



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio
canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) FRENTE A
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

AUTORES:

Bach. SÁNCHEZ SÁNCHEZ, EDWIN JONATHAN

<https://orcid.org/0000-0001-6720-9042>

Bach. SAAVEDRA QUIROGA, WALTER ALEXANDER

<https://orcid.org/0000-0002-1751-3625>

ASESOR:

Dr. VÍLCHEZ CÁCEDA, HÉCTOR ALEXANDER

<https://orcid.org/0000-0001-7094-0821>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza de seguir adelante a pesar de las adversidades que se presentaron durante todo el camino.

A mis padres Nita y Edwin quienes con su amor, paciencia y sacrificio me apoyaron desde el inicio de esta carrera, gracias mamita por creer en mí siempre y gracias papito por tu esfuerzo, para ti un abrazo hasta el cielo.

A mi amada esposa Jenny y a mi hija Nijeth, gracias por estar siempre a mi lado, son mi fortaleza y mi valentía.

A mi hermana Brigit y a todos mis familiares por el apoyo, quienes sin esperar nada a cambio compartieron alegrías y tristezas conmigo.

Edwin Jonathan Sánchez Sánchez

A Dios, porque ha guiado con su amor el camino a terminar mi carrera universitaria.

A mi madre, a pesar que ya no está a mi lado fue la precursora principal de este proyecto de mi vida.

A mi papá, hermanos y a las personas que más quiero por brindarme su apoyo incondicional sin esperar nada a cambio. Gracias a ellos he aprendido a ser positivo y perseverante en todo lo que me proponga. Debido a ello estoy en la mejor etapa académica de mi vida.

Walter Alexander Saavedra Quiroga

AGRADECIMIENTO

A todos los profesores de la Universidad Alas Peruanas por ser parte de nuestra formación profesional y en especial a la profesora Vania, Mallqui Brito por su apoyo incondicional desde el inicio de nuestra formación académica.

A la Universidad María Auxiliadora que nos acogió y nos dio la oportunidad de obtener el título profesional.

Al Dr. Héctor Alexander, Vílchez Cáceda por su denodado esfuerzo y dedicación durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Índice General

	Páginas
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	9
2.2 Población, muestra y muestreo	9
2.3 Variables de investigación	10
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	11
2.5 Proceso de recolección de datos	11
2.6 Métodos de análisis estadístico	14
2.7 Aspectos éticos	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	27
4.1 Discusión de resultados	27
4.2 Conclusiones	29
4.3 Recomendaciones	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	37

Índice de Tablas

Tabla 1. Solubilidades del extracto hidroalcohólico desecado	15
Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico desecado de (wila wila)	16
Tabla 3. Resultado del análisis <i>in vitro</i> por el método Kirby Bauer	17
Tabla 4. Análisis de varianza para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18
Tabla 5. Prueba de HSD Tukey para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19
Tabla 6. Análisis de varianza para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22
Tabla 7. Prueba de HSD Tukey para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	23
Tabla 8. Escala de sensibilidad de Duraffourd de los extractos hidroalcohólicos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25
Tabla 9. Porcentaje de la actividad inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	26

Índice de Figuras

Figura 1. Especie vegetal	4
Figura 2. Lugar de recolección: Localidad de Lima provincia de Yauyos, distrito de Laraos entre los 3500 y 4000 m.s.n.m.	50
Figura 3. Recolección de la especie vegetal : <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	50
Figura 4. Peso de la muestra recolectada	51
Figura 5. Limpieza y selección de la muestra (hojas)	51
Figura 6. Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	52
Figura 7. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	53
Figura 8. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	55
Figura 9. Activación de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	55
Figura 10. Preparación de las diluciones al 100, 80, 60 y 40 % del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	56
Figura 11. Control positivo (ciprofloxacino 5 µg) frente a cepas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	56
Figura 12. Control negativo (dimetilsulfóxido) frente a cepas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	57
Figura 13. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 100, 80, 60, y 40 % frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	57
Figura 14. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 100, 80, 60, y 40 % frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	58

Índice de Anexos

Anexo A. Operacionalización de la variable	38
Anexo B. Instrumento de recolección de datos	39
Anexo C. Certificado de clasificación taxonómica	42
Anexo D. Informe del análisis fitoquímico	43
Anexo E. Informe de medición de pH	44
Anexo F. Certificado de calidad de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	45
Anexo G. Certificado de calidad de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	46
Anexo H. Constancia de evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	47
Anexo I. Evidencias del trabajo de campo	50

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Métodos: Se elaboró el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) por el método de maceración con un total de 1000 g de hojas trituradas. Estas fueron recolectadas en la localidad de Lima, provincia de Yauyos distrito de Laraos, de la cual se obtuvo un total de 13,19 kg del recurso vegetal con un muestreo aleatorizado de la zona. Se realizaron los análisis de tamizaje fitoquímico y de solubilidad. Seguidamente, se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* mediante la técnica de kirby Bauer a concentraciones de 100, 80, 60 y 40 % del extracto hidroalcohólico frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando como control positivo al antibiótico ciprofloxacino de 5 µg.

Resultado: El extracto hidroalcohólico a las concentración de 100, 80, 60 y 40 % presentaron halo de inhibición promedio de 12,16, 9,23, 8,3 y 7,36 mm respectivamente frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 las cuales fueron comparadas con ciprofloxacino de 5 µg logrando un promedio de halo de inhibición de 38 mm; sin embargo, a la concentración del 100 % se determinó halo de inhibición promedio de 7,2 mm frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con el control positivo que alcanzó un promedio de halo de inhibición de 50 mm.

Conclusiones: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) presentó actividad antibacteriana *in vitro* a concentraciones de 100, 80, 60 y 40 % frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y muy poca actividad antibacteriana *in vitro* a una concentración de 100 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Palabras clave: *Senecio Canescens*, actividad antibacteriana, extracto hidroalcohólico, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, halo de inhibición.

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro* antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

Methods: The hydroalcoholic extract of *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) by the maceration method with a total of 1000 g of crushed leaves. These were collected in the town of Lima, province of Yauyos, district of Laraos, from which a total of 13,19 kg of the plant resource was obtained with a random sampling of the area. Phytochemical screening and solubility analyzes were performed. Next, the *in vitro* antibacterial activity was determined using the Kirby Bauer technique at concentrations of 100, 80, 60 and 40 % of the hydroalcoholic extract against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 using the antibiotic ciprofloxacin as a positive control 5 µg.

Results: The hydroalcoholic extract at concentrations of 100, 80, 60 and 40 % presented an average inhibition halo of 12,16, 9,23, 8,3 and 7,36 mm respectively against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 which were compared with ciprofloxacin of 5 µg achieving an average halo 38 mm inhibition; However, at the 100 % concentration, an average inhibition halo of 7,2 mm was determined against *Escherichia coli* ATCC 25922 compared to the positive control, which reached an average inhibition halo of 50 mm.

Conclusions: The hydroalcoholic extract of the leaves of *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) showed antibacterial activity *in vitro* at concentrations of 100, 80, 60 and 40 % against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and very little antibacterial activity *in vitro* at a concentration of 100 % against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keywords: *Senecio Canescens*, antibacterial activity, hydroalcoholic extract, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, inhibition halo.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la población peruana sufre una fuerte crisis en el sistema de salud, la adquisición de medicamentos es muy limitada para cada familia, esto genera que cada peruano a la hora de presentar un problema de salud intente llevar un tratamiento improvisado, la cual se caracteriza por ser una terapia sin prescripción médica.¹

Mientras tanto el uso descontrolado de los antibióticos nos está llevando a una serie de consecuencias graves como el ocultamiento de una dolencia, la demora en la atención médica, la presencia de efectos adversos e interacciones químicas entre los fármacos y el incremento de la resistencia a los medicamentos antibacterianos.²

El Instituto Nacional de Salud (INS) informa que en el año 2018 el 53,4 % de personas que acuden a establecimientos farmacéuticos en el Perú, adquieren antibióticos sin prescripción médica. La prevalencia de la automedicación antimicrobiana en los países de bajos recursos es variable, la estimación general es del 38,8 % y en América del sur presentaron una alta prevalencia general del 44,1 %.^{1,3}

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las publicaciones que viene realizando, presenta un registro de microorganismos resistentes a los antibióticos, en la que detalla a diferentes grupos de bacterias dañinas para la salud, este registro se ha trabajado para pretender orientar y fomentar la investigación de nuevos fármacos, esta relación comprende diferentes bacterias como: *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Estas generan lesiones severas y mortales, que atacan al sistema sanguíneo, urinario y respiratorio.⁴

Staphylococcus aureus forma parte de nuestra microbiota cutánea y son también causa habitual de infecciones tanto en la comunidad como en los centros de atención de salud. Los pacientes con infecciones por esta bacteria resistente a la meticilina tienen una probabilidad de fallecer un 64 % mayor que los pacientes con infecciones farmacosensibles.⁵

El estudio realizado en el Hospital Nacional Hipólito Unanue en Lima, da a conocer que *Staphylococcus aureus* genera infecciones y lesiones graves, pero no necesariamente va producir un índice alto de morbilidad y mortalidad en la población. El avance de la resistencia bacteriana que esta produce viene siendo un problema de salud en la actualidad. La vancomicina, uno de los medicamentos más utilizados en el esquema del tratamiento para infecciones por esta bacteria, ya no viene siendo tan efectiva. Esto conlleva a una condición epidemiológica muy crítica en los países en la cual todavía no se ha desarrollado casos de esta magnitud.⁶

En la ciudad de Chiclayo en el periodo 2009 - 2014, el estudio realizado en el área de servicio crítico de un hospital público, nos revela que *Escherichia coli* es una de las bacterias que se encuentran con mayor incidencia en los urocultivos realizados a pacientes por posibles infecciones del tracto urinario de origen intrahospitalario, dando a conocer que este microorganismo presenta un índice alto de resistencia a los fármacos betalactámicos pero también una elevada sensibilidad a los aminoglucósidos.⁷

Dentro de las especies vegetales que ayudan a reducir e impedir las enfermedades que aquejan al ser humano, destacan varias con grandes propiedades farmacológicas. Es por ello que la fitoterapia se viene presentando como una posible solución terapéutica, con el fin de tratar o curar afecciones de origen bacteriano, que se complementa con la medicina convencional a través de una formulación, según el paciente y lo que padece. La mayor parte de estos recursos se localiza en la Amazonia. Sin embargo, muchas de ellas están por ser identificadas botánicamente.⁸

El principal empleo que se viene realizando de estos recursos vegetales son de uso terapéutico, nutricional y costumbrista, cabe resaltar que alrededor de 5,000 especies de estas ya han sido evaluadas hasta el momento, siendo la mayor parte oriundas de nuestro país, sin dejar de lado que aproximadamente 600 géneros de plantas son introducidos en el ámbito nacional.⁹

Las bacterias como *Escherichia coli* se caracterizan por presentar bacilos Gram negativos y pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae*. Son relativamente resistentes a los agentes externos, poseen un tamaño entre 0,5 x 1,0 a 3,0 micras, se transportan gracias a sus flagelos, se localizan en la microbiota del tracto gastrointestinal y alguna de estas son inofensivas para el ser humano. Sin embargo, las que se consideran patógenas producen diferentes manifestaciones clínicas dañinas para el organismo como por ejemplo cólicos estomacales y evacuaciones líquidas sangrantes.¹⁰

Sin embargo, *Staphylococcus aureus* presenta cocos Gram positivos y poseen un tamaño de 0,5 a 1,5 micras, formando racimos de uvas, estas se caracterizan por ser la principal causa de bacteriemia intrahospitalaria en el mundo. La ubicación de esta bacteria en la mucosa nasal juega un papel importante para su propagación y resistencia a diferentes fármacos. No obstante, algunas cepas tienen cierta inclinación por algunas zonas específicas, como por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* que se desarrolla en la dermis y *Staphylococcus capitis* que se desarrolla en el cuero cabelludo.¹¹

Varios países fomentan el uso de plantas medicinales, algunos como Rusia y China emplean fitofármacos como alternativa en la medicina tradicional. Hoy en día la gran industria farmacéutica propone medicamentos a base de recursos naturales, siendo estos requeridos en varios países del primer mundo.⁸

Senecio canescens se cosecha y distribuye en las alturas de Venezuela hasta Argentina. En el Perú, se desarrolla en zonas como pastizales naturales, ubicado en Áncash, Apurímac, Huánuco, Junín, Cuzco, Huancavelica, La Libertad, Lima, Tacna, Pasco y Puno, entre los 3500 y 5000 metros de altitud. Podemos encontrarla en Lima cerca de las localidades de Canta, Huaral, Huarochirí, Oyón y Yauyos, siendo empleada como un recurso de grandes propiedades farmacológicas que se puede conseguir con el apelativo de “wila wila”, “oreja de conejo”, “ancosh” y “Huila-Huila”, siendo las hojas la parte más utilizada dentro del ámbito nacional para contrarrestar las afecciones respiratorias.¹²



Figura 1. *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)

Fuente: Elaboración propia.

Entre los antecedentes al desarrollo del trabajo de investigación se dispone de los siguientes:

Huillca L. (2020), determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* de los liposomas que fueron preparados con el extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, se determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto frente a *Pseudomonas aeruginosa* con un valor de 0,125 mg y el halo máximo de 17,306 mm a una concentración de 160 mg, luego se procedió a la elaboración de los liposomas utilizando componentes como fosfatidilcolina, donde fueron sometidos a diferentes pruebas y controles microbiológicos donde se demostró la ausencia de microorganismos que puedan alterar su composición, seguidamente se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas mediante el método de microdilución en caldo y la turbidez (lectura al espectrómetro UV. Visible), donde se emplearon concentraciones de 12, 25, 50, 100 y 200 mg del extracto respectivamente. Concluyendo que las 5 concentraciones del extracto hidroalcohólico impidieron el desarrollo microbiano de la cepa en estudio, pero a 200 mg (7 %) y a 100 mg (11 %) obtuvieron un mejor efecto antibacteriano.¹³

Anco L, et al (2019), evaluaron el efecto antibacteriano *in vitro* de cuatro concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y

Pseudomonas aeruginosa, cuyo resultados reflejaron que a concentraciones de 200, 100 y 50 mg/ml, con un porcentaje de 100, 50 y 25 % respectivamente, impiden el desarrollo bacteriano de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, sin embargo frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* no presentaron ningún tipo de inhibición, demostrando así efecto antibacteriano solo frente a dos cepas.¹⁴

Alonso G. (2021), evaluó el efecto antiulceroso gástrico del extracto etanólico de las hojas secas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "HUILA HUILA" en ratas albinas Cepa Holtzman. En la prueba de solubilidad, se evidenció que el extracto etanólico de las hojas secas fue muy soluble en agua y etanol, pero poco soluble en metanol. En el extracto etanólico se encontró la presencia de alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, triterpenos y aminoácidos. Concluyendo que el extracto etanólico de las hojas secas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "HUILA HUILA" presentó efecto antiulceroso en ratas albinas inducidas a úlcera gástrica.¹⁵

Vinod K, et al (2019), evaluaron la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graciliflorus* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, dando como resultado que el aceite esencial de *Senecio graciliflorus* presentó un halo de inhibición de 8,6, 6,0, 4,2, y 3,3 mm frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* demostrando así actividad antibacteriana solo frente a una cepa.¹⁶

Sabry S, et al (2021), determinaron el efecto *in vitro* del extracto de partes vegetales de *Senecio glaucus* frente a bacterias, evaluando la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las diferentes partes del recurso vegetal como tallo, raíz y hoja, recolectados en diferentes zonas. Concluyendo que el extracto metanólico de la raíz, tallo y hoja poseen actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* con halos de inhibición de 25,15 y 15 mm, sin embargo frente a *Pseudomonas aeruginosa* demostró resultados negativos de inhibición.¹⁷

Chandra M, et al (2019), evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de dos compuestos aislados de *Senecio royleanus*, frente a cinco patógenos bacterianos y fúngicos. Concluyendo que el aceite esencial de estos dos compuestos aislados presentaron los siguientes resultados: 1,10 β -epoxi 6-oxo-furanoeremofilano presentó la máxima actividad antibacteriana frente a *Agrobacterium tumefaciens* con halos de inhibición de 13 mm y actividad fúngica frente a *Fusarium oxysporum* con halos de inhibición de 15 mm. Sin embargo el 1 β ,10-epoxi-furanoeremofilano se encontró inactivo frente a la cepa de *Escherichia coli* y presentó halos de inhibición de 12 mm frente a la cepa de *Bacillus subtilis* y de *Rhizoctonia solani*.¹⁸

En el Perú, el uso terapéutico de los recursos naturales como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas se usa desde la antigüedad basándose en teorías y creencias nativas. Gracias a su biodiversidad, se estima que presenta 25000 especies vegetales con actividad biológica. Sin embargo, existen recursos con escasa investigación que conllevaría a un mal manejo de la sistematización etnobotánica, etnofarmacológica y toxicológica de las diferentes especies vegetales. Por esta razón se justifica el presente trabajo, aportando conocimiento científico y a su vez investigando las posibles propiedades del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila), además de incentivar a la industria farmacéutica a utilizar los recursos vegetales como posible alternativa en la producción de fitofármacos.¹⁹

El objetivo general del estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) frente a las cepas tipificadas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La hipótesis general del estudio fue:

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a las cepas tipificadas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Enfoque: Cuantitativo, porque a través de la medición se pudo comprobar y obtener nuevas hipótesis, y de diseño experimental porque se evaluó el efecto de las variables, donde el investigador controla las condiciones del estudio.²⁰

Analítico: Por ser un estudio que va establecer la relación entre las variables después del recojo de los datos.

Explicativo: Porque la atención se concentró en la justificación causal de la actividad antibacteriana *in vitro* de las hojas del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Prospectivo: Porque se reunió la información luego de iniciado el estudio.

Transversal: Porque la recolección de los datos se realizó en un único momento.

2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

Se recolectó un total de 13,19 kg del recurso vegetal con un muestreo aleatorizado de la zona de recolección. La población estuvo constituida por 5 kilogramos de hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila), procedentes de la localidad de Lima provincia de Yauyos, distrito de Laraos entre los 3500 y 4000 m.s.n.m.

Para su identificación botánica se llevó el recurso vegetal a un Biólogo especialista en certificaciones taxonómicas registrado por el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) (Anexo C).

Se seleccionó las hojas que se encontraron en buen estado, libre de manchas oscuras o atacadas por insectos, luego se procedió; a lavar con abundante agua, seguidamente fueron secadas a temperatura ambiente por 24 horas y llevadas al horno a una temperatura de 40 °C aproximadamente, luego se llevó a ser trituradas con un mortero para obtener una proporción homogénea

de las partículas, las cuales fueron vertidas en un envase de vidrio oscuro a temperatura ambiente.²¹

Para obtener la muestra se elaboró el extracto hidroalcohólico por la técnica de maceración, consistió en sumergir 1000 gramos de las hojas trituradas en 800 ml de etanol de 70 %, a temperatura ambiente y protegida de la luz; tomando en cuenta que esta mezcla se dejó en reposo aproximadamente 10 días. Durante este periodo se realizó agitaciones diarias de 5 minutos durante la mañana. Terminado el periodo de reposo, se procedió a filtrar con papel Whatman # 03, luego se llevó a baño maria a 40 ± 1 °C, hasta peso constante, de esta manera se pudo obtener el extracto seco.^{22,23}

El extracto hidroalcohólico se preparó en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En cuanto a la unidad de análisis se utilizaron cepas tipificadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (anexo F y G).

2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

El estudio tiene como variables:

Variable independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila).

Definición conceptual: Solución líquida que contiene metabolitos secundarios.

Definición operacional: La maceración permite la extracción de los metabolitos secundarios por medio de los disolventes.

Variable dependiente: Actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Definición conceptual: Capacidad de inhibir el desarrollo bacteriano.

Definición operacional: La actividad antibacteriana se mide mediante la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos seleccionados.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica que se utilizó en esta investigación fue la observación, y el instrumento de recolección de datos fue mediante el uso de fichas en las cuales se colocó los resultados obtenidos en el análisis de solubilidad, tamizaje fitoquímico y el ensayo microbiológico de cada cepa bacteriológica utilizada.²⁰

2.5. PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

2.5.1 Análisis previo del extracto alcohólico

El análisis previo se realizó en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos donde se realizaron las siguientes pruebas:

- a) **Índice afrosimétrico:** Se colocó 1 g del extracto en un tubo de ensayo y se añadió 5 ml de agua destilada; seguidamente se sometió a baño maria por 2 min. Este proceso se realizó con agitación constante y enérgica con ayuda de una bagueta. Los resultados se vieron por la persistencia de espuma por un determinado tiempo, esto se califica de 5 - 20 min (+) y 20 - 25 min (++)²⁴.
- b) **Determinación de pH a 25°C:** En un tubo de ensayo se agregó 1 g del extracto seco, luego se procedió a añadir 5 ml de etanol y con ayuda del potenciómetro marca LUTRON PH-220S, se determinó el pH de la solución.
- c) **Prueba de solubilidad:** En cada uno de los 8 tubos de ensayo se colocó 1 g del extracto seco de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila), seguidamente se agregó a cada tubo 1 ml de los diferentes solventes a trabajar: agua destilada, cloroformo, metanol, etanol, n-hexano, acetona y ácido acético.

2.5.2 Marcha fitoquímica

Se colocó 300 mg del extracto hidroalcohólico seco a cada uno de los tubos de ensayo, luego se agregó 10 ml de etanol de 96 % y se procedió a homogenizar. Seguidamente se adicionó a cada uno de ellos los reactivos correspondientes, con la finalidad de determinar la presencia de metabolitos secundarios. Estos se dan por técnicas químicas de reacción por coloración y precipitación, como la reacción de: Dragendorff, Mayer y Wagner (alcaloides), Baljet (lactonas), Shinoda (flavonoides), Kedde (cardenólidos), Lieberman Burchard (esteroides), espuma (saponinas), Cloruro férrico (taninos), Lieberman Burchard (triterpenos), Cloruro férrico (fenoles) y prueba cualitativa (antocianinas) según el método de Olga Lock.²⁴

2.5.3 Actividad antibacteriana por método Kirby Bauer o antibiograma

Se realizó en el laboratorio microbiológico BIOEM LAB S.A.C., por el método de difusión en agar por discos (KIRBY BAUER), por triplicado.

- a) **Preparación de los extractos a ensayar:** Se procedió a agregar a cuatro tubos de ensayo 1000, 800, 600 y 400 μ L del extracto hidroalcohólico, luego se aforó con el diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo las concentraciones deseadas de 100, 80, 60 y 40 % respectivamente.
- b) **Activación de las cepas:** La activación de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron reactivadas en medio de cultivo Agar Soya Trypticasa (TSA) a 35 °C de 2 a 8 horas, esto se realizó manteniendo las medidas de bioseguridad según lo que precisa el proveedor en la ficha técnica y el manual de bioseguridad en el laboratorio elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).^{25,26}
- c) **Preparación del inóculo:** Se comprobó que los cultivos indiquen la formación de un solo microorganismo, con ayuda de una asa bacteriológica se procedió a diluir el cultivo a una suspensión estándar de 5 ml de agua peptonada al 0,1 %. Se ajustó el inóculo

a la concentración correspondiente al 0,5 de la escala de Mac Farland, ajustada al rango equivalente de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonia/mililitro (UFC/ml).^{27,28}

- d) **Preparación de los medios de cultivo:** Se utilizó aproximadamente 25 ml de Agar Plate Count (APC), a 45 - 50 °C, luego fueron vertidos sobre placas Petri de 90 mm de diámetro y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.²⁹
- e) **Inoculación de las placas:** Los inóculos bacterianos fueron colocados en los medios de cultivo ya solidificados y con ayuda de un hisopo estéril se empezaron a distribuir en diferentes direcciones. Se dejó reposar aproximadamente 5 minutos antes de aplicar los discos evitando así un posible daño a la bacteria.²⁹
- f) **Grupos a ensayar:** Se procedió a preparar los discos de papel filtro Whatman N° 3, de 6 mm de diámetro previamente esterilizados por autoclave por 30 minutos. Estos fueron preparados según los grupos que se detallan a continuación: Grupo I: Discos embebidos con Dimetilsulfóxido (DMSO), Grupo II: Disco embebidos con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* al 40 %, Grupo III: Disco embebidos con el extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* al 60 %, Grupo IV: Disco embebidos con el extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* al 80 %, Grupo V: Discos embebidos con el extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* al 100 %, Grupo VI: Discos con ciprofloxacino de 5 µg. Luego se colocaron los discos en el centro de la superficie del agar y con ayuda de pinzas estériles se aplicó una ligera presión, el cual se impregnó con las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila). Por último las placas se incubaron 24 horas a 35 ± 1 °C en posición invertida y al aire libre. Estos ensayos fueron realizados por triplicado.^{30,31}
- g) **Interpretación de los resultados:** Pasado el tiempo se procedió a la medición del halo de inhibición de crecimiento (diámetro), mediante el instrumento de vernier expresado en milímetros.^{32,33,34}

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Luego de la obtención de los análisis mencionados, se realizó las valoraciones mediante estadística descriptiva utilizando el paquete informático Microsoft Excel versión 2019 para las pruebas de ANOVA y test de HSD tukey.³⁵

2.7. ASPECTOS ÉTICOS

Al realizar este estudio se tuvo en cuenta evitar la contaminación bacteriana, para ello se aplicó los diferentes protocolos de cuidados necesarios y específicos detallados en los manuales de bioseguridad, proporcionado por las entidades de salud como la Organización Mundial de la Salud (OMS).²⁵

III. RESULTADOS

3.1 De las pruebas de solubilidad

Tabla 1. Solubilidades del extracto hidroalcohólico desecado

SOLVENTES	RESULTADOS
N-hexano	-
Cloroformo	-
Etanol 96 %	+++
Metanol	+
Ácido acético	++
Acetona	++
Agua destilada	+++

Fuente: Elaboración propia

Donde: (-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Soluble (+++) Muy soluble

En la **tabla 1**, se puede observar que el extracto hidroalcohólico es muy soluble en agua destilada y etanol de 96 %, soluble en ácido acético y acetona, poco soluble en metanol e insoluble en N-hexano y cloroformo.

3.2 De la marcha fitoquímica

Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico desecado de (Wila Wila)

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Antocianinas	Prueba cualitativa	++
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	+++
	Reacción de Mayer	++
	Reacción de Wagner	+
Lactonas	Reacción de Baljet	++
Flavonoides	Reacción de Shinoda	++
Cardenólidos	Reacción de Kedde	-
Esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	-
Saponinas	Reacción de espuma	-
Taninos	Reacción de cloruro férrico	+++
Triterpenos	Reacción de Liebermann Burchard	-
Fenoles	Reacción de cloruro férrico	+++

Fuente: Elaboración propia

Donde: (+++) Reacción muy evidente (++) Reacción evidente (+) Reacción poco evidente (-) No hubo reacción

En la **tabla 2**, se puede observar la presencia considerable de alcaloides, fenoles y taninos; seguido por flavonoides, lactonas y antocianinas. Todos estos fitoconstituyentes químicos representan el inicio de los principales efectos farmacológicos que el extracto hidroalcohólico presenta.

3.3 Del ensayo microbiológico

Tabla 3. Resultado del análisis *in vitro* por el método Kirby-Bauer

CEPAS	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
	Halos de inhibición (mm)							
Grupos de ensayo	n			x	n			x
	1	2	3		1	2	3	
Dimetilsulfóxido(DMSO)	0	0	0	0	0	0	0	0
100 %	12,0	12,2	12,3	12,16	7,3	7,2	7,1	7,2
80 %	9,2	9,1	9,4	9,23	0	0	0	0
60 %	8,3	8,2	8,4	8,3	0	0	0	0
40 %	7,5	7,4	7,2	7,36	0	0	0	0
Ciprofloxacino 5 µg	38	38	38	38	50	50	50	50

Fuente: Elaboración propia

n= N° de ensayos

x= Promedio de halos

En la **tabla 3** se observan las lecturas de los halos de inhibición de los diferentes grupos de ensayo donde se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) y su comparación con ciprofloxacino de 5 µg, dando como resultado una diferencia muy significativa con el control positivo en ambas cepas, no obstante se demostró que a concentraciones de 100, 80, 60 y 40 % presentaron actividad antibacteriana con halos promedio de inhibición de 12,16, 9,23, 8,3 y 7,36 mm respectivamente frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sin embargo, solo a una concentración de 100 % presentó un halo de inhibición promedio de 7,2 mm frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 4. Análisis de varianza para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2583,817778	5	516,7635556	38757,26667	0,00	3,105875239
Dentro de los grupos	0,16	12	0,013333333			
Total	2583,977778	17				

Fuente: Programa estadístico Excel 2019

En la **tabla 4** el análisis de varianza (ANOVA), realizado entre todos los grupos de estudio, muestra un $P= 0,00$ ($p < 0,05$) esto indica que existe diferencia significativa entre las medias de todos los grupos analizados.

Tabla 5. Prueba de HSD Tukey para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TUKEY HSD/KR AMER						alpha	0,05		
group	mean	n	ss	df	q-crit				
Dimetil sulfóxido	0,00	3	0						
extracto al 40 %	7,37	3	0,04666667						
extracto al 60%	8,30	3	0,02						
extracto al 80%	9,23	3	0,04666667						
extracto al 100%	12,17	3	0,04666667						
ciprofloxacino 5 µg	38,00	3	0						
		18	0,16	12	4,75				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Dimetil sulfóxido	extracto al 40 %	7,36666667	0,06666667	110,5	7,05	7,68333333	0,00	0,31666667	63,747

Dimetil sulfóxido	extracto al 60%	8,3	0,0666 66667	124, 5	7,9833 33333	8,6166 66667	0,00	0,31 6666 67	71,8 8010 85
Dimetil sulfóxido	extracto al 80%	9,2333 33333	0,0666 66667	138, 5	8,916 66666 7	9,55	0,00	0,31 6666 67	79,9 6301 23
Dimetil sulfóxido	extracto al 100%	12,166 66667	0,0666 66667	182, 5	11,85	12,48 33333 3	0,00	0,31 6666 67	105, 3664 24
Dimetil sulfóxido	ciprofloxacino 5 µg	38	0,066 66666 7	570	37,683 33333	38,31 66666 7	0,00	0,31 6666 67	329, 0896 53
extracto al 40 %	extracto al 60%	0,9333 33333	0,066 66666 7	14	0,6166 66667	1,25	0,00	0,31 6666 67	8,08 2903 77
extracto al 40 %	extracto al 80%	1,8666 66667	0,066 66666 7	28	1,55	2,1833 33333	0,00	0,31 6666 67	16,1 6580 75
extracto al 40 %	extracto al 100%	4,8	0,0666 66667	72	4,4833 33333	5,1166 66667	0,00	0,31 6666 67	41,5 6921 94
extracto al 40 %	ciprofloxacino 5 µg	30,633 33333	0,0666 66667	459 ,5	30,316 66667	30,95	0,00	0,3 166 666 7	265 ,29 244 9
extracto al 60%	extracto al 80%	0,9333 33333	0,0666 66667	14	0,6166 66667	1,25	0,00	0,31 6666 67	8,08 2903 77
extracto al 60%	extracto al 100%	3,8666 66667	0,0666 66667	58	3,55	4,1833 33333	0,00	0,3 166 666 7	33, 486 315 6
extracto al 60%	ciprofloxacino 5 µg	29,7	0,0666 66667	445, 5	29,383 33333	30,016 66667	0,00	0,31 6666 67	257, 2095 45
extracto al 60%	extracto al 100%	2,9333	0,0666	44	2,616	3,25	0,00	0,31	25,4

o al 80%	al 100%	33333	66667		66666 7			6666 67	0341 18
extract o al 80%	ciproflo xacino 5 µg	28,766 66667	0,0666 66667	431 ,5	28,45	29,083 33333	0,00	0,31 6666 67	249, 1266 41
extract o al 100%	ciproflo xacino 5 µg	25,83 33333 3	0,066 66666 7	387 ,5	25,51 66666 7	26,15	0,00	0,31 6666 67	223, 7232 29

Fuente: Programa estadístico Excel 2019

En la **tabla 5** se observa el análisis de comparaciones múltiples entre los diferentes grupos de estudio mediante la prueba de HSD Tukey. La cual determinó diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos de comparación $p < 0,05$

Tabla 6. Análisis de varianza para *Escherichia coli* ATCC 25922

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6019,6	5	1203.92	722352	0,00	3,105875239
Dentro de los grupos	0,02	12	0,001666667			
Total	6019,62	17				

Fuente: Programa estadístico Excel 2019

En la **tabla 6** el análisis de varianza (ANOVA), realizado entre todos los grupos de estudio, muestra un $p < 0,05$ esto indica que existe diferencia significativa mínima entre las medias de al menos un grupo.

Tabla 7. Prueba de HSD Tukey para *Escherichia coli* ATCC 25922

TUKEY HSD/KRAMER		alpha	0,05						
group	mean	n	ss	df	q-crit				
Dimetilsulfóxido	0,00	3	0						
extracto al 40 %	0,00	3	0						
extracto al 60%	0,00	3	0						
extracto al 80%	0,00	3	0						
extracto al 100%	7,20	3	0,02						
ciprofloxacino 5 µg	50,00	3	0						
		18	0,02	12	4,75				
Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Dimetilsulfóxido	extracto al 40 %	0	0,023570226	0	-0,111958574	0,11195857	1,00	0,11195857	0
Dimetilsulfóxido	extracto al 60%	0	0,023570226	0	-0,111958574	0,11195857	1,00	0,11195857	0
Dimetilsulfóxido	extracto al 80%	0	0,023570226	0	-0,111958574	0,11195857	1,00	0,11195857	0

Dimetilsulfó xido	extracto al 100%	7,2	0,02357 0226	305,4 701	7,088041 426	7,31195 857	0,00	0,11195 857	176,363 261
Dimetilsulfó xido	ciproflo xacino 5 µg	50	0,02357 0226	2121, 32	49,88804 143	50,1119 586	0,00	0,11195 857	1224,74 487
extracto al 40 %	extracto al 60%	0	0,02357 0226	0	- 0,111958 574	0,11195 857	1,00	0,11195 857	0
extracto al 40 %	extracto al 80%	0	0,02357 0226	0	- 0,111958 574	0,11195 857	1,00	0,11195 857	0
extracto al 40 %	extracto al 100%	7,2	0,02357 0226	305,4 701	7,088041 426	7,31195 857	0,00	0,11195 857	176,363 261
extracto al 40 %	ciproflo xacino 5 µg	50	0,02357 0226	2121, 32	49,88804 143	50,1119 586	0,00	0,11195 857	1224,74 487
extracto al 60%	extracto al 80%	0	0,02357 0226	0	- 0,111958 574	0,11195 857	1,00	0,11195 857	0
extracto al 60%	extracto al 100%	7,2	0,02357 0226	305,4 701	7,088041 426	7,31195 857	0,00	0,11195 857	176,363 261
extracto al 60%	ciproflo xacino 5 µg	50	0,02357 0226	2121, 32	49,88804 143	50,1119 586	0,00	0,11195 857	1224,74 487
extracto al 80%	extracto al 100%	7,2	0,02357 0226	305,4 701	7,088041 426	7,31195 857	0,00	0,11195 857	176,363 261
extracto al 80%	ciproflo xacino 5 µg	50	0,02357 0226	2121, 32	49,88804 143	50,1119 586	0,00	0,11195 857	1224,74 487
extracto al 100%	ciproflo xacino 5 µg	42,8	0,02357 0226	1815, 85	42,68804 143	42,9119 586	0,00	0,11195 857	1048,38 161

Fuente: Programa estadístico Excel 2019

En la **tabla 7** se observa el análisis de comparaciones múltiples entre los diferentes grupos de estudio mediante la prueba de HSD Tukey. La cual determinó diferencia estadísticamente significativa entre 9 grupos de comparación $p < 0,05$

Tabla 8. Escala de sensibilidad de Duraffourd de los extractos hidroalcohólicos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

GRUPOS	Escala Duraffourd de los extractos hidroalcohólicos	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Dimetilsulfóxido	-	-
100 %	+	-
80 %	+	-
60 %	+	-
40 %	-	-
Ciprofloxacino 5 µg	+++	+++

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (-) Nula: Diámetro (< 8 mm)
- (+) Sensible bajo: Diámetro (9 - 14 mm)
- (++) Muy sensible: Diámetro (15 - 19 mm)
- (+++) Sumamente sensible: Diámetro (> 20 mm)

En la **tabla 8** se observa la escala de Duraffourd donde la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demostró sensibilidad baja en las concentraciones de 100, 80 y 60 %, y ser nula al 40 %. Sin embargo, la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 presenta una escala nula con cada una de las concentraciones. Por otro lado, ambas cepas demostraron ser sumamente sensibles al control positivo (ciprofloxacino 5 µg).

Tabla 9. Porcentaje de la actividad inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

GRUPOS	Porcentaje de la actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
100 %	32 %	14,4 %
80 %	24,28 %	0 %
60 %	21,84 %	0 %
40 %	19,36 %	0 %
Ciprofloxacino 5 µg	100 %	100 %

Fuente: Elaboración propia

% Inhibición = $\frac{\text{Diámetro de muestra}}{\text{Diámetro del control positivo}} \times 100$

Diámetro del control positivo

En la **tabla 9** se observa que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) a concentraciones de 100, 80, 60 y 40 % demostraron un porcentaje de inhibición de 32, 24,28, 21,84 y 19,36 % respectivamente frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sin embargo, a concentraciones de 80, 60 y 40 % presentaron un porcentaje de inhibición de 0 % y a una concentración de 100 % presentó un porcentaje de inhibición de 14,4 % frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. A su vez, el control positivo (ciprofloxacino 5 µg) demostró tener 100 % de inhibición en ambas cepas.

IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión de resultados

De acuerdo con los ensayos de solubilidad realizados en la **tabla 1**, se determinó que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila), demuestra ser muy soluble en agua destilada y etanol a 96 %, soluble en ácido acético y acetona, poco soluble en metanol e insoluble en N-hexano y cloroformo; Lock O. (2016)²⁴ señala que esto se debe a la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, antocianinas, flavonoides y fenoles que se caracterizan por ser moléculas constituidas por grupos atómicos que contienen nitrógeno, carbono, hidrógeno y oxígeno, formando enlaces químicos con los solventes polares.

En la **tabla 2**, se observó la presencia considerable de alcaloides, fenoles y taninos; seguido por flavonoides, lactonas y antocianinas. Todos estos fitoconstituyentes químicos representan el inicio de los principales efectos farmacológicos que el extracto hidroalcohólico presenta, estos resultados son similares a los obtenidos por Chilquillo H. y Cervantes R. (2017)³⁶, en su estudio sobre efecto antiinflamatorio como analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (vira vira), encontraron la presencia de alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas, de igual forma los resultados son similares en lo descrito por Alonso G. (2021)³⁷, efecto antiulceroso gástrico del extracto etanólico de las hojas secas *Senecio Canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (Huila Huila) en ratas albinas cepa holtzman, hallaron compuestos en abundante cantidad como alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos.

El estudio realizado por Anco L, et al (2019)¹⁴, sobre el efecto antibacteriano *in vitro* de cuatro concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos Se observó que a concentraciones de 200 mg/ml, 100 mg/ml y 50 mg/ml presentan halos de inhibición promedio de 19 mm, 18 mm y 17.3 mm respectivamente frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, sin embargo frente a *Escherichia coli* no presentaron ningún tipo de inhibición, demostrando así efecto antibacteriano solo frente a una sola cepa. Estos

resultados mostraron similitud a los obtenidos en la **tabla 3** del ensayo microbiológico, considerando que ambas especies vegetales pertenecen a la misma familia. De igual forma Vinod K, et al (2019)¹⁶, evaluaron la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graciliflorus* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, dando como resultado que el aceite esencial de *Senecio graciliflorus* presentó un halo de inhibición de 8,6, 6,0, 4,2, y 3,3 mm frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* demostrando así actividad antibacteriana solo frente a una cepa.¹⁶

El análisis de varianza (ANOVA), nos permitió comparar las diferencias que existe entre los promedios de los halos de inhibición entre todos los grupos de ensayo, obteniendo un $p < 0,05$ por lo tanto se confirma que son estadísticamente diferentes en al menos un grupo como muestra la **tabla 4 y 6**, de acuerdo a estos resultados se procedió a realizar el análisis de HSD Tukey mostrado en la **Tabla 5 y 7** donde se encontró diferencia significativa en varios grupos analizados, evidenciando que existe actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico en todos los grupo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y solamente un grupo frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, pero ninguno se compara con la efectividad del ciprofloxacino 5 µg (control positivo).

Por otro lado, en la **tabla 8** nos muestra la escala de Duraffourd donde la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 presentó una escala nula con las diferentes concentraciones del extracto, en cambio la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demostró sensibilidad baja en las concentraciones de 100, 80 y 60 %, y ser nula al 40 %, dando un porcentaje inhibitorio como se detalla en la **tabla 9**, de 14,4 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, con una concentración al 100% del extracto hidroalcohólico y 32, 24,28, 21,84 y 19,36 % para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con una concentración al 100, 80, 60 y 40 % del extracto hidroalcohólico.

4.2 Conclusiones

Los estudios realizados en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a las cepas tipificadas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- En el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) se determinó metabolitos secundarios con actividad antibacteriana tales como alcaloides, taninos y fenoles.
- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las concentraciones de 100, 80, 60 y 40 % y frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 solo al 100 %.
- Se comprobó que el ciprofloxacino de 5 µg presentó actividad antibacteriana *in vitro* significativamente mayor que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) frente a las cepas tipificadas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

4.3 Recomendaciones

- Se recomienda emplear estudios comparativos sobre la actividad antibacteriana de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) recolectadas de diferentes zonas del país.
- Así mismo, se recomienda realizar estudios de sinergismo con otros recursos vegetales para un posible efecto antibacteriano más alto.
- Del mismo modo se recomienda continuar con las investigaciones a fin de obtener mejores resultados frente a diferentes cepas que puedan causar daño al ser humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas C, Pereyra R, Mayta T. Prevalencia y factores asociados a la compra de antimicrobianos sin receta médica, Perú 2016. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2018. [acceso: 15/04/2021]; 35(3): 400-408. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/3458-17081-6-PB.pdf>.
2. Sánchez C, Nava G. Análisis de la automedicación como problema de salud. Rev Mex Enf Neurol. 2012. [acceso: 16/04/2021]; 11(3): 159-163. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfneu/ene-2012/ene123h.pdf>.
3. Morales J, Rivera J, Matta H. Prevalencia y características de la automedicación en estudiantes de una universidad privada de Lima norte. Rev Salud & Vida Sipanense. 2018. [acceso: 16/04/2021]; 5(1): 47-57. Disponible en: <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/921/783>.
4. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Ginebra; 2017. [acceso: 20/04/2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
5. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. Ginebra; 2020. [acceso: 20/04/2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
6. Sandival G, Mucching S, Champi R, Alvarado G. Colonización simultánea por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus* resistente a vancomicina. Rev Perú Med Exp Salud pública. 2015. [acceso: 22/04/2021]; 32(2):400-401. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000200033.

7. Montenegro B, Tafur R, Díaz C, Fernández J. Infecciones intrahospitalarias del tracto urinario en servicios críticos de un hospital público de Chiclayo, Perú (2009-2014). Acta Med Perú. 2016. [acceso: 23/04/2021]; 33(3):189-194. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172016000300004.
8. Avello M, Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile. 2010. [acceso: 24/04/2021]; 138: 1288-1293. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>.
9. Instituto Nacional de Salud (INS). Plantas Medicinales, evaluación etnobotánica e inventario Nacional de plantas medicinales. Perú. [acceso: 24/04/ 2021]. Disponible en: <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/plantas-medicinales>.
10. López W, Guevara J. Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Rev Med. Universidad Ricardo Palma. 2002. [acceso: 25/04/2021]; 2 (1): 38-41. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/rfmh_urp/v03_n1/a12.htm.
11. Cervantes E, García R, Salazar M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Pato Clin Med Lab. 2014. [acceso: 25/04/2021]; 61 (1): 28-40. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>.
12. Beltrán H, Roque J. El género *Senecio L.* (Asteraceae-Senecioneae) en el departamento de Lima, Perú. Arnaldoa. 2015. [acceso: 26/04/2021]; 22 (2): 395-412. Disponible en: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/208-764-1-PB%20\(12\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/208-764-1-PB%20(12).pdf).
13. Huillca L. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus rusby* (tikllaywarmi) frente a *Pseudomona Aeruginosa* cepas ATCC 27853. [Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico]. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2020.

14. Anco L, Gálvez F. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Senecio Hyoseridifolius Wedd* (llancahuasha) frente a cepas de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis* y *Pseudomonas Aeruginosa*. [Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
15. Alonso Graciela. Efecto antiulceroso gástrico del extracto etanólico de las hojas secas de *senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "Huila Huila" en ratas albinas cepa Holtzman. [Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico]. Huancayo: Universidad Roosevelt; 2021.
16. Vinod kumar. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graciliflorus*. Journal of drug delivery y therapeutics, 2019. [Acceso: 12/01/2022]; 9(1-s): 98-100. Disponible en: <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/2265/1709>
17. Sabry M, Elsayed A y Ahmed A. Efecto *in vitro* del extracto de partes vegetales de *Senecio glaucus* sobre bacterias patógenas. Biointerface research in Applied chemistry, 2022. [Acceso: 05/01/2022]; vol 12, issue 13, 3800-3810. Disponible en: <https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2021/08/20695837123.38003810.pdf>
18. Singh C, Shakeel S, et al. Productos naturales en el descubrimiento de fármacos: Actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial del compuesto aislado de *Senecio royleanus*. J Pure Appl Microbiol, 2019. [Acceso: 03/12/2021]; 13 (3): 1611-1617. Disponible en : <https://microbiologyjournal.org/natural-products-in-drug-discovery-antibacterial-and-antifungal-activity-of-essential-oil-of-compound-isolated-from-senecio-royleanus/>
19. Ramírez K, Velásquez S, Rodríguez C, Villarreal V. *Culcitium canescens* Humb. & Bonpl. (Asteraceae): una revisión etnobotánica, etnofarmacológica y fitoquímica. Ethnobotany Research and Applications. 2020. [acceso: 30/04/ 2021]; 19(19):1-14. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/339940811_Culcitium_canescens

_Humb_Bonpl_Asteraceae_una_revisión_etnobotánica_etnofarmacológica_y_fitoquímica.

20. Arispe C, Yangali J, Guerrero M, et al. La investigación científica Una aproximación para los estudios de posgrado. 1ed. Guayaquil: editorial Universidad Internacional del Ecuador; 2020.
21. Gennaro R. Remington Farmacia. 20ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003
22. Fullerton E, Cook W, Martin Eric. Farmacia Práctica de Remington. 10ed. Filadelfia: Unión Tipográfico Editorial Hispano América; 1953.
23. Tituaña G. Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación flor de campo en la estancia y mushukwiñary en Tambalo de Pasa, para promover su desarrollo. [Tesis para optar la maestría en gestión de la producción agro industrial]. Ambato: Universidad Técnica de Ambato; 2013.
24. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos para el estudio de productos naturales 3ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 2016.
25. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra; 2005. [acceso: 1/04/2021]. Disponible en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf.
26. Picazo J, García J, Cantón R. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000.
27. Pérez C, Rojas J, Rodríguez J, Doncel A, Arrieta I, Arrieta J.. Evaluación de métodos para medir la actividad inhibitoria de extractos vegetales nativos del departamento de Sucre sobre bacterias y levadura patógenas. Rev Colombiana de ciencia animal. 2011. [acceso: 3/05/2021]; 3(1): 90-101. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3691389.pdf>.

28. Montero M, Vayas L, Avilés D, Pazmiño P, Erazo V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*. Rev Inv Vet Perú. 2018. [acceso: 3/05/2021]; 29(4): 1543-1547. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a52v29n4.pdf>.
29. Ministerio de Salud del Perú Instituto Nacional de Salud Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima-Perú: Serie de Normas Técnicas N°30. 2012. [acceso: 4/05/2021]. Disponible en: [:http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf).
30. Malbrán C. Método de determinación antimicrobiana por difusión. Servicio antimicrobiano INEI. Guayaquil-Ecuador Universidad Internacional del Ecuador; Octubre 2020. [acceso: 5/05/2021]. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf.
31. Pedrique M. Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma). Laboratorio de Microbiología. 2002. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf.
32. Montero M, Vayas L, Avilés D, Pazmiño P, Erazo V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*. Rev Inv Vet Perú. Ecuador. 2018. [acceso: 1/07/2021]; 29(4):1543-1547. disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a52v29n4.pdf>.
33. Gamazo C, Sánchez S, Camacho A. Microbiología basada en la experimentación. 1ed. España: Editorial Elsevier; 2013.

34. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Diagnóstico microbiológico. 12ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
35. García J, Castillo A, Ramírez M, Rendón G, Larque M. Comparación de los procedimientos de tukey, duncan, dunnett, hsu y bechhofer para selección de medias. *Agrociencia*. 2001. [acceso: 15/05/2021]; 35(1): 79-86. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/302/30235107.pdf>.
36. Chilquillo H. y Cervantes R. Efecto antiinflamatorio como analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio Canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (vira vira). [Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
37. Alonso G. Efecto antiinflamatorio como analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio Canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (vira vira). [Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico]. Huancayo: Universidad Roosevelt; 2021.

ANEXOS

Anexo A. Operacionalización de las variables

VARIABLES	Tipo de variable	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° DE ITEMS	VALOR FINAL	CRITERIOS
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)	Cualitativo	Solución líquida que contiene los metabolitos secundarios.	La maceración permite la extracción de los metabolitos secundarios por medio de disolventes.	Tamizaje fitoquímico	Identificación de metabolitos secundarios	5	Abundante Moderado Leve Ecaso Ausente	Rango de presencia o ausencia
				Diluciones del extracto hidroalcohólico	Concentraciones específicas	4	100 % 80 % 60 % 40 %	Concentración final después de la dilución
VARIABLE DEPENDIENTE Actividad antibacteriana frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Cuantitativo	Capacidad de inhibir el desarrollo bacteriano.	La actividad antibacteriana se mide mediante la susceptibilidad <i>In Vitro</i> de los microorganismos patógenos seleccionados.	Inhibición del crecimiento bacteriano	Medición del diámetro del Halo de inhibición (mm)	2	Crecimiento Sin crecimiento	Evidencia de inhibición de crecimiento

Anexo B. Instrumentos de recolección de datos

Solubilidades del extracto hidroalcohólico desecado

SOLVENTES	RESULTADOS
N-hexano	
Cloroformo	
Etanol 96%	
Metanol	
Ácido acético	
Acetona	
Agua destilada	

Fuente: Elaboración propia

Donde: (-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Soluble (+++) Mu soluble

MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Antocianinas	Prueba cualitativa	
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	
	Reacción de Mayer	
	Reacción de Wagner	
Lactonas	Reacción de Baljet	
Flavonoides	Reacción de Shinoda	
Cardenólidos	Reacción de Kedde	
Esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	
Saponinas	Reacción de espuma	
Taninos	Reacción de cloruro férrico	
Triterpenos	Reacción de Liebermann Burchard	
Fenoles	Reacción de cloruro férrico	

Fuente: Elaboración propia

Donde: (+++) Reacción muy evidente (++) Reacción evidente (+) Reacción poco evidente (-) No hubo reacción

DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

CEPAS	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				
Concentración del extracto hidroalcohólico (%)	Halos de inhibición (mm)							
	n			x	n			x
	1	2	3		1	2	3	
Dimetilsulfóxido(DMSO)								
100 %								
80 %								
60 %								
40 %								
ciprofloxacino 5 µg								

Fuente: Elaboración propia

n= N° de ensayos

x= Promedio de halos

Anexo C. Certificado de clasificación taxonómica

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 RPM 963689079
Email: jocamde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, los Bachilleres SÁNCHEZ SÁNCHEZ, EDWIN JONATHAN y SAAVEDRA QUIROGA, WALTER ALEXANDER. Tesistas de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad María Auxiliadora, con fines de trabajo de investigación para desarrollar la tesis titulada: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila) FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta conocida con el nombre vulgar de "wila wila", la muestra con flores y frutos ha sido estudiada y determinada con el nombre científico de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. Y según la base de datos Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue la clasificación de los grupos de filogenia de las angiospermas (APG), sistema moderno de clasificación taxonómica publicado en 1998, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), este sistema considera a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida (Chasse, Mw y JI. Reavel. 2009), comparado con el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. et. al (1981), (1988), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

Categorías	Sistema APG-(1998-2016)	Sistema Cronquist (1981-1988)
Reino	Plantae	Plantae
División	Angiospermae	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae	Asteridae
Orden	Asterales	Asterales
Familia	Asteraceae	Asteraceae
Género	<i>Senecio</i>	<i>Senecio</i>
Especie	<i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec.	<i>Senecio canescens</i> Humb. & Bonpl. Cuatrec.

Nombre vulgar: "wila wila"

Se expide la presente certificación para fines de investigación científica.

Lima, 09 de julio del 2021



José R. Campos De La Cruz
José R. Campos De La Cruz
BIÓLOGO
C.B.P. 3796

JR. SANCHEZ SILVA N° 156- piso 2. Urb. Santa Luzmila. Lima 07
Email. joricampos@yahoo.es; jocamde@gmail.com

Anexo D. Informe del análisis fitoquímico



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROCOLO DE ANÁLISIS N.º00466-CPF-2021

ORDEN DE ANÁLISIS : 06041/2021
SOLICITADO POR : WALTER ALEXANDER SAAVEDRA QUIROGA
EDWIN JONATHAN SÁNCHEZ SÁNCHEZ
MUESTRA : Extracto hidroalcohólico de las hojas del *Senecio canescens Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila-wila)*
FECHA DE RECEPCIÓN : 10 de Julio del 2021

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITO	ENSAYO	MÉTODOS	RESULTADOS
ANTOCIANINAS	Prueba Cualitativa	Cualitativo	++
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	Cualitativo	+++
	Reacción de Mayer	Cualitativo	++
	Reacción de Wagner	Cualitativo	+
LACTONAS	Reacción de Baljet	Cualitativo	++
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	Cualitativo	++
AMINOÁCIDOS	Reacción de Ninhidrina	Cualitativo	-
CARDENÓLIDOS	Reacción de Kedde	Cualitativo	-
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann – Burchard	Cualitativo	-
SAPONINAS	Reacción de espuma	Cualitativo	-
TANINOS	Reacción con cloruro férrico	Cualitativo	+++
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann – Burchard	Cualitativo	-
AZUCARES REDUCTORES	Reacción de fehling	Cualitativo	++
FENOLES	Reacción de cloruro férrico	Cualitativo	+++

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



Anexo E. Informe de medición de pH



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



Leyenda:

- +++ : Reacción muy evidente
- ++ : Reacción evidente
- + : Reacción poco evidente
- : No hubo reacción

ANALISIS	METODO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
pH	POTENCIOMETRIA	-	5.95

Se realizó la extracción hidroalcohólica de las hojas del *Senecio canescens Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila-wila)* en las instalaciones del Centro de Control Analítico-CENPROFARMA

Lima, 09 de Agosto del 2021

Dr. Eduardo Flores Juárez
Gerente General de CENPROFARMA



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification

N° 0R233265



Anexo F. Certificado de calidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

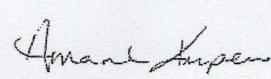


Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-512** Reference Number: ATCC® 25923™** Passage from Reference: 3 (7) Mean Assay Value (MAV): 7.1E+04 CFU per pellet	Expiration Date: 2022/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Jackie L. Mackedanz Release Date: 2020/11/19
--	--

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

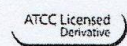
ID System: MALDI-TOF (1)
 See attached ID System results document.


 Amanda Kuperus
 Quality Control Manager
 AUTHORIZED SIGNATURE

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

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.



(7) The Mean Assay Value (MAV) stated above may deviate from the end-user's MAV based on variables inherent to each laboratory environment, such as methods, media type, equipment, pipettes, and individual technician technique.

Anexo G. Certificado de calidad de *Escherichia coli* ATCC 25922

thermoscientific

Certificate of Quality

Product Name: E. coli ATCC 25922 PK/5
Lot Number: 205797

Product Number: R4607050
Expiration Date: 2022-06-14
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Inc., a part of Thermo Fisher Scientific Quality Control specifications and were found to performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Gram Reaction: Gram Negative Rod

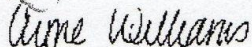
Passage: 3

Biochemical Profile: MicroSEQ®

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signature:



Senior Quality Assurance Engineer

Anexo H. Constancia de evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)



BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 1 de 3

**ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS
INFORME N° 816-2021**

1. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

Nombre: Edwin Jonathan Sánchez Sánchez
DNI: 44255392
Nombre: Walter Alexander Saavedra Quiroga
DNI: 76224748
Universidad: María Auxiliadora
Facultad: Ciencias de la Salud
Escuela Profesional: Farmacia y Bioquímica

2. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Ingrediente activo: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)
Cantidad recibida: 01 frasco de vidrio x 26,48 gramos de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)
Diluyente: Dimetilsulfóxido (DMSO)
Control positivo: Ciprofloxacina (discos de sensibilización 5 µg)
Lote CIP23 Vence: marzo 2024
Control negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO)
Cepas bacterianas utilizadas para enfrentamiento: *Escherichia coli* ATCC 25922
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Fecha de análisis: 14 de setiembre del 2021
Fecha de reporte: 15 de setiembre del 2021

3. MÉTODO DE ANÁLISIS:

Evaluación microbiológica *in vitro*. Método de difusión en agar por discos

3.1 Medio de cultivo: Agar Plate Count (APC)
3.2 Inóculo: 0,5 Mc Farland (1×10^8 UFC/mL)
3.3 Discos: Papel filtro Whatman N°3, de 6 mm de diámetro
3.4 Repeticiones: Tres
3.3 Tiempo de incubación: 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, en aerobiosis.

4. DATOS DEL ENSAYO

4.1. Concentraciones de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila). Según protocolo recibido, volumen final 1000 µL.

CONCENTRACIÓN (%)	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO (µL)	DILUYENTE (µL)
100	1000	0
80	800	200
60	600	400
40	400	600

Bigo. Neil Azabache V.
C.B.P. 4001

Av. Guardia Civil 1041. Los Inkas E-302. Santiago de Surco. Tlf: 309-1514. E-mail: neilazabache@gmail.com
Celular: 944-936145



5. CONTROLES:

Muestra	Medio de cultivo	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	APC	Crecimiento
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	APC	Crecimiento
Sin sembrar (control del medio)	APC	No hubo crecimiento
Discos con DMSO	APC + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ausencia de halo
Discos con DMSO	APC + <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ausencia de halo
Discos de Ciprofloxacina	APC + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Presencia de halo
Discos de Ciprofloxacina	APC + <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Presencia de halo

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación microbiológica *in vitro* de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).


<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 n	100 %	80 %	60 %	40 %
1	7,3	0,0	0,0	0,0
2	7,2	0,0	0,0	0,0
3	7,1	0,0	0,0	0,0

n= número de repeticiones.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 n	100 %	80 %	60 %	40 %
1	12,0	9,2	8,3	7,5
2	12,2	9,1	8,2	7,4
3	12,3	9,4	8,4	7,2

n= número de repeticiones.

Método utilizado: Kirby Bauer y col. modificado.


Bigo. Neil Azabache V.
C.B.P. 4001



BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 3 de 3

6.2. Evaluación microbiológica *in vitro* de discos de Ciprofloxacina (control positivo). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5 µg
n	
1	50,0
2	50,0
3	50,0

n= número de repeticiones.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5 µg
n	
1	38,0
2	38,0
3	38,0

n= número de repeticiones.

Método utilizado: Kirby Bauer y col. modificado.

6.3. Evaluación microbiológica *in vitro* de DMSO (control negativo). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).


<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	100 %
n	
1	0,0
2	0,0
3	0,0

n= número de repeticiones.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100 %
n	
1	0,0
2	0,0
3	0,0

n= número de repeticiones.

Método utilizado: Kirby Bauer y col. modificado.


Bigo. Néstor Azabache V.
C.B.P. 4001

Anexo I. Evidencias del trabajo de campo



Figura 2. Lugar de recolección: Localidad de Lima provincia de Yauyos, distrito de Laraos entre los 3500 y 4000 m.s.n.m.

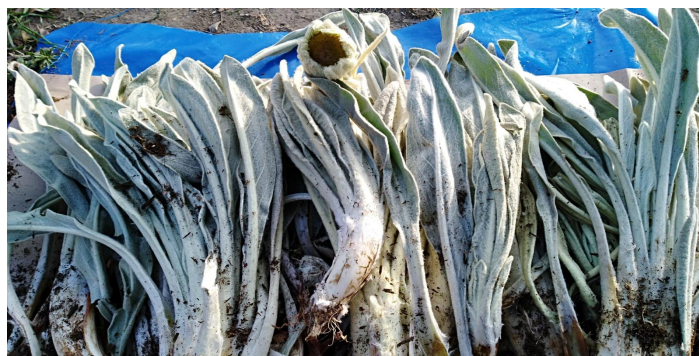


Figura 3. Recolección de la especie vegetal: *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)



Figura 4. Peso de la muestra recolectada



Figura 5. Limpieza y selección de la muestra (hojas)

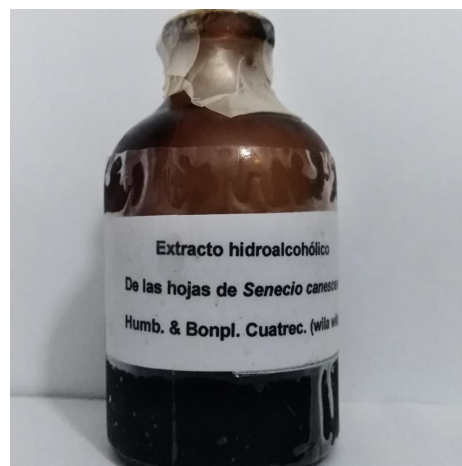
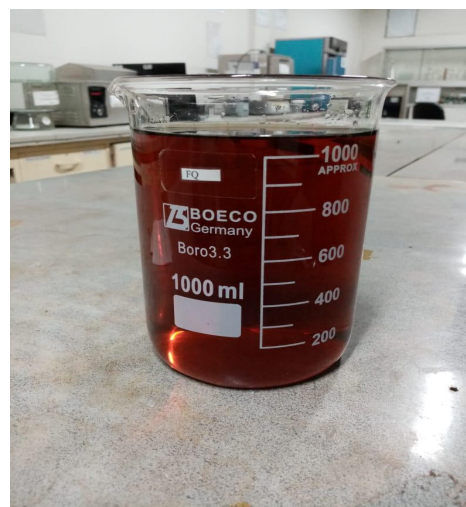


Figura 6. Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)

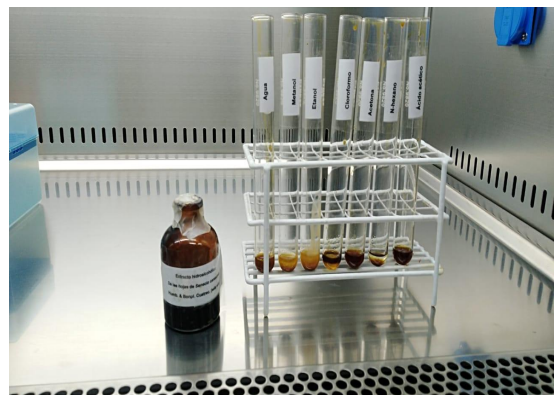
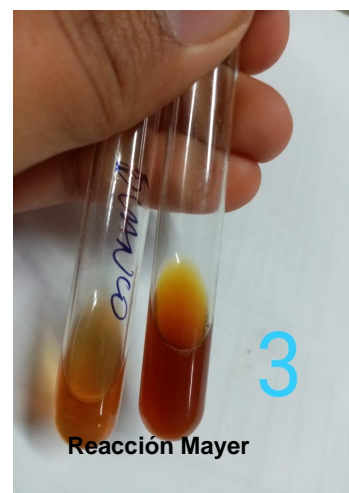
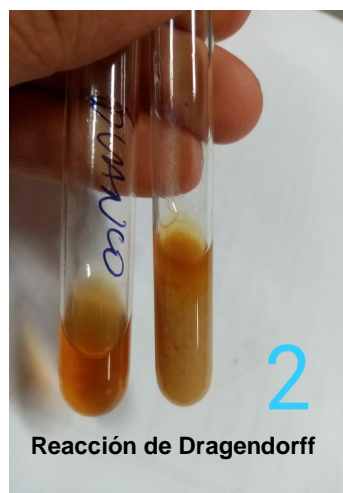
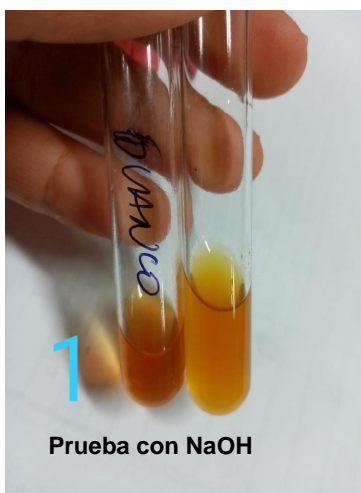
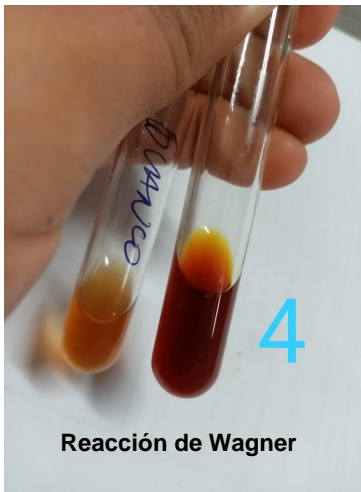
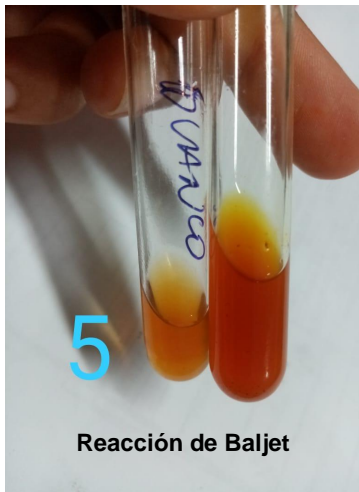


Figura 7. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)

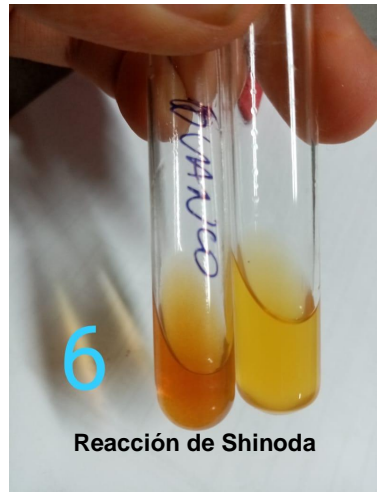




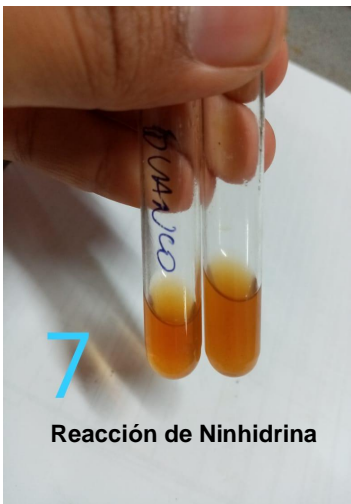
Reacción de Wagner



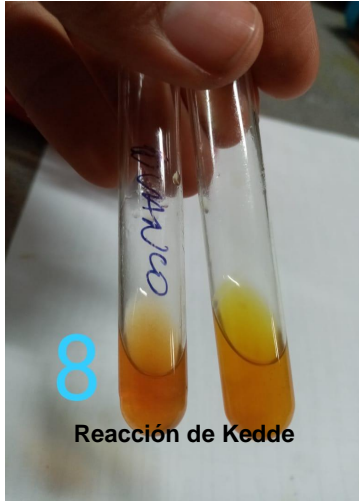
Reacción de Baljet



Reacción de Shinoda



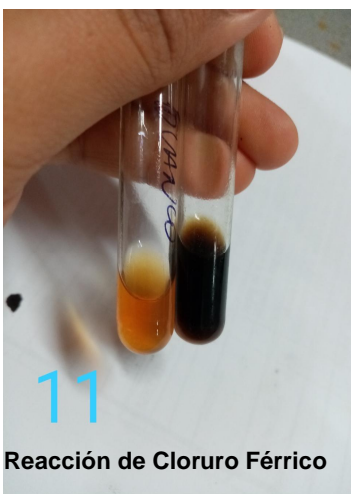
Reacción de Ninhidrina



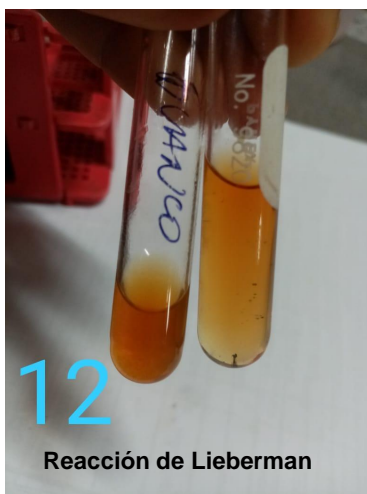
Reacción de Kedde



Reacción de Liebermann



Reacción de Cloruro Férrico



Reacción de Lieberman



Reacción de Fehling

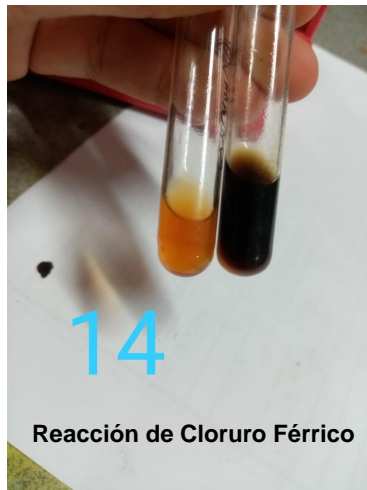


Figura 8. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)

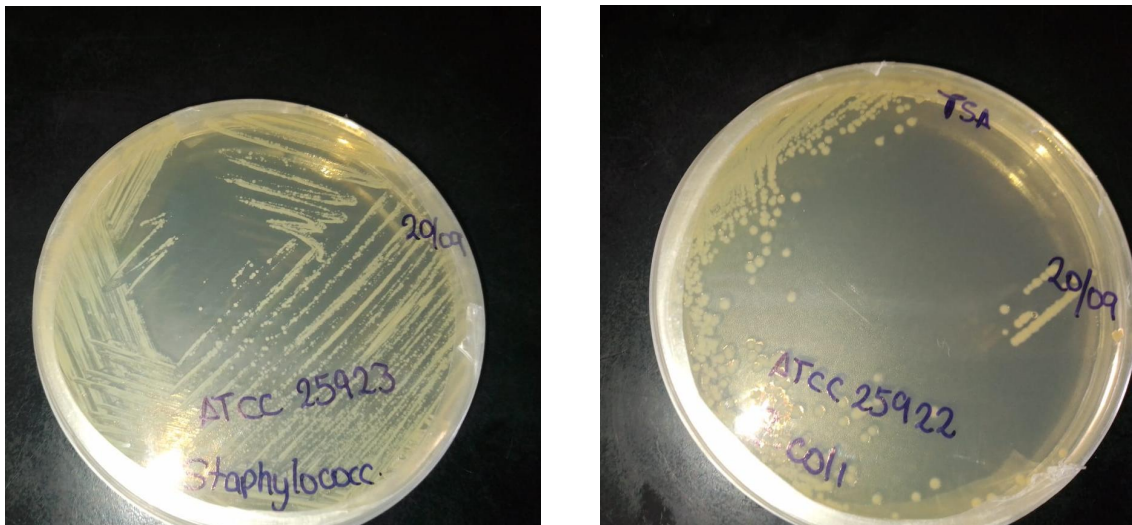


Figura 9. Activación de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.



Figura 10. Preparación de las diluciones al 100, 80, 60 y 40 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb. & Bonpl. Cuatrec. (wila wila)

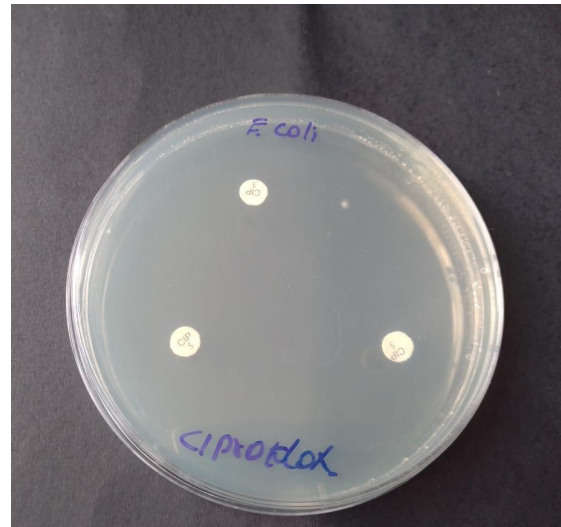
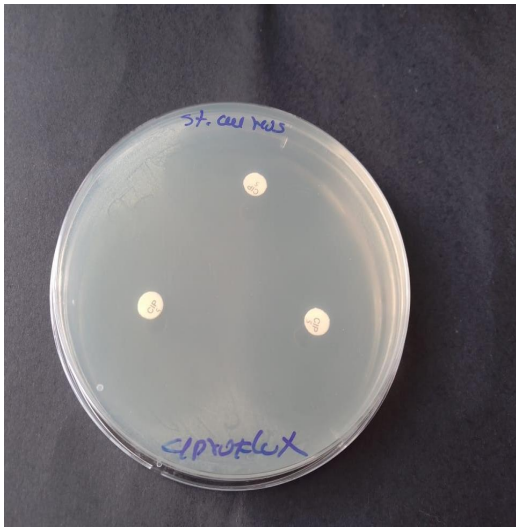


Figura 11. Control positivo (ciprofloxacino 5 μ g) frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

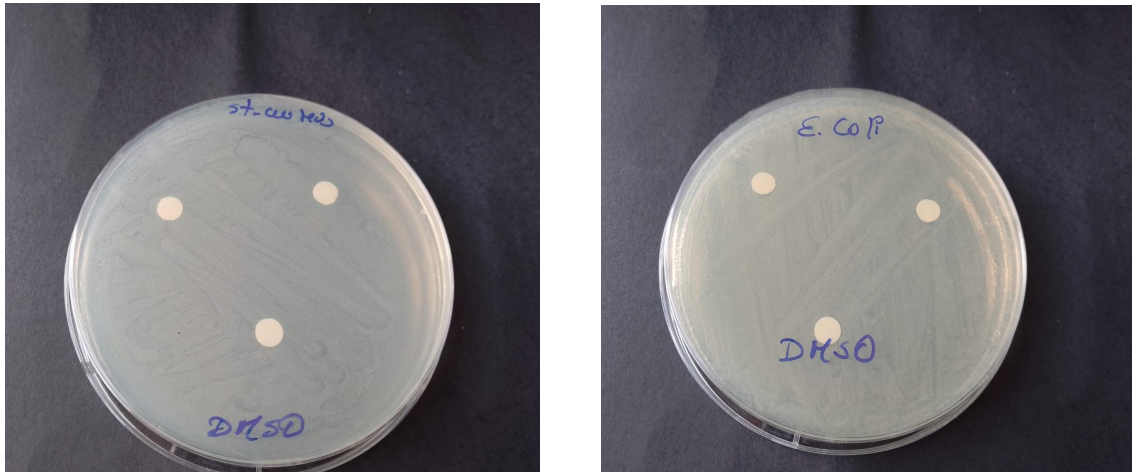


Figura 12 Control negativo (dimetilsulfóxido) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

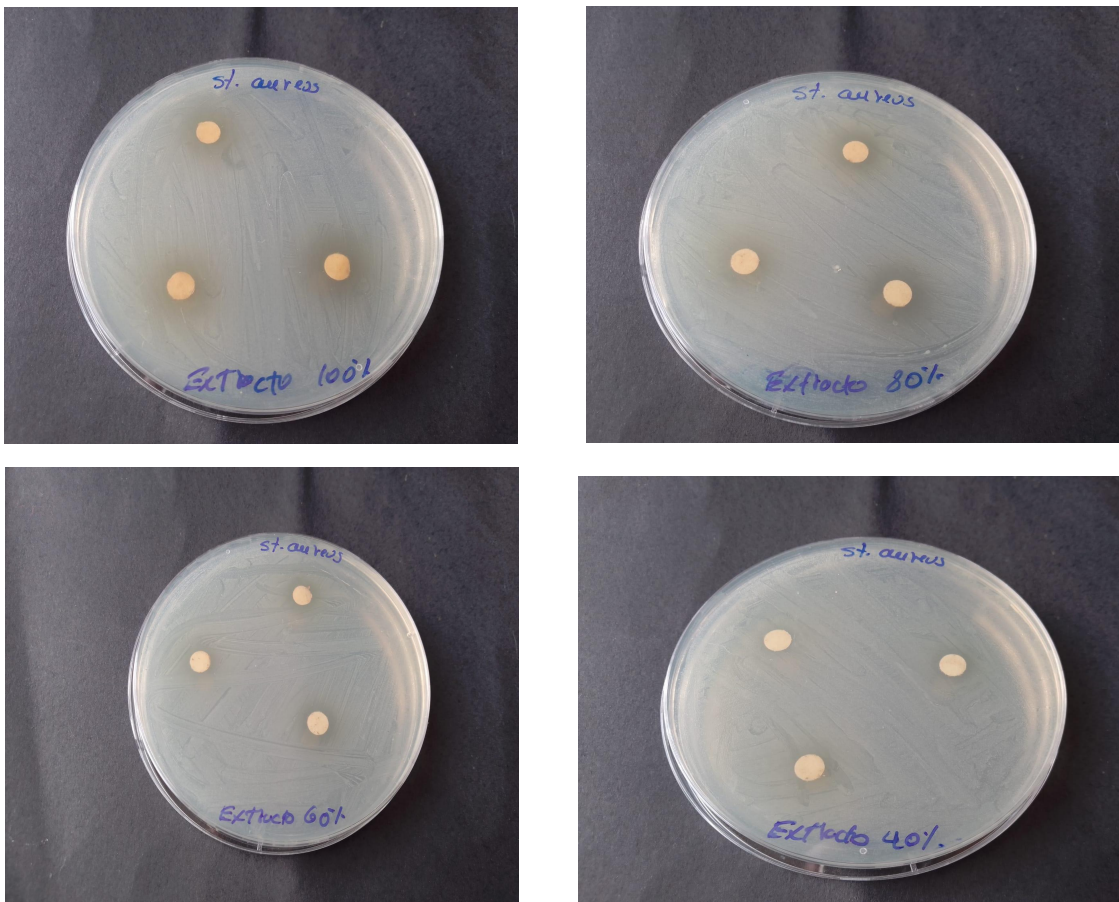


Figura 13. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 100, 80, 60, y 40 % frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

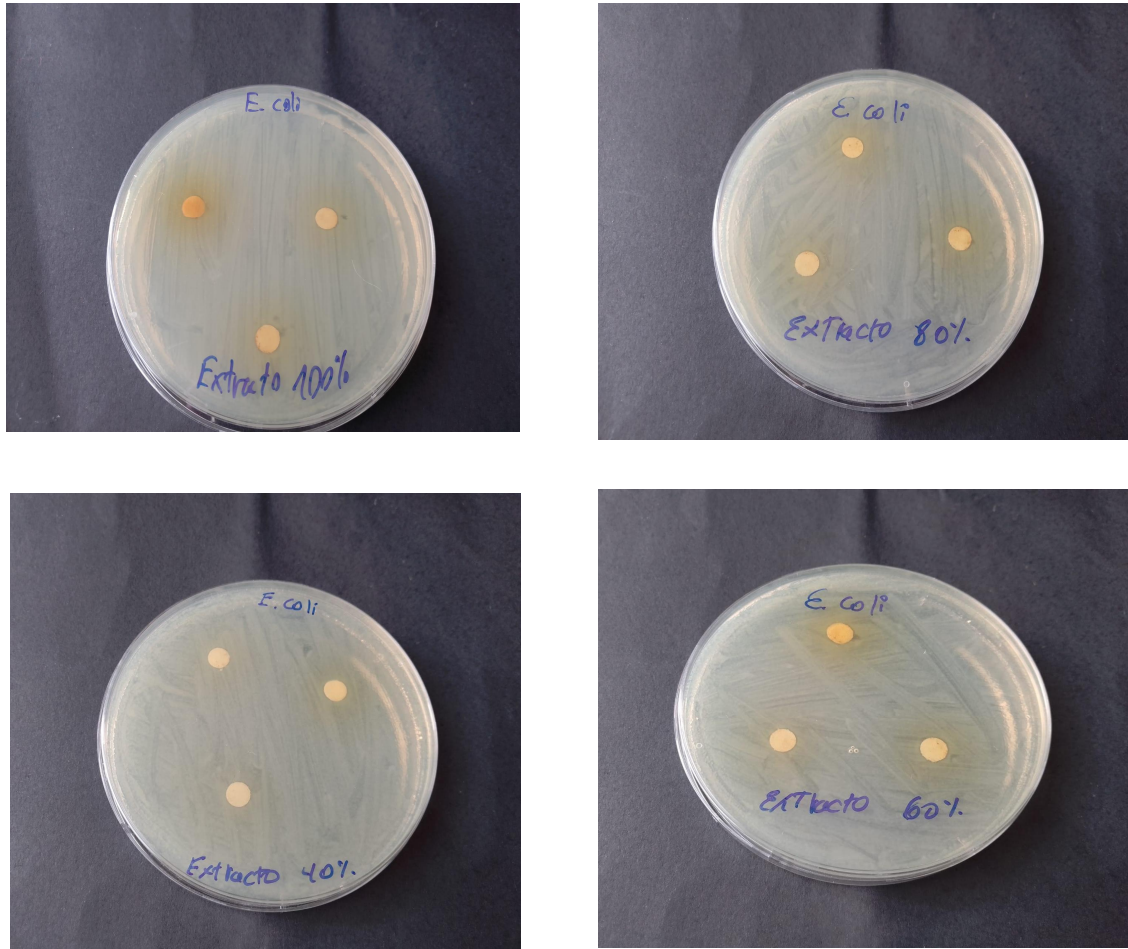


Figura 14. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 100, 80, 60 y 40 % frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.