



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA



"ACCIÓN ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DEL
***Gnaphalium vira vira (WIRA WIRA)*"**

TESIS

PRESENTADA POR:

ABIGAIL TERESA DE LA CRUZ PEREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAGÍSTER SCIENTIAE EN SALUD PÚBLICA
MENCIÓN EN EPIDEMIOLOGIA



PUNO - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
BIBLIOTECA CENTRAL AREA DE TESIS
Fecha Ingreso: 11 AGO 2014
Nº 00464

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRIA EN SALUD PÚBLICA



TESIS

**“ACCIÓN ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DEL
Gnaphalium vira vira (WIRA WIRA)”**

**PRESENTADA POR:
ABIGAIL TERESA DE LA CRUZ PEREZ
PARA OBTAR EL GRADO DE:
MAGISTER SCIENTIAE EN SALUD PUBLICA MENCION EPIDEMIOLOGIA**

**PUNO, PERU
2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRIA EN SALUD PÚBLICA

TESIS

“ACCIÓN ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL
Gnaphalium vira vira (WIRA WIRA)”

PRESENTADA POR:

ABIGAIL TERESA DE LA CRUZ PÉREZ

PARA OBTAR EL GRADO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN SALUD PUBLICA MENCIÓN EPIDEMIOLOGIA

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:


PRESIDENTE


.....
DR. HUGO COTACALLARA GUTIERREZ

PRIMER MIEMBRO


.....
DR. MARCELINO ARANIBAR ARANIBAR

SEGUNDO MIEMBRO


.....
M. Sc. CHRISTIAN WILLIAN JARA ZEVALLOS

ASESOR DE TESIS


.....
M. Sc. RUBEN ZAVALTA GIBAJA

ASESOR DE TESIS


.....
Mg. OSCAR HENRY ESPEZUA FLORES

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que permitieron la realización de esta investigación en especial al Dr. Rubén Zavaleta Gibaja mi director, quien con paciencia me oriento acertadamente en la culminación de mi trabajo y al Sr. Severo Nina Medina, por su incondicional apoyo.

Un especial agradecimiento al Dr. Oscar Oros Butrón, al Dr. Oscar Espezúa Flores, al Ing. Pedro Villalta, al Ing. Wilfredo Zea Flores y al Dr. Roberto Gallegos Acero, por el aporte intelectual que permitió la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi madre quien siempre cree en mí.

A mi esposo Hernán, mis hijos Diego y Sebastián quienes soportaron mi ausencia.

INDICE

CAPITULO I

PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACION.....	1
1.1 Problema	1
1.2 Objetivos	2

CAPITULO II

MARCO TEORICO.....	4
2.1 Antecedentes.....	4
2.2 Marco Referencial.....	9
2.2.1 Clasificación Taxonómica.....	9
2.2.2 Composición química.....	11
2.2.3 Propiedades Medicinales.....	16
2.2.4 Microorganismos del tracto respiratorio.....	18
2.2.5 Método de difusión con disco en agar.....	22
2.2.6 Extracto etanólico.....	23

CAPITULO III

METODOLOGIA.....	25
3.1 Ámbito de estudio.....	25
3.2 Materiales.....	26
3.3 Método.....	28
3.3.1 Preparado del extracto etanólico.....	28
3.3.2 Método de difusión con disco en agar.....	30
3.4 Análisis estadístico.....	32

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION	33
4.1 Determinación de la acción antimicrobiana del Extracto etanólico del <i>Gnaphalium vira vira</i>	33
4.2 Determinacion de la acción antimicrobiana del preparado acuoso y etanólico en las diferentes partes del <i>Gnaphalium vira vira</i>	37
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53
ANEXOS	61

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1 Acción antimicrobiana del <i>G. vira vira</i> frente a microroganismos gram (+) y gram (-) según preparado	34
CUADRO 2 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del <i>G. vira vira</i> , para las diferentes variables y sus interacciones.....	38
CUADRO 3 Acción antimicrobiana del <i>Gnaphalium vira vira</i> según el tamaño de halo (mm) considerando las partes de la planta en los preparados acuosos y etanólico.....	62
CUADRO 4 Acción antimicrobiana de la <i>Gnaphalium vira vira</i> según el tamaño de halo (mm) considerando tipo de Microorganismo.....	63
CUADRO 5 Acción antimicrobiana de la <i>Gnaphlium vira vira</i> según el tamaño de halo (mm) considerando tipo de preparado.....	63
CUADRO 6 Análisis de varianza de los tamaños de halo, de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de <i>Gnaphalium vira vira</i> según, preparados, microorganismos	

y partes de la planta.....64

CUADRO 7 Análisis de varianza para el efecto simple de la
acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphalium*
vira vira de las diferentes partes de la planta en los preparados
acuoso y etanólico.....65

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del <i>G. vira vira</i> , medido con la regla de Vernier.....	31
FIGURA 2 Halos formados por el preparado acuoso, del extracto etanólico de toda la planta de <i>Gnaphalium vira vira</i>	35
FIGURA 3 Ausencia de halos del preparado acuoso del extracto etanólico del <i>Gnaphalium vira vira</i> frente a <i>E. coli</i>	36
FIGURA 4 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del <i>Gnaphalium v.</i> para los preparados.....	39
FIGURA 5 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del <i>Gnaphalium v.</i> para los microorganismos.....	41
FIGURA 6 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del <i>Gnaphalium v.</i> para las partes de la planta.....	44

FIGURA 7 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana

del extracto etanólico del *Gnaphalium v.* para la int.

preparado y partes de la planta48

FIGURA 8 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana

del extracto etanólico del *Gnaphalium v.* para la

int. microorganismo y partes de la planta.....49

RESUMEN

El estudio de la actividad antimicrobiana del *Gnaphalium vira vira*, (wira wira) se realizó en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA-PUNO, con muestras traídas la comunidad de Camacani - Puno, los objetivos fueron: comprobar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico, en sus preparados acuoso y etanólico, diferenciando, flores, hojas, tallo y toda la planta; por el método de difusión microbiológica en placa, utilizando un diseño completamente al azar conducido bajo un arreglo factorial 2 x 2 x 4. Los resultados fueron: que existió acción antimicrobiana frente a: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$), entre preparados, microorganismos y partes de la planta, e interacciones entre partes de la planta, preparados y microorganismos, la acción antimicrobiana se evidencio con el tamaño de halo de los preparados frente a los microorganismos; para preparados etanólico y acuoso se obtuvo un tamaño de halo de 15.6418 ± 3.127 y 14.7145 ± 2.569 mm de diámetro respectivamente; para los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* el tamaño de halo fue de 15.8050 ± 2.403 y 14.5513 ± 3.2 mm de diámetro respectivamente; para las partes de la planta, flores, toda la planta, hoja y tallo se obtuvo un tamaño de halo de 17.7145 ± 0.933 ; 16.462 ± 0.953 ; 15.373 ± 1.912 ; 11.1630 ± 1.890 mm de diámetro respectivamente; se concluye que el *Gnaphalium vira vira* tiene efecto antimicrobiano, siendo más sensible el *Staphylococcus aureus*, mayor en flores y en su preparado etanólico.

Palabras Clave: Extracto etanólico, *Gnaphalium vira vira*, microorganismos, preparado acuoso, preparado etanólico.

ABSTRACT

The study of the antimicrobial activity of *Gnaphalium vira vira* (wira wira) was performed in the laboratory of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine of the UNA- Puno , with samples brought Camacani community - Puno , the objectives were : test the antimicrobial activity of the ethanol extract, ethanol and their aqueous preparations , differentiating , flowers, leaves , stem and the whole plant ; microbiological method for disk diffusion , using a completely randomized design conducted under a factorial 2 x 2 x 4 The results were that existed antimicrobial action against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* , significant difference ($p < 0.05$) between preparations , microorganisms and plant parts , and interactions between the plant parts , preparations and microorganisms , the antimicrobial activity was evident with the halo size of the preparations against microorganisms ; for ethanolic and aqueous preparations halo size of 15.6418 and 14.7145 \pm 3.127 \pm 2.569 mm in diameter was obtained respectively ; for microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* was halo size was 14.5513 15.8050 \pm 2.403 and \pm 3.2 mm in diameter respectively ; for plant parts , flowers, whole plant, leaf and stem size halo of 17.7145 \pm 0.933 was obtained ; 16.462 \pm 0.953 ; 15,373 \pm 1,912 ; 11.1630 \pm 1.890 mm in diameter respectively ; concluded that the *Gnaphalium vira vira* has antimicrobial effect , being more sensitive *Staphylococcus aureus*, higher in flowers and its ethanolic prepared.

Keywords : ethanolic extract , *Gnaphalium vira vira* , microorganisms, prepared aqueous, ethanolic prepared .

INTRODUCCION

El uso de plantas medicinales en el Perú es tan antiguo como la cultura andina, muchos conocimientos se encuentran arraigados en el saber popular. Sin embargo, la excesiva “modernización” de la Medicina Occidental ha hecho que estos conocimientos sean relegados, y en ciertos aspectos, hasta olvidados (Mantilla y Olazábal, 2008).

La multirresistencia se ha desarrollado debido al uso indiscriminado de antibióticos comerciales comúnmente utilizados para tratar enfermedades infecciosas, por otro lado la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales (Zampini, 2007).

El Perú y sobre todo el departamento de Puno es un ámbito de extraordinaria variedad de recursos vivos y ecosistemas, que hoy se conocen como diversidad biológica o biodiversidad, y por eso se encuentra entre los mega diversos del planeta ocupando uno de los cinco primeros sitios donde se calcula la existencia de unas 25000 especies (10% del total mundial) de manera, que hay que comprender que las personas del mundo andino no solo hemos sido generadores de la misma en el vínculo con nuestro entorno sino

que se ha trabajado y se continuara demostrando que las plantas medicinales han generado una impresionante diversidad biológica que es la que permite en el presente subsistir (Vicente, 2004).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado surge como alternativa de tratamiento la wira wira, una planta a la que se le atribuye propiedades antitusígenas y antiinflamatorias, motivo por el cual es utilizada por la población puneña, es importante validar el uso de esta planta en los problemas respiratorios, además conocer que parte de la planta podría tener un mejor efecto terapéutico.

CAPITULO I

1.1 PROBLEMA DE INVESTIGACION

La falta de desarrollo y fuente de empleo en el Departamento de Puno, el clima que es frío y seco, típico de las altas mesetas, donde su temperatura media anual es 9°C, pudiendo bajar a 0°C en el invierno con lluvias en los meses de enero a marzo, estas condiciones afectan la salud de los habitantes, ocasionando un incremento de la Infecciones respiratorias agudas, siendo esta la primera causa de morbilidad en la ciudad de Puno llegando a un 29.7% frente a las demás enfermedades (DIRESA 2010). Teniendo en cuenta estos aspectos se hace necesaria la búsqueda de alternativas que traten de dar solución a los problemas de salud, una de ellas es el uso de las plantas medicinales.

En los últimos años el estudio de las plantas medicinales ha llamado la atención de la ciencia, convirtiéndose así en un área amplia de investigación y desarrollo, debido a la gran acogida que tienen dentro de la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, entre otras. Por otra parte, el obtener

los extractos de las plantas y estudiar sus partes activas permite conocer más este recurso natural, que permitirá un uso racional con base científica.

Se han realizado investigaciones en torno a la acción antimicrobianas de las plantas, en Chile el desarrollo del *Staphylococcus aureus* fue inhibida intensamente por extractos etanólicos de *Gnaphalium vira vira* (Lazo y Bravo, 1993). En Argentina se aislaron los principios activos del *Gnaphalium gaudichaudianum* tales como diterpenos a los cuales se les atribuye el efecto antimicrobiano (Pettenatti *et al.*, 2004), estos antecedentes nos llevan a pensar que en la planta en estudio también se puedan encontrar compuesto que puedan tener algún efecto antimicrobiano que ayude en el tratamiento de las enfermedades respiratorias, motivo por el cual se hace necesaria su validación científica.

1.2 OBJETIVOS

General:

- Establecer la acción antimicrobiana del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* (*Wira wira*) in vitro.

Específicos:

- Determinar mediante un preparado etanólico y acuoso de las flores, tallos y hojas por separado, la acción antimicrobiana de la *Gnaphalium vira vira* (*Wira wira*) frente a microorganismos gram positivos y gram negativos que afectan el tracto respiratorio, in vitro.

- Determinar mediante un preparado etanólico y acuoso de todas las partes de la planta, la acción antimicrobiana de la *Gnaphalium vira vira* (Wira wira) frente a microorganismos gram positivos y gram negativos que afectan el tracto respiratorio, in vitro.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

Algunos estudios de casos realizados en Bolivia para combatir enfermedades de origen bacteriano, viral y fúngicas, entre otras, en que se refleja la importancia del uso de plantas medicinales en el avance de la medicina. Dentro de estas investigaciones bioquímicas y farmacológicas se encuentra la realizada por Quispe donde se evaluaron a ciertas especies de la familia Asterácea, reconocidas tradicionalmente por sus efectos antimicrobianos. Según los resultados, estas especies tienen grandes posibilidades de ser validadas al no presentar niveles de toxicidad ni reportar efecto hemolítico (Quispe *et al.*, 1995).

En otro estudio se validaron la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales reconocidas en la medicina tradicional de la Provincia de Capinota (departamento Cochabamba - Bolivia). De las diferentes especies estudiadas, *Schinus molle* (Anacardiaceae), *Phrygilanthus cuneifolius*

(Loranthaceae), *Matricaria recutita* (Asteraceae) y *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) presentaron actividad antibacteriana para tres especies de microorganismos: *Salmonella thipy*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermis* (Bustamante *et al.*, 1995).

En un estudio para probar la acción antimicrobiana de algunas plantas de uso medicinal en Chile se demostró que el *Streptococcus aureus* fue inhibido intensamente por los extractos etanólico de *Gnaphalium vira vira* y solo escasamente por extractos clorofórmicos, lo que demuestra que el tipo de extracto influye en la mayor o menor actividad antimicrobiana (Lazo, 1993).

Toribio (2009), realizó un estudio en el que quería probar la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* a extractos metanólicos de 80 plantas nativas de Argentina de las cuales 33 de ellas presentaron halos de inhibición. El *Gnaphalium gaudidraudianum* no presentó actividad antimicrobiana lo que no significa que no la tenga ya que la extracción de los principios activos depende del método y solvente utilizados.

Algunas plantas que pertenecen al género *Gnaphalium* tienen actividad antibacteriana frente al *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhimurium* y *E. coli*, esto fue demostrado por Enciso (2012) en un trabajo en México, utilizando el método de difusión en agar y con un preparado etanólico que previamente fue sometido a ebullición, el tamaño de halo para el *Gnaphalium attenuatum* fue de 20 mm. de diámetro.

Cotoras *et al.* (2001), comprobaron la actividad antimicótica de los flavonoides y diterpenos aislados de extractos resinosos de la superficie de *Pseudognaphalium vira vira*, *P. cheiranthifolium*, *P. heterotrichium* y *P.*

robustum sobre el hongo *Botrytis cinérea*, además se aisló 10 flavonas, flavononas además de diterpenos.

Las diferentes partes de la planta pueden presentar diferencia en cuanto a la actividad antimicrobiana. Es así que en un trabajo realizado en Iquitos sobre el efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* "camu camu" donde se comprobó el efecto antimicrobiano frente a *S. aureus*, *P. aureginosa* y *E. coli* de un extracto hidroalcohólico de la mencionada planta, obteniéndose como resultado que la hoja y la corteza presentaron actividad antimicrobiana frente al *S. aureus* (Mori, 2010).

En un trabajo realizado con las hojas del guayabo para el tratamiento de las afecciones gastrointestinales, se demostró que su extracto metanólicos y su extracto acuoso tienen actividad antibacterina frente al *Staphylococcus aureus* y que esta actividad antimicrobiana se debe a un componente dela planta denominado como quercetina que es extraído mayoritariamente de las hojas (Rivera, 2003).

Se realizó el siguiente trabajo que tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de la *Azadirachta indica* y preparar una fórmula magistral antiacné. Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de *Azadirachta indica* A. Juss, mostraron que el *Staphylococcus aureus* presentó la mayor sensibilidad con una zona de inhibición de 15 mm. ; *E. faecalis*, con una sensibilidad de 7 mm. ; *K. pneumoniae*, con una zona de inhibición de 8 mm. y *E. coli*; mostró ser resistente a todas las diluciones ensayadas. Esta búsqueda sugiere que los principios activos extraídos con etanol de las hojas, pueden jugar un rol

significativo en la acción inhibitoria contra el *Staphylococcus aureus* responsable del acné juvenil (Gualtieri *et al.*, 2008).

En Huancayo y Huarochiri se determinó la actividad antimicrobiana de 17 plantas medicinales utilizando el método disco –placa- cultivo. Los diversos extractos obtenidos fueron ensayó frente a bacterian gram (-) y gram(+) y frente a una levadura (*Candida albicans*). De la 17 especies estudiadas 13 presentaron actividad antimicrobiana frente a por lo menos 4 bacterias gram (+), una especie *Solanum radicans* mostró actividad frente a bacteria gram (-) y *Juglans netropica* presento actividad frente a la levadura. Con los extractos que presentaron actividad antimicrobiana se realizaron pruebas de biocromatografía a fin de determinar el grupo química responsable de dicha actividad, siendo un flavonoide en el caso de *Archyrocline alata* y *Psoralea pubescens* el responsable de la actividad y en todos los demas casos la presencia de triterpenos y /o esteroides los responsables de dicha actividad (Castro, 1993).

Los antecedentes etnobotánicas de plantas presentes en la provincia de Entre Ríos (Argentina), usadas como antiséptico, facilitaron la selección de algunas de géneros vasculares: *Myrcianthes pungens*, *Myrsine laetevirens*, *Tessaria integrifolia*, *Acanthospermum australe*, *Arctium minus* y *Polygonum punctatum*. Se ensayó la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales mediante el test de difusión en medio sólido, contra seis especies bacterianas y dos fúngicas. Una fracción del extracto etanólico de *A. minus* mostró actividad contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*. Dos fracciones del extracto diclorometánico de *P. punctatum* exhibieron actividad

contra *B. subtilis* y *S. aureus*. El segundo fraccionamiento mostró actividad contra *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* y *S. aureus* (Vivot y Cruanes, 2008).

Existen estudios de actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico del propóleo frente a microorganismos cariogénicos *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, concluyéndose que el extracto etanólico al 0.8 % tiene mejor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* que la clorhexidina al 0.12% que se utilizó como testigo positivo (Eguizabal y Moromi, 2007).

En otro estudio se evaluó en cuatro especies del género *Bacchari* (*Compositae*) la presencia de actividad antimicrobiana frente a ocho especies bacterianas. Los extractos metanólicos de *B. articulata*, *B. soliafolia*, *B. pingraea* presentaron halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus epidermidis*. Ninguna de las especies investigadas presentó actividad frente a bacterias gram negativas. El *B. spartioides* no demostró actividad antimicrobiana frente a ninguna de las especies bacterianas investigadas (Toribio *et al.*, 2007).

En Argentina se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos etanólico de hojas de corteza seca del *Polylepis australis* Bitter recibe el nombre vulgar de "queñoa" o "tabaquillo". Sus hojas y corteza son utilizadas tradicionalmente para enfermedades infecciosas de vías respiratorias y otras enfermedades. Se probó la eficacia frente a microorganismos como: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se maceraron hojas o cortezas secas en etanol 70% por 5 días, se filtraron, secaron y esterilizaron. La actividad antimicrobiana

se evaluó mediante el método de difusión en placas de agar (Daud, *et al.*, 2008).

La forma en la que se obtienen los extractos también es importante, en un trabajo donde se comprobó la actividad anti fúngica de plantas usadas en medicina popular en Argentina, donde se usaron dos tipos de extractos: uno por decocción y otro etanólico, mostrando que la decocción en agua destilada es menos efectiva que el extracto etanólico, pero habría que tomar en cuenta la mayor toxicidad del extracto alcohólico por su alto contenido en ácido norhidroguayaretico en comparación con los extractos acuosos (Davicino, 2007).

2.2 MARCO REFERENCIAL

2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino : Vegetal
Sub reino : Phanerogame
División : Angiosperme
Clase : Dicotyledoneae
Orden : Asterales
Familia : Asteracea
Sub.Familia: Cichoroideae
Género : *Gnaphalium*
Especie : *Gnaphalium vira vira*
(Solano, 2013)

Las asteráceas (Asteráceas), también denominadas compuestas, reúnen más de 23.500 especies repartidas en unos 1600 géneros, por lo que son la familia de Angiospermas con mayor riqueza, la familia se caracteriza por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas (involucro). El nombre "asterácea" deriva del tipo de la familia Aster, término que su vez proviene del griego ἀστήρ que significa "estrella" y hace alusión a la forma de la inflorescencia. Las Asteráceas ocupan el segundo lugar entre las familias diversas de la flora peruana. Dentro de la familia de las Asteráceas se encuentra el género *Achyrocline* que es sinónimo de *Gnaphalium*, en Argentina se les conoce como Marcelas o Marcelitas que tienen muchas aplicaciones medicinales (Del Vitto, 2009).

En el catálogo florístico de plantas medicinales existente en el Ministerio de Salud el *Gnaphalium dombeyanum* cuyas características botánicas son las mismas que el *Gnaphalium vira vira* se encontró en la comunidad de Catamuro a 4000 msnm, distrito de llave, provincia de El Collao y de la comunidad de Sihueiro, distrito de Juli, Provincia de Chucuito (Santivañez, 2013).

Las especies del género *Gnaphalium* reclasificadas en 1991 en el género *Pseudognaphalium* se encuentran representadas en Sud América por 37 especies. Características de esta especie son las resinas epicuticulares producidas por los tricomas glandulares que recubren externamente la planta y que aparentemente están asociadas a complejos mecanismos de defensa frente al ataque de Fito patógenos, así como a las condiciones adversas. En Chile las

flores se recomiendan en infusiones para el tratamiento de resfríos y bronquitis (Muñoz *et al.*, 2004).

Las especies de los géneros *Gnaphalium*, cubiertas de tomentos blanquecinos se distinguen colectivamente con el nombre de “vira vira” o “wira wira” en los andes de Chile y países limítrofes, son muy valorados como plantas medicinales, las flores tomadas en infusión alivian la tos y algunos indican que la bronquitis. “Vira vira” es una expresión peruana, es una palabra quechua que significa manteca, cosa gorda, también se le conoce como bálsamo del campo y yerba de la vida (Villagrán y Castro, 2004).

2.2.2 Composición química

Las Asteráceas con principios activos amargos, como es el caso del *Gnaphalium vira vira*, que son producto del metabolismo secundario, en algunos países de Sud América se usa para elaborar los aperitivos denominados amargos y se elaboran a partir de Marcelas y Vira viras, que a su vez tiene su uso en medicina popular por su acción eupéptica y antitusígena (Del Vitto, 2009).

En el centro oeste de Argentina se conoce como huira huira una especie de *Gnaphalium* que se usa como depurativos, antiinflamatorio, expectorante, hepatoprotectores y digestivo, se dice que el *Gnaphalium gaudichaudianum* en las partes aéreas han sido detectadas la presencia de diterpenos, tales como: pimaratos, flavonoides como 5,8 hidroxí-3,6,7-trimetoxiflavona y 5,8 dihidroxí-6,7 dimetoxiflavona, acetilenos y carotenoides así como derivados del ácido

kaurenico (Pettenatti 2004), para el caso del *Gnaphalium affine* se informó nuevos componentes fenólicos, polisacáridos, compuestos de aceites esenciales y diterpenos (Li, 2013).

En un estudio sobre la composición química del aceite esencial de *Pseudognaphalium vira vira*, se reporta la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos a los cuales se les atribuye la función repelente de insectos y también se le puede atribuir cierta actividad antibacteriana frente a diferentes microorganismos (Fernández, 2008). Hay reportes de que se aislaron 2 diterpenos: el ácido Kaurenico, el ácido 3p-hidroxi kaurenico y el flavonoide 5 hidroxi-3,6,7,6- tetrametoxiflavona, gracias a los cuales se probó la actividad antifúngica y antibacteriana (Mendoza, 2006).

En hojas y tallos se encuentran alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles y taninos, en las hojas existe un mayor número de compuestos o metabolitos activos, porque aquí ocurre la fotosíntesis donde primeramente ocurre la formación de metabolitos primarios que a su vez constituyen los precursores de los metabolitos secundarios teniendo estos diferente actividad, a los alcaloides se les atribuye una acción analgésica, a los principios amargos y astringentes se les confiere de mejorar la digestión y las secreciones gástricas, las saponinas cumplen una función expectorante, los flavonoides tienen un efecto antiinflamatorio, los triterpenos y esteroides se les considera como antisépticos, antibacterianos y antifúngicos (Lopez, 2003).

Dentro de la composición química de las Asteráceas se encuentran los terpenos que son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, son sintetizados por las

plantas, donde son importantes en numerosas interacciones bióticas. En las plantas los terpenos cumplen muchas funciones primarias: algunos pigmentos carotenoides son terpenos, también forman parte de la clorofila y las hormonas giberelina y ácido abscísico. Los terpenos también cumplen una función de aumentar la fijación de algunas proteínas a las membranas celulares, lo que es conocido como isoprenilación. Los esteroides y esterolés son producidos a partir de terpenos precursores. Los terpenos de las plantas son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios, y se están investigando sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos. Están presentes, por ejemplo, en las esencias del eucalipto, los sabores del clavo y el jengibre. También en el citral, mentol, alcanfor, y los cannabinoides (Goodwi, 1971).

Se han aislado alrededor de 12000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios (Schultes, 1978), un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los organismos. Existen distintas teorías indicando que podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano como primer fin. Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados; los compuestos fitoquímicos consisten en un anillo fenólico sustituido, algunos ejemplos lo constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámico y cafeico. Se estima que la parte aérea de las plantas, la filósfera y especialmente en las hojas, existe alrededor de 10 millones de células por cm^2 de microorganismos especialmente bacterias (Andrews, 2000).

Globalmente las plantas producen más de 100 mil productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta en parte de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales. Estas sustancias se pueden dividir básicamente en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas y fitoalexinas cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana. En el caso de que un metabolito constitutivo se produzca en grandes cantidades tras un ataque microbiano, su condición de fitoalexina dependería de sus concentraciones constitutivas fueran o no capaces de eliminar el agente infeccioso (Domingo, 2003).

La definición de fitoalexina y fitoanticipina se refiere a la actividad antimicrobiana in vivo de este tipo de compuesto pero a veces es difícil dirimir entre las acciones in vitro e in vivo debido a que en muchas ocasiones no han sido medidas específicamente en las células que están directamente en contacto con los microorganismos infectantes pudiéndose producir unos resultados dispares (Mondal *et al.*, 2001).

En estudios realizados con otras especies de Astertaceas se muestran que *Achiroclyne alata*, *A. satureioides* y *A. tomentosa* presentan un mayor contenido porcentual en derivados cafeil quínicos. Debido a la actividad farmacológica de estos compuestos, los resultados están en concordancia con

los datos etnomédicos previos. Se observa que en *A. flaccida* el contenido porcentual de estos compuestos es menor (López *et al.*, 2003).

Las plantas sintetizan compuestos denominados terpenos estas son sustancias de muy bajo peso molecular con un olor más o menos intenso para el olfato humano y que los vegetales producen bajo condiciones de estrés. Las plantas emiten cantidades elevadas de terpenos al aumentar la luz y la temperatura así como en condiciones de contaminación atmosférica y sequía moderada, los terpenos se encuentran en las flores, hojas y en menor cantidad en los tallos, también protegen a la planta de las bacterias, hongos y virus (Ormeño y Fernández, 2012).

En las plantas también se pueden encontrar flavonoides, que son fenilbenzopironas, se encuentra en las plantas en forma de glicósidos y son los pigmentos amarillos, naranjas, azules y rojos de las flores, actuando como atractores visuales para la polinización, la importancia de los flavonoides radica en su actividad antioxidante por que atrapa radicales libres, quelar metales que se generan en inflamación, hipoxia o radiaciones, esto por la presencia de un grupo catecol y son más oxidantes que las flavonas (Martino, 2000).

Según Heinrich y *col.* (1998), las asteráceas en la medicina son de uso diverso, como antisépticos, antiinflamatorios, expectorantes y otros. Presentan un grupo diverso de compuestos entre los cuales las lactonas sesquiterpenos son el grupo más grande y diverso de compuestos activos, con aproximadamente 3 000 estructuras. Estos compuestos son de sabor amargo, se ha probado su actividad biológica y se los considera poderosos antiinflamatorios y potentes relajantes del músculo liso *in vitro* (provocan una

reducción de estímulos de estos músculos y con eso alivia problemas gastrointestinales). Además poseen otros compuestos como los poliacetilenos, alcaloides, monoterpenos y varios fenoles semejantes a los flavonoides que provocan una inhibición de síntesis de prostaglandina y una reducción de estímulos del músculo liso.

2.2.3 Propiedades medicinales

Las plantas juegan un papel muy importante en la vida de la gente en el sur andino. En el sistema médico quechua, la gente trata permanentemente de mantener un equilibrio interno en su cuerpo, y un equilibrio con su ambiente. En los rituales y ceremonias dedicados al mantenimiento de este equilibrio, las plantas juegan un papel importante. La tierra es vista como la tierra que da vida a todo, por ende su nombre es "pachamama" (la tierra madre), ella es la fuente de fertilidad, da vida a las plantas, animales y a los seres humanos. A la pachamama la gente le pide salud y buena cosecha. Es entonces lógico que las plantas sean usadas en la curación de las enfermedades. Una ceremonia muy importante es el pago a la "pachamama". A través de esta ceremonia el padre de familia pide a la tierra madre una buena cosecha, buenos animales, suerte en sus negocios, salud y bienestar para su familia (Hahold, 1986).

El Perú, considerado como el tercer país más mega diverso del planeta, ha efectuado importantes aportes de especies y variedades para el mundo gracias a los diversos pisos ecológicos y microclimas que presenta, contando con 84 zonas de vida de las 103 conocidas donde habría 50 mil especies

vegetales (20% de las existentes en la Tierra) de las que 2,000 han sido utilizadas con fines curativos. Actualmente, esta riqueza de promisorios agentes terapéuticos vegetales aunada al conocimiento ancestral de su uso etnofarmacológico, constituye un valioso recurso por explotar adecuadamente mediante el desarrollo sostenible en beneficio de la humanidad y, especialmente, de las comunidades nativas que han preservado estos recursos hasta los actuales días (Pereyra, 2002).

Mendoza (2004) de la Universidad de Santiago de Chile se refirió a las propiedades biológicas del *Pseudognaphalium vira vira*, una planta resinosa que tiene un efecto antioxidante a la que los Mapuches y Aymaras la utilizaron como antiséptico, contra la fiebre y el resfriado y para tratamientos bronquiales.

La profilaxis de las enfermedades será el evento de salud del futuro y es ahí en el desarrollo de la medicina preventiva, donde la ciencia debe mirar a la naturaleza en búsqueda de nuevas drogas. Esto es ya observable en Europa especialmente en Alemania donde se registran importaciones que llegan a las 80 mil toneladas de 400 plantas medicinales. La OMS apoya y promueve la investigación sobre las plantas medicinales, (posee un registro de 20 mil especies) a través del intercambio de información sobre la eficacia de la utilización de medicamentos de origen natural y el aprovechamiento de los mismos (Ferraro y Martino, 1990).

En el Perú, en la estructura del Ministerio de Salud se ha organizado el Instituto Nacional de Medicina Tradicional (INMETRA), cuyo objetivo es la vinculación de la medicina tradicional y la medicina académica. En la Amazonía peruana hay numerosos proyectos sobre atención primaria de salud y

utilización de plantas medicinales. En el ámbito internacional los médicos alemanes tratan enfermedades respiratorias con plantas medicinales y a la estimación del mercado europeo en cuanto a preparados basados en plantas medicinales para el 2002 es de 8900 Millones de dólares (Cañiguera, 2003).

2.2.4 Microorganismo del tracto respiratorio

Las infecciones del tracto respiratorio superior son muy frecuentes como causa de consulta tanto a pediatras como a médicos internistas, incluyen entre otros síndromes la faringo amigdalitis, la otitis, la sinusitis, para el caso de la faringitis obedece a una etiología viral, rinovirus, adenovirus, parainfluenza, etiología bacteriana siendo la más frecuente el *Streptococcus pyogenes* responsable del 15 a 30% de las faringoamigdalitis en niños. Hay microroganismos que son parte de la flora de la faringe y participan en la etiología de otras infecciones del tracto respiratorio tal es el caso del *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. aureus*. Los patógenos frecuentes en la senos nasales y paranasales son bacterias como la *Pseudomona aureginosa*, enterobacterias, *S. aureus* y *S. epidermidis* asociado a la intubación naso entérica o naso traqueal (Braun, 2003).

Se realizó un trabajo de resistencia antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en casos de neumonía y meningitis en niños menores de 5 años desde Octubre del 2000 a Diciembre del 2001, se implementó la vigilancia centinela del *Hi* y *Spn* de dos hospitales en Lima y tres

en provincias, Arequipa, Puno y Cusco. Las tasas de aislamiento fueron bajas 1.5% y 0.8% para *Hi* y *Spn* causantes de neumonía (INS, OPS- Perú, 2003).

Los *Staphylococcus* son microorganismos de gran importancia por su elevada capacidad de supervivencia en condiciones ambientales desfavorables. Se dividen entre aquellos productores de coagulasa (*Staphylococcus aureus*) y las que no la producen (*Staphylococcus epidermidis*). El *Staphylococcus aureus* está cubierto por una proteína denominada proteína A, la cual se utiliza para una prueba específica de aglutinación con anticuerpos monoclonales, para la identificación de este patógeno se utiliza otra proteína que es la coagulasa que puede encontrarse ligada a la célula o libre en el medio, esta coagulasa es capaz de convertir directamente, sin intervención de factores plasmáticos el fibrinógeno en fibrina produciendo la coagulación del plasma (Pahissa, 2009).

El *Staphylococcus aureus* es un patógeno ubicuo, capaz de transmitirse de persona a persona y esconderse en compartimientos intracelulares, un 30% de las personas sanas pueden albergarlo en las fosas nasales y en 20% en la piel, hallándose el porcentaje más alto en los enfermos del hospital. La incidencia de infecciones causadas por cocos gram positivos ha aumentado considerablemente y la diseminación de los microorganismos multirresistentes ha ocurrido tanto en hospitales como en la comunidad, resultando de la interacción de muchos factores de los cuales quizá el más importante entre las mutaciones de los genes y el intercambio de información genética, sea la presión selectiva para sobrevivir en presencia de los antibióticos usados tanto en los hospitales como en otras instituciones sanitarias y en la alimentación animal (Gobernado, 2002).

El *Staphylococcus aureus* es una de las principales causas de infecciones adquiridas en la comunidad y a nivel hospitalario, provocando bacteriemia y afectar la piel, los tejidos blandos y el tracto respiratorio inferior. Puede ser responsable de la bacteremia asociada al catéter venoso central y neumonía asociada a la ventilación mecánica. También puede provocar graves infecciones como endocarditis y osteomielitis, también es responsable de enfermedades mediadas por toxinas, síndrome de la piel escaldada y enfermedades transmitidas por alimentos. La importancia de este patógeno humano aparte de su capacidad de ocasionar infecciones que ponen en riesgo la vida, es su potencial remarcable para desarrollar resistencia a los antimicrobianos (Castañón, 2012).

Las β -lactamasas producidas por el *Staphylococcus aureus*, son enzimas de naturaleza proteica codificadas a través de la expresión de un gen tipo cromosómico o transferidas por plasmidios que tiene un origen bacteriano inducible o constitutivo que son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico dejándolo inactivo. Estas enzimas se han desarrollado como variantes de las propias enzimas biosintéticas de la pared celular, las transpeptidasas, transglucosidas y carboxipeptidasas que conocemos como las Proteínas Fijadoras de Penicilinas. La industria farmacéutica investiga mecanismos para anular el efecto de las β -lactamasas alterando la molécula del antibiótico para hacerla insensible a la acción de las β -lactamasas (Barcelona, 2008).

El *Staphylococcus epidermidis*, un coco gram negativo, coagulasa negativo, es constituyente normal de la microbiota de la piel, pudiendo producir infecciones a este nivel y en tejidos anexos, colonizando cuerpos extraños y

también es causa de infecciones profundas en huéspedes inmunocomprometidos. En la última década se ha encontrado que el *Staphylococcus epidermidis* es un patógeno nosocomial oportunista responsable de infecciones especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en estado crítico en quienes se implantan biomateriales como catéteres, prótesis óseas, tubos, válvulas, su virulencia está ligada a su habilidad para colonizar la superficie de biomateriales formando una película o biofilm (Ruiz, 2010).

Streptococcus pyogenes es el agente causal de varias enfermedades comunes entre las que se encuentran la faringoamigdalitis, la escarlatina y el impétigo. También provoca enfermedades graves como el síndrome del shock tóxico estreptocócico. Además es capaz de causar complicaciones pos infecciosas como fiebre reumática y glomerulonefritis. A mediados de la década de los 80 se observó un incremento significativo en los casos y en la gravedad de la enfermedad invasora por *Streptococcus pyogenes* en varios países de Europa y América del Norte, llegando a causar la muerte de muchas personas (Traverso, 2010).

La *Pseudomonas spp.* es un microorganismo que como patógeno oportunista es la especie de mayor importancia clínica; puede causar una gran variedad de infecciones en las vías respiratorias, urinarias, oculares, óticas, etc., estas pueden ser comunitarias o intrahospitalarias. Estas son las causantes de gran número de problemas debido a que pueden ocurrir en pacientes inmunodeprimidos hospitalizados durante largos periodos de tiempo, teniendo la mayoría de ellos antecedentes de uso previo de antibióticos de

amplio espectro, graves quemados o haberse sometido a distintos tipos de manipulaciones. Es la causante del 10% a 20% de bacteremias por gram negativos. En pacientes con tratamiento antimicrobiano inadecuado o bien con infecciones de origen respiratorio, se ha visto que produce una mortalidad del 30% al 40% sobretodo en las primeras 24 a 48 horas de su inicio (Casal, 2012).

Las enterobacterias forman parte de la microbiota normal gastrointestinal, cuando en las células del huésped ocurre una alteración de los puntos de unión para los bacilos gram negativos, se produce un aumento en la colonización orofaríngea por estas bacterias que fundamentalmente por aspiración alcanzan el parenquima pulmonar y dan lugar a la neumonía, siendo estas mayoritariamente nosocomiales, dentro de estas bacterias se encuentra la *Escherichia coli* (Cacho et al., 2007).

2.2.5 Método de difusión con disco en agar

Es un método que se utiliza para probar la sensibilidad de los antibióticos frente a determinados gérmenes y consiste en una suspensión de la bacteria en estudio la cual se inocular sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton. Posteriormente se colocan sobre la superficie del agar discos de papel de filtro impregnados con cantidades estandarizadas de agentes antimicrobianos. Luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos. El tamaño de la zona de inhibición es inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (MIC) de la bacteria y mediante el uso de tablas de referencia se prepara un reporte cualitativo

(sensible, intermedio o resistente).El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Tan pronto como el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Picazo, 2000).

2.2.6 Extracto etanólico

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con

el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (Gonzales, 2004).

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1 AMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en la ciudad de Puno, ubicada a 3820 msnm, al sureste del Perú entre los 13⁰ 00' 30'' de latitud sur y los 71⁰ 06' 57'' y 68⁰ 48' 46'' de longitud oeste del meridiano de Greenwich en la Meseta del Collao. El territorio puneño comprende parte de dos regiones, el altiplano y la selva que son bastante diferenciadas y con características propias. La población se encuentra desde zonas de altitud mínima de 820 msnm (Lanlacuni bajo) y una máxima de 4725 msnm (San Antonio de Esquilache).

El departamento de Puno tiene un relieve de una inmensa planicie cubierta de pajonales que oscila entre 3800 y 4000 msnm debido a que buena parte de su territorio se encuentra en la Meseta del Collao orillas del Lago Titicaca, su clima frío y seco cuyas temperaturas promedio anual de 8.5 grados Celsius y una precipitación pluvial anual de 125 milímetros cúbicos, (SENAMHI 2001).

El trabajo de análisis del efecto antimicrobiano de la planta, se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacología y Terapéutica Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano.

3.2 MATERIALES

Material biológico

- *Gnaphalium vira vira*

El material experimental que consistió en hojas, tallos y flores de *Gnaphalium vira vira*, fueron extraídas de la localidad de Camacani ubicado en el distrito de Platería a 3850 msnm a 27 Km. de la ciudad de Puno, correspondiendo a la zona agroecológica circunlacustre.

- Las cepas microbiológicas utilizadas, fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Cepa de *Staphylococcus aureus*

Cepa de *Staphylococcus epidermidis*

Cepa de *Escherichia coli*

Cepa de *Streptococcus pyogenes*

Cepa de *Pseudomona spp*

Material de laboratorio

- Placas Petri de 25 ml de capacidad y de 90 mm de diámetro
- Vaso de precipitados de 10 ml 500 ml y 1000 ml

- Embudo de vidrio
- Matraz con perlas de vidrio
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Papel filtro
- Hisopos de algodón estériles
- Discos de 6 mm de diámetro por 1,4 mm de espesor
- Pinzas
- Mechero
- Ansa
- Pinza simple
- Frascos de vidrio
- Pizeta
- Micropipeta
- Tips para micropipeta de 20 μ l
- Balanza digital
- Balanza granataria
- Homogenizador
- Cámara de flujo Laminar
- Estufa
- Incubadora
- Regla digital milimetrada de Vernier
- Lámpara
- Agar Mueller-Hinton

- Caldo Mueller-Hinton
- Etanol absoluto

3.3 METODO

Determinar mediante un preparado etanólico y acuoso de las flores, tallos, hojas y toda la planta, la acción antimicrobiana de la *Gnaphalium vira vira* (Wira Wira) frente a microorganismos gram positivos y gram negativos que afectan el tracto respiratorio, in vitro.

3.3.1 Preparado del extracto etanólico.

- Se seleccionó la planta en sus diferentes componentes (tallo, hojas, flor) para luego ser sometida a un proceso de eliminación de todo residuo que no esté relacionado con la planta.
- Luego se procedió a exponer la planta al aire libre para que perdiera humedad y los elementos puedan concentrarse, por un periodo de 5 días.
- Se separó cuidadosamente cada una de las partes de la planta, hojas, tallos y flores para evitar que se mezclen y se pueda conservar los elementos de cada una de las partes. Se pudo observar en este procedimiento las características resinosas de la planta que se evidenciaron mayormente en las hojas.
- Luego cada una de las parte fueron trituradas con un molino eléctrico, para poder aprovechar al máximo los componentes de la planta, que podrían ser más fácilmente liberados cuando el tamaño de las partes es

menor, y también para permitir que el etanol extraiga cada uno de los componentes de la planta.

- Se procedió al pesado de cada una de las partes de la planta, dando como resultado 100 g de hojas a las que se le añadió 500ml de etanol absoluto; 50g de tallos en 250ml de etanol; 37gr de flores en 700ml de etanol; y 48 g de toda la planta en 400 ml de etanol, las diferencias en el peso fue porque se tomaron plantas completas, las cuales al ser separadas en sus partes dieron diferentes pesos y los volúmenes de etanol fue diferente porque se tenía que cubrir toda la planta que pese a que se trituraron ocupaban volúmenes diferentes
- Seguidamente se dejó en maceración los preparados de la planta triturada con el etanol por el lapso de 5 días, a temperatura ambiente, teniendo en cuenta de que en Puno la temperatura ambiental tiene un promedio de 8°C, también fue necesario no exponer los preparados a la luz.
- Luego se procedió al proceso de filtrado, para lo cual se utilizó papel filtro, el cual retuvo las partes trituradas de la planta.
- Posteriormente el extracto se colocó en la estufa a una temperatura de 37 °C hasta lograr que se evapore todo el etanol, esto demora entre 2 y 5 días dependiendo de la cantidad de etanol que había en cada parte de la planta.
- Cuando todo el etanol es evaporado se logra una pasta resinosa, la cual se extrae con dificultad, para facilitar esto, se colocó el vaso de precipitado en la refrigeradora por unas horas y luego se procedió a extraer la pasta.

Se pesó 0.11 g. de cada parte de la planta y se diluyó en 4ml de agua destilada y en etanol, haciendo una solución al 2.75% la cual se homogenizó hasta desaparecer todas las partículas, luego se procedió a realizar el procedimiento de difusión con disco en agar.

3.3.2 Método de difusión con disco en agar

- Se preparó cultivos de reciente inoculación, en un medio sólido específico para la bacteria a probar, para los *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *E. coli* se utilizó agar Mueller-Hinton, para el *Streptococcus* se utilizó agar sangre elaborado con sangre de ovino desfibrada.
- Se tomó una cantidad determinada de cepa bacteriana y se inoculó en 5 ml de agua destilada, el grado de turbidez se ajustó a la turbidez del estándar de Mc Farland que es una solución de sulfato de bario a una concentración de 0.5 y que equivale a 1.5×10^8 bacterias o Unidades Formadoras de Colonias (Silva, 2006).
- Seguidamente con un hisopo estéril, se impregna en la solución que contiene la cepa bacteriana y se empezó a rotar contra las paredes del tubo para remover el exceso de inóculo.
- Luego se procedió a inocular en la superficie seca del agar con el hisopo humedecido en la solución que contenía las bacterias realizando una siembra por estrías en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo y se deja secar a temperatura ambiente por 5 min.

- En la cámara de flujo laminar, se colocaron los discos de 6 mm de diámetro impregnados de 20 μ l de preparado acuoso del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira*, sobre las placas que contenían el agar con el inóculo del microorganismo, en el caso del preparado etanólico se esperó 12 horas mínimamente hasta que se evapore el etanol, se realizaron 5 repeticiones para cada microorganismo y con cada uno de los preparados, después de 10 min. se colocó la placa a la incubadora a 35 °C por el lapso de 24 horas.
- La lectura se realizó en las placas donde se formaron halos alrededor del disco, se colocó la placa sobre una superficie negra con luz directa a 45° con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo, se midió el diámetro de los halos con una regla milimetrada de Vernier digital. (Fig. 1).

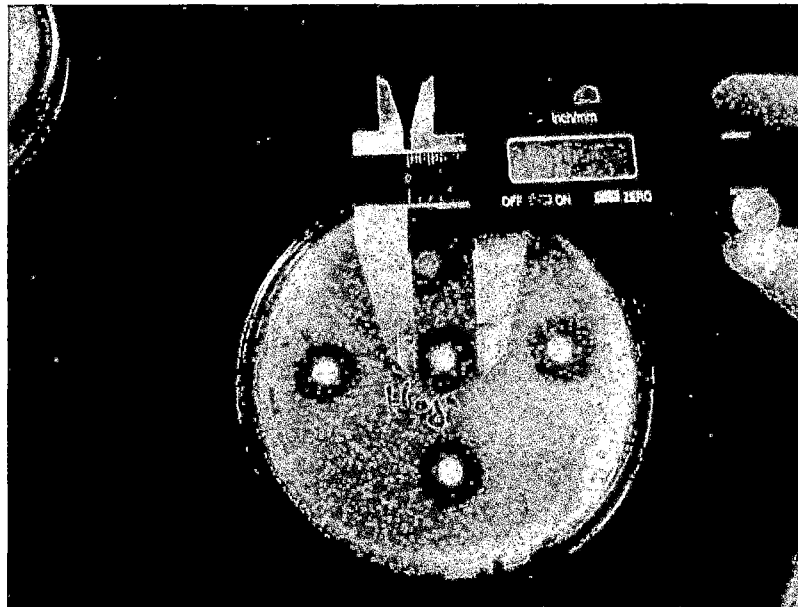


Fig. 1 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira*, medido con la regla de Vernier

3.4 ANALISIS ESTADISTICO

La variable a medir fue el tamaño de halo expresado en mm. Se utilizó un diseño completamente al azar conducido bajo un arreglo factorial 2 x 2 x 4 (2 preparados, 2 tipos de microorganismos y 4 partes de la planta), además se emplearon medidas de tendencia central (promedio) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variabilidad). El modelo matemático es el siguiente:

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha_i\beta_j\delta_k) + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

γ_{ijk} = Variable respuesta (tamaño de halo en mm).

μ = Media poblacional.

α_i = Efecto del *i*ésimo factor (preparado etanólico, preparado acuoso).

β_j = Efecto del *j*ésimo factor (microorganismo: *Stafilococcus epidermidis* y *Stafilococcus aureus*).

δ_k = Efecto del *k*ésimo factor (parte de la planta: flor, tallo, hoja y toda la planta).

ε_{ijk} = Error experimental.

Ante la presencia de diferencia estadística entre medias ($p < 0.05$) se realizó una prueba múltiple de significancia de Tukey.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Determinación de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* frente a microorganismos gram positivos y negativos in vitro.

Luego de obtener las medidas de los halos que evidenciaban la acción antimicrobiana del extracto etanólico de cada una de las partes (flor, hoja, tallo y toda la planta) del *Gnaphalium vira vira*, en sus dos preparados etanólico y acuoso, frente a dos tipos de microorganismos, se procedió a realizar el análisis estadístico respectivo, cuyos resultados se muestran a continuación:

CUADRO 1

ACCIÓN ANTIMICROBIANA DEL *GNAPHALIUM VIRA VIRA* FRENTE A MICROORGANISMOS GRAM (+) Y GRAM (-) SEGÚN PREPARADO

Extracto de <i>Gnaphalium vira vira</i>	Tipo de microorganismo				
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Pseudomona Sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
Preparado acuoso	S	S	R	R	R
Preparado etanólico	S	S	R	R	R

S (sensible) Presentó acción antimicrobiana
R (resistente) no presentó acción antimicrobiana

En el cuadro 1 se observa el efecto del *Gnaphalium vira vira* frente a microorganismos gram positivos y gram negativos, se observó que el extracto etanólico en su preparado acuoso y etanólico tuvo un efecto antimicrobiano frente al *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Stafilococcus epidermidis* coagulasa negativa lo que se evidenció con la formación de halos (fig. 1), no así frente al *Streptococcus pyogenes* y a los microorganismos gram negativos *Pseudomona sp.* y *Escherichia coli* (fig 2). Es probable que el extracto etanólico que se utilizó no haya permitido que ciertos componentes de la planta que pudiesen tener acción antimicrobiana frente a *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomona sp* y *Escherichia coli* no se hayan manifestado. Las especies vegetales a veces no exhiben actividad antimicrobiana, por el método o solvente de extracción (Rios, 1989).

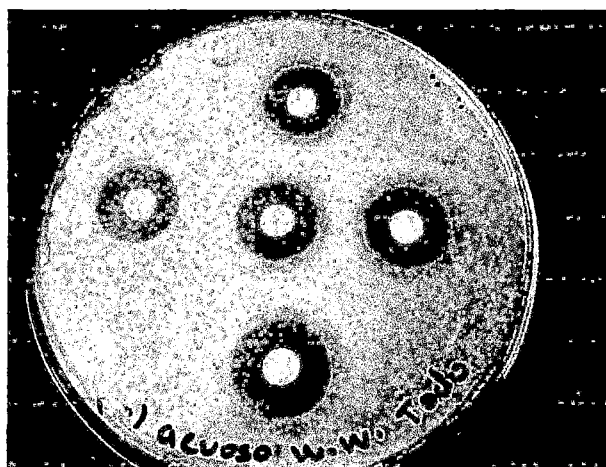


Fig 2 Halos formados por el preparado acuoso, del extracto etanólico de toda la planta de *Gnaphalium vira vira*

Lazo y Bravo (1993) demostraron que el desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue inhibida intensamente por extractos etanólico de *Gnaphalium vira vira* y solo escasamente por extractos clorofórmicos, al igual que el presente trabajo en el que el extracto etanólico inhibió el desarrollo del *S. aureus*. Por otro lado Enciso *et al.*, (2012) comprobaron la actividad antibacteriana del *Gnaphalium attenuatum* frente a *E. coli* utilizando un extracto etanólico a partir de una decocción, en el presente caso no se encontró actividad antimicrobiana frente a la *E. coli* (fig. 3).



Fig. 3 ausencia de halos del preparado acuoso del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* frente a *E. coli*

Es importante tener en cuenta que el *Staphylococcus aureus* catalasa positiva, fue sensible al posible factor componente de la planta que tienen acción antimicrobiana, esto nos podría llevar a deducir que podría existir un efecto de la planta frente al *Staphylococcus aureus* que posee β -lactamasa (+), que es una enzima de naturaleza proteica codificada a través de la expresión de un gen tipo cromosómico y que es capaz de hidrolizar el anillo beta lactámico dejándolo inactivo (Barcelona, 2008); también se considera como uno de los mecanismos más usados por la bacteria para disminuir o evitar la presencia del antibiótico en su interior modificando su permeabilidad, alterando su mecanismo de transporte activo en la membrana celular o generando mecanismo de eliminación activa del antibiótico (Echevarria, 1998).

Frente a este problema de resistencia del *Staphylococcus aureus* por la presencia de β -lactamasa la industria farmacéutica investiga mecanismos para

anular sus efectos alterando la molécula del antibiótico para hacerla insensible a la acción de las β -lactamasas. Otros mecanismos es la utilización de sustancias que bloquean las β -lactamasas o el empleo de inhibidores de su acción enzimática, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, estas sustancias tienen una gran afinidad por las β -lactamasas a las que se unen de forma irreversible y se metabolizan con ellas. (Barcelona, 2008). El *Gnaphalium vira vira* hace frente a esta enzima inhibiéndola y permitiendo una acción antimicrobiana óptima frente al *Staphylococcus aureus*, siendo dicha planta una fuente para poder sintetizar antibióticos que hagan frente a esta enzima, la β -lactamasas y ayudar a controlar la multiresistencia de los microorganismos.

También se observó que el *Staphylococcus epidermidis* fue sensible a la acción antimicrobiana del *G. vira vira*, teniendo en cuenta que es un patógeno nosocomial oportunista responsable de infecciones especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en estado crítico en quienes se implantan biomateriales como catéteres, prótesis óseas, tubos, válvulas (Ruiz, 2010), este resultado podría ser útil en el control de las enfermedades nosocomiales, identificando al principio activo que cumple con la actividad antimicrobiana.

4.2 Determinación de la acción antimicrobiana del preparado acuoso y etanólico de la flor, hoja, tallo y toda la planta del *Gnaphalium vira vira* frente a microorganismos in vitro

CUADRO 2

MEDIA DEL TAMAÑO DE HALO DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA DEL *GNAPHALIUM VIRA VIRA*, PARA LAS DIFERENTES VARIABLES Y SUS INTERACCIONES

Variable	N	Tamaño de halo (mm)
<i>Tipo de preparado</i>		
Etanólico	40	15.642 _a
Acuoso	40	14.715 _b
<i>Tipo de microorganismo</i>		
<i>Stafilococcus aureus</i>	40	15.805 _a
<i>Stafilococcus epidermidis</i>	40	14.551 _b
<i>Parte de la planta</i>		
Flor	20	17.715 _a
Toda la planta	20	16.462 _b
Hoja	20	15.373 _c
Tallo	20	11.163 _d
<i>Tipo de preparado x parte de la planta (p<0.05)</i>		
p. acuoso x flor	10	17.482
p. acuoso x hoja	10	13.890
p. acuoso x tallo	10	11.561
p. acuoso x toda la planta	10	15.925
p. etanólico x flor	10	17.947
p. etanólico x hoja	10	16.856
p. etanólico x tallo	10	10.765
p. etanólico x toda la planta	10	16.999
<i>Microorganismo x parte de la planta (p<0.05)</i>		
s. aureus x flor	10	17.833
s. aureus x hoja	10	16.016
s. aureus x tallo	10	12.669
s. aureus x toda la planta	10	16.702
s. epidermidis x flor	10	17.596
s. epidermidis x hoja	10	14.730
s. epidermidis x tallo	10	9.657
s. epidermidis x toda la planta	10	16.222

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (p<0.05)

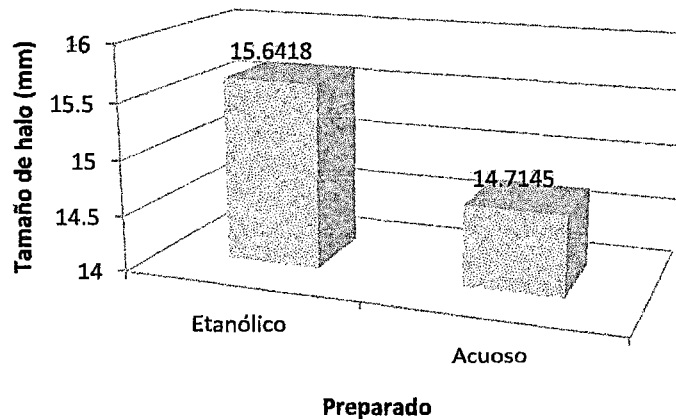


Fig. 4 Tamaño de halo (mm) de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphalium vira vira* para el preparado etanólico y el preparado acuoso

Según el cuadro 2 existe diferencia significativa ($p < 0.05$), en lo relacionado a los preparados, acuoso y etanólico, a los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y a partes de la planta, flor, toda la planta, hojas y tallo. Para el caso de los preparados, indica que los tamaños de halo fueron diferentes, en el preparado etanólico se obtuvo un tamaño de halo de 15.6418 mm de diámetro y en el preparado acuoso un halo de 14.7145 mm de diámetro (Fig.4). El solvente puede permitir la manifestación antimicrobiana de la planta, es así que el preparado etanólico, presentó una mejor actividad antimicrobiana que el acuoso; en un trabajo realizado por Recio y Rios (1989) demostraron que las especies vegetales a veces no exhiben actividad antimicrobiana por el método o solvente de extracción o dilución es así que la *Capsella bursapastoris* y *Tribulus terrestris* presentan actividad antimicrobiana

frente a *S. aureus* utilizando como solvente de extracción cloroformo, mientras que los extractos metanólicos presentan resultados negativos.

Davicino *et al.*, (2007) en un estudio de plantas medicinales en Argentina, realizo dos tipos de extractos: uno etanólico y el otro por decocción, donde el material vegetal se mantiene en ebullición en agua destilada; obteniendo mejores resultados con el preparado etanólico ya que el etanol fue capaz de evidenciar de mejor manera los efectos antimicrobianos de las plantas, al igual que en el presente trabajo, donde se observa un halo de mayor tamaño para el preparado etanólico frente al acuoso.

En una investigación realizada por Rangel *et al.*, (2001) sobre la actividad antimicrobiana de los extractos, etanólico, acetónico y acuoso del *Baccharis nitida*, encontró que el extracto etanólico del *B. nitida* frente al *Staphylococcus aureus* formo un halo de 16mm de diámetro y el extracto acuoso formo un halo de 17 mm de diámetro, no coincidiendo con lo reportado en el presente estudio, pero hay que tener en cuenta que se trata de plantas completamente diferentes.

En otro trabajo realizado en México por Enciso *et al.*, (2012) con el *Gnaphalium attenuatum*, con un extracto etanólico, utilizando el método de difusión en agar Muller Hinton, en discos de 6 mm se obtuvo un halo cuyo diámetro fue de 20mm, también mayor al que hallamos en el presente trabajo, es probable por que nuevamente se trata de géneros diferentes y porque en el preparado del extracto etanólico existe un paso previo de ebullición de la planta triturada en agua, pudiendo probablemente este paso extraer un mayor número de componentes que hicieron que el halo de inhibición sea mayor al que encontramos en este trabajo.

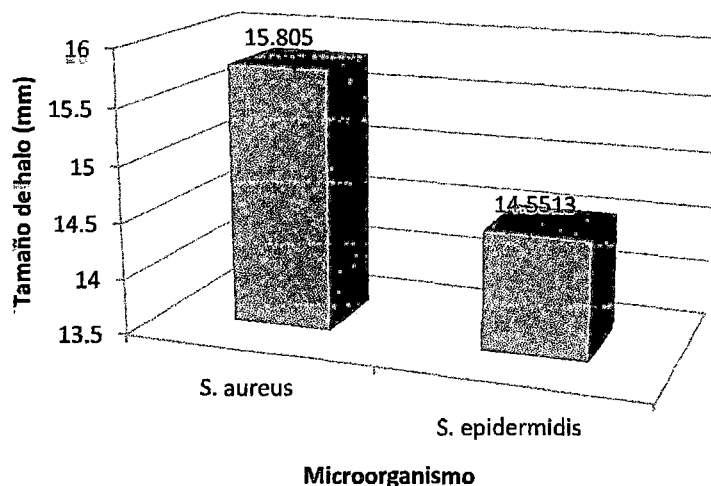


Fig. 5 Tamaño de halo (mm) de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphalium vira vira* para cada tipo de microorganismos *S. aureus* y *S. epidermidis*

En lo relacionado a la acción antimicrobiana del *Gnaphalium vira vira* frente al *S. aureus* y *S. epidermidis* ($p < 0.05$), (Cuadro 2). Se obtuvo un tamaño de halo de 15.805 mm de diámetro como promedio de la actividad antimicrobiana del extracto etanolico de la planta en estudio frente al *S. aureus* y de 14.5513 mm de diámetro frente al *S. epidermidis* (fig. 5). Este resultado estaría indicando que esta planta podría inhibir la enzima β -lactamasa que se encuentra en los *Staphylococcus aureus* y que hacen que sean tan resistentes a ciertos antibióticos como la penicilina G, aminopenicilinas, carboxipenicilinas y metilicina, ello ha promovido la investigación de novedosas alternativas para combatir las bacterias, entre ellas el uso de las moléculas naturales de defensa, así como el diseño de péptidos canónicos producidos por varias especies de organismos, siendo este campo la base para el desarrollo de los antimicrobianos del futuro.(Abarca y

Herrera, 2001). Otra alternativa para combatir la resistencia de estos microorganismos es la utilización de sustancias que bloquean las β -lactamasa o el empleo de inhibidores de su acción enzimática, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, estas sustancias tiene una gran afinidad por las β -lactamasas a las que se unen de forma irreversible y se metabolizan con ellas. (Barcelona, 2008).

Si el *Gnaphalium vira vira* es efectiva frente a los *Staphylococcus aureus* es porque debe tener algún mecanismo que permitiría la inhibición de esta enzima, ayudando a su actividad antimicrobiana. Mendoza (2004) se refiere al *G. vira vira* que fue reclasificada como *Pseudognaphalium vira vira* desde 1991, como una planta resinosa con efecto antioxidante y antiséptico que los mapuches y aymaras la utilizaron para la fiebre resfrío y enfermedades bronquiales. (Muñoz, 2004) realizó un estudio para probar la actividad antibacteriana frente a diferentes microorganismos entre ellos el *S. aureus* en el que se comprobó un efecto bactericida, esto por el contenido de flavonoides, diterpenos y sesquiterpenos coincidiendo con este estudio.

Fernandez (2008) comprobó que el *Pseudognaphalium caeruleocanum*, utilizando el método de difusión en agar con discos de 6 mm de diámetro y con agar Muller Hinton impregnado con 10 μ l del preparado tenía efecto antibacteriano frente a *S. aureus* teniendo un tamaño de halo de 20 mm, la diferencia con el presente trabajo es que se impregnaron los discos con 20 μ l de extracto etanólico de *G. vira vira* obteniendo un tamaño de halo menor (15.8050 mm) probablemente porque se trata de plantas de género diferente.

Toribio *et al.*, (2009) en una investigación de las plantas nativas de Argentina, encontró que el extracto hidroalcohólico de *Gnaphalium gaudidraudianum* no presentó actividad antibacteriana frente al *S.aureus*, pudiendo ser de una familia diferente a la de la *G. vira vira*, lo que difiere con nuestro trabajo donde se encontró marcada actividad frente al *S. aureus*. Mori *et al.*,(2010) trabajaron con raíz, tallo y flor, de *Myrciaria dubia* (camu camu) realizando un extracto hidroalcohólico sobre el *S. aureus* cultivados en agar Tripticasa soya, solo las hojas y la corteza presentaron actividad antimicrobiana frente al *S. aureus* formando un halo de 15 mm coincidiendo con el promedio de nuestro trabajo, pese a que se tratan de plantas diferentes vemos que son varios los géneros que presentan actividad antimicrobiana.

Frente al *Staphylococcus epidermidis*, no se encontraron muchas plantas que tengan actividad antimicrobiana frente a este microorganismo, en caso del *Gnaphalium* no se realizaron trabajos anteriores donde se consigne pruebas de sensibilidad de los extractos obtenidos de las partes de estas planta frente a este microorganismo; en el presente trabajo se comprobó que el *S. epidermidis* era sensible al extracto etanólico de todas las partes de la planta *G. vira vira* obteniéndose un halo de: 14.8408 mm de diámetro.

Mercado y Arevalo (2013), mencionan que el *Alium sativum* tiene un efecto antimicrobiano muy marcado frente al *S. aureus* y *S. epidermidis*, al igual que nuestro trabajo las plantas muestran que los componentes que son utilizados por estas como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros predadores, puedan servir como fuente de medicamentos para el hombre (Toribio, 2009).

El Instituto Nacional de Salud (2002), emite una serie de normas técnicas a través de un Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, donde establece el tamaño de halo y los clasifica como: sensible, intermedio y resistente para los diferentes antibióticos que existe en el mercado, y es específica para cada bacteria, es así que para el *Staphylococcus* frente a la oxacilina, vancomicina y gentamicina para considerarlos como sensibles deben formar un halo mayor o igual a 13,15 y 15 mm de diámetro, respectivamente, comparando con los resultados obtenidos vemos que el efecto antimicrobiano del *G. vira vira* es mayor que la oxacilina e igual que la gentamicina y la vancomicina, pudiendo ser esta planta una alternativa de uso.

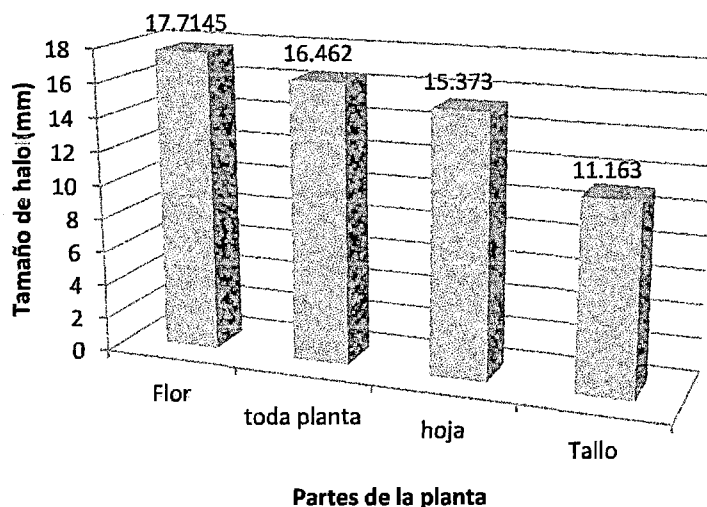


fig. 6 Tamaño de halo (mm) de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphalium vira vira* para las diferentes partes de la planta

En el cuadro 2, en el análisis de varianza también nos indica que existe diferencia significativa entre partes de la planta, y como se observa en la figura 6

la medida de la flor de 17.7145 mm de diámetro, mayor en relación a las otras partes de la planta, esto puede deberse a que en la flores se encuentran los flavonoides que les dan el color a estas y para el caso de nuestra planta es de color amarillo, sirviendo también como atractores visuales para la polinización. Martino (2000) describe que en las flores de la *Achyrocline saturoides* que pertenece a la misma familia que el *Gnaphalium vira vira* se encuentra la quercetina 3 metil éter y la apigenina, dos flavonoides que le confieren actividad antibacteriana a las flores. Según Diaz C. y Heinzen H. (2006) este efecto podría incrementarse por el tipo de extracto ya que dependiendo de este, se arrastraría una mayor cantidad de quercetina, estos autores compararon diferentes extractos (Soxhlet, maceración, percolación, decocción y tisana) obteniendo mayor cantidad de quercetina en el extracto obtenido en Soxhlet, en el extracto por maceración que es igual al que se realizó en el presente trabajo, arrastró una menor cantidad de quercetina comparada con el extracto obtenido por Soxhlet pero mayor comparado con la decocción y tisana.

Muñoz, (2004) en un estudio en flores de *G. vira vira* aisló compuestos acetilénicos, enol – éteres, lactonas diterpénicas y labdanos a los cuales también se le confiere una actividad antibacteriana. El mecanismo de acción de los componentes de la planta frente al microorganismo estaría dado en que se afecta la actividad de numerosas enzimas, actuando como inhibidores o inductores, enzimas como las protein-quinasas y lípido-quinasas, que participan en la transducción de señales entre las células. (Martino, 2000).

En el caso del tamaño de halo de 16.4620 mm de diámetro para toda la planta que incluye flores, hojas y tallos es mayor comparado con el tamaño de

halo en las hojas y tallos, Petenatti (2004) indica que en las partes aéreas del *Gnaphalium gaudichaudianum* que en el centro oeste de Argentina se conoce como Huirá Huirá que se usa como expectorante en esta zona se ha detectado la presencia de diterpenos tales como: ent-pimaratos, flavonoides como 5, 8 dihidroxi-3,6,7- trimetoxiflavona y 5,8 dihidroxi-6,7- dimetoxiflavona, acetilenos y carotenoides así como derivados del ácido Kaurenico, siendo los flavonoides a los que se les atribuye la actividad antibacteriana además de un efecto antiinflamatorio que podría ayudar a la planta a cumplir con el efecto expectorante en los casos de procesos respiratorios.

Fernández (2008) en un estudio del *Pseudognaphalium caeruleocanum*, planta de la misma familia que el *G. vira vira*, encontró en su composición química la presencia de hidrocarburos, monoterpenicos y el sesquiterpeno oxigenado nerolidol, a los cuales también se les atribuye efectos antimicrobianos y antiinflamatorios.

Para el tamaño de halo de las hojas de 15.373 mm de diámetro, mayor que el del tallo, probablemente se deba según lo indicado por Domingo (2003) de que en la parte aérea de las plantas, la filósfera especialmente las hojas, existen alrededor de 1 a 10 mlls de células/cm² de microorganismos principalmente bacterias, frente a estas, las plantas adquieren defensas que les permite contrarrestar a los microorganismos existentes, estas sustancias se dividen en dos grupos, las Fitoanticipinas que están presentes de forma constitutiva de la planta y las Fitoalexinas cuya presencia en forma considerable se produce como respuesta a una invasión bacteriana, también reporta la existencia de flavonas cuya actividad frente al microorganismo, es formar complejos con las proteínas solubles y

extracelulares y con las estructuras de la pared bacteriana de forma similar a las quinonas.

En el caso de los tallos el diámetro de halo es de 11.163 mm indicándo que la actividad antimicrobiana es menor comparado con las demás partes de la planta, esto podría deberse a que en el tallo no se encuentran algunos elementos químicos que si existen en la hojas pues en estas existe una gama más completa de principios activos, pues es ahí donde se produce la fotosíntesis de la planta provocando la formación de metabolitos primarios que a su vez constituyen los precursores de metabolitos secundarios, otorgándoles una mayor actividad antimicrobiana (Lopez, 2003).

El Instituto Nacional de Salud (2002), emite una serie de normas técnicas a través de un Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, donde establece el tamaño de halo y los clasifica como: sensible, intermedio y resistente, para los diferentes antibióticos que existe en el mercado, y es específica para cada bacteria, es así que para el *Staphylococcus* frente a la oxacilina, vancomicina, gentamicina, teicoplanina, norfloxacina, nitrofurantoina y trimetropin/sulfametoxazol para considerarlos como sensibles deben formar un halo mayor o igual a 13, 15, 15, 14, 17, 17 y 16 mm, respectivamente, comparando con los resultados obtenidos se ve que el efecto antimicrobiano de las flores de *G. vira vira* es mayor que la oxacilina, gentamicina, vancomicina, teicoplanina, y el trimetropin/sulfametoxazol e igual que la, norfloxacina y la nitrofurantoina, las hojas forman un halo mayor o igual a la oxacilina, vancomicina, gentamicina y teicoplanina pudiendo ser, esta planta una alternativa de uso.

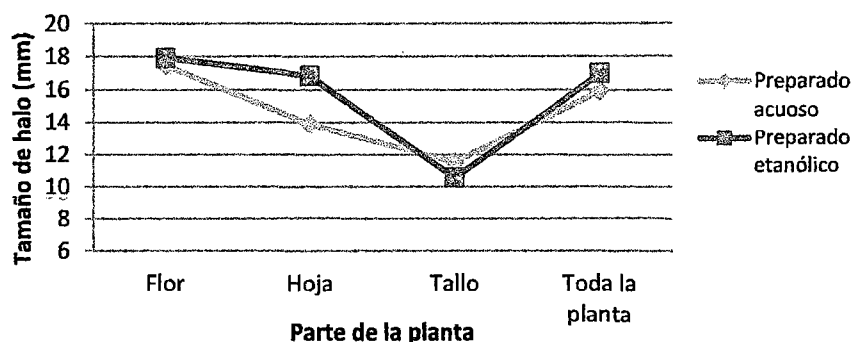


Fig. 7 tamaño de halo de la acción antimicrobiana del *gnaphalium vira vira*, para la interacción tipo de preparado y parte de la planta

En el cuadro 2 también se demuestra que se encontró diferencia estadística para la interacción tipo de preparado y parte de la planta ($p < 0.05$). Los niveles del factor parte de la planta como son flor, toda la planta y hoja presentan un mayor tamaño de halo, (fig. 7) respecto del tallo, dentro del nivel preparado etanólico del factor tipo de preparado, indicando que la actividad antimicrobiana es mayor en esos niveles. Los niveles flor y toda la planta cuentan con el mayor tamaño de halo respecto de la hoja y tallo dentro del nivel preparado acuosos del factor tipo de preparado, lo que nos estaría indicando de que los metabolitos secundarios que tienen actividad antimicrobiana y que se encuentran en los diferentes componentes de la planta son evidenciadas en los preparados tanto acuoso como etanólico.

En un trabajo realizado por Recio y Rios (1989) demostraron que las especies vegetales a veces no exhiben actividad antimicrobiana por el método o solvente de extracción o dilución es así que la *Capsella bursapastoris* y *Tribulus terrestris*

presentan actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* utilizando como solvente el etanol, mientras que los extractos metanólicos presentan resultados negativos.

Davicino *et al.*, (2007) en un estudio de plantas medicinales en Argentina, realizo dos tipos de extractos: uno etanólico y el otro por decocción, donde el material vegetal se mantiene en ebullición en agua destilada; obteniendo mejores resultados con el preparado etanólico ya que el etanol fue capaz de evidenciar de mejor manera los efectos antimicrobianos de las plantas.

En una investigación realizada por Rangel *et al.*, (2001) investigó sobre la actividad antimicrobiana de los extractos, etanólico, acetónico y acuoso del *Baccharis nitida* donde encontró que el extracto etanólico del *B. nitida* era mayor frente al *Staphylococcus aureus*.

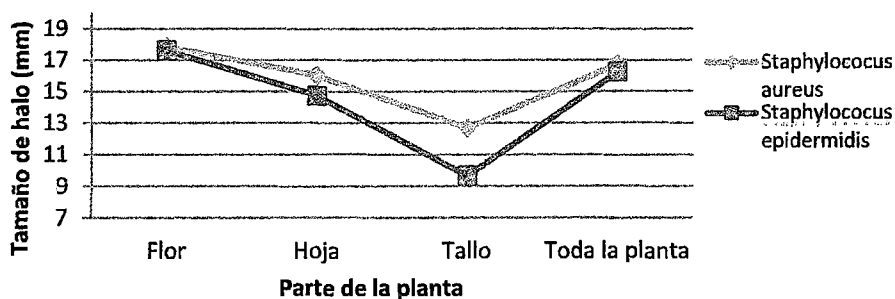


fig. 8 Tamaño de halo de la acción antimicrobiana del *Gnaphalium vira vira*, para la interacción tipo de microorganismo y parte de la planta.

En la figura 8 observamos que existe diferencia significativa en la interacción microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y partes de la planta (flor, toda la planta, hoja, tallo,) ($p < 0.05$), se observó que los niveles del factor parte de la planta como son flor, toda la planta, hoja y tallo para

el nivel *Staphylococcus aureus* del factor tipo de microorganismo, presentaron un mayor tamaño de halo y consecuentemente una mayor actividad antimicrobiana que los mismos niveles en el factor parte de la planta para el nivel *Staphylococcus epidermidis* del factor tipo de microorganismo, encontrándose medias superiores en flor y en toda la planta, siendo el tallo en el nivel *Staphylococcus epidermidis* el que presento el menor tamaño de halo, es decir que existe un efecto de la toda la planta que interactúa con los microorganismos lo que se demuestra con el tamaño de halo que se formó. Dentro de los componente químicos de la planta tenemos diterpenos como el ácido kaurenico y flavonoides como la tetrametoxiflavona (Mendoza, 2006), que se encuentran distribuidos en hojas, tallos y flores, dichos componentes son los responsables de la actividad antimicrobiana frente al *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Los *Staphylococcus* son micrororganismos de gran importancia por su elevada capacidad de supervivencia en condiciones ambientales desfavorables, el elevado número de resistencias a antibióticos y su elevada patogenicidad (Navarro, 2008), fueron inhibidos por el extracto del *Gnaphalium vira vira* esto probablemente se deba a que se produjo un aumento en la turgencia de la bacteria y la desintegración de la superficie celular que podría llevarla a a la muerte, evidenciando el daño a nivel de la pared celular (Daud *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* tiene acción antimicrobiana frente al *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

El extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* no tiene acción antimicrobiana frente a *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Pseudomona spp.*

Existe diferencia de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* con respecto a preparados (etanólico y acuoso), siendo mejor el preparado etanólico; microorganismos (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*), siendo más sensible el *Staphylococcus aureus* y partes de la planta: flores, toda la planta, hojas y tallo ($p < 0.05$), siendo las flores la de mayor acción antimicrobiana.

Existen interacción entre el preparado y parte de la planta, e interacción entre microorganismo y parte de la planta ($p < 0.05$).

RECOMENDACIONES

Identificar los componentes químicos del *Gnaphalium vira vira* en la región altiplánica para un mejor estudio.

Estudiar sobre sus posibles efectos antiinflamatorios y antimicóticos del *Gnaphalium vira vira* para su aplicación.

Conocer acerca de sus efectos nocivos, para poder establecer sus contraindicaciones.

BIBLIOGRAFIA

ANDREW, J. y HARRIS, R. (2000). The ecology and bioecography of microorganisms on plants surfaces. *Annu Rev Phytopathol*

ABARCA, Gabriela y HERRERA, Marco Luis (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* [online]., vol.36, n.1-2 [cited 2014-01-03], pp. 77-104. Disponible:

<http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1017-8546.

BARCELONA, Laura; MARIN, Marcelo y STAMBOULIAN, Daniel. (2008) Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas: Amoxicilina-sulbactam. *Medicina (B. Aires)* [online]. vol.68, n.1 [cited 2014-01-12], pp. 65-74. Disponible en:

<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802008000100012&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1669-9106.

BRAUN, J. Stephanie. (2003). Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior. *Revista chilena de infectología*, 20(3), 193-198. Recuperado en 12 de noviembre de 2013,

de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003000300007&lng=es&tlng=es. 10.4067/S0716-10182003000300007.

CACHO, Juana; MESEGUER Maria; OLIVER, Palomo y PUIG Jorge (2007). Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Bacterianas del Tracto Respiratorio Inferior. Seimc. ISBN-978-84-611-8^a35-9

CASAL, M.; CAUSSE Manuel y RODRIGUEZ F. (2012). Resistencia Antimicrobiana en aislados Clínicos de *Pseudomona aureginosa*. Revista Especializada de Quimioterapia. 25(1):37-41.

CASTAÑÓN, Carlos (2012). Patogenia Molecular del *Staphylococcus aureus*. Articulo de Revision Evidencia Medica e investigación en Salud. Vol. 5-3 Julio-Septiembre.

CASTRO, G. y LEMA, N. (1993) Determinación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales de Huancayo y Huarochirí Lima; s.n; . 134 p. ilus, graf. (3686). LILACS

CAÑIGUERA Salvador, DELLACASSA Eduardo y BANDONI Arnaldo. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia. Indicadores de dependencia o factores de Desarrollo. Acta Farmacéutica Bonaerense vol. 3 ISSN 0326-2383. Argentina.

COTORAS, Milena; GARCIA, Carolina; LAGOS, Carol; FOLCH, Carolina; MENDOZA, Leonora (2001). Actividad Antimicótica de los Flavonoides y Diterpenos aislados de la superficie de *Pseudognaphalium sp.* Boletín de la Sociedad Chilena de Química V 46. Concepción Chile.

DAVICINO, R.; MATTAR, M.; CASALI, Y.; CORREA, S.; PETTENATI, E. y MICALIZZI, B. (2007). Actividad Antifúngica de extractos de plantas usadas en Medicina Popular en Argentina. Revista Peruana de Biología 14 (2). UNMSM. Lima Perú.

DEL VITTO, Luis y PETENATTI, Elisa (2009). Asteráceas de Importancia Económica y ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y Taxonómicas; importancia Ecológica y Plantas de interés industrial. Multequina Vol. 18 2 Mendoza, Argentina.

DIAZ, Claudia y HEINZ Horacio (2006). Variaciones en el Perfil de Flavonoides y en la cantidad de Quercetina Libre en diferentes Extractos de *Archirocline saturoides*. Revista Acta Farmacéutica Bonaerense. Vol 25 -4. Argentina.

DOMINGO, D. y LOPEZ, M. (2003). Plantas con Acción Antimicrobiana. Revista especializada en Quimioterapia. Sociedad española de Quimioterapia. España.

ESPITIA Jorge, DURAN Harriette, FANDIÑO Jaime, DÍAZ Fred, y GÓMEZ Harold. (2011) Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet]. Dic [citado 2014 Ene 07] ; 16(4): 337-346. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000400005&lng=es.

FERNÁNDEZ, Janett; Buitriago, Diolimar; Velazco Judith; Rojas ,Luis; Morales, Antonio.(2008). Composición Química y actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Pseudognaphalium caeruleocanum* (Steyermark). Revista Latinoamericana de Química 36/1.

ECHEVARRIA, J. (1998) Resistencia Bacteriana. Revista Médica Herediana. 9 (2). Lima Perú.

EGUIZABAL, M. y MOROMI, H. (2007) Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propoleo Peruano. Odontológica. Sanmarquina; 18-20 . Facultad de odontología. UNMSM. Lima Perú.

DAUD, A.; HABIB I. y SÁNCHEZ A. (2008) actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa).

- ENCISO, Oswaldo; MENDEZ Alfonso; HERNANDEZ Jesus; ASHUTOSH Sharma; VILLAREAL Maria Luisa; CARDOSO Alexandre (2012). Antibacterial Activity of *Boungainvillea glabra*, *Eucaliptus globulus*, *Gnaphalium attenuatum*, and *Propolis collected* in Mexico. *Pharmacology and Pharmacy* 3, 433-438.
- HAHOLD, A. (1986) Hausbehandlung und Heilinstitutionen in den Sudlichen Anden Perus. Inaugural-Dissertation. Universidad de Heidelberg, Alemania Federal.
- GOODWIN, T.W. (1971) *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Londres.
- GOBERNADO, M. (2002) Resistencia en *Staphylococcus aureus* ahora a la Vancomicina. *Revista española de Quimioterapia* Vol. 15 n 3 Pous Science, S.A. Sociedad Española de Quimioterapia.
- GONZALEZ, V. (2004) Obtención de Aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del Amazonas, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, departamento de Ingeniería química.
- GONZÁLEZ, Martha; SOTO, Marcos; KITE, Geoffrey; MARTÍNEZ, Mariano (2007) Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, enero-marzo, 43-49.
- GUALTIERI, A.; GONZALEZ, M.; CONTRERAS, B.; KEYLLA P. (2008) Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica*. *INHRR*, dic., vol.39, no.2, p.12-16. ISSN 0798-0477.

HEINRICH, M.; ROBLES, J.; WEST, B. y RODRIGUEZ, E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.38:539-65.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2002). Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad antimicrobiana por el Metodo de disco Difusion.

LAZO, Waldo y BRAVO, Hector (1993) Acción Antimicrobiana de algunas Plantas de uso Medicinal en Chile (1/2) 43-5 Julio-Diciembre .Boletín Micologico. Biblioteca Virtual en Salud. Portal de Revistas científicas en Ciencias de la Salud

LOPEZ, P.; FERRARO, G.; BROUSSALIS, A. (2001) Determinación del Contenido de Derivados Cafeilquínicos en Especies Sudamericanas del Género *Achyrocline* Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina.

LI, P. (2001) El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes/plantas medicinales. Estado del Arte del Sector de Plantas Medicinales en Perú 1 Informe Final.

MANTILLA, J. y OLAZÁBAL, O. (2008) Las Plantas Medicinales de nuestra Madre Tierra Valle Sagrado de los Inkas-Cusco Instituto de Ecología y Plantas Medicinales "Pachamama Hampi Qhoranchiskuna".

MENDOZA, Leonora (2006). Química y Actividad Biológica del Vira Vira. Resúmenes del I Simposio Plantas Medicinales y Aromáticas. Los Angeles Chile.

MERCADO, M. y AREVALO, P.(2013) Sensibilidad de Cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona*

aureginosa frente a la acción antimicrobiana del *Alium sativum* "Ajo". Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas 33 (1):6-13 Enero- Junio. Universidad Nacional de Trujillo- Peru.

MONDAL, K.; DUREZA, P. y VERMA, J. (2001) Managemet of xanthomas campretris PV. Malvacearum-induced blight of cotton rhizobacterium

MORI T.; RUIZ E.; GARCIA M.; BARDALES J.; BENDAYAN M. ; ESPINOZA M.; TRESIERIA A.; DAVILA C.; AREVALO L.; REATEGUI R.; ANGULO J.; QUEVEDO C. ; ZAPATA E.(2010). Efecto Antimicrobiano de *Myrciaria dubia* "camu camu" y *Cyperus luzulae* "piri piri" sobre microorganismos patogenos. Artículo científico de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos Peru.

MUÑOZ, Orlando; MONTES Marco; y WILKOMIRSKY, Tatiana (2004). Plantas Medicinales de Uso en Chile Química y Farmacología. Segunda edición. Vicerrectorado de Asuntos Académicos. Universidad de Chile ISBN 956-11-1514.Editor Universitaria. Santiago de Chile.

NAVARRO C. (2008) Cirugía oral. Aran Ediciones España ISBN: 978-84-96881-34-1

ORMEÑO, Elena y FERNANDEZ Catherine (2012) Los Terpenos de las Plantas, Revista de investigación científica.

PETENATTI, Elisa; NIEVAS, Carlos; PETENATTI Marta y DEL VITTO Luis (2004) Medicamentos herbarios en el centro-oeste argentino IV Marcelas y Vira Viras en muestras comerciales. Acta Faarmaceutica Bonaerense 23 (4). ISSN 0326-2383

- PAHISSA, Albert (2009) Infecciones Producidas por *Staphylococcus aureus*. Edita ICG Marge, SL Valencia Barcelona España.
- PICAZO, Juan (2000) Recomendación de la Sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica.
- QUISPE, M.; VINO y CARVAJAL R. (1995) Modelo para el estudio de plantas con actividad antiofídica. Congreso Internacional de Medicina Alternativa, SELADIS, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 81 p.
- RANGEL, D.; GARCIA, I.; VELAZCO, J.; BUITRAGO, D. y VELAZCO, E. (2001) Actividad Antimicrobiana de los Extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Bacharis nítida* (Ruiz et Pavon). Revista de la facultad de Farmacia vol. 42. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- RIVERA, Erika; CHAVEZ, Marco Antonio; GATTUSO, Martha y LOZOYA Xavier (2003) La hoja de Guayabo en el Tratamiento de las afecciones Gastrointestinales. Revista de Fitoterapia 3 (2) España.
- RUIZ, J. y ROQUE, M. (2009). Actividad Antimicrobiana de cuatro Plantas del Nor- oriente Peruano. Ciencia e Investigacion ISSN 1561-0861. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima Perú.
- SANTIVANEZ, Rocio y CABRERA, Jorge (2013) Catalogo Florístico de Plantas Medicinales Peruanas. Ministerio de Salud. ISBN 978 – 612-310-015-5. Lima Perú.
- SOLANO, Mario (2013) Informe sobre clasificación taxonomica del *Gnaphalium vira vira*. Facultad de Ciencias Agrarias UNA-PUNO.

- TRAVERSO, F.; SPARO, M.; RUBIO, V.; SAENZ NIETO J. (2010). Caracterización Molecular de *Streptococcus pyogenes* causantes de enfermedad invasora y síndrome de Shock toxico estreptococcico.
- TORIBIO, M.; ORIANI D.; FERNENDEZ J.; TOSO R.; TORTONE C. (2007) Estudio de la actividad antimicrobiana de 4 especies del genero Baccharis. *Ciencia Veterinaria* Vo0lumen 9- Nro 1 General Pilco- La Pampa Argentina- ISSN 1515-1883.
- VICENTE, C. (2004) "Plantas medicinales, biodiversidad y comunidades locales"; Rv. N° 18, sección plantas medicinales. Grupo semillas ppl. <http://www.semillas.org.g> Bogota Colombia.
- VILLAGRAN, C. y CASTRO, V. (2004). *Ciencia Indigena de los Andes del Norte de Chile*. Editorial Universitaria. ISBN 956-11-1697-9. Santiago de Chile.
- VIVOT, P. y CRUANES, M. (2008) Actividades antimicrobiana y antiviral de extractos vegetales de algunas especies de la flora de Entre Ríos. *Cienc. docencia tecnol. (Entre Ríos)* [online], n.37 [citado 2011-02-17], pp. 177-189:<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162008000200008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1851-1716.
- ZAMPINIL, Iris; CUDMANI, Norma e ISLA, María Inés. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [online]. 2007, vol.41, n.3 [citado 2013-11-22], pp. 385-393. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572007000300013&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1851-6114.

ANEXOS

Cuadro 3. Acción antimicrobiana del *Gnaphalium vira vira* según el tamaño de halo (mm) considerando las partes de la planta en los preparados acuosos y etanólico.

Parte de la planta	N	Diámetro de halo
		$\bar{X} \pm DS$
Flor	20	17.7145a \pm 0.933
Toda la planta	20	16.4620b \pm 0.953
Hoja	20	15.3730c \pm 1.912
tallos	20	11.1630d \pm 1.890

\bar{X} : promedio, DS: desviación estándar; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Acción antimicrobiana de la *Gnaphalium vira vira* según el tamaño de halo (mm) considerando tipo de Microorganismo

Microorganismo	N	Diámetro de halo
		$\bar{X} \pm DS$
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	15.8050a \pm 2.403
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40	14.5513b \pm 3.2

\bar{X} : promedio, DS: desviación estándar; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Acción antimicrobiana de la *Gnaphalium vira vira* según el tamaño de halo (mm) considerando tipo de preparado.

Preparado	N	Diámetro de halo
		$\bar{X} \pm DS$
Etanólico	40	15.6418a \pm 3.127
Acuoso	40	14.7145b \pm 2.569

\bar{X} : promedio, DS: desviación estándar; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Cuadro 6. Análisis de varianza de los tamaños de halo, de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphallium vira vira* según, preparados, microorganismos y partes de la planta.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr >F
Preparados	1	17.1958512	17.1958512	18.33	<.0001 **
Microorganismos	1	31.4377812	31.4377812	33.51	<.0001 **
Partes de la planta	3	484.8147637	161.6049213	172.26	<.0001 **
Interac. Prep. Micro	1	1.1305013	1.1305013	1.21	0.2764
Interac.Prep. parte plant.	3	36.8065138	12.2688379	13.08	<.0001 **
Interac.Micro.parte plant	3	23.6247638	7.8749213	8.39	<.0001 **
Interac. Prep.micro.plan.	3	0.8613637	0.2871212	0.31	0.8209
Error	64	60.0410800	0.9381419		
Total	79	655.9126188			

** Altamente significativo

Cuadro 7 Análisis de varianza para el efecto simple de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphalium vira vira* de las diferentes partes de la planta en los preparados acuoso y etanólico.

Fuentes de variación	GL	CM	SC	Valor F	Pr >F
Parte y p. acuoso	3	197.4872900	65.8290967	39.54	<.0001 **
Parte y p. etanólico	3	324.1339875	108.0446625	68.05	<.0001**
Error	64	60.0410800	0.9381419		
Total	79	655.9126188			

** Altamente significativo