



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE LOS
EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *Ephedra americana* H&B EX
WILL Y *Chuquiraga rotundifolia* WEDD. Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA EN EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*
y *Klebsiella sp***

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ANGELA HUANCA QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2021



DEDICATORIA

A mi madrecita Lucia Quispe Paredes; por sus consejos, la perseverancia que me ha inculcado, por el valor mostrado para salir adelante. Y por haberme permitido ser una persona de bien.

Con mucho amor y cariño a mi querida hija; Ariana del Pilar A. por haber sido el motor y motivo para seguir mi carrera profesional y haber concluido satisfactoriamente.

Angela Huanca Quispe



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, por haberme dado la oportunidad de poder continuar con mis estudios superiores y brindarme las condiciones para desarrollarme académicamente.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme desarrollarme como estudiante y lograr ser un profesional de éxito, a los docentes y trabajadores administrativos quienes me impartieron sus sabias enseñanzas, por compartir sus experiencias que contribuyeron en mi formación profesional.

Finalmente quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi asesor de tesis Dr. Sc. Juan José Pauro Roque, por sus valiosas sugerencias y el interés puesto en la revisión del presente trabajo.

Angela Huanca Zuispe



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 10

ABSTRACT..... 11

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL..... 13

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 13

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES..... 14

2.2 MARCO TEÓRICO..... 16

2.2.1 Plantas medicinales 16

2.2.2 Pinco pinco 18

2.2.3 Kiswara..... 19

2.2.4 Fitoquímica..... 23

2.2.5 Bacterias 25

2.2.6 Resistencia bacteriana a los antibióticos 27

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO 29

3.2 TIPO DE ESTUDIO 29

3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA 30

**3.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA
CUALITATIVA DE LOS TALLOS-RAÍCES DE *E. americana* E
INFLORESCENCIAS DE *Ch. rotundifolia*..... 31**



3.5	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA BACTERIANA DE <i>E. coli</i> Y <i>Klebsiella</i> sp FRENTE A LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS <i>Ephedra americana</i> Y <i>Chuquiraga rotundifolia</i>	33
-----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA (ALCALOIDES, FENOLES-TANINOS Y CARBOHIDRATOS) DE TALLOS-RAÍCES DE <i>Ephedra americana</i> E INFLORESCENCIA DE <i>Chuquiraga rotundifolia</i>	37
4.2	EVALUAR LA RESPUESTA BACTERIANA DE <i>Escherichia coli</i> Y <i>Klebsiella</i> sp FRENTE A LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE LOS TALLOS-RAÍCES DE <i>Ephedra americana</i> E INFLORESCENCIA DE <i>Chuquiraga rotundifolia</i>	42
V.	CONCLUSIONES	49
VI.	RECOMENDACIONES	50
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXOS	59

AREA: Ciencias Biomédicas.

LINEA: Diagnóstico y Epidemiología.

Fecha de sustentación: 3 de diciembre del 2021.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Planta de <i>Ephedra americana</i> Humb. & Bonpl., 1806 (pinco pinco)	18
Figura 2.	Tallos, frutos, hojas e inflorescencias de <i>Chuquiraga rotundifolia</i> Wedd.	20
Figura 3.	Halos de inhibición de <i>E. coli</i> por extractos alcohólicos de inflorescencias de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	44
Figura 4.	Halos de inhibición de <i>Klebsiella</i> sp por extractos alcohólicos de inflorescencias de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	46
Figura 5.	Procesamiento de kiswara y pinco pinco, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	59
Figura 6.	Preparación de extractos alcohólicos y estudio fitoquímico, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	59
Figura 7.	Análisis fitoquímicos de pinco pinco (izquierda) y kiswara (derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	59
Figura 8.	Preparación de medios de cultivo bacteriano, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	60
Figura 9.	Cultivos puros de <i>E. coli</i> (izquierda) y <i>Klebsiella</i> sp (derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	60
Figura 10.	Preparación de medios de cultivo de bioquímica bacteriana, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	60
Figura 11.	Bioquímica de <i>E. coli</i> (izquierda) y <i>Klebsiella</i> sp (derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.	61



- Figura 12.** Medición de halos de inhibición bacteriana, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019. 61
- Figura 13.** Inhibición bacteriana de los extractos alcohólicos, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019. 61



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cuadro de rango colorimétrico	32
Tabla 2.	Preparación de extractos alcohólicos de las plantas, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, setiembre 2019.....	34
Tabla 3.	Resultados de fitoquímica de los tallos-raíces de <i>Ephedra americana</i> e inflorescencia de <i>Chuquiraga rotundifolia</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.....	38
Tabla 4.	Respuesta antimicrobiana de concentraciones de extractos alcohólicos de inflorescencia de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.....	43
Tabla 5.	Respuesta antimicrobiana de concentraciones de extractos alcohólicos de inflorescencias de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco frente a cepas de <i>Klebsiella</i> sp, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.....	45



INDICE DE ACRÓNIMOS

°C	: grados centígrados.
µg	: microgramo.
µl/l	: microlitros por litro.
ATTCC	: American Type Culture Collection Rockville - EU.
cél/ml	: células por mililitro.
CMI	: concentración mínimo inhibitoria.
<i>et al.</i>	: y colaboradores.
g/ps	: gramos por peso seco.
mg/l	: miligramos por litro.
mg/ml	: miligramos por mililitro.
UFC/g	: unidades formadoras de colonia por gramo.



RESUMEN

Las infecciones urinarias producidas por bacterias son prevalentes en los pacientes que asisten a los servicios de salud, los agentes causales son principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp, por lo que se experimentó el efecto antibacteriano *in vitro* de *Ephedra americana* (pinco pinco) y *Chuquiraga rotundifolia* (kiswara), plantas que son recomendadas por expendedores o curanderos para infecciones urinarias. **Los objetivos específicos** fueron: a) Determinar la composición fitoquímica cualitativa (alcaloides, fenoles-taninos y carbohidratos) de tallos-raíces de *E. americana* e inflorescencias de *Ch. rotundifolia* Wedd. y b) Evaluar la respuesta bacteriana de *E. coli* y *Klebsiella* sp frente a extractos alcohólicos de tallos-raíces de *E. americana* e inflorescencias de *Ch. rotundifolia*. **Los métodos** utilizados en el proceso del tamizaje fitoquímico fueron colorimétricos, mediante los reactivos Dragendorff, Wagner, Mayer, cloruro férrico y reactivo Fehling; la respuesta bacteriana a los extractos en concentraciones diferentes, se evaluó mediante el método de la difusión en agar con discos de sensibilidad. **Los resultados** fueron *E. americana* presentó alcaloides y fenoles–taninos abundantes y moderado contenido de carbohidratos y *Ch. rotundifolia* presentó moderado contenido de alcaloides y fenoles–taninos y leve contenido de carbohidratos, los mayores halos de inhibición se obtuvieron a una concentración de 100%, resultando ambas bacterias con respuesta intermedia de inhibición y fueron inferiores al antibiótico ciprofloxacina, al cual sí fueron sensibles. **Se concluye** que el mayor contenido de alcaloides, fenoles–taninos y carbohidratos fueron para *E. americana* y la mayor inhibición bacteriana se obtuvo con extractos alcohólicos al 100% de concentración.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, *Chuquiraga*, *Ephedra*, *Escherichia*, extractos alcohólicos, *Klebsiella*.



ABSTRACT

Bacterial urinary infections are prevalent in patients attending health services, the causative agents are mainly *Escherichia coli* and *Klebsiella sp.*, for which the in vitro antibacterial effect of *Ephedra americana* (Pinco pinco) and *Chuquiraga rotundifolia* was experienced (Kiswara), plants that are recommended by vendors or healers for urinary infections. The specific objectives were: a) To determine the qualitative phytochemical composition (alkaloids, phenols - tannins and carbohydrates) of stems and roots of *E. americana* and inflorescences of *Ch. Rotundifolia* Wedd. and b) Evaluate the bacterial response of *E. coli* and *Klebsiella sp.* against alcoholic extracts of stems and roots of *E. americana* and inflorescences of *Ch. rotundifolia*. The methods used in the phytochemical screening process were colorimetric, using Dragendorff, Wagner, Mayer reagents, ferric chloride and Fehling reagent; the bacterial response to the extracts in different concentrations was evaluated by means of the agar diffusion method with sensitivity discs. The results were *E. americana* presented abundant alkaloids and phenol-tannins and moderate carbohydrate content and *Ch. Rotundifolia* presented moderate alkaloid and phenol-tannin content and slight carbohydrate content, the highest inhibition halos were obtained at a concentration of 100%, resulting in both bacteria with intermediate inhibition response and were inferior to the antibiotic ciprofloxacin, to which they were sensitive. It is concluded that the highest content of alkaloids, phenol-tannins and carbohydrates were for *E. americana* and the highest bacterial inhibition was obtained with alcoholic extracts at 100% concentration.

Keywords: Antibacterial activity, *Chuquiraga*, *Ephedra*, *Escherichia coli*, alcoholic extracts, *Klebsiella*.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El expendio de plantas medicinales es tradicional en la región Puno y en diferentes partes del Perú y el mundo, mayoritariamente en fechas festivas y durante todo el año, donde los vendedores ofrecen efectos beneficiosos en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas muchas de las infecciones urinarias, pero las mismas no pasaron por exámenes de laboratorio que corroboren dichos efectos.

La infección urinaria tiene como etiología por *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* fundamentalmente, además influyen factores como actividad sexual, embarazo, obstrucción del flujo de orina, alteraciones de inervación de la vejiga, reflujo vesicoureteral y factores genéticos (Jawetz *et al.*, 2014). En gestantes del Hospital Manuel Núñez Butrón – Puno, de un total de 453 casos atendidos durante los meses de marzo a mayo del año 2017, 205 presentaron infecciones urinarias, el 49% correspondió a cistitis, 41% a bacteriuria asintomática y el 10% a casos de pielonefritis, constituyéndose así en una problemática a tomar en cuenta por las autoridades de los servicios de salud (HRMNB, 2018).

Los vendedores de plantas medicinales recomiendan ante las infecciones urinarias, el consumo de las plantas como Pinco Pinco (*Ephedra americana*) y Kiswara (*Chuquiraga rotundifolia*), por lo que en la investigación inicialmente se evaluó la presencia de metabolitos secundarios mediante un tamizaje fitoquímico en los extractos alcohólicos de sus órganos vegetales recomendados tales como la presencia de alcaloides, fenoles, taninos y carbohidratos (Brack, 1999), a continuación fueron diluidos a diferentes concentraciones, con la finalidad de determinar si poseen algún efecto inhibitor del



crecimiento de bacterias que originan infecciones urinarias y contrastadas con un antibiótico convencional como la ciprofloxacina.

Con los resultados se pretende comprobar las cualidades antibacterianas de dichas plantas, creando nuevas alternativas de trabajo e ingresos para la población rural que viene sufriendo pérdidas de rentabilidad en sus cultivos tradicionales y orientar su uso futuro como agente antibacteriano en afecciones del tracto urinario, así como también obtener un producto ecológico a bajo costo y accesible para su consumo en la población de bajos recursos económicos. En tal sentido se planificaron los siguientes objetivos:

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar el tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos alcohólicos de *Ephedra americana* H&B ex Will y *Chuquiraga rotundifolia* Wedd. y actividad antibacteriana en el crecimiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición fitoquímica cualitativa (alcaloides, fenoles-taninos y carbohidratos) de los tallos-raíces de *Ephedra americana* e inflorescencia de *Chuquiraga rotundifolia* Wedd.
- Evaluar la respuesta bacteriana de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. frente a los extractos alcohólicos de los tallos-raíces de *Ephedra americana* e inflorescencia de *Chuquiraga rotundifolia* Wedd.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Aquino (2018) indica que *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” presentaron alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, fenoles, lactonas y aminoácidos, sin presentar toxicidad por administración en animales en 14 días ni originar efectos genotóxicos. Azuero *et al.* (2016) indican que *Lippia citriodora* (cedrón), *Ambrosia artemisifolia* (altamisa), *Taraxacum officinale* (diente de león), *Ageratum conyzoides* (mastrante), *Piper carpunya* (guaviduca), *Borago officinalis* (borraja), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Melissa officinalis* (toronjil), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Momordica charantia* (achochilla) y *Moringa oleífera* (moringa) exhibieron una acción bactericida contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*. Mojica *et al.* (2015) evaluaron el efecto antibacteriano de extractos de siete plantas en donde Cuatro extractos tuvieron una CMI de 1.25 mg/ml, y el extracto diclometánico de las hojas de *C. officinalis* tuvo una CMI de 0.625 mg/ml.

Dueñas *et al.* (2014) indican que la especie *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel, posee propiedades medicinales, presenta tripterpenos y/o esteroides, fenoles y/o taninos, resinas y flavonoides, origina irritabilidad oftálmica moderada y presentan una baja toxicidad. Soto *et al.* (2014) determinaron en flores de *Cantua buxifolia* Juss los metabolitos catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, quinonas, flavonoides y antocianidinas e inhibe el crecimiento bacteriano de *Escherichia*



coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a una concentración de 1.5 mg/ml. Zheng *et al.* (2013) en China, reportaron que el género *Gnaphalium*, presenta más de 125 componentes químicos que incluyeron flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, fitosteroles y otros compuestos, también se ha demostrado su actividad farmacológica.

Cruz *et al.* (2010) prepararon extractos etanólicos, a partir de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, se evaluó su actividad antibacteriana a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, los extractos mostraron actividad contra *S. aureus*; la que exhibió la mejor actividad fue *B. pilosa* y *L. cámara*. Callacondo *et al.* (2008) en el Perú, evaluaron los extractos etanólicos de *Gnaphalium spicatum* sobre algunas líneas celulares tumorales humanas, mostrando mayor actividad citotóxica en las líneas celulares MCF-7 y K-562, las CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$ fueron de 98 y 46 respectivamente. Borchardt *et al.* (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de etanol de 336 especies nativas y naturalizadas (597 extractos), contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, el 24% (142 extractos) mostraron actividad antimicrobiana.

Laciar *et al.* (2009) evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial del ajeno *Artemisia echegarayi* extraído de sus partes aéreas, frente a especies bacterianas contaminantes de alimentos, utilizando las técnicas de difusión con discos en agar y micro dilución en placa respectivamente; demostraron que *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* son las bacterias más sensibles, mas no así *Proteus mirabilis*, que no demostró sensibilidad al aceite. Matthew *et al.* (2007) mencionan que el extracto de ajo



posee un efecto antimicrobiano en bacterias entéricas como *E. coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp. y *Proteus mirabilis*; indicando que *Shigella* sp, posee alta sensibilidad al ajo, mientras que *P. mirabilis* es menos sensible.

El musgo *Pleurozium schreberi*, en la época seca variaron su contenido de azúcares reductores durante todo el día, en promedio de 300 µg de azúcar g/ps y 220 µg de azúcar g/ps, no variando entre los ciclos de deshidratación rehidratación (Montenegro y Melgarejo, 2012); por tanto, no participan en la prevención del daño por estrés hídrico, asimismo desnaturalizan las proteínas ante el bajo déficit hídrico (Alpert, 2006), en musgos que toleran la deshidratación, los azúcares reductores se encuentran estables o disminuyen ante la deshidratación (Smirnoff, 1992), la misma disminución de los contenidos de glucosa y fructosa se determinó en musgos tolerantes al congelamiento (Brinda *et al.*, 2011).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Plantas medicinales

Son cualquier planta que posee en alguno de sus órganos, diversas sustancias con actividad farmacológica o fisiológica que podrían ser utilizados con fines terapéuticos o para construirse en un prototipo para obtener nuevos fármacos por síntesis o hemisíntesis farmacéutica (Carranza y Huayanay, 2009).

La medicina con plantas medicinales, usa terapéuticamente a las plantas medicinales que sustituyen a las medicinas farmacéuticas o se combinan, de las plantas se obtienen sus extractos en diferentes formas de preparación con la finalidad de mejorar



el estado de salud (White *et al.*, 2004), la OMS afirma el uso de hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, todos ellos poseen principios activos de algún órgano vegetal, su uso está bien establecido y reconocido como inocuo y eficaz (OMS, 2016). Es aplicada desde tiempos remotos para tratar o aliviar enfermedades, conocidos como fitofármacos, y es consumida por su costo bajo y reducidos índices de toxicidad (Pascual *et al.*, 2014). Según el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, el 67% tiene su origen, en la naturaleza (McMurry, 2012) y el 25% derivan de las plantas (Corrales y Reyes, 2015).

Extracto etanólico de plantas medicinales

El extracto etanólico posee un olor característico, se obtiene desde la materia prima vegetal desecado, se puede obtener por maceración o percolación con etanol de 70° o 90°. Los extractos son obtenidos a partir de concentrados de consistencia líquida, sólida o intermedia, y son derivados generalmente desde un material vegetal desecado, finalmente se obtienen mediante la evaporación parcial o totalmente del disolvente en el líquido extractor de origen vegetal (Carrión y García, 2010).

La maceración es el procedimiento por el cual se extrae los principios activos y responde a una extracción realizada a temperatura ambiente, se remoja la materia prima preliminarmente desecada en el solvente etanol, a continuación se coloca dentro de un frasco de coloración ámbar de material de vidrio tapado, dejándose en reposo de 2 a 15 días agitándolo diariamente, luego se filtra el líquido, seguidamente se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio, obteniéndose así el extracto. El método de la maceración es utilizado para extraer drogas rígidas a partir de tallos, raíces, entre otros, reduciéndose los costos de solventes (Carrión y García, 2010).

2.2.2 Pinco pinco



Figura 1. Planta de *Ephedra americana* Humb. & Bonpl., 1806 (pinco pinco)

Taxonomía

Dominio	: Eucarya
Reino	: Plantae
Division	: Spermatophyta
Clase	: Gnetopsida
Orden	: Gnetales
Familia	: <i>Ephedraceae</i>
Género	: <i>Ephedra</i>
Especie	: <i>americana</i> Nelson

Nombre científico: *Ephedra americana* H&B ex Will

Descripción botánica. Arbusto rastrero y rizomatoso. Hojas pequeñas de 2 mm de longitud decusadas, reducidas a escamas. Flores: estróbilos masculinos de 7 mm de altura con pedúnculo de 1.5 – 2 mm de longitud, cada flor masculina de 2 mm de largo por 1.5 mm de ancho, contiene 4 estambres con anteras biloculares. Estróbilos femeninos de 5 mm de altura por 4 mm de ancho, rodeado de 4 pares de brácteas rojas, carnosas de sabor



dulce. Pedúnculo pequeño de 2 – 5 mm de longitud. Semillas de 4 – 5 mm de longitud por 2.5 mm de ancho, aovado – acuminadas (Cáceda y Rossel, 1993).

Hábitat. Posee una distribución en los andes entre los 500 a 4,500 msnm, en la costa, sierra y selva alta en lugares secos. Es una hierba a arbusto silvestre (Brack, 1999).

Propiedades medicinales. La infusión de la planta es antiflatulento, diurético, anticongestivo, afecciones a la vejiga, enfermedades genitourinarias y depurativo. La infusión o cocción de la planta es antitumoral. Las decocción y lavados bucales se recomienda en piorrea e inflamaciones de las encías (Brack, 1999). Por la acción curativa de la efedrina, posee un efecto antiespasmódico sobre el sistema simpático en el tratamiento del asma. Tiene propiedades diuréticas, desarreglos del sistema urinario, inflamaciones de la vejiga y próstata, también se utiliza para normalizar la presión sanguínea, en la urticaria y otros estados alérgicos (Cáceda y Rossel, 1993).

Fitoquímica. Contiene vicenina, apigenina, campferol, delfinidina, herbacetina, pelargonidina, procianidina y prodelfinidina (Brack, 1999).

2.2.3 Kiswara

Taxonomía

Dominio	: Eucarya
Reino	: Plantae
División	: Tracheophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Asterales

Familia : Asteraceae

Género : *Chuquiraga*

Especie : *rotundifolia*

Nombre científico: *Chuquiraga rotundifolia* Wedd.



Figura 2. Tallos, frutos, hojas e inflorescencias de *Chuquiraga rotundifolia* Wedd.

Descripción botánica. *Chuquiraga rotundifolia* Wedd, “kiswara”, es un arbusto erecto de 2 – 3 m de altura, intrincado, hojas hasta el ápice. Hojas de 7 – 10 mm de largo por 3 – 5 mm de ancho, coriáceas, glabras en ambas caras, espiniforme en el ápice, ovado lanceoladas, margen entero engrosado, con el nervio medial notorio. Flor de 25 a 30 mm de largo anaranjado – rojizo. Corola tubulosa, pentasecta, con segmentos agudos, una con incisión más profunda que los demás. Anteras sagitadas en la base terminada en una cola, apéndices conectivales agudo. Ramas del estilo cortísimas obtusas. Capítulos solitarios en el extremo de las ramitas. Involucro turbinado, rojizo – anaranjado a verde de 15 a 20 mm de altura. Filarias en varias series, coriáceas, velloso en los bordes, agudos en el ápice; las exteriores de 15 mm de largo por 3 mm de ancho y las interiores lineales de 25



mm de largo por 1 mm de ancho. Aquenio cilíndrico, vellos seríceos. Pappus plumoso igual a 15, formado por una sola serie más corto que la corola (Cáceda y Rossel, 1993).

El género vegetal *Chuquiraga* incumbe a la familia Asteraceae (subfamilia Barnadesioideae), está integrada por más o menos 250 géneros y 1590 especies (Ulloa *et al.*, 2004), quienes en su mayor parte son hierbas, subarbustos y arbustos (Beltrán *et al.*, 2006). *C. spinosa* conocida comúnmente como "Huamanpinta", es una planta recomendada para tratar afecciones del sistema urinario (EsSalud, 2002) gracias a las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Tello *et al.*, 2019). A pesar de tener un alto potencial terapéutico, su toxicidad y su eficacia potencial deben investigarse científicamente, para garantizar su uso seguro y eficaz en los servicios de salud (Pérez *et al.*, 2020).

Hábitat. Vegeta en las zonas rocosas entre 3,800 – 4,000 msnm y florece de enero a marzo (Cáceda y Rossel, 1993). Especies sinónimas poseen una distribución en la sierra entre los 3,000 y 4,500 msnm, es un arbusto silvestre (Brack, 1999).

Medicina. Los campesinos de la zona utilizan las flores y hojas en decocción para controlar las afecciones renales. Se recomiendan su uso en forma de infusión, como agente diurético y antiblenorrágico (Cáceda y Rossel, 1993). Otras especies del género *Chuquiraga*, en infusión son diuréticas y antiblenorrágicas, en veterinaria es contra parásitos internos y en dosis altas puede ser letales para los animales (Brack, 1999).



Composición fitoquímica

C. spinosa una especie muy cercana a la especie *C. rotundifolia*, en ella se identificó compuestos químicos en extractos alcohólicos e hidroalcohólicos en los órganos vegetales aéreas. Los principales principios fitoquímicos incluyen flavonoides, saponinas, compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos, taninos y esteroides (Herrera *et al.*, 2017). Casado *et al.* (2011) ejecutaron un estudio fitoquímico de tres extractos (metanólico, metanólico 50% y acuoso) de los órganos aéreos de *C. spinosa*. La evaluación cromatográfica arrojó la presencia de flavonoides en el extracto metanólico y ácidos fenólicos en extracto acuoso. Senatore *et al.* (1999) encontraron tres flavonoides glucosilados (quercetina 3-O-rutinósido, kaempferol 3-O-rutinósido y kaempferol 3-O-glucósido) y un fitoquímico llamado acetofenona (p-hidroxiacetofenona) en extractos metanólicos de las partes aéreas de *C. spinosa*.

También presentó un total de nueve flavonoides (kaempferol, quercetina e isorhamnetin y sus derivados 3-O-glucósidos, glucurónidos y rutinósidos) en extractos metanólicos de los órganos aéreos de *C. spinosa* mediante análisis por HPLC-DAD, GCMS, HPLC-MS y NMR (Landa *et al.*, 2009). Setenta (70) componentes se identificaron en el aceite esencial de los órganos aéreos de *C. spinosa* por NMR y GC-MS, entre ellos se mencionan a p-hidroxiacetofenona, linalool, p-metoxiacetofenona, α -terpineol, apiol, nonanal, pulegona, α -curcumeno, β -humuleno, espatulenol y cupareno (Senatore, 1996). La prueba de la espuma indicó la presencia de saponinas en el extracto etanólico de esta especie (Herrera *et al.*, 2017). También posee presencia de alcaloides con los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff (Arroyo *et al.*, 2019).



2.2.4 Fitoquímica

Es el estudio de los componentes químicos de las plantas, los principios activos son extraídos por la acción de un disolvente separando la materia soluble (componentes fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble) (Shing, 2011), entre los métodos empleados se citan las técnicas de extracción sólido – líquido, mediante el contacto íntimo de la materia prima y el disolvente, entre ellas la percolación, la inmersión y la maceración (Bart y Pilz, 2011), entre las técnicas más avanzadas para la separación de los componentes fitoquímicos se mencionan los métodos cromatográficos en capa fina y cromatografía en columna (Ríos, 2013).

La búsqueda de principios activos en la flora posee métodos a partir de los extractos con los agentes cromógenos, los análisis fisicoquímicos de plantas incluyen la detección de los principales tipos de metabolitos que poseen alguna actividad biológica como los son los alcoholes, alcaloides, flavonoides, compuestos carbonílicos, esteroides, indoles, ácidos grasos y azúcares y sus derivados (Shing, 2011). Existe la necesidad de conseguir alternativas eficaces para controlar infecciones bacterianas, por lo que se recurrió a la fitoquímica y fitofarmacología (Domingo y López, 2003). El gran número de metabolitos secundarios que poseen las plantas se constituye en una posibilidad de descubrir moléculas bioactivas con actividad biológica, con propiedades antibacterianas (Jawetz, 2002).

Los metabolitos secundarios son sustancias químicas que derivan del metabolismo primario, su distribución es limitada en las plantas y muchos concentrados a grupos taxonómicos particulares (Shilpa *et al.*, 2010). Su producción en las plantas es inespecífica, posteriormente se determinó que poseen altos rendimientos y poseen



múltiples funciones (Wink, 2007), no poseen función aparente en el metabolismo primario, pero sí están implicadas en la defensa contra animales herbívoros e infecciones por virus, hongos y bacterias, llamada también compuestos alelopáticos, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgaud *et al.*, 2001). Algunos poseen función fisiológica, como los alcaloides, las pectinas sirven de transporte de nitrógeno tóxico y moléculas de almacenamiento, los fenoles entre ellos los flavonoides otorgan protección a los rayos ultravioletas (Wink, 2007).

A nivel internacional el 44% de nuevos medicamentos se basan en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos proceden de las plantas (Haq, 2004), 60% son compuestos anticancerígenos y el 75% de medicamentos son usadas contra enfermedades infecciosas (Cragg y Newman, 2005). Entre los efectos fisiológicos que originan los metabolitos secundarios se citan: alcaloides aislados de *Physostigmatis semina* contraen la pupila, los alcaloides aislados de *Atropa belladonna* la dilatan; los glucósidos cardíacos de *Strophantus* son estimulantes del corazón; la aspirina, que es un analgésico y previene infartos y trombos, es un derivado del ácido salicílico, procede género *Salix*; las especias, condimentos, infusiones y bebidas como el café, el té y el chocolate, aromas, saborizantes y estimulantes son atribuidos a los alcaloides cafeína, teofilina y teobromina (Anaya y Espinoza, 2006).

Los metabolitos secundarios de plantas poseen tres principales categorías: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Chinou, 2008), los terpenos tienen su origen en la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides (Sarin, 2005), éstos se dividen en: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de ellos se encuentran los carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol,



entre otros (Shilpa *et al.*, 2010), los fenoles incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos, poseen efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otras (Gurib, 2006), los compuestos nitrogenados son los alcaloides en un número de 4,000, poseen efectos fisiológicos activos en humanos (cocaína, nicotina y morfina) y glucósidos cianogénicos (Sajc *et al.*, 2000), éstos últimos poseen funciones de defensa (Bennett y Wallsgrove, 1994).

2.2.5 Bacterias

a. *Escherichia coli*

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacterales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>Escherichia coli</i> Escherich 1885.

Es un bacilo Gram negativo, constituye la flora intestinal normal, pero algunas especies son patógenas y causan daño iniciando cuadros clínicos, como diarrea y otras afecciones gastrointestinales (Rodríguez, 2002). En cultivo *in vitro* forman colonias circulares, convexas y lisas, frecuentemente origina la positividad al indol, lisina descarboxilasa, fermentadoras de manitol y producen gas a partir de la glucosa, todas son similares morfológica y fisiológicamente, es utilizada como indicador de contaminación ya que, si se aíslan en el agua, significa presencia de desechos fecales en el agua y no es



considerada apta para consumo humano, el ser humano excreta diariamente con las heces, recuentos bacterianos entre $10^8 - 10^9$ UFC/g, tradicionalmente es considerada como bacteria comensal no patógena (Jawetz *et al.*, 2014).

b. *Klebsiella* sp. (Hold & Hendricks, 1994)

Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Klebsiella</i>
Especie	: <i>Klebsiella</i> sp

Klebsiella sp son bacilos Gram negativos inmóviles, a menudo son capsulados, donde la cápsula posee naturaleza polisacáridica, en forma natural son aislados desde ambientes acuáticos y su reproducción se puede llevar a cabo en medios acuáticos ricos en nutrientes como las aguas residuales, en sistemas de repartición de agua y también son defecados en heces de personas y animales (Ainsworth, 2004), son patógenas oportunistas, provocan gran variedad de cuadros clínicos en el ser humano, desde infecciones urinarias, bacteriemias, neumonías, infecciones hepato biliares, infecciones nosocomiales, los cromosomas extranucleares (plásmidos) les otorgan resistencia a los antibióticos, generalmente resistentes a betalactámicos y aminoglucósidos (Kunkel, 2001).



2.2.6 Resistencia bacteriana a los antibióticos

Es la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico al que antes fue susceptible, es un cambio indeleble del material genético del microorganismo, que logra transferirle a sus descendientes (Forbes, 2009). Los cambios genéticos, explican la resistencia y posee varios mecanismos que involucran al ADN cromosomal, como la mutación o la adquisición de material genético extracromosomal, o por la transducción, innovación o conjugación, es un problema que tiene implicaciones clínicas, ya que obliga al descubrimiento y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, cada vez más costosos y más tóxicos que los utilizados habitualmente en el tratamiento de las infecciones; además ha forzado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico a muchas drogas que primeramente fueron muy útiles (Madigan *et al.*, 2003).

La resistencia bacteriana a los antibióticos actualmente es un grave problema de salud, pero a inicios los antibióticos fueron vistos como balas mágicas que lograrían el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Livermore, 2003), pero las bacterias lograron desarrollar resistencia a muchos fármacos, el descubrimiento de nuevas moléculas es lenta y disminuyó en los últimos años, en algunas veces quedó hasta el día de hoy sin un tratamiento eficaz (Soto, 2003).

Los antibióticos para ingresar a la bacteria, se mantienen intactos hasta llegar a su lugar de acción para luego lograr unirse al sitio diana para ejercer su función en la bacteria (Neu, 1992). Uno de los principales mecanismos bacterianos para disminuir o evitar la presencia del antibiótico es modificando su permeabilidad, alterando los mecanismos de transporte activo en la membrana celular o generando mecanismos de eliminación activa del antibiótico, cuando el antibiótico ingresa es bloqueada por enzimas producidas por



genes bacterianos, modificando su estructura e inactivandola, tal es el caso de las betalactamasas que destruyen en anillo betalactámico de las penicilinas y cefalosporinas, o las fosforilasas y acetilasas que inactivan a los aminoglicósidos (Cohen, 1992).

Las bacterias modifican o cambian sus puntos de unión para los antibióticos, de tal manera que evita que el antibiótico pueda ejercer su acción como el estafilococo meticilino resistente, el pneumococo penicilino resistente y el enterococo multiresistente (Spratt, 1994), todo originado por la modificación de su información genética o variando grandes segmentos de su código genético (transposones), se puede transmitir dentro de su misma especie o a otras especies mediante plásmidos o bacteriófagos (Jacoby y Archere, 1991).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

La investigación se realizó en la región Puno, las plantas fueron adquiridas en los mercados Santa Bárbara de la ciudad de Juliaca, capital de la provincia de San Román y ubicado en las coordenadas 15°29'27.8" S 70°08'13.7" W y mercado Laykakota de la ciudad de Puno, ubicado en coordenadas 15°50'46.8" S 70°01'14.8" W, que es capital de la provincia de Puno, ambas ciudades de en la región Puno - Perú. Los análisis fitoquímicos y el aislamiento de las bacterias se realizaron en el Laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

La investigación fue de tipo experimental y de corte longitudinal (Hernández *et al.*, 2014). Experimental, porque se ejecutaron diversos tratamientos, los que estarían representados por las concentraciones de extractos de las plantas en estudio, todos ellos comparadas frente a un tratamiento control, que fue representado por un antibiótico de acción bactericida conocida. De corte transversal, porque se desarrolló en determinados meses o temporalidad conocida.



3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

La población de plantas es una población infinita y el tamaño de muestra se calculó mediante la siguiente ecuación matemática (Murray y Larry, 2005):

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{i^2}$$

Donde: **Z** = valor correspondiente a la distribución de Gauss (1.96); **p** = prevalencia esperada (0.6); **q** = diferencia de la prevalencia esperada (0.4); **i** = error que se prevee cometer (0.05).

Reemplazando en la ecuación matemática se obtuvo:

$$n = \frac{1.96_{0.05}^2 * 0.6 * 0.4}{0.05^2}$$

$$n = 18.44$$

Las 18 muestras de plantas, 9 de pinco pinco y 9 de kiswara, fueron distribuidas en 6 colecciones en cada mercado. Por otro lado, las bacterias *E. coli* y *Klebsiella* sp, fueron aisladas desde muestras de orina positivas a infección urinaria, que procedieron de los consultorios externos del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón de Puno.



3.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA DE LOS TALLOS-RAÍCES DE *E. americana* E INFLORESCENCIAS DE *Ch. rotundifolia*

a. Frecuencia y lugares de muestreo

Las plantas fueron colectadas cada 7 días, con la finalidad de lograr la uniformidad de la especie y fueron adquiridos en dos mercados, uno de la ciudad de Juliaca y el otro en la ciudad de Puno.

b. Descripción detallada de uso de equipos y procedimientos

Las muestras de plantas se secaron al ambiente y bajo sombra, los tallos-raíces de pinco – pinco (*E. americana*) y las inflorescencias de kiswara (*Ch. rotundifolia*) fueron molidas en un mortero, 10 g de muestra seca en 100 ml de etanol tal como lo recomienda Pimentel *et al.* (2015), dejándose macerar por 7 días y se pasó a realizar el tamizaje fitoquímico con los siguientes procedimientos:

Determinación de alcaloides con reactivo Dragendorff. En un tubo de ensayo se colocó 5 ml del extracto a investigar al que se le agregó 2 ml del reactivo de Dragendorff, se homogenizó y procedió a la lectura visual tomando en cuenta el rango de intensidad de la valoración y fue positivo ante la presencia de un precipitado café rojizo (Medina, 1997).

Determinación de alcaloides con reactivo Mayer. En un tubo de ensayo se colocaron 5 ml del extracto a investigar al que se le agregó 2 ml del reactivo de Mayer, se homogenizó y se procedió a la lectura visual, tomando en cuenta el rango de intensidad de la coloración y fue positivo ante la presencia de un precipitado amarillo pálido (Medina, 1997).



Determinación de alcaloides con reactivo Wagner. En un tubo de ensayo se colocaron 5 ml del extracto a investigar al que se le agregó 2 ml del reactivo Wagner, se homogenizaron para después proceder a la lectura visual, tomando en cuenta el rango de intensidad de la coloración y fue positivo ante la presencia de un precipitado naranja oscuro (Medina, 1997).

Identificación de fenoles-taninos con reactivo cloruro férrico. En un tubo de ensayo se adicionó 2 ml de cloruro férrico al 5% y 5 ml del extracto a investigar, se homogenizó y se procedió a la lectura visual, siendo positivo ante la presencia de un precipitado verde oscuro (Medina, 1997).

Determinación de carbohidratos con reactivo de Fehling. En un tubo de ensayo se agregó unas gotas del reactivo de Fehling y 5 ml del extracto alcohólico, posteriormente se llevó a baño maría por 5 minutos y se observó, la presencia de un precipitado rojo se dio como positivo a carbohidratos (Medina, 1997).

Las lecturas realizadas para determinar alcaloides, fenoles-taninos y carbohidratos, se realizó con el siguiente rango de visualización colorimétrico:

Tabla 1. Cuadro de rango colorimétrico

Lectura	Rango
Color intenso	+++ : muy abundante
Color regular	++ : abundante
Color débil	+ : leve
Sin coloración	- : ausente

Fuente: Medina (1997).



c. Variables analizadas

- **Variable independiente:** Extracto alcohólico de plantas medicinales.
- **Variable dependiente:** Rango de contenido de metabolitos secundarios.

d. Aplicación de bioestadística para el contraste de hipótesis

Considerando que los resultados del análisis fitoquímico se realizó mediante la visualización de las coloraciones fitoquímicas y su respectiva descripción (cualitativa), no realizaron pruebas bioestadísticas.

**3.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA BACTERIANA DE *E. coli* Y *Klebsiella* sp
FRENTE A LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS *Ephedra americana* Y
*Chuquiraga rotundifolia***

a. Frecuencia y lugares de muestreo

Los tratamientos experimentales se realizaron cada 15 días, con la finalidad de obtener un promedio del efecto inhibidor bacteriano, todo ello se realizó en el laboratorio antes mencionado.

b. Descripción detallada de uso de equipos y procedimientos

Aislamiento de bacterias

Método: Cultivo *in vitro* en agar Eosin Metil Blue (EMB) y bioquímicas diferenciales.

Procedimientos. Las muestras de orinas positivas a la infección urinaria, fueron cultivadas en el medio de cultivo de agar EMB, mediante estrías en los cuatro cuadrantes. La identificación preliminar de las bacterias se realizó mediante las características de las colonias en cada medio de cultivo, las bacterias *E. coli* presentaron colonias con una región central azulado con brillo metálico y *Klebsiella pneumoniae* fueron aquellas con

características mucosas y de color rosa púrpura (Mendo, 2003). Para corroborar las especies, se realizó la tinción Gram y las pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CS e indol para la identificación de cada una de las bacterias.

Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos alcohólicos de *E. americana* y *Ch. rotundifolia* en el crecimiento *in vitro* de bacterias

Para obtener los resultados de este objetivo, se realizaron los procedimientos recomendados por Alí *et al.* (2009), los cuales se detallan a continuación:

Preparación de extractos vegetales. Las muestras secas de plantas fueron trituradas en un mortero de porcelana, para la obtención de las concentraciones experimentales de los extractos alcohólicos, se realizaron los pesados y la mezcla con los volúmenes del solvente (Tabla 2) en las siguientes cantidades:

Tabla 2. Preparación de extractos alcohólicos de las plantas, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, setiembre 2019.

Concentración del extracto	Preparación
40 %	40 g de planta + 100 ml de etanol al 70%
50 %	50 g de planta + 100 ml de etanol al 70%
75 %	75 g de planta + 100 ml de etanol al 70%
100 %	100 g de planta + 100 ml de etanol al 70%
Ciprofloxacina	Disco de sensibilidad



Las concentraciones fueron impregnadas por un tiempo de 3 horas en los discos de sensibilidad (papel filtro Whatman), cortados en la ayuda de un perforador de papel y esterilizados en autoclave.

Evaluación de la inhibición bacteriana

Método: Difusión en agar con discos de sensibilidad o antibiograma disco - placa.

Utilizando discos de papel filtro impregnados con las concentraciones de extractos alcohólicos de las plantas, se ensayaron los efectos antibacterianos. Las bacterias previamente aisladas fueron cultivadas en medio de cultivo Muller Hinton, para ello se preparó una dilución de concentración bacteriana conocida, transfiriendo a un tubo de ensayo limpio y esterilizado 5 ml de suero fisiológico, con una asa de siembre se colectó una colonia bacteriana de la placa y se transfirió al suero fisiológico, con ayuda del vórtex se logró la disolución y dispersión bacteriana, la cual se contrastó con el patrón del estándar MacFarland 0.5, turbidez equivalente a una concentración bacteriana de 1.5×10^8 cél/ml, a continuación con ayuda de un hisopo estéril se procedió a cultivar sobre la placa de agar Muller Hinton las bacterias del tubo conteniendo la dilución bacteriana.

En cada placa Petri, sobre el cultivo bacteriano, se colocaron los discos de papel filtro impregnado con las concentraciones de los extractos alcohólicos de las plantas y un disco de ciprofloxacina (tratamiento control). Los cultivos se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37 °C, luego la actividad antibacteriana se determinó con la medida del diámetro de halo de inhibición producido alrededor de cada disco de papel filtro. Los valores fueron contrastados con el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión del Instituto Nacional de



Salud (INS, 2002) y así se determinó si la bacteria presentó una respuesta de resistencia, intermedia o respuesta de sensibilidad.

c. Variables analizadas

- **Variable independiente:** Concentraciones de extractos alcohólicos.
- **Variable dependiente:** Halos de inhibición bacteriana.

d. Aplicación de bioestadística para el contraste de hipótesis

Para el cumplimiento de objetivo no se realizaron pruebas bioestadísticas, en razón de que los halos de inhibición bacterianas fueron comparados con una norma de salud vigente.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA (ALCALOIDES, FENOLES-TANINOS Y CARBOHIDRATOS) DE TALLOS-RAÍCES DE *Ephedra americana* E INFLORESCENCIA DE *Chuquiraga rotundifolia*.

Luego de realizar el estudio fitoquímico cualitativo de los extractos alcohólicos de las plantas, los extractos alcohólicos de tallos-raíces de *Ephedra americana* ante los reactivos de Mayer y Wagner para la determinación de alcaloides y cloruro férrico para determinar fenoles-taninos, se obtuvo una cantidad abundante (+++); mientras tanto el contenido de carbohidratos fue moderado (++); por otro lado, los extractos alcohólicos de la inflorescencia de *Ch. rotundifolia* presentaron alcaloides ante los reactivos de Mayer y Wagner y fenoles-taninos mediante el reactivo cloruro férrico en cantidad moderada (++) y el contenido de carbohidratos fue leve (+). El contenido de alcaloides en ambos extractos de las plantas no fue detectado con el reactivo Dragendorff (Tabla 3). Como no se determinó presencia de alcaloides con el reactivo Dragendorff, eso indica que los alcaloides poseen el nitrógeno terciario, y no primario ni secundario, unido a un grupo alquilo que por lo general puede ser N – metilo.

El mayor contenido de compuestos fitoquímicos se determinó en los extractos etanólicos de tallos-raíces en *E. americana*, con tres cruces en los metabolitos secundarios alcaloides y fenoles-taninos, estos resultados concuerdan con lo reportado por Bach *et al.* (2017), quienes afirman que *Ephedra tweediana*, conocida como “tramontana”, es utilizada como antiasmático y entre sus componentes poseen altos contenidos de fenoles

y taninos, entre ellos la proapigeninidina como parte de los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos y los órganos subterráneos poseen proapigeninidina, propelargonidina, taninos y proantocianidinas; coinciden también con lo establecido por Medina (1997), quien en individuos de *Ephedra americana*, adquiridos en la ciudad de Arequipa, registraron altos contenidos de alcaloides a los reactivos Mayer y Wagner, dichos metabolitos proporcionarían a las plantas propiedades bactericidas.

Tabla 3. Resultados de fitoquímica de los tallos-raíces de *Ephedra americana* e inflorescencia de *Chuquiraga rotundifolia*, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

Plantas medicinales	Alcaloides			Fenoles–taninos	Carbohidratos
	Drag	May	Wag	Cloruro férrico	Fehling
<i>Ephedra americana</i>	--	+++	+++	+++	++
<i>Chuquiraga rotundifolia</i>	--	++	++	++	+

Donde: +++ : abundante; ++ : moderado; + : leve; - : no detectado; Drag : reactivo Dragendorff; May : reactivo Mayer; Wag : reactivo Wagner.

En relación al análisis cualitativo de los extractos alcohólicos de *E. americana*, la planta mostró tener un alto contenido de taninos, en tal sentido el consumo de pinco pinco, debería ser controlado, en razón de que posee un alto contenido de taninos, y pueden ser tóxicos para las bacterias, y en el caso del ser humano que cuenta con bacterias intestinales benéficas, pueden ser eliminadas por el consumo exagerado de dicha planta; en caso de los rumiantes los taninos originan cambios de la digestión ruminal de proteínas y carbohidratos, y en la producción de ácidos grasos volátiles (Makkar *et al.*, 1997), el cual alteraría la producción normal de leche en los vacunos.

Con respecto a la planta *Ch. rotundifolia*, esta presentó una moderada cantidad (++) de alcaloides, fenoles-taninos y una leve cantidad (+) de carbohidratos, lo cual



concuerta con lo mencionado por Dueñas *et al.* (2014), quienes en la especie de *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel, encontraron triterpenos y/o esteroides, fenoles y/o taninos, resinas y flavonoides, debiéndose tener cuidado en razón de que dichas plantas originan irritabilidad oftálmica moderada y presentan una baja toxicidad; asimismo Aquino (2018), obtuvo en la especie *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, fenoles, lactonas y aminoácidos.

Otras especies vegetales presentan los mismos metabolitos secundarios, tal como lo que indica Soto *et al.* (2014), en *Cantua buxifolia* Juss determinaron compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, adicionados a catequinas, lactonas, triterpenos, esteroides, saponinas, quinonas y antocianidinas, al mismo tiempo Zheng *et al.* (2013), señalan que especies del género *Gnaphalium*, posee flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, fitosteroles.

Los alcaloides poseen un efecto fisiológico desconocido; sin embargo, es considerado una sustancia de desecho o almacenamiento de nitrógeno parecido al ácido úrico en los animales, y al encontrarlos en tejido periféricos se les atribuiría la función de protección a la planta (Arango, 2009), otras plantas como la especie *Ch. spinosa* arrojaron no poseer toxicidad por administración en animales en 14 días ni originar efectos genotóxicos (Aquino, 2018), quedando pendiente llevar a cabo estudios de toxicidad. Por otro lado, Ávalos y Pérez (2009), manifiestan que, en humanos, los alcaloides originan respuestas fisiológicas y psicológicas ya que poseen interacción con neurotransmisores, pero a dosis altas son muy tóxicos, pero a dosis bajas poseen un alto valor terapéutico y es utilizado como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos.



Los fenoles-taninos determinados en ambas plantas fueron determinadas con tres cruces (+++) en *E. americana* y dos cruces (++) en *Ch. rotundifolia*, los cuales son abundantes en los extractos alcohólicos, a ellos se les atribuyen efecto antioxidante, antiinflamatorio prostático, inmunomodulador, cicatrizante y antiséptico vaginal (Casado *et al.*, 2011; Ramírez, 2014; Condorhuamán *et al.*, 2016). Adicionalmente, las cumarinas, los fenoles y los flavonoides, rebajan la tasa de colesterol, regeneran células hepáticas, protegen de los virus, microbios y células cancerosas, reducen la tensión sanguínea, fortifican el sistema cardiovascular, fijan el ritmo cardiaco, detoxifican el hígado y el sistema digestivo, tratan las úlceras, heridas, alergias y tranquilizan depresiones e impotencias, son poderosos antioxidantes, potencian la función de las vitaminas, activan y desbloquean numerosos sistemas enzimáticos metabólicos y detoxificantes, mejoran la circulación periférica y fortalecen el sistema inmunológico (Martínez *et al.*, 2006).

Los taninos poseen un alto peso molecular (500 – 3,000 Daltons) y son almacenados dentro de las vacuolas, conjuntamente con alcaloides y proteínas, asimismo originan función defensiva a insectos y hongos (Makkar y Goodchild, 1997). La época de recolección puede alterar la cantidad presente de taninos en las plantas, sin tener tendencias consistentes, pero la mayor concentración se obtuvo en época de sequía que en la de lluvias, asimismo se afirma que en animales origina la depresión en el consumo y la digestibilidad de la materia seca y el nitrógeno, pues provocan saciedad y limitan el consumo de materia seca (Gutiérrez *et al.*, 2003).

La presencia de azúcares en las plantas evaluadas también fue determinada con tres y dos cruces en pinco pinco y kiswara respectivamente, con los que se afirma que



dichas plantas poseen glucosa, manosa y otros, donde la manosa que es un epímero de la glucosa, puede ser absorbido a nivel intestinal por difusión simple, transformándose a manitol, promoviéndose a la diuresis y que en las plantas abunda en la savia elaborada (Brewster y McEwen, 1967).

El contenido de metabolitos secundarios que poseen las especies vegetales varían entre plantas e inclusive entre individuos vegetales de una misma especie y está influenciado por el genotipo de la planta (especie y variedad), direccionándose las diferencias a las distintas épocas de muestreo, al estado vegetativo y reproductivo de la planta, al estado del suelo y al clima del hábitat vegetal (Medina, 1997), por lo que en la investigación las plantas fueron muestreadas en diferentes fechas con la finalidad de obtener resultados aleatorios ya que sus hábitats variarán en su temperatura ambiental, estado del suelo y presencias de lluvia, entre otros aspectos. Por otro lado, la presencia de metabolitos también está influido por los aspectos ambientales como la radiación solar y la disponibilidad de agua, la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades (Waterman y Mole, 1994), están relacionadas con los mecanismos de defensa en las plantas, así como los efectos del suelo y del clima como la humedad ambiental y la luminosidad (Harborne, 1993). De igual manera, Kumar (1997), afirma que una planta puede sintetizar los fitoquímicos en diferentes órganos, los tejidos e inclusive algunas células y posee influencia ambiental, tales como en las vacuolas o en la pared celular (Leinmüller *et al.*, 1995), ante esa noción.

De lo analizado e interpretado, se acepta la hipótesis planteada, el cual menciona que el tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos de *Ephedra americana* H&B ex Will y *Chuquiraga rotundifolia* Weed. varían según las plantas, en razón de que el



contenido de alcaloides, fenoles–taninos y azúcares varían entre las dos especies vegetales medicinales.

4.2 RESPUESTA BACTERIANA DE *Escherichia coli* Y *Klebsiella* sp FRENTE A LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE LOS TALLOS-RAÍCES DE *Ephedra americana* E INFLORESCENCIA DE *Chuquiraga rotundifolia*

Los extractos alcohólicos de las plantas medicinales experimentadas en la investigación, no lograron superar al tratamiento control ciprofloxacina en originar los diámetros de inhibición (Tabla 4). Con respecto al extracto alcohólico de inflorescencia de kiswara, los mayores diámetros de halos de inhibición se lograron con extractos alcohólicos de concentraciones 75% y 100% con 10.67 mm y 17.33 mm respectivamente, siendo inferiores a los discos del antibiótico ciprofloxacina con un diámetro de 34.33 mm. Agregando a lo anterior, la bacteria *E. coli* resultó ser sensible a la ciprofloxacina comparando con las normas del Instituto Nacional de Salud (INS, 2002). De modo idéntico, los extractos alcohólicos de tallos–raíces de pinco pinco originaron los mayores diámetros de inhibición bacteriana sobre *E. coli*, con extractos de concentraciones del 75% y 100% con diámetros de halo de 10.00 mm y 15.67 mm, con estos valores se puede afirmar que a una concentración de 100% del extracto alcohólico se obtuvo una respuesta antibacteriana intermedia, mientras que fue sensible a la ciprofloxacina (tratamiento control) formando halos de 7.78 mm (Figura 3).

Tabla 4. Respuesta antimicrobiana de concentraciones de extractos alcohólicos de inflorescencia de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco frente a cepas de *Escherichia coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

Extracto de planta medicinal	Concentraciones y el control	Repeticiones			\bar{X}	C. V. (%)	Respuesta antimicrobiana *
		1	2	3			
Inflorescencia de <i>Chuquiraga rotundifolia</i>	40%	4	6	5	5.00	20.00	Resistente
	50%	6	9	8	7.67	19.92	Resistente
	75%	10	10	12	10.67	10.83	Resistente
	100%	14	18	20	17.33	17.63	Intermedio
	Ciprofloxacina	32	34	37	34.33	7.33	Sensible
Tallos-raíces de <i>Ephedra americana</i>	40%	5	5	6	5.50	12.86	Resistente
	50%	6	7	8	7.00	14.29	Resistente
	75%	8	10	12	10.00	20.00	Resistente
	100%	15	14	18	15.67	13.29	Intermedio
	Ciprofloxacina	30	32	35	32.33	7.78	Sensible

Donde: * establecidos en INS (2002): ciprofloxacina 5 µg (Quinolonas): Resistente: ≤ 15 mm; Intermedio: 16 – 20 mm; Sensible: ≥ 21 mm.

Las respuestas del crecimiento bacteriano de *Klebsiella* sp fueron muy similares a los obtenidos por *E. coli* con respecto a los extractos alcohólicos de inflorescencia de kiswara (Tabla 5). Estos extractos de kiswara originaron diámetros de 11.33 mm y 16.67 mm, a concentraciones de 75% y 100% respectivamente, el mayor halo de inhibición se determinó con los discos de antibióticos de ciprofloxacina con halos promedios de 33.33 mm, siendo las bacterias sensibles al antibiótico, según los diámetros de halos recomendados por el INS (2002) (Figura 4). *Klebsiella* sp frente a los extractos alcohólicos de tallos-raíces de pinco pinco, las concentraciones de 75% y 100% originaron los mayores halos de inhibición con 12.33 mm y 18.67 mm respectivamente. De todas las concentraciones experimentadas el extracto alcohólico al 100% de pinco pinco resultó con una respuesta intermedia con un promedio de 18.67 mm, siendo la más

próxima a los halos de inhibición bacteriana del tratamiento control (≥ 21 mm) con ciprofloxacina con estos valores se obtuvo una respuesta sensible.

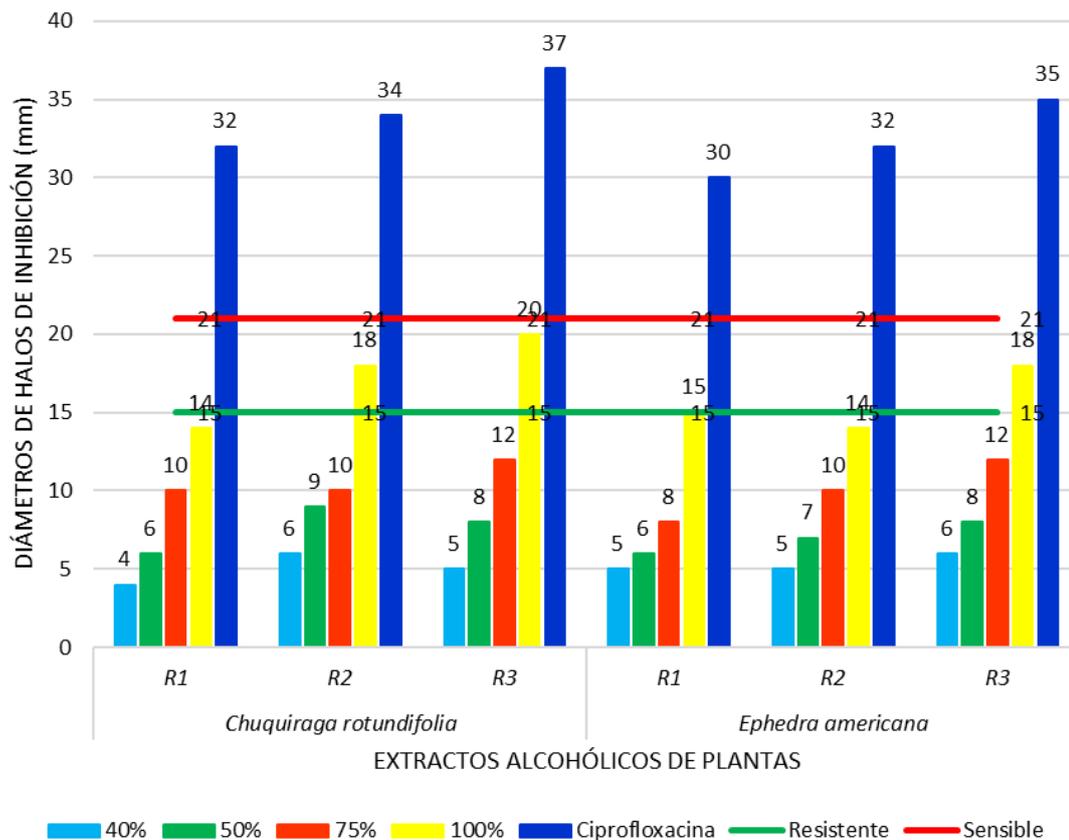


Figura 3. Halos de inhibición de *E. coli* por extractos alcohólicos de inflorescencias de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

Los resultados obtenidos en la investigación, fueron similares a los obtenidos por Cruz *et al.* (2010), quienes determinaron que los extractos alcohólicos de hojas secas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, solo tuvieron acción inhibitoria sobre *Staph. aureus*, mientras que *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron resistentes, por lo tanto, dichas bacterias Gram negativas podrían generar un importante impacto en la salud y en la producción animal (San Martín *et al.*, 2005), y si tuvieran efectos antibacterianos sobre las bacterias, Sharma y Kumar (2009), se

atribuirían a la presencia de flavonoides en la planta *Lantana camara* contra *Staph. aureus*.

Tabla 5. Respuesta antimicrobiana de concentraciones de extractos alcohólicos de inflorescencias de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco frente a cepas de *Klebsiella* sp, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

Extracto de planta medicinal	Concentraciones y el control	Repeticiones			\bar{X}	C. V. (%)	Respuesta antimicrobiana *
		1	2	3			
Inflorescencia de <i>Chuquiraga rotundifolia</i>	40%	4	5	8	5.67	36.74	Resistente
	50%	6	7	10	7.67	27.15	Resistente
	75%	11	10	13	11.33	13.48	Resistente
	100%	16	14	20	16.67	18.33	Intermedio
	Ciprofloxacina	31	32	37	33.33	9.64	Sensible
Tallos-raíces de <i>Ephedra americana</i>	40%	4	5	8	6.67	22.91	Resistente
	50%	6	7	10	8.67	17.63	Resistente
	75%	11	10	13	12.33	12.39	Resistente
	100%	16	14	20	18.67	6.19	Intermedio
	Ciprofloxacina	31	32	37	35.00	8.57	Sensible

Donde: * establecidos en INS (2002): ciprofloxacina 5 µg (Quinolonas): R = ≤ 15 mm; I = 16 – 20 mm; S = ≥ 21 mm.

En contraste, Pacheco y Roque (2013) lograron la inhibición del crecimiento *in vitro* de las bacterias *E. coli* y *Proteus* sp aplicando aceites esenciales de muña, wira wira y chiri chiri, la diferencia se debería a que estos autores trabajaron con aceites esenciales y éstos poseen contenido de metabolitos secundarios con potencial antibacteriano ya que se obtiene por arrastre a vapor, asimismo, se debería a que el contenido de metabolitos secundarios en algunas plantas sería inferiores, variarían según el género y la especie y los aspectos climáticos de sus hábitats. Asimismo, ante la resistencia de las bacterias a los extractos alcohólicos, esta se debería a que los metabolitos alcaloides, flavonoides,

saponinas y esteroides presentes en las plantas, no poseerían potencial antibacteriano contra las bacterias en investigación, tal como lo menciona Ramírez *et al.* (2017).

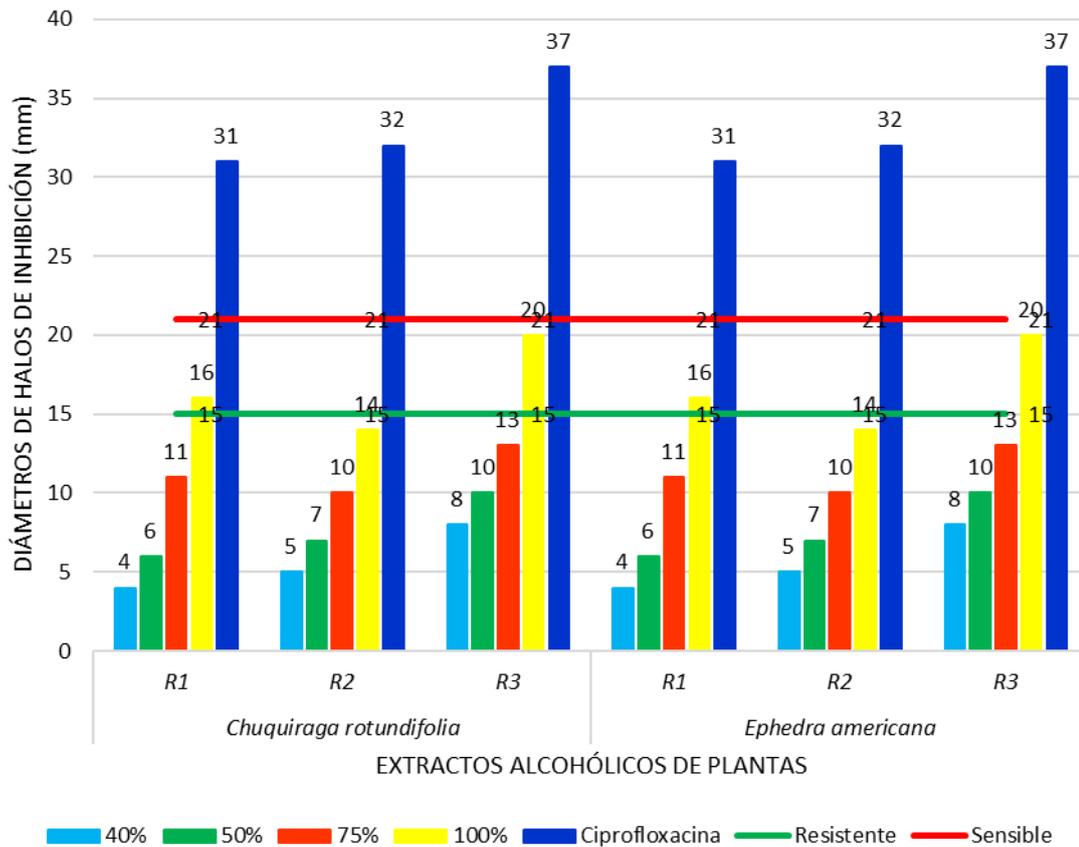


Figura 4. Halos de inhibición de *Klebsiella sp* por extractos alcohólicos de inflorescencias de kiswara y tallos-raíces de pinco pinco, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

En la investigación se utilizó el etanol al 70% como solvente orgánico para la obtención de los extractos, lo cual concuerda con Infantes (2004), quien también utilizó un solvente orgánico como el alcohol ya que preserva mejor los compuestos biológicos como los principios activos de las plantas; asimismo minimiza las pérdidas de metabolitos logrando el mayor beneficio de los principios activos, manteniendo el equilibrio de los compuestos originales y conservándolos (Cortez y Mego, 2017).



Ambas bacterias Gram negativas fueron resistentes a las concentraciones iguales e inferiores al 75%, y presentaron respuesta intermedia a concentraciones del 100%, Grosvenor *et al.* (1995), manifiesta que las Gram positivas son más susceptibles a los extractos vegetales con respecto a las Gram negativas, esta diferencia se debería a que las Gram negativas poseen características morfológicas como una membrana externa compuesta principalmente por lipopolisacáridos, haciéndolas impermeables a las moléculas lipofílicas, antibióticos hidrofóbicos, detergentes y sales biliares, y ser selectiva a moléculas hidrofílicas. La respuesta antimicrobiana en *E. coli* y en *Klebsiella* sp es que son resistentes a múltiples antimicrobianos, por ejemplo, muchas de ellas son resistentes a la carbenicilina y ampicilina debido a que producen betalactamasas y la resistencia es adquirida a través de plásmidos (León, 2014), a ello se incluyen los mecanismos bacterianos de expulsión del antibiótico mediante bombas de eflujo, alteración de la permeabilidad, modificación del blanco terapéutico y/o inactivación del antibiótico (Arenas y Moreno, 2018).

Asimismo, tanto *E. coli* y *Klebsiella* sp, como bacterias Gram negativas poseen compuestos anfipáticos (fosfolípidos y porinas) que a manera de bombas de expulsión reducirían el efecto antibacteriano debido a la supresión de los metabolitos secundarios (Domingo y López, 2003), o éstos mismos compuestos no logren romper eficientemente los fosfolípidos de la membrana externa de las Gram negativas (De Britto *et al.*, 2011), y que por tanto las Gram positivas son más sensibles a la acción antimicrobiana debido a que su pared celular conformada por el peptidoglicano (Domingo y López, 2003).

De los metabolitos secundarios fenoles-taninos, estos se ubican en diferentes partes de las plantas, son solubles en agua, etanol y acetona, su acción antibacteriana se



origina al combinarse con las proteínas de la membrana citoplasmática bacteriana e inhibiendo la actividad enzimática mediante la desnaturalización de las proteínas (Bruneton, 2001), los taninos como los galotaninos y el ácido gálico presentes en vainas de *Caesalpinia spinosa* (Chambi *et al.*, 2013), poseen actividad antibacteriana, de ellos los galotaninos poseen la capacidad de quelar hierro y cobre gracias a que poseen grupos o – difenol, y estos forman complejos metal – taninos, inactivando así a las metaloenzimas (Scalbert, 1991) y tanto *E. coli* como *Klebsiella* sp, poseerían la capacidad de bloquear la acción de los principios activos, por la influencia de la estructura de la pared celular, membrana celular y el grado de hidroxilación de los compuestos fenólicos (Kim *et al.*, 2010).

La acción antimicrobiana no fue la esperada por los investigadores, en razón de que la más alta concentración no llegó a inhibir de igual forma que el antibiótico control, esto se debería a que el efecto antimicrobiano dependería del origen de la planta y el hábitat del piso ecológico de donde procedieron las plantas, tal como se demostró en los análisis fitoquímicos realizados a la tara, donde López *et al.* (2011), encontraron diferencias en las concentraciones de taninos y péptidos presentes en diferentes regiones del Perú, por tanto la diferencia sería según el lugar de procedencia (Kim *et al.*, 2010).

De lo analizado e interpreta, se acepta la hipótesis nula, el cual menciona que la actividad antibacteriana de extractos de *Ephedra americana* H&B ex Will y *Chuquiraga rotundifolia* Wedd. varían en las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp según las plantas y la concentración de los extractos alcohólicos, en razón de que la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano fue similar entre las plantas y las concentraciones de los extractos alcohólicos.



V. CONCLUSIONES

- La composición fitoquímica cualitativa de los extractos alcohólicos de tallos–raíces de *E. americana* fue de abundante (++++) a alcaloides y fenoles–taninos y moderado (++) contenido de carbohidratos; mientras que el extracto alcohólico de inflorescencias de *C. rotundifolia* presentó moderado (++) contenido de alcaloides y fenoles–taninos y leve (+) contenido de carbohidratos.
- La respuesta bacteriana de *E. coli* y *Klebsiella* sp frente a los extractos alcohólicos de tallos–raíces de *E. americana* e inflorescencias de *Chuquiraga rotundifolia* Wedd. fueron similares, ambas bacterias resultaron ser resistentes a concentraciones de extractos alcohólicos de 40%, 50% y 75% y los extractos alcohólicos al 100% de concentración presentaron una respuesta intermedia, todos los diámetros de halos de inhibición bacteriana fueron inferiores a los obtenidos con el tratamiento control (ciprofloxacina), donde ambas bacterias resultaron ser sensibles.



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar tamizajes fitoquímicos a cada uno de los órganos vegetales, según diversas condiciones ambientales, como épocas del año, aspectos edafológicos, por altitud, el sistema lunar, el tiempo de conservación luego de la recolección, ya que la presencia de metabolitos en las plantas varía según las características antes mencionadas.
- Realizar exámenes de extractos alcohólicos de plantas medicinales utilizando metanol y mayores concentraciones, además de precisar la dosificación que es un aspecto muy relevante.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth, R. (2004). Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems. IWA Publishing, Londres (Reino Unido), para la Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza).
- Alí, Y., Acebey Sh., Álvarez D., Condori A., Huari C. y Huaycho A. (2009). Inhibición de *Staphylococcus aureus* mediante la actividad anitbacteriana de plantas medicinales bolivianas. Rev. SCientífica. Vol. 7(1): 29 – 32.
- Alpert, P. (2006). Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare. J. Evolution Biol. Vol. 209: 1575 – 1584.
- Anaya, A. y Espinoza F. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. Rev. Ciencias. Vol. 83: 4 – 13.
- Aquino, L. (2018). Toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *Chuquiraga spinosa* (R. & P.) D. Don “huamanpinta”. 2017. Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú. 82 p.
- Arenas, N. y Moreno V. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. Rev. Infectio. Vol. 22 (2): 110 – 119.
- Arroyo, J., Rojas J., Herrer O., Chávez R., Justil H., Aguilar C. *et al.* (2019). Protective effect of *Chuquiraga spinosa* Lessing associated with simvastatin on NNitroso-N-methylurea (NMU)-induced prostate cancer in rats. Oncotargets and Therapy. Vol. 12: 6555-6562.
- Ávalos, A. y Pérez E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Vol. 2 (3): 119 – 145.
- Azuero, A., Jaramillo C., San Martin D. y D´Armas H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador Revista Ciencia UNEMI Vol. 9, N° 20 pp. 11 – 18
- Bach, G., Iturbe N., Agudelo I., Wagner M. y Ricco R. (2017). Dinámica de polifenoles en *Ephedra tweediana* Fisch & C. A. Mey. Emend. J. H. Hunz. (Ephedraceae). Bolentín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad de Santiago de Chile. Vol. 16 (1): 1 – 13.



- Bart, H. y Pilz S. (2011). Industrial scale natural products extraction. Alemania: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
- Beltrán H, Granda A, León B, Sagástegui A, Sánchez I, Zapata M. 2006. Asteraceae endémicas del Perú. Revista Peruana de Biología. Vol. 13: 64-164.
- Bennett, R. y Wallsgrove R. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist. Vol. 127: 617 – 633.
- Borchardt, J., Wyse D., Sheaffer C., Kauppi K., Fulcher R., Ehlke N., Biesboer D. y Bey R. (2008). Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 2, No. 5: 98 – 110.
- Bourgaud, F., Gravot A., Milesi S. y Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. Vol. 161: 839 – 851.
- Brack, A. (1999). Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Editorial CBC. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). 556 p.
- Brewster, R. y McEwen W. (1967). Química orgánica. Edición revolucionaria, La Habana – Cuba.
- Brinda, J., Fernando C., Tuba Z., Slack N. y Stark L. (2011). Ecology of bryophytes in Mojave desert biological soil crusts: effects of elevated CO₂ on sex expression, stress tolerance, and productivity in the moss *Syntrichia caninervis* Mitt. Bryophyte Ecology and Climate Change. Cambridge University Press. p. 169 – 191.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica; Rev. Plantas Medicinales, Zaragoza. Vol. 12: 126 – 135.
- Cáceda, F. y Rossel J. (1993). Flora medicinal nativa y cosmovisión campesina en comunidades de Puno. Impreso de CopiTesis. Gráficos Editorial Universitaria. UNA – Puno. 253 p.
- Callacondo, D., Quispe – Mauricio A., Lindo – Gamarra S. y Vaisberg A. (2008). Actividad citotóxica del extrato etanólico de *Gnaphalium spicatum* “keto keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. Vol. 25, No. 4: 380 – 385.
- Carranza, D. y Huayanay J. (2009). Determinación de metabolitos secundarios del tallo de *Croton alnifolius* L. (Tunga). Informe de trabajo de investigación. E. A. P. de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 66 p.
- Carrión, A. y García C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. 27-31.



- Casado, R., Landa A., Calvo J., García J., Marston A., Hostettmann K. y Calvo M. (2011). Antiinflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Biol. Pharm. Vol. 49 (6): 620 – 626.
- Chambi, F., Chirinos R., Pedreschi R., Betalleluz I., Devaste F., y Campos D. (2013). Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. Industrial Crops and Products. Vol. 47: 168 – 175.
- Chinou, I. (2008). Primary and secondary metabolites and their biological activity. En: WaksmundzkaHajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) Thin layer chromatography in phytochemistry. p. 59-76. CRS Press, Boca Raton.
- Cohen, M. (1992). Epidemiology of drug resistance: Implications for a postantimicrobial era. Science. 1050 – 1055.
- Condorhuamán, M., Rojas L., Collado A., Contreras E., Ortiz J., Córdova J., Ruiz E. y Herrera O. (2016). Toxicidad subcrónica y posible efecto teratogénico en ratas del extracto etanólico de *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta”. Ciencia e Investigación. Vol. 19 (2): 74 – 78.
- Corrales, I. y Reyes J. (2015). Actividad etnofarmacológica y antimicrobiana de los componentes químicos de las plantas medicinales utilizadas en Estomatología. Vol. 54 (257): 71 – 83.
- Cortez, K. y Mego L. (2017). Actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* “taya”, frente a *Streptococcus mutans*. Tesis de pregrado. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.
- Cragg, G. y Newman D. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl Chem. Vol. 77: 7 – 24.
- Cruz, A., Rodríguez N. y Rodríguez C. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana cámara*, *Schinus molle* y *Silybun marianum*. Rev. U. D. CA. Act. E Div. Cient. Vol. 13(2): 117 – 124.
- De Britto, J., Herin, D., Gracelin S., Benjamin P. y Rathna J. (2011). Antimicrobial activity of a few medicinal plants against Gram negative bacteria. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical technology. Vol. 2 (3): 457 – 461.
- Domingo, D. y López M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española Quimioterapia. Vol. (4): 385 – 393.



- Dueñas, A., Alcivar U., Olazábal E., Cortés R., Marrero O., Pérez A., Serrano H., Betancourt P. y Navarro M. (2014). Análisis fitoquímico y de seguridad de los extractos de *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmell. Rev. Centro Agrícola. Vol. 41 (2): 79 – 84.
- EsSalud. 2002. Formulario nacional de recursos naturales y afines. Lima, Perú.
- Forbes, B. (2009). Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico, 12^a. Edic. Edit. Panamericana
- Grosvenor, P. Supriono A. y Gray D. (1995). Medicinal Plants from Riau province, Sumatra Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. J. Ethnopharm. Vol. 45: 95 – 111.
- Gurib, A. (2006). Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med. Vol. 27: 1 – 93.
- Gutiérrez, E., Villaseñor A., Cancino R., Lemus E. y Madrigal. S. (2003). Contenido de compuestos fenólicos en arbustos y árboles forrajeros en San Lucas, Michoacán. XIV Encuentro de Investigación Pecuaria y Producción Animal Morelia, Michoacán. p. 182 – 186.
- Haq, N. (2004). *In vitro* production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants. Documento on line. Fecha de revision: 12 octubre 2019.
- Harborne, B. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry. 4th Edition. Academic Press, Harcomt Brace & Co. Publishers, New York, USA. 320 p.
- Hernández, R., Fernández C. y Baptista M. (2014). Metodología de la investigación. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 600 p.
- Herrera O., Tinco J., Franco C., Chumpitaz V., Castro W., Pari B. *et al.* (2017). Antioxidant activity and cytotoxic profile of *Chuquiraga spinosa* Lessing on human tumor cell lines: A promissory plant from Peruvian flora. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. Vol. 7: 304-308.
- HRMNB, Hospital Regional Manuel Núñez Butrón. (2018). Estadísticas de enfermedades en la region Puno. Puno.
- INS, Instituto Nacional de Salud. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30. Ministerio de Salud. Lima – Perú. 67 p.
- Jawetz, Melnick, y Adelberg. (2014). Microbiología Médica (26va Edición ed.). MC Graw Hill. Recuperado el 20 de Diciembre de 2015, de



<http://es.slideshare.net/AndresNeiraQuezada7/jawetz-microbiologia-medica-ed-25>

- Kim, T., Silva J., Kim M. y Jung Y. (2010). Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chem.* Vol. 118: 740 – 746.
- Kumar, R. (1997). Ant nutritional factors. The potential risks of toxicity and the methods to alleviate them. In: *Legumes trees and other fodder trees as protein source for livestock.* (Eds. Speedy).
- Kunkel, D. (2001). *Las Enterobacterias.* Microscopy INC. Hospital Militar Regional Córdoba. 127 p.
- Laciar, A., Vaca M., Carrizo R. y Saad J. (2009). Actividad antibacteriana y antioxidante del aceite esencial extraído del “ajenjo” *Artemisia echegarayi*. Tesis de Licenciado en Biología. Universidad Nacional de San Luis Chacabuco y Pedernera. Argentina:
- Landa, A., Casado R. y Calvo I. (2009). Identification and quantification of flavonoids from *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae). *Natural Product Communications.* Vol. 4: 1353-1355.
- Leinmüller, H., Steingass H. y Menke K. (1995). Tannins in ruminant feedstuffs. *Animal and Research and Development.* Vol. 33: 9 – 62.
- León, L. (2014). Multiresistencia antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aislados de urocultivos del Hospital Regional Manuel Núñez Butrón Puno-2012. Tesis de licenciatura. Escuela profesional de Biología. UNA-Puno 62p.
- Livermore, D. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis.* Vol. 36 (1): 511 – 523.
- López, A., Oré R., Miranda C., Trabucco J., Orihuela D., Linares J., Villafani Y., Ríos S. y Siles M. (2011). Capacidad antioxidante de poblaciones silvestres de “tara” (*Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Scientia Agropecuaria.* Vol. 2: 25 – 29.
- Makkar, P. y Goodchild A. (1997). *Quantification of tannins a laboratory manual.* pasture, forage and livestock program International Center for Agricultural research in the dry areas. Second edition. Aleppo, Syria.
- Makkar, P., Blümmel M. y Becker, K. (1997). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication



- in gas production and true digestibility in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*. Vol. 73: 897 – 913.
- Martínez, B., Hung B., Hernández E. y Audivert Y. (2006). Caracterización físico – química del extracto acuoso de *Zuelania* sp. *Rev. Cubana de Química*. Vol. XVIII (1): 258 – 268.
- Matthew, E., Bassey, E., Clement, A., Giddings, A., Edet, A. y Kingsley E. (2007). A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*.; Vol 38.
- McMurry, J. (2012). *Química Orgánica*. Cengage Learning Editores. 1382 p.
- Medina, M. (1997). Estudio Fitoquímico de *Ephedra americana* H. & B. Tesis de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa – Perú. 54 p.
- Mendo, M. (2003). Medios de cultivo en Microbiología. Manual de Laboratorio. Ediciones Laborales S. R. L. Lima – Perú. 238 p.
- Mojica, D., Ramírez R. y Espetia M. (2015). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. *Revista Salud Soc Uptc*. 2015;2(1): pp. 27-32
- Montenegro, L. y Melgarejo L. (2012) Variación del contenido de azúcares totales y azúcares reductores en el musgo *Pleurozium schreberi* (Hylocomiaceae) bajo condiciones de déficit hídrico. *Acta Biológica Colombiana*. Vol. 167 (3): 599 – 611.
- Murray, S. y Larry S. (2009). *Estadística*. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. México.
- Neu, H. (1992). The crisis in antibiologic resistance. *Science*. 1064 – 1073.
- OMS. (2016). *Medicina tradicional: definiciones*. WHO. Fecha de revisión: 24 de julio de 2019. Página web: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
- Pacheco, M., y Roque F. (2013). Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto y aceite esencial de muña, wira wira y chiri chir. *Rev. Ing. Quím. UNA-Puno*. Vol. 14: 91-95.
- Pascual, D., Pérez Y., Morales I., Castellanos I. y González E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *MEDISAN*. Vol. 18 (10): 1467 – 1474.



- Pérez, E., Saldaña V. y Minchán P. (2020) Etnobotánica, farmacología, fitoquímica y usos medicinales de Huamanpinta en el Perú – *Chuquiraga spinosa* Less. (Asteraceae). Mini Review. *Ethnobotany Research and Applications*. Vol. 19: 1-13.
- Pimentel, E., Castillo D., Quintana M., Maurtua D., Villegas L. y Díaz C. (2015). Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev. Estomatol. Herediana*. Vol. 25 (3): 268 – 277.
- Ramírez, A., Isaza G., Pérez J. y Martínez M. (2017). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum dolichosepalum* Bitter (Frutillar). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 22 (1): 1 – 11.
- Ramírez, E. (2014). Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “Huamanpinta”. Tesis de Doctor en Farmacia y Bioquímica. Escuela de Posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Ríos, M. (2013). Chemical Constituents from *Flourensia resinosa* S.F. Blake (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 51: 240 – 242.
- Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. 2002, de Salud Pública Mex Sitio web: http://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf
- Sajc, L., Grubisic D. y Vunjak G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 4: 89 – 99.
- San Martín, B., Bravo, B. y Borie C. (2005). Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Arch. Med. Vet. (Chile)*. Vol. 37 (2): 117 – 123.
- Sarin, R. (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. *J. Biotechnology*. Vol. 4: 79 – 93
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. Vol. 30 (12): 3875 – 3883.
- Senatore, F. (1996). Composition of the essential oil of *Chuquiraga spinosa* (R. et P.) D. Don. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 11: 215-217.
- Senatore, F., Nunziata A., D'Agostino M. y De Feo V. (1999). Flavonol glycosides and phidroxycetophenone from *Chuquiraga spinosa*. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 37: 366-368.



- Sharma, B. y Kumar P. (2009). Bioefficacy of *Lantana camara* l. against some human pathogens. *Indian J. Pharm Sci.* Vol. 71 (5): 589 – 593.
- Shilpa, K., Varun K. y Lakshmi B. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. Plant. Sci.* Vol. 5: 222 – 247.
- Shing, S. (2011). *Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology*. USA: CRC Press Taylor & Francis.
- Smirnoff, N. (1992). The carbohydrates of bryophytes in relation to desiccation tolerance. *J. Bryol.* Vol. 17 (2): 185 – 191.
- Soto, L. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit.* No. 1: 44 – 48.
- Soto, M. (2014). Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores *Cantua buxifolia* Juss. Ex Lam. (Polemoniaceae) “Flor Sagrada de los Incas”. *Revista Arnaldoa.* Vol. 21, No. 1: 81 – 90.
- Spratt, B. (1994). Resistance to antibiotic mediated by target alterations. *Science.* Vol. 264: 388 – 393.
- Tello, G., Flores M. y Gómez V. (2019). Uso de las plantas medicinales del distrito de Quero, Jauja, región Junín, Perú. *Ecología Aplicada.* Vol. 18: 1-10.
- Ulloa, C., Zarucchi J. y León B. (2004). Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003. *Arnaldoa, Edición Especial Nov. 2004:* 1-242.
- Waterman, G. y Mole S. (1994). *Method in Ecology. Analysis of Phenolic Plant Metabolites.* Blackwell Sci. Publ., London. p. 66 – 103.
- White, L., Foster S. y Staff H. (2004). *El Recetario Herbario: Las mejores alternativas naturales a los medicamentos.* Emmaus, PA: Rodale Books. 672 p.
- Wink, M. (2007). *Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature.* En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application.* p. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Zheng, X., Wang W., Piao H., Xu W., Shi H. y Zhao Ch. (2013). The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Review. Molecules Journal.* Vol. 18: 8298 – 8318.

ANEXOS



Figura 5. Procesamiento de kiswa y pinco pinco, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.



Figura 6. Preparación de extractos alcohólicos y estudio fitoquímico, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

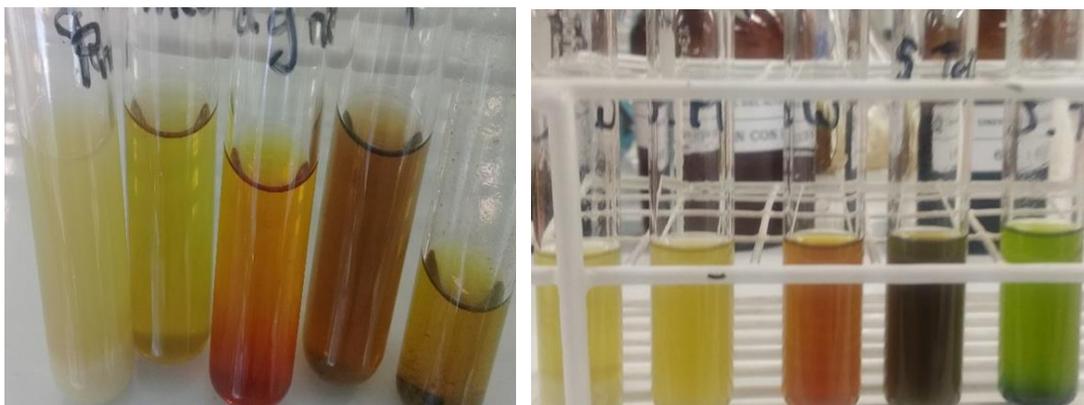


Figura 7. Análisis fitoquímicos de pinco pinco (izquierda) y kiswa (derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.



Figura 8. Preparación de medios de cultivo bacteriano, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

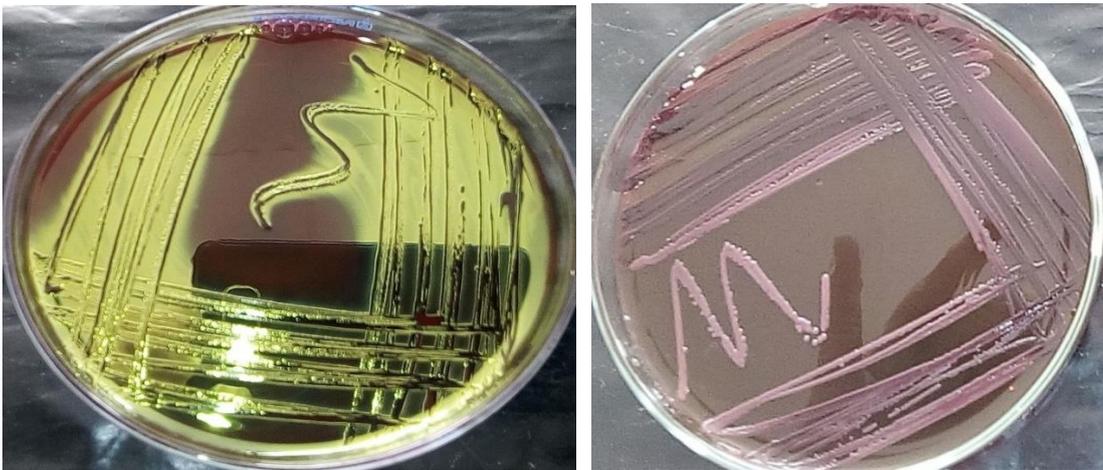


Figura 9. Cultivos puros de *E. coli* (izquierda) y *Klebsiella* sp (derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.



Figura 10. Preparación de medios de cultivo de bioquímica bacteriana, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.



Figura 11. Bioquímica de *E. coli* (izquierda) y *Klebsiella* sp (derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.



Figura 12. Medición de halos de inhibición bacteriana, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.

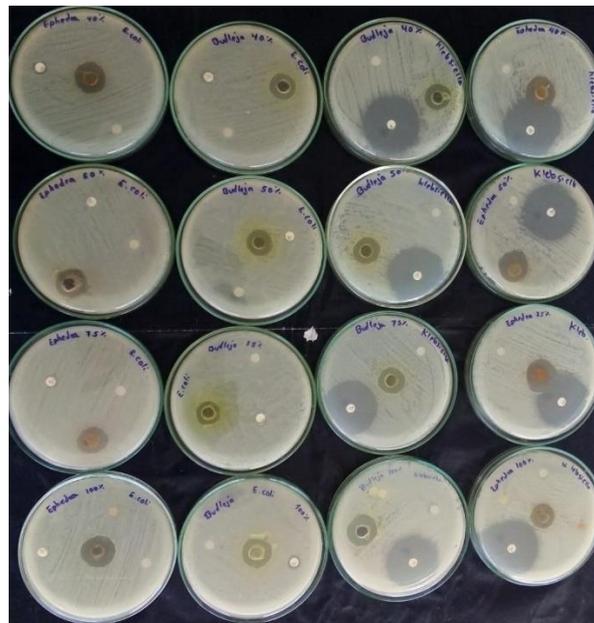


Figura 13. Inhibición bacteriana de los extractos alcohólicos, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto y noviembre 2019.



Universidad Nacional del Altiplano de Puno

Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



Registro: 002-2021

CONSTANCIA

AUTORIDAD QUE SUSCRIBE, **DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO – PERÚ.**

HACE CONSTAR:

Que el (la) Bachiller **ANGELA HUANCA QUISPE**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado los análisis fitoquímicos y experimentos bacterianos de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **TAMIZAJE FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *Ephedra americana* H&B EX WILL Y *Chuquiraga rotundifolia* WEDD. Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.***, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de agosto a noviembre del 2019.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del (a) interesado (a) para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 26 de julio del 2021.



UNA
PUNO

Firmado digitalmente por LAURA
CHAUCA DE MEZA Eva FAU
20145490170 soft.
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2021 10:46:10 -05:00

**M. Sc. EVA LAURA CHAUCA
DECANO
FCCBB – UNA Puno**

Constancia de laboratorio donde se realizó la parte experimental de la investigación.