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" obtenido por el método de decocción.

Gráfico N° 1: Rendimiento de extracción por método de decocción



Fuente: elaboración propia.

El gráfico N° 1 expresa con mayor claridad la escasa diferencia entre los porcentajes de rendimiento de extracción del extracto de hojas de Sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci obtenidos en cada una de las tres repeticiones.

Cuadro N° 3: Análisis fitoquímico preliminar para el extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci”

Extracto	Ensayo	Metabolito	Observación
ACUOSO	Fehling	Azúcares r.	+
	Espuma	Saponinas	-
	Tricloruro de hierro	Comp. fenólicos	+
	Flavonoides	Shinoda	+
	Gelatina – Sal	Taninos	+
	Wagner	Alcaloides	+

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (-) identificación negativa (+) identificación positiva.

El cuadro N° 3 expone los resultados obtenidos en la identificación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci”. Todos los ensayos realizados fueron positivos a excepción del ensayo de la espuma para la identificación de saponinas.

Tabla N° 2: Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

	N° de Tubos										Control	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	-
Caldo peptonado mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto acuoso mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/	/
Inóculo 10⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/
Concentración del extracto mg/mL	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.195	/	/
Turbidez <i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CMI <i>S. aureus</i>				12.5								

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (-) ausencia (+) presencia (/) sin adición.

La tabla N° 2 indica la distribución de las diez concentraciones ensayadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci”, obteniéndose de acuerdo a los resultados una CMI de 12.5 mg/mL en las tres repeticiones realizadas frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla N° 3: Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

	N° de Tubos												Control	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	+	-
Caldo peptonado mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto acuoso mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/	/
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/
Concentración del extracto mg/mL	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.195	/	/
Turbidez <i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CMI <i>E. coli</i>		200												

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (-) ausencia (+) presencia (/) sin adición.

La tabla N° 3 detalla la distribución de las doce concentraciones ensayadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci”, obteniéndose de acuerdo a los resultados una CMI de 200 mg/mL en las tres repeticiones realizadas frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla N° 4: Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

	Concentración del extracto (mg/ mL)			
	100	50	25	12.5
Repetición 1° serie de tubos	-	-	-	+
Repetición 2° serie de tubos	-	-	-	+
Repetición 3° serie de tubos	-	-	-	+
CMB			25	

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (-) ausencia de colonias (+) presencia de colonias.

La tabla N° 4 señala las concentraciones del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” que se ensayaron para la determinación de concentración mínima bactericida (CMB). De acuerdo a la presencia o ausencia de colonias bacterianas, se obtuvo una CMB de 25 mg/mL en las tres repeticiones realizadas en placa de cada serie de tubos frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla N° 5: Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

	Concentración del extracto (mg/ mL)	
	400	200
Repetición 1° serie de tubos	-	+
Repetición 2° serie de tubos	-	+
Repetición 3° serie de tubos	-	+
CMB	400	

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (-) ausencia de colonias (+) presencia de colonias.

La tabla N° 5 hace referencia a las concentraciones del extracto acuoso de hojas de sasahui “*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci” que se ensayaron para la determinación de concentración mínima bactericida (CMB). De acuerdo a la presencia o ausencia de colonias bacterianas, se determinó una CMB de 400 mg/mL en las tres repeticiones realizadas en placa de cada serie de tubos frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Primera: Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, confirmando que el sasahui tiene actividad bactericida y bacteriostática frente a las bacterias mencionadas anteriormente.

Segunda: Considerando los resultados obtenidos tras la aplicación del proceso de liofilización sobre el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" elaborado por el método de decocción, se obtuvo un rendimiento de extracción de 24.44%.

Tercera: A través del análisis fitoquímico preliminar, se identificó la presencia de compuestos fenólicos del tipo taninos pirogalotánicos, flavonoides, alcaloides y azúcares reductores en el extracto acuoso de hojas de sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci".

Cuarta: Por medio del método de macrodilución en tubo, se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 12.5 mg/mL frente a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de 200 mg/mL para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Quinta: Mediante el método de dilución en placa, se determinó una concentración mínima bactericida (CMB) de 25 mg/mL frente la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de 400 mg/mL para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Recomendaciones

- Primera:** Evaluar la actividad antibacteriana del sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" utilizando solventes orgánicos y sobre otras bacterias para ampliar el estudio de su espectro antibacteriano.
- Segunda:** Realizar pruebas "*in vivo*" para valorar la efectividad y la toxicidad que puedan proporcionar los componentes activos del sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" como también poder determinar su dosis terapéutica para su uso en la población.
- Tercera:** A partir de los resultados fitoquímicos obtenidos en el presente estudio, se recomienda realizar una investigación orientada al aislamiento y cuantificación de los metabolitos secundarios.
- Cuarta:** Evaluar la actividad terapéutica del sasahui "*Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci" en otras líneas de investigación de acuerdo a los usos tradicionales que la población le atribuye.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Minsa 2012; p. 3.
2. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Nota descriptiva N°194: 2013 [citado el 20 de abril de 2015]. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
3. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Minsa 2012; p. 3.
4. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Minsa 2012; p. 6-8.
5. GERENCIA REGIONAL DE SALUD AREQUIPA. Morbilidad en consulta externa abril 2015 [Internet]. Arequipa: Ministerio de Salud [citado el 23 de abril de 2015]. Disponible desde: <http://www.saludenarequipa.gob.pe/pe>

6. KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p.13-14.
7. KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 16
8. KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 16.
9. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 43.
10. KULKINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 17.
11. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 159.
12. MORRISON R, BOYD R. Química orgánica. 5ª ed. México: Addison Wesley Longman de México; 1998, p. 999.
13. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 357.
14. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.
15. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.
16. MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.
17. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 209.

18. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 209.
19. MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.
20. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 97.
21. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 97.
22. MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.
23. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.
24. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 208.
25. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 305.
26. MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.
27. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 210.
28. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 210.

29. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 210.
30. MINISTERIO DE SALUD. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999, p. 32.
31. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 196.
32. LOCK O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988, p. 196.
33. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 9a ed. 2012 Vol. 32 N°2: 1-88, p. 17.
34. URMENETA A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 143.
35. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 9a ed. 2012 Vol. 32 N°2: 1-88, p. 17-18.
36. INGRAHAM J, INGRAHAM C. Introducción a la microbiología. 1ª ed. Vol. II. Barcelona: Reverté; 1998, 494-495.
37. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 9ª ed. 2012. Vol. 32 N°2: 1-88, p. 17.
38. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 9ª ed. 2012. Vol. 32 N°2: 1-88, p. 17-18.
39. URMENETA, A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 141-142.

40. URMENETA A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 145.
41. URMENETA A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 145.
42. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: Mutisieae). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 9-10.
43. GALLEGOS C. et al. Evaluación de la capacidad antioxidante, determinación de polifenoles y antocianinas totales de la especie nativa *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci (Sasahui). Sociedad Química del Perú 2010; p. 66.
44. LINARES, E. Flora silvestre del transecto Yura-Chivay, Departamento de Arequipa. Boletín de Lima 1995; Nª 100: 211-254, p. 211.
45. MUÑOZ F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2002, p. 15.
46. MUÑOZ F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2002, p. 15.
47. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 52.
48. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 52.
49. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 52.
50. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 54.

51. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 52.
52. SISTEMA NACIONAL DE DATOS BIOLÓGICOS DE LA ARGENTINA. Clasificación de Especies: *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci [internet]. Argentina [citado el 25 de marzo de 2015]. Disponible desde:
<http://datos.sndb.mincyt.gob.ar/portal/species/browse/resource/111/taxon/7960595/>
53. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 54.
54. SERVICIO NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS POR EL ESTADO. Reserva paisajística sub cuenca del Cotahuasi [internet]. Arequipa, Perú: Sernarp [citado el 25 de marzo de 2015]. Disponible desde:
<http://www.sernarp.gob.pe/sernap/zonaturismo.jsp?ID=53&c=1>
55. CRISCI, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20: 9-126, p. 54.
56. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 51.
57. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 261.
58. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 262.
59. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 262.
60. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 108.

61. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 106-107.
62. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 265.
63. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 351.
64. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 112.
65. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 352.
66. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 113.
67. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 114.
68. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 115-116.
69. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 168.
70. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 169.
71. SERVICIO DE MEDICINA PRO-VIDA. Guía de plantas de uso medicinal. 1ª ed. Lima: Servicio de Medicina Pro-Vida; 1997, p. 26.
72. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 32.

73. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 35.
74. KUKLINSKI C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000, p. 35.
75. MIRANDA M, CUÉLLAR A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001, p. 160.
76. GARCÍA V. Introducción a la microbiología. 2ª ed. Costa Rica: Euned; 2004, p. 47.
77. TÓRTORA G. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 86.
78. NEGRONI M. Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 1ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2009, p. 353.
79. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 17.
80. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 17.
81. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 17-18.
82. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 18.
83. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 23.
84. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 24

85. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 24.
86. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 24.
87. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 33.
88. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 34.
89. PAHISSA A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009, p. 19.
90. URMENETA A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 62.
91. MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003, p. 100-101.
92. URMENETA A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 54.
93. TÓRTORA G. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 86.
94. TÓRTORA G. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 86.
95. TÓRTORA G. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 86.
96. KONEMAN E. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2008, p. 225.

97. KONEMAN E. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2008, p. 227.
98. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 753.
99. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 753.
100. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 768-771.
101. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 754-755.
102. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 756-758.
103. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 759-760
104. CABELLO R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007, p. 760-762.
105. URMENETA A. et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009, p. 64-66.
106. MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003, p. 301-302.
107. MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003, p. 411.
108. MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003, p. 92.

BIBLIOGRAFÍA

LIBROS

1. Astete J. Vida campesina y manejo de recursos naturales. 1ª ed. Arequipa: Proyecto Sierra Sur; 2009.
2. Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007.
3. García V. Introducción a la Microbiología. 2ª ed. Costa rica: Euned; 2004.
4. Ingraham J, Ingraham C. Introducción a la microbiología. 1ª ed. Vol. II. Barcelona: Reverté; 1998.
5. Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Ministerio de Salud 2012; p. 3 – 8.
6. Koneman E. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2008.
7. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000.

8. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1ª ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988.
9. MacFaddin J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2003.
10. Ministerio de Salud. Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. 1ª ed. Lima: Minsa; 1999.
11. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1ª ed. La Habana: Félix Varela; 2001.
12. Montoya H. Microbiología Básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Medellín: Universidad de Antioquía; 2008.
13. Morrison R, Boyd R. Química orgánica. 5a ed. México: Addison Wesley Longman de México; 1998.
14. Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2002.
15. Negroni M. Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 1ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2009.
16. Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona: ICG Marge; 2009.
17. Prats G. Microbiología clínica. 1ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2005.
18. Servicio de Medicina Pro-Vida. Guía de plantas de uso medicinal. 1ª ed. Lima: Ed. Servicio de Medicina Pro-Vida; 1997.
19. Tortora G. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007.
20. Urmeneta, Alonso et al. Manual Práctico de Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2009.

REVISTAS

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9ª Ed. 2012 Vol. 32 N°2: 1-88.
22. Crisci, J. Revisión del género *Leucheria* (Compositae: *Mutisieae*). Darwiniana 1976; 20:9 - 126.
23. Gallegos C. *et al.* Evaluación de la capacidad antioxidante, determinación de polifenoles y antocianinas totales de la especie nativa *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci (Sasahui). Sociedad Química del Perú 2010; p. 66.
24. Linares, E. Flora silvestre del transecto Yura-Chivay, Departamento de Arequipa. Boletín de Lima 1995; N° 100:211 - 254.

WEB

25. Gerencia Regional de Salud Arequipa. Morbilidad en consulta externa abril 2015 [Internet]. Arequipa, Perú: Ministerio de Salud [citado el 23 de abril de 2015]. Disponible desde:
<http://www.saludarequipa.gob.pe/oei/MCEestadisticas2015.php>
26. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Nota descriptiva N°194: 2013 [citado el 20 de abril de 2015]. Disponible desde:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
27. Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado. Reserva paisajística sub cuenca del Cotahuasi [Internet]. Arequipa, Perú: Sernanp [citado el 25 de marzo de 2015]. Disponible desde:
<http://www.sernanp.gob.pe/sernanp/zonaturismo.jsp?ID=53&c=1>

28. Sistema Nacional de Datos Biológicos de la Argentina. Clasificación de Especies: *Leucheria daucifolia* (D. Don) Crisci [Internet]. Argentina. [citado el 25 de marzo de 2015]. Disponible desde: <http://datos.sndb.mincyt.gob.ar/portal/species/browse/resource/111/taxon/7960595/>

ANEXO N° 1**“AÑO DE LA DIVERSIFICACIÓN PRODUCTIVA Y DEL FORTALECIMIENTO DE LA EDUCACIÓN”****SOLICITO: IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA BOTÁNICA****Señor Director del HUSA - UNSA
BLGO. LEONCIO MARIÑO HERRERA****Presente. -**

Yo, **EMERSON RICHARD TURPO BALDARRAGO**, identificado con DNI N° 73128996 y con domicilio en Calle 24 de junio N°200 Mz. C Lt. 1 P.J. Ciudad Blanca, Distrito de Paucarpata, ante Ud. Con el debido respeto me presento y expongo:

Que, en mi condición de estudiante de la Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa, es mi deseo llevar a cabo una investigación de grado tesis que lleva por título: **“Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas de sasahui *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Arequipa 2015”**, por lo que recurro a Ud. para solicitar la Identificación de la muestra botánica adjunta, recolectada el día 05 de abril a las 11:20 am en el pueblo de Chivay, provincia de Caylloma, Departamento de Arequipa.

Por lo expuesto:

Ruego a Ud. acceder a mi petición, por ser de justicia.

Arequipa, 09 de abril del 2015

Atentamente,

Emerson Richard Turpo Baldarrago
DNI: 73128996

ANEXO N° 2

MUESTRA BOTÁNICA DE *Leucheria daucifolia* D. Don Crisci

Fam. Asteraceae

“Leucheria daucifolia D. Don Crisci”

Nombre Común	: Sasahui
Descripción	: Herbácea 13 cm. de longitud Flores con cáliz plumoso.
Localización	: Pueblo de Chivay, Provincia de Caylloma, Departamento Arequipa
Altitud	: 3680 m.s.n.m.
Colector	: Emerson Richard Turpo Baldarrago
Fecha	: 05 de Abril del 2015

ANEXO N° 3
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA EMITIDA POR LA UNSA

ANEXO N° 4
CUADRO DE REGISTRO DE DATOS DE ENSAYO FITOQUÍMICO PARA
EXTRACTO ACUOSO

Extracto	Ensayo	Metabolito	Observación
ACUOSO	Fehling	Azúcares r.	
	Espuma	Saponinas	
	Tricloruro de hierro	Comp. fenólicos	
	Flavonoides	Shinoda	
	Gelatina – Sal	Taninos	
	Wagner	Alcaloides	

Fuente: elaboración propia.

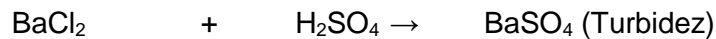
ANEXO N° 5
ESCALA DE MAC FARLAND

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR N° 0.5 DE LA ESCALA DE MAC FARLAND

a) COMPOSICIÓN:

Cloruro de Bario	0.05 mL
Ácido Sulfúrico	9.95 mL

b) REACCIÓN:



c) PROCEDIMIENTO:

Para preparar la suspensión estándar, se agrega 0.5 mL de una solución de cloruro de bario 0.048 M a 9.95 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.18 M

d) CÁLCULOS:

Para cada 25 mL de cloruro de bario 0.048 M

$$\frac{0.048 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} (25 \text{ mL}) \frac{208.23 \text{ g BaCl}_2}{1 \text{ mol}} = 0.2499 \text{ g BaCl}_2 \text{ en } 25 \text{ mL}$$

Hallamos la molaridad de una solución 10% de ácido sulfúrico

$$\frac{10 \text{ g}}{100 \text{ mL}} \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{98 \text{ g}} \right) = 1.0204 \text{ M H}_2\text{SO}_4$$

Para cada 25 mL de ácido sulfúrico 0.18 M

$$\frac{0.18 \text{ M} \times 25 \text{ mL}}{1.0204 \text{ M}} = 4.41 \text{ mL de H}_2\text{SO}_4 \text{ 1.0204 M en } 25 \text{ mL}$$

ANEXO N° 6

CALDO PEPTONADO

FUNDAMENTO:

Es un medio de enriquecimiento no selectivo, en el cual la peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

COMPOSICIÓN:

Peptona de carne	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada csp.	1.0 L

PREPARACIÓN:

Suspender 15 g del medio en 1 litro de agua purificada. Mezclar calentando hasta ebullición durante 1 minuto. Distribuir en recipientes apropiados. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar ligeramente el medio e inocular directamente a partir del material de estudio, posteriormente incubar en aerobiosis a 35-37°C durante 18-48 horas.

INTERPRETACIÓN:

El caldo peptonado es un medio líquido utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) al apreciar la turbidez en los tubos de ensayo incubados a 37°C por 24 horas. Los tubos con turbidez muestran la proliferación del microorganismo en estudio mientras que los tubos que no presentan turbidez muestran que no hay crecimiento bacteriano.

ANEXO N° 7
AGAR TRIPTICASA SOYA

FUNDAMENTO:

Es un medio que garantiza el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios, en este medio de cultivo las peptonas proveen la fuente de nitrógeno y minerales. El azúcar de la peptona de soja provee la fuente de los carbohidratos. El cloruro de sodio tiene su función en el balance osmótico y el agar es incorporado como agente solidificante.

COMPOSICIÓN:

Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de soja	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada csp.	1.0 L

PREPARACIÓN:

Suspender 40 g del medio en 1 litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y llevar a ebullición por un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

INTERPRETACIÓN:

Medio de cultivo para crecimiento general de microorganismos.

ANEXO N° 8
AGAR MÜELLER HINTON

FUNDAMENTO:

Es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de diversos microorganismos y es recomendado por la CLSI para la evaluación de antimicrobianos. En este medio, la caseína hidrolizada y la infusión de carne aportan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, minerales, algunas vitaminas y otros nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos. El almidón actúa como coloide de protección contra las sustancias tóxicas que pueden estar presentes en el medio. La hidrólisis del almidón durante el procesamiento en la autoclave proporciona una pequeña cantidad de dextrosa, que constituye una fuente de energía. Por último, el agar actúa como agente solidificante.

COMPOSICIÓN:

Infusión de carne	2.0 g
Caseína hidrolizada	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	13.0 g
Agua destilada csp.	1.0 L

PREPARACIÓN:

Disolver 34 g del medio en 1 litro de agua desmineralizada. Calentar en baño de agua hirviendo o en corriente de vapor. Tratar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar eventualmente a 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles hasta una medida de 4 mm.

INTERPRETACIÓN:

Medio de cultivo para crecimiento de diversos microorganismos.

ANEXO N° 9

TABLA DE REGISTRO DE DATOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ACUOSO FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

	N° de Tubos										Control	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	-
Caldo peptonado mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto acuoso mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/	/
Inóculo 10⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/
Concentración del Extracto mg/mL	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.195		
Turbidez <i>S. aureus</i>												
CMI <i>S. aureus</i>												

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (/) sin adición.

ANEXO N° 10

TABLA DE REGISTRO DE DATOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ACUOSO FRENTE A
Escherichia coli ATCC 25922

	N° de Tubos												Control	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	+	-
Caldo peptonado mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1
Extracto acuoso mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			/	/
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	/
Concentración del Extracto mg/mL	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.195		
Turbidez <i>E. coli</i>														
CMI <i>E. coli</i>														

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: (/) sin adición.

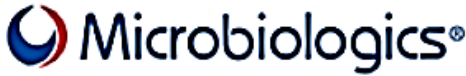
ANEXO N° 11
TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA
BACTERICIDA (CMB)

	Concentración del extracto (mg/ mL)	
Repetición 1° serie de tubos		
Repetición 2° serie de tubos		
Repetición 3° serie de tubos		
CMB		

Fuente: elaboración propia.

ANEXO N° 12


CERTIFICADO DE ANÁLISIS *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-219 Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4</p>	<p>Expiration Date: 2017/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Marie M Howe Release Date: 2015/2/9</p>
--	---

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

<p>ID System: Vitek GP (1) See attached ID System results document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase(3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase(rabbit plasma-tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg)(Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units)(Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg)(Disk Susceptibility): 18 - 24 mm</p> <div style="text-align: center;">  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE </div>
---	---

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

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

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

TESTING CERT #2655.01

MicroBioLogics

bioMerieux Customer: 05871
System #: C21105

Laboratory Report

Printed Feb 6, 2015 08:14 CST
Printed by: mmh
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 360219-1

Bench: MH

Card Type: GP Testing Instrument: 00000A6D6328 (1116)

Bionumber: 010402023763231
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 242332310	Expires: Jan 19, 2016 12:00 CST
	Completed: Feb 4, 2015 16:14 CST	Status: Final	Analysis Time: 5.00 hours
Selected Organism	98% Probability Staphylococcus aureus		Confidence: Excellent identification
	Bionumber: 010402023763231		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			
Staphylococcus aureus AGLU(79),			

Biochemical Details																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

ANEXO N° 13


CERTIFICADO DE ANÁLISIS *Escherichia coli* ATCC® 25922



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-156 Reference Number: ATCC® 25922™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4</p>	<p>Expiration Date: 2017/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Marie M Howe Release Date: 2015/2/11</p>
---	--

Performance	
<p>Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough</p> <p>Microscopic Features: Gram negative straight rod</p>	<p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>

<p>ID System: Vitek GN (1) See attached ID System results document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase(Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm</p> <div style="text-align: center;">  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE </div>
---	--

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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



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

TESTING CERT #2655.01

MicroBioLogics

bioMerieux Customer: 05871
System #: C21105

Laboratory Report

Printed Feb 6, 2015 08:02 CST
Printed by: mmh
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 335156-1

Bench: MH

Card Type: GN Testing Instrument: 00000A6D6328 (1116)

Bionumber: 0405611560566611
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 241316840	Expires: Aug 17, 2015 13:00 CDT
	Completed: Feb 4, 2015 16:17 CST	Status: Final	Analysis Time: 4.75 hours
Selected Organism	98% Probability Escherichia coli Bionumber: 0405611560566611 Confidence: Excellent identification		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s) Escherichia coli dTAG(22),			

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

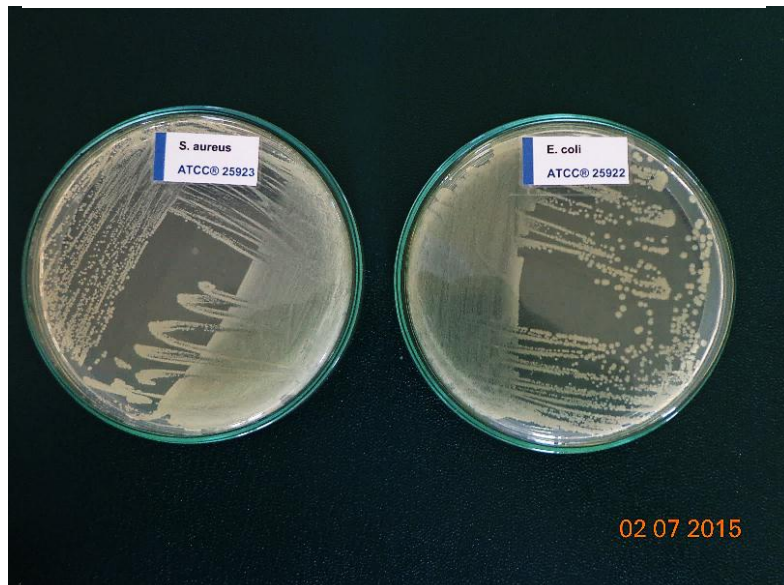
ANEXO N° 14 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS ATCC

Figura N° 25: Reactivación de las cepas ATCC



Fuente: elaboración propia.

Figura N° 26: Cepas ATCC tras 24 horas de incubación



Fuente: elaboración propia.

ANEXO N° 15
PREPARACIÓN DE LA ESCALA DE MC FARLAND 0.5

Figura N° 27: Preparación de la Escala de Mc Farland 0.5



Fuente: elaboración propia.

Figura N° 28: Escala 0.5 Mc Farland



Fuente: elaboración propia.

PREPARACIÓN DE LA ESCALA DE MC FARLAND 0.5
(Continuación)

Figura N° 29: Absorbancia del blanco



Fuente: elaboración propia.

Figura N° 30: Absorbancia del BaSO₄



Fuente: elaboración propia.

ANEXO N° 16
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Figura N° 31: CMI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Fuente: elaboración propia.

Figura N° 32: CMI para *Escherichia coli* ATCC 25922 100 a 200 mg/mL



Fuente: elaboración propia.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)
(Continuación)

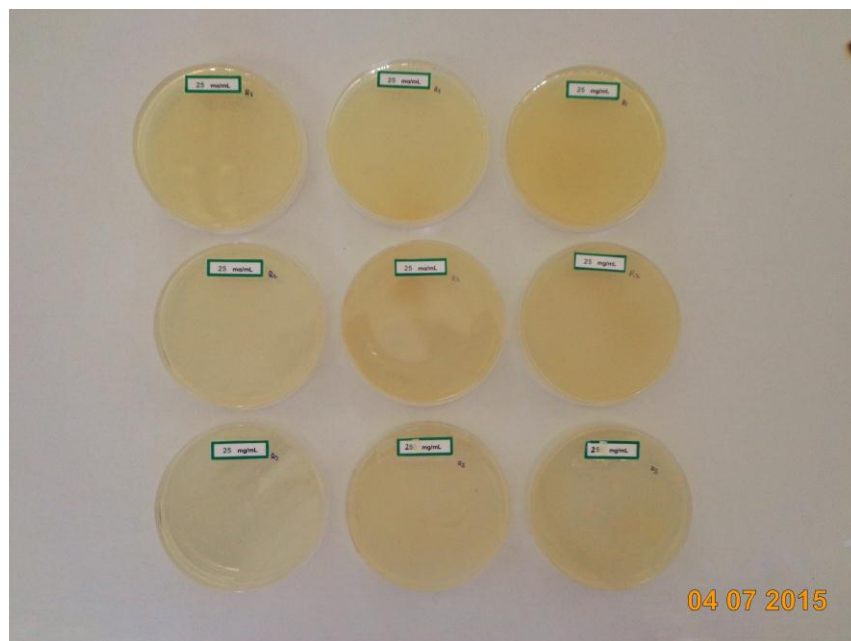
Figura N° 33: CMI para *Escherichia coli* ATCC 25922 200 a 400 mg/mL



Fuente: elaboración propia.

ANEXO N° 17
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Figura N° 34: CMI frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Fuente: elaboración propia.

Figura N° 35: CMI frente a *Escherichia coli* ATCC 25922



Fuente: elaboración propia.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Astringente: adjetivo usado para describir que una sustancia, en contacto con la lengua, produce en esta una sensación mixta entre la sequedad intensa y el amargor, como, especialmente, ciertas sales metálicas.

Concentración mínima bactericida: mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

Concentración mínima inhibitoria: mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.

Decocción: método de extracción de los principios activos, que consiste en llevar la droga con el disolvente hasta la temperatura de ebullición durante un tiempo determinado.

Droga: todo material de origen natural ya sea en bruto (por ejemplo, las hojas, la corteza) u obtenido por sencillas operaciones (por ejemplo: los extractos), que contiene los principios activos con actividad farmacológica para su uso directo o para la elaboración de medicamentos.

Enterotoxina: sustancia dañina producida por ciertas bacterias y que es especialmente peligrosa para partes del tracto gastrointestinal.

Farmacoresistencia: disminución de la eficacia de un medicamento específico diseñado para curar una enfermedad o para mitigar los síntomas de un paciente.

Inóculo: cantidad o número de microorganismos infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales.

Liofilización: método de conservación que elimina el agua de una droga. Consiste en congelar rápidamente la droga a temperaturas muy bajas, entre -40°C y -80°C , y luego sublimar el agua aplicando el vacío y calentando.

Análisis fitoquímico: método de detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en las plantas.

Metabolito secundario: compuestos químicos sintetizados por las plantas que son productos del metabolismo secundario y cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas.

Principio activo: sustancia química pura (aislada de la droga) responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga.