

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Polylepis incana Kunth***

Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico.

TESISTAS:

MARIA PRESMERITA CUBAS VILLANUEVA.

DEBORA ANTONIA HUAMAN JIMENEZ.

ASESOR: Mg. Q.F HENRY MONTELLANOS CABRERA.

2018

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
INDICE DE TABLAS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE ANEXOS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO 1: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Formulación del problema	4
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación de la investigación	5
1.5. Limitaciones de la investigación	5
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes de la investigación	6
2.1.1 Antecedentes nacionales	6
2.1.2 Antecedentes internacionales	6
2.2 Bases teóricas	8
2.2.1 <i>Polylepis spp</i>	8
2.2.1.1 Taxonomía del Género <i>Polylepis</i>	8
2.2.1.2 Características botánicas del género	9
2.2.1.3 <i>Polylepis Incana</i> Kunth	9
2.2.1.4 Distribución Geográfica	10
2.2.1.5 Distribución en el Perú	10
2.2.1.6 Usos del Género <i>Polylepis</i>	10
2.2.2 El estrés oxidativo	11
2.2.2.1 Especies Oxidantes	12
2.2.2.2 Agentes que estimulan los ROS	12
2.2.2.3 Radicales Libres	13
2.2.2.4 Antioxidantes	13
2.2.3 Compuestos Fenólicos	15

2.2.3.1	Síntesis de compuestos fenólicos	15
2.2.3.2	Actividad antioxidante	16
2.2.3.3	Actividad antimicrobiana	17
2.2.4	Los flavonoides	17
2.2.4.1	Estructura química	18
2.2.4.2	Características Generales	18
2.2.4.3	Clasificación	19
2.2.4.4	Fuentes de flavonoides	19
2.2.4.5	Actividad antioxidante	20
2.2.4.6	Técnicas de identificación de compuestos fenólicos	21
2.2.5	Agentes patógenos	22
2.2.5.1	Bacterias	23
2.2.5.2	Antimicrobianos	24
2.2.5.3	Resistencia bacteriana	24
2.2.6	Método para la evaluación de la actividad antioxidante	25
2.2.6.1	Determinación de fenoles totales	25
2.2.6.2	Determinación de la Actividad antioxidante	26
2.2.7	Metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana	27
2.2.7.1	Clasificación de los métodos de evaluación microbiológica	27
2.3	Formulación de la hipótesis	28
2.3.1	Hipótesis General	28
2.3.2	Hipótesis Específicas	28
2.4	Operacionalización de variables e indicadores	29
2.4.1	Variables	29
2.4.2	Dimensiones	29
2.4.3	Indicadores	29
2.5	Definición de términos básicos	31
CAPITULO III. METODOLOGIA		31
3.1	Tipo y diseño de la investigación	31
3.2	Población y muestra de la investigación	31
3.2.1.	Población	31
3.2.2.	Muestra	31
3.3	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	31
3.3.1.	Técnica	31
3.4	Equipos, materiales y reactivos	31
3.4.1	Equipos y materiales	31
3.4.1.1	Equipos e instrumentos	31
3.4.1.2	Material biológico	32
3.4.1.3	Material de vidrio y otros	32
3.4.1.4	Reactivos	33

3.5	Procedimiento experimental	34
3.5.1	Preparación del extracto	34
3.5.2	Ensayo de Solubilidad	35
3.5.3	Tamizaje Fitoquímico	35
3.5.4	Análisis Cromatográfico	36
3.5.5	Método para determinar la actividad antioxidante	37
3.5.6	Método para determinar la actividad antimicrobiana	39
3.5.6.1	Método de difusión en agar	39
3.5.6.2	Método de Microdilución colorimétrica	41
CAPITULO IV. PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS		45
4.1	4.1.1 Resultado del ensayo de solubilidad	45
	4.1.2 Resultado del tamizaje fitoquímico.	45
	4.1.3 Resultado de cromatografía en capa fina	46
	4.1.4 Resultado fenoles totales	47
	4.1.5 Resultado de la actividad antioxidante DPPH	48
	4.1.6 Resultado de la actividad antimicrobiana	51
4.2	Discusión de resultados	54
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		56
5.1	Conclusiones	56
5.2	Recomendaciones	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58
Anexos		66

DEDICATORIA

A Dios, porque es fuente de vida y salud

A mis padres y hermanos por ser los que me apoyan incondicionalmente en todos los días de mi vida.

A mi hija Ariana, por ser fuente de inspiración e impulsarme para poder cumplir esta meta trazada y por el tiempo que le robe.

A mi esposo por su amor, comprensión, apoyo económico y emocional en toda mi carrera profesional.

María

DEDICATORIA

A Dios, porque es el centro de mi vida mi fuerza y pasión.

A mis padres Juan y Antonia por ser mi apoyo incondicional, gracias a su ejemplo y sabios consejos soy digna de ellos.

A todas las personas que creyeron en mí y fueron mi motivación para culminar con éxito mi carrera profesional.

Débora

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Inca Garcilaso de la Vega Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, por ser nuestra alma, mater formarnos y orientarnos a ser buenos profesionales de la salud.

A nuestro asesor de tesis, Mg. HENRY MONTELLANOS CABRERA, por su apoyo y dirección para realizar este proyecto.

Al Dr. BONILLA RIVERA PABLO, docente de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por sus valiosos consejos basados en su amplia experiencia en la investigación de recursos vegetales, además de su gran paciencia y disponibilidad para finalizar este proyecto

A la Dra. MARIA ELENA SALAZAR SALVATIERRA, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por su colaboración y sus aportes de conocimientos microbiológicos para el presente trabajo.

A la Dra. BRITT ALVARADO CHAVEZ, por su colaboración y sus aportes de conocimientos en el área botánica.

A LIZ ZAGASTIZABAL MENDOZA tesista de la UNMSM, por su gran paciencia y ayuda en el laboratorio de microbiología.

Finalmente al presidente y miembros del jurado examinador y calificador, designados por la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1: Clasificación Taxonómica De <i>Polylepis</i> spp	8
Tabla N° 2: Características botánicas de <i>Polylepis incana</i> kunth	9
Tabla N° 3: Especies del genero <i>Polylepis</i> registrados en América del sur	10
Tabla N° 4: Periodo de tiempos de vida media de las ERO	12
Tabla N° 5: Mecanismo de los antioxidantes naturales	14
Tabla N° 6: Tipos de antioxidantes	15
Tabla N° 7: Concentración relativa de compuestos fenólicos en tejidos vegetales	16
Tabla N° 8: Clasificación de los flavonoides según su estructura.	19
Tabla N° 9: Fuente de los flavonoides en los alimentos	20
Tabla N° 10: Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Tabla N° 11: Clasificación taxonómica de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	23
Tabla N° 12: Diseño de la microdilución colorimétrica	44
Tabla N° 13: Clasificación de la actividad antimicrobiana según el valor del CMI	44
Tabla N° 14: Resultado de ensayo de solubilidad	45
Tabla N° 15: Resultado del tamizaje fitoquímico	45
Tabla N° 16: Resultado de cuantificación de fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu	47
Tabla N° 17: Datos de las concentraciones y absorbancias del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth	48

Tabla N° 18:	Datos de las concentraciones y absorbancias del estándar de vitamina C.	49
Tabla N° 19:	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Polylepis incana</i> Kunth en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 por el método de difusión en agar.	51
Tabla N° 20:	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Polylepis incana</i> Kunth en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 por el método de difusión en agar.	52
Tabla N° 21:	Determinación del resultado de CMI para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	52

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1:	Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo	11
Figura N° 2:	Propiedades de los compuestos fenólicos	16
Figura N° 3:	Núcleo básico de un flavonoide	18
Figura N° 4:	Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.	25
Figura N° 5:	Revelado de la placa cromatográfica	46
Figura N° 6:	Grafica de la cuantificación de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu	47
Figura N° 7:	Actividad antioxidante de <i>Polylepis incana</i> Kunth por método de DPPH	49
Figura N° 8:	Actividad antioxidante del estándar de vitamina c	50
Figura N° 9:	Procedimiento de la CMI para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	53
Figura N° 10:	Ramas de <i>Polylepis incana</i> kunth	711
Figura N° 11:	<i>Árbol de Polylepis incana kunth</i>	71
Figura N° 12:	Hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth	71
Figura N° 13:	Limpieza de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth	72
Figura N° 14:	Hojas secas de <i>Polylepis incana</i> kunth	72
Figura N° 15:	Filtrado del extracto de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth	72
Figura N° 16:	Resultado de las pruebas de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth	73
Figura N° 17:	Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth	74

Figura N° 18:	Frasco del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunthal 100%	75
Figura N° 19:	Frasco del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth al 75%,50%y 25%	75
Figura N° 20:	Placa de Control con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figura N° 21:	Placa de al 25% y 50% del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	76
Figura N°22:	Placa de al 100% y 75% del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figura N° 23:	Placa Control con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	77
Figura N° 24:	Placa de al 100% del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	77
Figura N° 25:	Placa de al 75% del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	78
Figura N° 26:	Placa de al 50% del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	78
Figura N° 27:	Placa de al 25% del extracto etanólico diluido de las hojas de <i>Polylepis incana</i> kunth con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	79
Figura N° 28:	Laboratorio de microbiología	80

Figura N° 29:	Micropipeta multicanal	80
Figura N° 30:	Cabina de flujo laminar TELSTAR	80
Figura N° 31:	Ultrasonido BRANSON	80
Figura N° 32:	Placa de agar con una cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	81
Figura N° 33:	Realizando el sembrado de las cepas	81
Figura N° 34:	Realizando el MIC	81
Figura N° 35:	Realizando las diluciones en la cabina para procedimiento MIC	82
Figura N° 36:	Pesado de las muestra para trabajar el método de DPPH	83
Figura N° 37:	Iz.Frasco con la muestra del extracto seco de <i>Polylepis incana</i> Kunth. Der. Frasco con el extracto diluido. Centro. Baño maría	85
Figura N° 38:	Fiolas cubiertas con papel platino para asegurar que la luz no interfiera con la reacción	85

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo N° 1: Matriz de consistencia	67
Anexo N° 2: Certificación botánica de <i>Polylepis incana</i> Kunth	68
Anexo N° 3: Certificado de cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	69
Anexo N° 4: Certificado de cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	70
Anexo N° 5: <i>Polylepis incana</i> kunth en su estado natural antes de ser recolectada	71
Anexo N° 6: Limpieza, secado y preparación del extracto de hojas secas de <i>Polylepis incana</i> Kunth.	72
Anexo N° 7: Prueba de solubilidad <i>Polylepis incana</i> Kunth	73
Anexo N° 8: Tamizaje fitoquímico de <i>Polylepis incana kunth</i> .	74
Anexo N° 9: Diluciones para el procedimiento de difusión en agar.	75
Anexo N° 10: Resultados de la difusión en agar del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana kunth</i> .	76
Anexo N° 11: Laboratorio de microbiología UNMSM y equipos utilizados en MIC y el método de difusión en agar.	80
Anexo N° 12: Realización del procedimiento de MIC y el método de difusión en agar en el laboratorio de la UNMSM	81
Anexo N° 13: Realización del procedimiento MIC	82
Anexo N° 14: Microplaca utilizado, para procedimiento de MIC	83
Anexo N° 15: Realización del procedimiento de DPPH	83
Anexo N° 16: Disoluciones realizadas con DPPH	84
Anexo N° 17: Espectrofotómetro utilizado en procedimiento de DPPH.	84

Anexo N° 18:	Procedimiento de cuantificación de fenoles por el método de de Folin-Ciocalteu.	85
Anexo N° 19:	Preparado del blanco para el método de fenoles totales.	85
Anexo N° 20:	Equipo utilizado en el procedimiento de cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu	86

RESUMEN

Esta investigación tiene por objetivo determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth para lo cual se realizaron estudios fitoquímicos, ensayos cualitativos y cuantitativos. Se cuantificó la presencia de fenoles totales por el método de F. Ciocalteu. La actividad antioxidante fue determinada por el método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en agar frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico en microplaca. El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth contiene 1.44mg/Eq (Equivalente ácido gálico) por gr de extracto seco y en el ensayo de DPPH presentó un porcentaje de captación de 65.06%. El método de difusión en agar se realizó a diferentes concentraciones de 120 mg/mL, 160 mg/mL, 240 mg/mL, 320 mg/mL (25%, 50%, 75%,100% respectivamente) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se comparó con el control positivo (Gentamicina10ug) observándose que para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 no presentó actividad antimicrobiana en las diferentes concentraciones, sin embargo, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a una concentración de 120 mg/mL (25%), se observó un halo de inhibición de 19 mm, mismo halo que presento el control positivo (Gentamicina 10µg). A partir de este resultado, se realizó el método de microdilución colorimétrico para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obteniéndose CMI de 0.78 mg/mL. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth tiene buena actividad antimicrobiana únicamente frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Palabras clave: *Polylepis incana* Kunth, compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

ABSTRACT

This research aims to determine the antioxidant and antimicrobial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Polylepis incana* Kunth for which phytochemical studies, qualitative and quantitative tests were carried out. The presence of total phenols was quantified by the method of F. Ciocalteu. The antioxidant activity was determined by the free radical method 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The antimicrobial activity was determined by the agar diffusion method against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and the minimum inhibitory concentration (MIC) by the microplate micro-dilution microdilution method. The ethanolic extract of the leaves of *Polylepis incana* Kunth contains 1.44mg / Eq (Equivalent Gallic Acid) per gr of dry extract and in the DPPH test presented a percentage of uptake of 65.06%. The agar diffusion method was performed at different concentrations of 120 mg / mL, 160 mg / mL, 240 mg / mL, 320 mg / mL (25%, 50%, 75%, 100% respectively) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. It was compared with the positive control (Gentamicin10ug), observing that for *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 did not present antimicrobial activity in the different concentrations, however, for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 at a concentration of 120 mg / mL (25 %), an inhibition halo of 19 mm was observed, same halo that presented the positive control (Gentamicin 10µg). From this result, the colorimetric microdilution method for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was obtained, obtaining a MIC of 0.78 mg / mL. It is concluded that the ethanolic extract of the leaves of *Polylepis incana* Kunth has good antimicrobial activity only against the strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Key words: *Polylepis incana* Kunth, phenolic compounds, flavonoids, antimicrobial activity, antioxidant activity.

INTRODUCCION

El género *Polylepis* es nativo de los andes tropicales. Su polinización es anemófila crece en las alturas como árboles y arbustos. Se caracteriza por tener una corteza compuesta por múltiples láminas delgadas¹. Debido al uso popular que se le da a las hojas y corteza de este género, se hicieron investigaciones en la búsqueda de moléculas antioxidantes y antimicrobianas.

Teniendo en cuenta que la capacidad antioxidante de una muestra está determinada por interacciones sinérgicas entre los distintos compuestos.

En la actualidad, existen varios métodos para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra como la captura de radicales peroxilo ORAC – TRAP, reducción de metales (FRAP), reducción de radicales (ABTS, DPPH)². En la provincia de Tucumán en Argentina, se identificó la especie *Polylepis australis* Bitter conocida, popularmente, como tabaquillo, Aristimuño y colaboradores demostraron su capacidad antioxidante comparado con la *Mespilus germanica* (níspero)⁴.

Su uso tradicional en afecciones respiratorias y como antihipertensivo fueron validadas por los estudios realizados por Daud Thoene y colaboradores^{3,5}. Además, en Tacna, se identificó la especie *Polylepis rugulosa*, la que por medio de estudios microbiológicos demostró tener efectos antimicrobianos frente a patógenos como a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*⁶.

El propósito de esta investigación es contribuir en el conocimiento de la investigación científica mediante el estudio de nuevas especies vegetales con efecto antimicrobiano como la *Polylepis incana* Kunth, para hacer frente a microorganismo que, con el paso del tiempo, están generando resistencia a los antibióticos de uso común. Además de encontrar metabolitos con poder antioxidante que sirvan para detener el incremento de las enfermedades degenerativas causadas por los radicales libres.

En este trabajo de investigación se demuestra la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana mediante ensayos cualitativos y cuantitativos como la marcha fitoquímica, donde se evidencian la presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Polylepis incana* Kunth, también se realizó la cromatografía en capa fina, cuantificación de fenoles y el método de DPPH, para la actividad antioxidante; Para la actividad antimicrobiana se realizó el método de difusión en agar y MIC en cepas bacterianas de tipo gram positiva y gram negativa. Comparándolo con un antimicrobiano (gentamicina).

En la presente investigación el estudio se dividió en capítulos. En el capítulo I, se plantea el problema y los objetivos de la investigación, así como la justificación y la viabilidad. En el capítulo II, se tomó en cuenta los antecedentes y bases teóricas de la investigación, y se formularon las hipótesis, variables y términos básicos. En el capítulo III, se habló de la metodología de investigación, el diseño, la población y el procedimiento experimental. En el capítulo IV, se presentó y analizó los resultados, así como la discusión de los mismos. En el capítulo V, se mencionó las conclusiones a las cuales se ha llegado en la investigación y se darán algunas recomendaciones. Finalmente, se mencionó la bibliografía y los anexos usados en el desarrollo de la investigación

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.

Los antioxidantes neutralizan la acción oxidativa de los radicales libres⁷ y de aquellas moléculas como el oxígeno singlete, anión superóxido, y radical hidroxilo los cuales derivan del metabolismo normal de los seres vivos; Sin embargo, cuando la cantidad de radicales libres sobrepasan la capacidad que tiene la célula para protegerse se produce el estrés oxidativo, asociado a muchas enfermedades de tipo degenerativas como la diabetes mellitus, arterioesclerosis, artritis, cáncer, Parkinson⁷. Los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica son el butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT, Nno obstante, han sido reportados efectos secundarios en humanos, como la hepatomegalia, niveles altos de colesterol e, incluso, cáncer hepático, entre otras⁸. Por tal motivo, existe una búsqueda incesante de moléculas con actividad antioxidante que no presenten efectos citotóxicos ni genotóxicos las plantas son una fuente de moléculas con actividad antioxidante que no tienen efectos nocivos.

Los antimicrobianos eliminan microorganismos patógenos causantes de diversas enfermedades gastrointestinales, respiratorias, entre otras, las cuales cuentan con un tratamiento farmacológico; Sin embargo, en la actualidad se reportan casos de resistencia bacteriana frente a los fármacos prescritos.

Por ende, una forma de contribuir a la solución de esta problemática es encontrar una especie vegetal que presente principios activos capaces de revertir los problemas de salud que aquejan a la población mundial.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema General

¿Tendrá actividad antioxidante y antimicrobiana el extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth?

1.2.2 Problemas Específicos.

1. ¿El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth presentará metabolitos secundarios?
2. ¿El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth, tendrá actividad antioxidante?
3. ¿El extracto etanólico de las hojas *Polylepis incana* Kunth, tendrá actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus* (grampositiva) y *Pseudomona aeruginosa* (gramnegativa).?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth.

1.3.2 Objetivo Específicos.

1. Identificar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth.
2. Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth mediante el método de radicales libres - DPPH y cuantificar el contenido de fenoles totales por el ensayo de Folin Ciocalteu.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas *Polylepis incana* Kunth, frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus* (grampositiva) y *Pseudomona aeruginosa* (gramnegativa).

1.4 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, se busca obtener y descubrir nuevas sustancias químicas de origen vegetal que puedan ser empleadas en la formulación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades causadas por el estrés oxidativo las cuales puedan ser empleadas como un tratamiento de primera elección; por otro lado, los microorganismos causantes de las infecciones, tienen un alto nivel resistencia a los antimicrobianos comunes.

Ante esta problemática, se justifica realizar esta investigación en nuevas especies vegetales con uso tradicional como una alternativa de encontrar los metabolitos secundarios que presenten actividad antioxidante y una potencial actividad antimicrobiana como es la del género *Polylepis incana kunth*, la cual no ha tenido aun estudios científicos, pero su género ha demostrado tener una buena actividad frente a estas afecciones.

1.5 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Una de las primeras limitaciones fue la falta de bibliografía y estudios de la especie *Polylepis incana* Kunth en nuestro país en el campo farmacológico.

Otra limitación fue la viabilidad de las cepas, las cuales tenían que ser frescas para los ensayos sobre todo la cepa de *Pseudomona aeruginosa*, pero se logró superar ello realizando varias siembras hasta obtener las cepas adecuadas para los ensayos.

CAPÍTULO II

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Nacionales.

Cáceda Quiroz (2012) realizó un estudio titulado “Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto alcohólico de las hojas de *Polylepis rugulosa* (queñoa)”, con el fin de demostrar la actividad antibacteriana contra cepas uropatógenas como el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli*. Obtenidas del hospital Hipólito Unanue en Tacna⁶. Utilizó el método de difusión de disco y el método de dilución en líquido para hallar la concentración mínima Inhibitoria (CMI), obtuvo como resultado para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 un halo de 11.2mm y la CMI de “4,375 mg/mL” y para *Escherichia coli* de “3,125 mg/mL”.

2.1.2 Internacionales.

Daud T, Habib I; y Sánchez R; (2007) realizaron un estudio titulado “Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis Bitter* (queñoa)”, con el objetivo de analizar la actividad diurética por vía oral en ratas wistar, se obtuvo como resultado que las dosis de 200 y 400 mg/kg tuvieron mayor actividad diurética que el grupo control y a la furosemida (20 mg/kg). Además, hallaron que su capacidad diurética sería similar a los diuréticos tiazídicos. Los resultados validarían el uso popular de hojas y corteza de queñoa como antihipertensivo como consecuencia de su actividad diurética³.

Aristimuño, M; Reynoso, M. Habib, N. et al. (2008) realizaron un estudio titulado “El contenido de fenoles totales y su relación con la posible actividad antioxidante de hojas de dos especies vegetales”: *Polylepis australis* (queñoa) y *Mespilus germanica* (níspero), ambas de la familia Rosaceae y de uso popular. El contenido de polifenoles fue de 7,0 (EA) mg/gr en queñoa, y de 2,5 (EA) mg/gr en níspero. Para el radical DPPH obtuvieron un porcentaje de depuración superior al 87 % (a 200 µg/ ml), en comparación con los controles positivos: BHT (84,5 %) y Quercetina (93,4 1%). El resultado de su investigación muestra una correlación significativa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de la *Polylepis australis* (queñoa)⁴.

Daud T, Habib I. y Sánchez R. (2008) realizaron un estudio titulado “ Actividad antimicrobiana de extractos alcoholicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter queñoa)”, con el objetivo de determinar su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, las que dieron como resultado un halo de inhibición de 8-11 mm para *Staphylococcus aureus* y 6-9 mm para *Pseudomona aeruginosa*. Los resultados para la CMI para *Staphylococcus aureus* fue de 1,25mg/mL y para *Pseudomona aeruginosa* de 2,5 mg/mL. El extracto etanólico de corteza presentó menos actividad antimicrobiana que el de hojas, el cual resultó bactericida en *Staphylococcus aureus* y bacteriostático en *Pseudomona aeruginosa*. El extracto alteró la permeabilidad membrana citoplasmática con una consecuente pérdida de citosol y muerte celular en *Staphylococcus aureus*. En el caso de *Pseudomona aeruginosa*, hallaron ampollas y vesículas en la membrana externa⁵.

María L. Tereschuk y colaboradores (2007)⁹ realizaron un estudio titulado “Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes del noa*”. Aislaron dos flavonoides *Quercetagetina 7-O- glucósido* y *7-O-arbinosil galactósido* los cuales presentaron actividad antimicrobiana y mayor sensibilidad en las cepas Gram negativas. Para la separación utilizaron técnicas clásicas y HPLC.

Hervert y colaboradores (2006)¹⁰ realizaron un estudio titulado “Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*.”

Detectaron la presencia de flavonoides en los extractos CHCl₃, AcOEt y n-BuOH, el extracto CHCl₃ a 1 000 µg/mL presentó una actividad biológica *Bacillus subtilis*, mientras que los extractos AcOEt y n-BuOH a la misma concentración también mostraron buenos resultados en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Modak B. (2002)¹¹ realizó un estudio titulado “Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*”.

De la cual se aisló y caracterizó ocho flavonoides. Logró además cuantificar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la resina empleando el método de “*tiempo generacional bacteriana*” en una cepa de *Escherichia coli*.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 POLYLEPIS

2.2.1.1 Taxonomía del género *Polylepis*

Según la clasificación APG III ¹² la familia Rosaceae está compuesta por 95 géneros y 2830 especies, distribuida en gran parte del mundo. En la subfamilia Rosoideae, la tribu Sanguisorbeae presenta 15 géneros de gran interés como los géneros *Polylepis*, *Tetraglochin*, *Margyricarpus* y *Acaena*. Los géneros más representativos en América del sur son de gran interés biológico y geográfico. La posición taxonómica que presenta es la siguiente:

Tabla N° 1: Clasificación taxonómica del genero *Polylepis spp*

REINO: Vegetal
DIVISIÓN: Magnoliophyta
CLASE: Magnoliopsida
SUBCLASE: Rosidae
ORDEN: Rosales
FAMILIA: Rosaceae
TRIBU: Sanguisorbeae
GÉNERO: <i>Polylepis</i>

Fuente: Clasificación APG III (Bremer et al., 2009)¹²

2.2.1.2 Características botánicas del género

El termino *Polylepis* tiene un origen griego “Poly” y “Iepis” lo cual hace referencia a las capas que presenta su corteza. Este género tiene entre 15 a 28 especies entre árboles y arbustos¹³; por lo general, los árboles miden hasta 25m de altura algunos arbustos de 5m hasta 10 m. En el Perú, es conocido por los pobladores como: Quinawira, quinawiro, queuña, queñua, etc. y otros pueden llegar a rebasar los 25 m de altura (*P. lanata*, *P. pauta*). En el Perú, se reportan 15 especies¹³.

2.2.1.3 *Polylepis incana* kunth

Pretell y colaboradores¹⁴ señalaron las características botánicas para esta especie:

Tabla N° 2 Características botánicas de *Polylepis incana* kunth

TALLO	La corteza es de color rojizo a marrón, que se desprende en forma continua en láminas delgadas translúcidas.
HOJAS	Son compuestas, imparipinnadas, de 3 folíolos de hasta 23mm. de largo. Los folíolos son de color verde claro a verde oscuro brillante en el haz, glabros, con el envés blanquecino-grisáceo a amarillo y pubescente. Sus nervaduras son bien marcadas
FLORES	Son incompletas presentan una inflorescencia en racimos que va de 5 a 10 flores tienen un diámetro de 5mm de altura y 5mm de ancho, y poseen entre 20 a 28 estambres. Contienen abundante polen.
FRUTO	El fruto, de unos 5mm de largo por 4mm de ancho, es seco, drupáceo, con cuatro aristas terminadas en cortos agujones.
SEMILLA	No son viables debido a la dicogamia y la polinización anemófila. Recolección entre abril y junio.

Fuente: Betancourt J; Y Rojas M. (2011)¹⁴.

2.2.1.4 Distribución geográfica

La distribución geográfica de este género es única en Sudamérica, se ubican desde Venezuela, Argentina hasta el norte de Chile¹⁵ y se encuentran entre los 3000 y 4800 msnm. La especie *Polylepis australis* original de Córdoba, Argentina crece a una altura de 1800 msnm contrario a este, la especie *Polylepis tarapacana* en Bolivia crece a 5000 msnm, siendo los bosques que crecen a mayor altitud en el mundo.

Tabla N° 3: Especies del género Polylepis registrados en América del Sur

PAIS	ESPECIES
Perú	19
Bolivia	13
Ecuador	7
Argentina	4
Colombia	3
Chile	2
Venezuela	1

Fuente: (Kessler 2006, Arévalo y Recharte 2003)¹⁵.

2.2.1.5 Distribución en el Perú

El género *Polylepis* se distribuye en el Perú entre los 2800 a los 1800 m.s.n.m., con variaciones. Este género lo encontramos cerca de los andes y grandes alturas, pueden sobrevivir cerca de cordilleras y nevados. Su adaptación al clima le permite realizar sus funciones biológicas incluso a temperaturas tan bajas como 4° C¹⁶. Su desarrollo por lo general va desde suelos residuales y superficiales, hasta laderas con piedras. Se le puede encontrar también en profundos valles y quebradas. Prefiere terrenos de textura media y ligeramente acidos¹⁷.

2.2.1.6 Usos del género Polylepis

Uso de la madera como leña, para la elaboración de carbón, para construcción de cercos y trabajo en carpintería por su alta duración. Su fácil y rápida adaptación a climas de andinos facilita su reforestación colaborando con el clima.

Se usa también para proteger al ganado durante los nevados. Tinte para lana y algodón de color marrón, producido de las hojas, corteza y ramas. Además el uso popular como infusión de las hojas y corteza para combatir infecciones respiratorias, problemas de hipertensión y como diurético¹⁸.

2.2.2 EL ESTRÉS OXIDATIVO

La mayoría de seres vivos necesita del oxígeno para mantener sus funciones vitales; sin embargo, es del oxígeno que van a derivar las especies reactivas (ERO) y los radicales libres (RL) como productos de los procesos metabólicos aerobios²¹. Estas moléculas con alto poder oxidante provocan serios daños en moléculas que son esenciales para el ser vivo como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, ante tal ataque el organismo se defiende usando moléculas antioxidantes, sin embargo, una excesiva producción de EROs puede desbordar la defensa de antioxidantes generando un desbalance entre oxidantes y antioxidantes, conocido como estrés oxidativo siendo este el origen de un sin número de enfermedades degenerativas además del envejecimiento¹⁹. Ver fig.1 Un factor importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo es el consumo de antioxidantes en la dieta, sobre todo los de origen vegetal.



Figura N° 1: Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo

Fuente: Pham –Huy et al. 2008

2.2.2.1 Especies oxidantes. Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones generando un desequilibrio electrónico en las moléculas que están en contacto con ella. Estas son conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO) y los radicales libres¹⁹. Las ERO tienen distintos grados de reactividad y tiempos de vida media. (Tabla N°4)

Tabla N° 4: Periodo de tiempos de vida media de las ERO

Radical	Fórmula	Tiempo de vida media [s]
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-9}
Radical alcóxido	$\text{RO}\cdot$	10^{-6}
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	10^{-5}
Anión peroxinitrito	ONOO^-	0.05-1
Radical peróxido	$\text{ROO}\cdot$	7
Óxido nítrico	$\cdot\text{NO}$	1 – 10
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Descomposición enzimática
Radical anión superóxido	O_2^-	Descomposición enzimática

Fuente: Bergendi et al., (1999)¹⁹

2.2.2.2 Agentes químicos estimuladores de ROS

Diversos estudios consideran que existen productos con la capacidad de estimular la producción de especies reactivas de oxígeno.

Existen diversas drogas y fármacos sobre todo los del tipo inmunosupresoras²⁰ y los tratamientos quimioterápicos, las cuales intensificarían la producción de las especies reactivas esto debido a sus efectos secundarios. Existen también compuestos con efectos tóxicos para el organismo como las micotoxinas, las que se encuentran en hongos comestibles y otros alimentos.

Otras toxinas como la *zearalenona* y la toxina T-2, las que son producidas por distintas especies del género *Fusarium* también, tienen un efecto inductor en la producción de las ERO las cuales dañan el tejido hepático y tejidos del riñón²¹. Otro factor en la excesiva producción de especies reactivas, es la acumulación de metales en el organismo, alterando el equilibrio químico en las células, por un aumento de las ERO, este sería el caso para las personas que están siendo tratadas de anemia con hierro²².

2.2.2.3 Radicales Libres

Los radicales libres son especies químicas muy inestables, pues presentan un electrón desapareado en su último orbital, lo cual los hace muy reactivos, tienen una vida media corta, debido a esto ejercen su acción cerca del lugar donde se formaron²³. Para alcanzar una estabilidad, estas especies se unen a moléculas cercanas a ellas que pueden ser de tejidos corporales, membranas celulares, ADN y otras proteínas²⁴ alterando su estructura molecular y convirtiéndolos en otros radicales, los cuales atacan a otras moléculas cercanas y desatan una reacción en cadena e incrementan la cantidad de estas especies²⁵.

2.2.2.4 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas, que por sus propiedades, pueden detener o prevenir una cadena de propagación oxidativa, logrando estabilizar al radical libre generado en el proceso del estrés oxidativo²⁶. En el organismo, tenemos varios antioxidantes que van a ser nuestra primera línea de defensa ante el ataque radicalario (Tabla 5), pero para ser considerados antioxidantes estos deben cumplir ciertas características.

Según Ballard ²⁷ las características son las siguientes:

- a. Ser capaz de competir con el oxidante.
- b. Debe tener la capacidad de regenerarse para establecer un equilibrio entre el antioxidante y la especie reactiva.
- c. Debe localizarse cerca de las especies oxidantes.
- d. No puede ser tóxico para el sistema ni ser integrante de la reacción
- e. Ser solo reactivos con el sustrato sin alterar sus características propias.

Tabla N°5 Mecanismo de acción de los antioxidantes naturales²⁸

ANTIOXIDANTES	ACCIÓN
Catalasa	Responsable de la transformación del peróxido de hidrógeno, en H ₂ O (agua) y O ₂ .
Superóxidodismutasa SOD	Elimina específicamente el anión superóxido Sintetizado por los epitelios de tipo alveolar, y en los endotelios vasculares.
El glutatión (GSH)	Por presentar un grupo sulfhidrilo (-SH) es el elemento clave en los sistema detoxificadores.
Albúmina	Amortiguador del efecto oxidativo.
Tocoferoles	Protegen las membranas de los hematíes. Pueden neutralizar al oxígeno singlete.
Acido ascórbico	Cataliza el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno.
Carotenos	Por su liposolubilidad, ejercen su acción en los compartimentos más hidrofóbicos.
Licopeno	Es el mejor agente neutralizador del oxígeno singlete.
Acido úrico	Neutraliza eficazmente al radical hidroxilo y peroxilo, y puede prevenir al ácido ascórbico de la oxidación.
Taurina	Presente tanto en el medio intracelular como el extracelular. Su concentración es más elevada en células que soportan más carga oxidativa.

Fuente: Paredes F. y Roca (2002)²⁸.

Existen antioxidantes extracelulares, como las antiproteasas y la ceruloplasmina, las cuales tienen como función inhibir la peroxidación lipídica. También, tenemos a los antioxidantes de tipo artificial como la N-acetilcisteína, el dimetilsulfóxido (DMSO), la etildimetiltiourea y el etanol²⁸.

Tabla N°6 Tipos de antioxidantes

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS	
	Endógenos	Exógenos
<ul style="list-style-type: none"> - Catalasa - Superóxido dismutasa (SOD) - Sistema glutatión - Glucosa fosfato deshidrogenasa (genera NADPH) 	<ul style="list-style-type: none"> - Glutatión – NADPH - Tocoferoles - Ácido ascórbico - Carotenos (albúmina, ceruloplasmina y ácidos grasos) 	<ul style="list-style-type: none"> - Etanol - Etildimetiltiourea - Dimetilsulfóxido (DSO) - N-acetilcisteína y otros tioles

Fuente: Fernando Paredes Salido (2002)²⁸.

2.2.3 Compuestos Fenólicos

2.2.3.1 Síntesis de compuestos fenólicos

Las sustancias conocidas como compuestos fenólicos son aquellas que tienen, en su composición, un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, en su mayoría son glicosidos, mezclado con una cantidad de azúcares. Son separables en H₂O y relativamente polares. El método más indicado para su identificación y análisis cuantitativo es por medio de la absorción UV, la cual es intensa debido a su naturaleza aromática, además, con una solución al 1% de cloruro férrico se tornan de color verde, púrpura, azul o negro. Así mismo, muestran desplazamiento batocrómico característico en presencia de álcalis ²⁹. Varios grupos de materiales poliméricos de plantas como las ligninas y taninos son polifenólicos. En la tabla 7, se muestra la concentración relativa en tejidos vegetales de estos compuestos fenólicos que podemos encontrar en la naturaleza, de las cuales se conocen 4000 aproximadamente³⁰.

Tabla N° 7: Concentración en tejidos vegetales

Tejido	Concentraciones relativas
Fruto	ácidos cinámicos > catequinas ≅ leucoantocianinas (flavan-3,4-dioles) > flavonoles
Hojas	flavonoles ≅ ácidos cinámicos > catequinas ≅ leucoantocianinas
Tronco	catequinas ≅ leucoantocianinas > flavanoles > ácidos cinámicos
Corteza	Al igual que en el tronco pero en altas concentraciones

Fuente: Robards et al. (1999)³¹.

2.2.3.2 Actividad antioxidante

Diversos estudios han atribuido propiedades antioxidantes a los compuestos fenólicos, sobre todo a través del consumo de frutas y verduras como preventivos de enfermedades degenerativas, cáncer etc.³¹. Los polifenoles pueden prevenir la oxidación lipídica, la mutación ácidos nucleicos y el daño del tejido ocasionado por las especies reactivas del oxígeno etc. (Fig. 2)

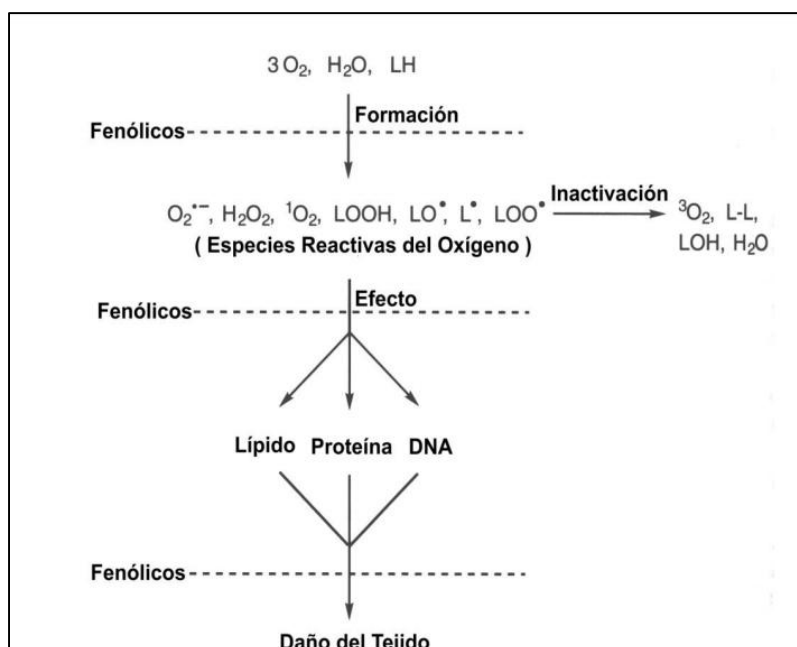


Figura N° 2. Propiedades de los compuestos fenólicos

Fuente; Shahidi (2004)³¹.

La conducta antioxidante de los compuestos fenólicos, al parecer, está relacionada a su capacidad de quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, además de algunos casos donde promueven la reacción de oxidación in vitro ³¹.

Existen dos condiciones básicas para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante:

1. Retrasar o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre, esto se da cuando se tiene una baja concentración respecto al sustrato que será oxidado.
2. Cuando el producto final de la reacción es estable y no pueda interactuar con otros, provocando otras oxidaciones posteriores.

2.2.3.3 Actividad antimicrobiana

En un estudio realizado por Ana María en 2015 ³² observó que el extracto de semilla de uva causó afecciones en la membrana bacteriana del *H. pylori* y tuvo más acción en las proteínas ribosomales. La composición de altas condensaciones de metilgalato con catequina tuvieron gran acción inhibitoria en las cepas de *H. pylori*.

2.2.4 Los Flavonoides

Flavonoide proviene del latín flavus el cual representa el tono amarillo y rojo análogo a la tonalidad de la miel³³. Los flavonoides pertenecen a un grupo aromático que están generosamente repartidos entre el reino vegetal, y componen la mayor cantidad de las tonalidades entre amarillo, rojo y azul de las plantas y frutos. Cuyos matices poseen el poder de cuidar al organismo de agentes oxidantes capaces de producir cáncer, etc. El hombre es incapaz de producirlos; por eso, se debe consumir en la alimentación o en forma de suplemento³⁴. En 1930, el nobel Szent-György fue quien descubrió los flavonoides, a partir de la cáscara de limón, obtuvo la citrina con capacidad de regular la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Los flavonoides fueron conocidos como vitaminas por su cualidad de permitir la regularización de la permeabilidad capilar y además de tener similitud con la vitamina C; sin embargo, no se pudo confirmar con exactitud su mecanismo de acción y se abandonó esta denominación en los años 1950³⁵.

2.2.4.1 Estructura química

“Presentan un peso molecular bajo y en su configuración comparten un esqueleto de difenilpiranos (C6-C3-C6), muestran dos anillos de fenilos (A y B) enlazados por un anillo C de pirano (heterocíclico). la numeración va desde el carbono C del 2 al 8 y los del anillo B desde el 2' al 6'12” (fig. 3)³⁴.

Su acción como antioxidante depende de las reacciones de Óxido - Reducción de sus grupos hidroxifenólicos y de la estrecha relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química ³³.

Al poseer este tipo de configuración química, le permite tener una infinidad de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. ³⁴

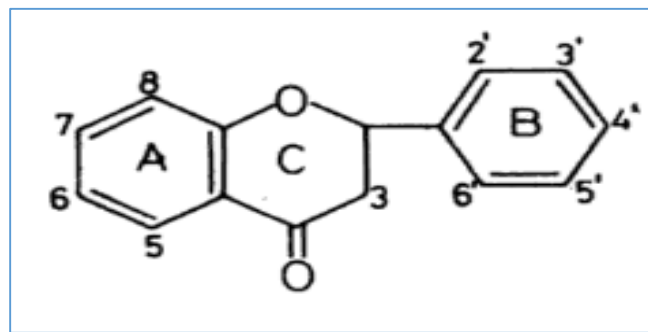


Figura N° 3: Núcleo básico de un flavonoide

Fuente: Pérez Trueba (2003)³⁴.

2.2.4.2 Características Generales

Presentan buena solubilidad en agua y etanol. La presencia del anillo aromático le da una condición fenólica. Por sus diferentes tonalidades, son utilizados en tintes de lana y, recientemente, se emplean como conservadores de las grasas y jugos de frutas por la capacidad antioxidante de sus polihidroflavonas³⁵. Otros usos muy importantes hoy en día es la de los glucosidos de dihidrochalconas como endulzantes y de la rotenona como veneno para insectos, etc.

2.2.4.3 Clasificación

Según sus características estructurales y por el lugar de sus sustituyentes en los carbonos ³⁵ C4 C3, se pueden encasillar según la tabla N° 8.

Tabla N° 8 Clasificación de los flavonoides según su estructura

Nombre	Descripción	Ejemplo
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Catequina
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina

Fuente: Christopher Isaac et al. (2009)³⁵.

2.2.4.4 Fuentes de flavonoides

Por lo general, se hallan en frutas, verduras, semillas y flores los que pueden ser parte de la dieta; también se puede unir a vitaminas y algunos minerales para tomarse de forma suplementaria. Además, los podemos encontrar en la síntesis de plantas como el arándano, *Ginkgo Biloba*, *Cardo Mariano* o *Crataegus*. La ubicación principal de estos flavonoides se encuentra en las hojas; Sin embargo, la cebolla presenta una gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos 17, simbolizando una inusual excepción³⁵.

Tabla N° 9: Fuente de flavonoides en los alimentos³⁵.

Subgrupos de flavonoides	Flavonoides específicos	Fuente de alimentos
Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina, isorhamnetina	Cebollas, manzanas, vegetales de hoja, bayas.
Flavonas	Luteolina, apigenina	Perejil, ají, apio, alcachofas especias
Flavanones	Hesperetina, naringenina, eriodictiol	Frutas cítricas y jugos de cítricos
Flavanoles	Catequinas, epigallocatequinas, Teaflavinas	Te, chocolate, frutas de árbol, semilla de uva
Antocianidinas	Cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina	La mayoría de las bayas(berries), caupi
Isoflavonas	Daidzeína, genisteína, glicitaina	Soja, alimentos derivados de la soja

Fuente: Christopher Isaac et al. (2009)³⁵

2.2.4.5 Actividad antioxidante

Los flavonoides poseen la particularidad de unirse a las enzimas, ácidos nucleicos, carriers para acelerar el transporte de electrones y eliminan radicales libres. Algunas investigaciones respaldan las propiedades de los flavonoides las que son resaltadas por actuar como defensores en las enfermedades que declinan la salud del ser humano como cáncer, diabetes mellitus, cardiopatías etc.³⁶. Se conoce su acción como antiviral, antiinflamatorio, antialérgicos y propiedades antitrombótica³⁷. Los flavonoides actúan al nivel de la parte hidrocarbonada de la doble capa lipídica de las células, alteran y disminuyen la fluidez de esta debido a las reacciones hidrofóbicas del flavonoide con las cadenas de ácidos grasos presentes en la membrana³⁸. Estudios demostraron que la quercetina actúa eliminando la fase de peroxidación lipídica de los fosfolípidos y del ácido linoleico de los hematíes, además actúa sobre la membrana celular de las células sanguíneas inhibiendo la fotooxidación de la vitamina E usando como fotosensibilizador a la hematoporfirina ⁵. También se ha demostrado su capacidad de reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas in vitro producidas por macrófagos³⁹. En el hígado, la quercetina altera las vías de expresión de proteínas celulares mediante la inhibición de la activación de las células estrelladas. Los flavonoides inhiben a las monooxigenasas ligado al citocromo P-450, lo que indicaría que juegan un rol importante en la regulación de la activación de carcinógenos.

Las chalconas y flavononas actúan como preventivos en la progresión de los hepatomas por su acción sobre las quinonas reductasas³³.

Los flavonoides protoantocianídicos pueden ingresar a las membranas celulares por su naturaleza liposoluble e hidrosoluble pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Por eso, a diferencia de otros antioxidantes tienen la capacidad de proteger a células cerebrales. Además, participan en el proceso de la inflamación y las alergias potencian la actividad de las células natural killer del sistema inmune ⁴⁰. Su poder antioxidante está ligado a su capacidad de eliminar el hierro. Estudios recientes comprobaron que, en células tratadas con un compuesto tóxico y estando en bajas concentraciones, tienen la capacidad de evitar la desintegración y oxidación del ADN. Esta acción protectora se debe a su lipofilicidad⁴⁰.

2.2.4.6 Técnicas para identificación de compuestos fenólicos

Reacción de color

Para la identificar la presencia de flavonoides, por lo general, se utiliza la reacción de SHINODA la cual consiste en colocar un trozo de magnesio y unas gotas de HCl concentrado, en el extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo, lo que como positivo la decoloración inmediata. Según el tipo de los flavonoides sería⁴¹.

1. Flavonas y flavonoles (amarillo a rojo)
2. Flavanonoles (rojo a magenta),
3. Flavanonas (rojo magenta, violeta, azul)
4. Las isoflavonas, chalconas y auronas (incoloro).

Cromatografía de capa fina

Es el método más sencillo y de rápido análisis, que se utilizan como soporte la celulosa, silica gel y poliamida. Los flavonoides son localizados por medio del revelado con luz ultravioleta.

El revelado es con Luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm para los que no son visibles a la luz uv se usa AlCl₃, Complejo Difenil ⁴¹. La Cromatografía de papel (CP) y la cromatografía de capa fina (CCF) son las técnicas más utilizadas para la determinación de flavonoides en extractos crudos de plantas o en fracciones.

2.2.5 AGENTES PATÓGENOS

2.2.5.1 Bacterias: Las bacterias son microorganismo que tienen una amplia distribución en la naturaleza. Según las características de su pared celular, las bacterias pueden asociarse en dos conjuntos: Gram positivas y Gram negativas⁴².

a. Bacterias Gram Positivas: Son bacterias que no tienen cápsula, son inmóviles y no esporuladas existen algunas que han creado una cápsula de limo y son anaerobias facultativas⁴³.

Tabla N°10: Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus*:

<i>Staphylococcus aureus</i>
Dominio: Bacteria
Filo: Firmicutes
Clase: Bacili
Orden: Bacillales
Familia: Staphylococcaceae
Género: Staphylococcus
Especie: <i>S. aureus</i>

Fuente: Ruiz de Gopegui E (2015)⁴⁴

El género *Staphylococcus* se compone de cocos Gram positivos, que miden un diámetro de 0.5 a 1.5µm, se encuentran agrupados, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Ogston). La mayoría de los estafilococos producen catalasa. Siendo esta capacidad la que los diferencia de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, los cuales no producen catalasa. Las especies forman sus colonias en y una zona específica del huésped. Se transmiten a alimentos contaminados generan toxiinfecciones alimentarias en el ser humano. Existe mayor riesgo de colonización por *S. aureus* en aquellas personas que sufren de enfermedades dérmicas, pacientes con diabetes, insuficiencia renal con diálisis, pacientes por VIH y enfermedades hepáticas terminales. Además es el responsable del 13-19% de las neumonías intrahospitalarias junto con *P. aeruginosa*.⁴³

b. Bacteria Gram negativa

Tabla N°11: Clasificación taxonómica de *Pseudomona aeruginosa*:

<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: <i>Pseudomona</i>
Especie: <i>P. aeruginosa</i>

Fuente: Ryan KJ et al (2004)⁴⁵

Es una de las bacterias más resistente a los antibióticos; además, de ser considerado como el responsable de bacteriemias más frecuentes y con mayor mortalidad que las otras especies de pseudomona⁴⁵.

La *P. aeruginosa* puede ser reconocida por su color perlado y olor a uvas in vitro. Se pueden identificar en el laboratorio por la producción de piocianina y fluoresceína. *P. aeruginosa* tiene la habilidad de crecer a temperaturas de 42 °C, pueden crecer en combustibles como el querosene, ya que puede nutrirse de hidrocarburos⁴⁵. Es responsable de la gran mayoría de infecciones intrahospitalarias.

Los pacientes que se encuentran con inmunosupresión, enfermedades pulmonares así como aquellos que han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia son los más vulnerables. Sin embargo, se han aislado colonias de esta bacteria en las heces de personas sanas desde un 2 a 8%, lo que demuestra que tenemos contacto con esta bacteria y va depender cómo se encuentre el sistema de defensa del individuo para que se pueda desarrollar la infección⁴⁶.

2.2.5.2 Antimicrobianos

Se le denomina antimicrobiano a cualquier agente que va interferir en el crecimiento y la actividad de los microorganismos, y depende del grupo sobre el cual ejerza su acción tendrá un nombre específico⁴⁷.

2.2.5.3 Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana se dio con la *S. aureus*. A inicios del año 1960, las cepas resistentes a penicilinas llevó al desarrollo de resistencia a meticilina (MRSA, siglas en inglés), las cuales se fueron diseminando rápidamente por todo el mundo⁴⁷. En las últimas décadas, el aumento de cepas resistentes ha ido en aumento, esto debido al uso indiscriminado de antibióticos. *S. aureus* es una de las bacterias con mayor incidencia en los hospitales y establecimientos comunitarios; además es responsable de muchas enfermedades en humanos y animales, desde infecciones simples como foliculitis, forunculitis, hasta infecciones más severas y complejas como neumonías, endocarditis, infección de meninges o bacteriemias. Los pacientes con diabetes están ligados en un 20% con este patógeno también los neonatos, pacientes inmunodeprimidos⁴⁸.

2.2.6 MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.2.6.1 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Ensayo de Folin-Ciocalteu

Este método tuvo su origen en 1927 cuando se realizaban análisis químicos de la tirosina. Luego Singleton y Rossi (1965), mejorarían el ensayo aplicándolo en fenoles del vino.

Este reactivo conocido como Folin-Ciocalteu (RF-C) es una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en un medio alcalino (Na_2CO_3 al 5-10 %, acuoso).

La mayoría de compuestos fenólicos son altamente oxidables en medio alcalino los cuales al reaccionar con el molibdato forman el óxido de molibdeno MoO_4 , compuesto de color azul que puede ser leído y cuantificado por un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de 750-760 nm.) Usando como patrón para la curva el ácido gálico⁴⁸.

A través de una reacción de REDOX el protón fenólico dissociado permite la formación del ion fenolato, quien es el responsable de la reducción de RF-C. El resultado es expresado equivalentes de ácido gálico⁴⁹.

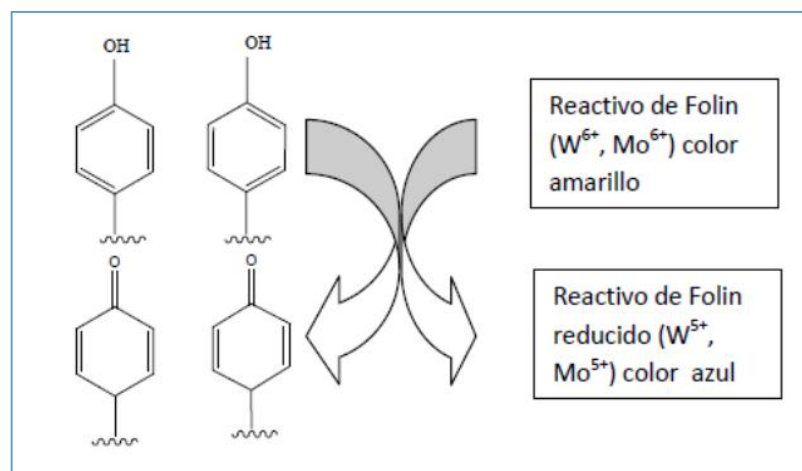


Figura N°4 Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Fuente: Roginsky V. Lissi (2005)⁴⁵.

2.2.6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Según Huang y colaboradores (2005)⁵⁰: *“Los métodos para la evaluación de flavonoides se basan en la transferencia del átomo de hidrógeno (HAT) y/o la transferencia de electrones (ET).*

Estos métodos son los más utilizados por su gran estabilidad, simpleza y rápido análisis. Ambas involucran una reacción entre el radical y el antioxidante; tienen el poder de ser utilizados en solventes orgánicos acuosos y no polares, como es el caso del benceno. Estos métodos no representan situaciones in vivo, ambos son artificiales, pero pueden ser usados para establecer un rango de actividad antioxidante⁵¹.

Determinación directa: A través de este método, se puede decir que la reacción empezara siempre y cuando se adicione el oxidante (DPPH, ABTS), ya que al agregar el antioxidante, generara un descenso en la señal. En ensayos de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes que sea generado el radical⁵².

Determinación indirecta: Se determina por el incremento o disminución de la señal dada por la pérdida o aparición de un reactivo debido a la presencia de radicales libres (métodos, ORAC, FRAP, etc)⁵³.

Método DPPH

Brand-Williams (1995),

Este método consiste en la reacción del DPPH con el compuesto en estudio el cual actúa reduciendo el electrón de nitrógeno desapareado de 2,2 – Difenil-1-picrilhidracil, el que al inicio presentaba una coloración azul- violeta llega al color amarillo suave visualizándose a través del espectrofotómetro a una absorbancia de λ 515nm hasta λ 517nm ⁵³.

El DPPH es un método muy empleado en la especificación de compuestos que actúan como antioxidantes. Una de sus características principales es que se puede efectuar a temperatura ambiente lo que nos asegura un bajo riesgo de que las moléculas se degraden y se estabiliza aceptando electrones de los antioxidantes. Esto no demanda de mucho tiempo para su realización. Los resultados se reportan en una curva de calibración obtenida de las concentraciones vs las absorbancias obtenidas por regresión lineal⁵³.

2.2.7 METODOLOGÍAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Existen diversos métodos in vitro para evaluar la actividad antibacteriana de un extracto; sin embargo, esta puede depender de factores como la sensibilidad del microorganismo y la solubilidad del agente antibacteriano⁵⁴.

2.2.7.1 Clasificación de los métodos de evaluación microbiológica

Métodos de difusión

Este método se realiza en placas de agar con resultados altamente reproducibles. Según Kirby Bauer “este método *busca establecer, en forma cualitativa y cuantitativa la susceptibilidad de las cepas bacterianas ante el agente antibacteriano*”. Además, se trabaja directamente con la interacción de la concentración de una muestra necesaria que es capaz de impedir el desarrollo de las bacterias expresado en la formación de un halo de inhibición en la placa de agar ya que es el medio de cultivo necesario sembrado con la cepa bacteriana a estudiar⁵⁴.

Métodos de dilución

Estos métodos son conocidos como “*test de susceptibilidad microbiana*”, los cuales se pueden desarrollar en dos medios ya sea en agar o en caldo, ayudándonos a conocer una concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC) los resultados son observables después de 24 horas de incubación⁵⁴.

a. Dilución en agar

Consiste en incorporar al antimicrobiano junto al agar justo cuando el medio aún está fundido. Se prepara una serie de placas para lograr el rango de dilución deseado, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Se utiliza un replicador para inocular las placas en cuanto se haya solidificado el medio de cultivo. Con este método, puede inocular de 32 a 36 organismos.

EL Agar Mueller-Hinton es uno de los más utilizados, sin embargo esto va depender del microorganismo y en función a sus necesidades nutritivas para su crecimiento⁵⁴.

b. Dilución en caldo

Esta técnica utiliza tubos de ensayo o microplacas a las cuales se les coloca parte de la muestra a diferentes concentraciones, valiéndose de una micropipeta. Se inoculan los organismos a evaluar en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación. Esta técnica es muy útil cuando se trata de un gran número de muestras, la ventaja se encuentra en el grado de sensibilidad para muestras pequeñas, muy apropiado cuando se trabaja con productos naturales y nos permite diferenciar si la muestra tiene efecto bactericida o bacteriostático⁵⁴.

2.3 Formulación de la hipótesis

2.3.1 Hipótesis General

El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth tiene actividad antioxidante y antimicrobiana.

2.3.2 Hipótesis Específicas

1. El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth tiene metabolitos secundarios.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth presenta actividad antioxidante.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth presenta actividad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4 Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
<p>Variable independiente:</p> <p>Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth.</p>	<p>VI.</p> <p>Tamizaje fitoquímico de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth</p>	<p>VI.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides • Compuestos fenólicos • Ensayos de solubilidad • Cromatografía en capa fina.
<p>Variable dependiente:</p> <p>Actividad antioxidante</p> <p>Actividad antimicrobiana</p>	<p>VD</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cuantificación de fenoles totales. • Capacidad antioxidante equivalente a vitamina C. • Capacidad antimicrobiana. 	<p>VD.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Miligramo de Equivalentes de Acido Gálico/gr de extracto seco. • Concentración de DPPH. • Diámetro del halo de inhibición en mm. • Concentración mínima Inhibitoria.

2.5. Definición de términos básicos.

1. Agentes patógenos.

Son aquellos organismos que van a producir una enfermedad o daño al ser vivo que lo albergue. Entre las más conocidas tenemos a las bacterias, hongos, protozoarios etc ⁵⁵.

2. Bactericidas.

Tienen la característica de matar la bacteria, su actividad terapéutica es inalterable⁵⁵.

3. Bacteriostático.

Es aquello que impide la multiplicación bacteriana, la cual se reinicia de una vez que se detiene la medicación⁵⁶.

4. Cromatografía.

Es un método físico de separación que sustancialmente se basa en la división de sus componentes, los cuales se racionan en sus dos fases, una que es la parte inmóvil conocida como la fase estacionaria y la otra es la fase móvil que pasa a través de la fase estacionaria⁵⁷.

5. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Es una prueba de susceptibilidad microbial que determina la mínima concentración de un elemento antimicrobiano que impide el desarrollo de un microorganismo⁵⁸.

6. Radicales libres.

Son especies químicas que pueden estar cargadas y otras no. Por lo general, en su estructura atómica, tienen un electrón desapareado o impar en el orbital externo, ya que por esta configuración es muy inestable⁵⁹.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de tipo experimental - *in vitro*, porque se realizó en un laboratorio y de corte transversal, pues los datos fueron recopilados en un solo momento.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población : Arboles de *Polylepis incana*

3.2.2. Muestra : Hojas fueron recolectadas en la Poblado de Huanchac, distrito de Independencia provincia de Huaraz departamento de Ancash. Se seleccionaron hojas jóvenes no deterioradas, de tamaño homogéneo y de la misma zona geográfica.

3.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1. Técnicas

- Tamizaje fitoquímico
- Cromatografía en capa fina,
- Método in vitro de DPPH
- Ensayo de Folin-Ciocalteu
- Método de MIC en placas de agar y pocillos

3.4 EQUIPOS MATERIALES Y REACTIVOS

3.4.1 Equipo y materiales

3.4.1.1. Equipos e instrumentos

- Estufa
- Balanza analítica (OHAUS Pioneer)
- Cabina de flujo laminar TELSTAR
- Ultrasonido BRANSON
- Potenciometro
- Vernier
- Asa de Drigalsky

3.4.1.2. Material biológico

- Hojas de *Polylepis incana* Kunth.
- Cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Medios de cultivo:

- Agar nutritivo (Agar Mueller Hinton4 marca Scharlau)
- Suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%)

3.4.1.3. Material de vidrio y otros

- Cubas para revelado
- Cromatofolios con Silicagel
- Capilares para cromatografía
- Frascos ámbar capacidad 1 L
- Frascos estériles tapa rosca (BIOGAS)
- Baguetas
- Embudos de vidrio (PIREX)
- Papel filtro
- Tubos de prueba
- Placas de vidrio
- Puntas para micropipeta de 20-200 μ L y 0.5-5mL
- Micropipeta Multicanal
- Micropipetas calibradas de 20-200 μ L y 0.5-5mL
- Viales de vidrio de 5mL de capacidad

3.4.1.4 Reactivos

Reactivos

- R. Molish
- R. Mayer
- R. Dragendorff
- R. de Ninhidrina 1 %
- R. Shinoda
- R. Bornträger
- R. Tricloruro de fierro 5 %
- R. Gelatina 1 %
- R. Folin-Ciocalteu
- R. DPPH.
- Resazurina

Solventes

- Cloroformo
- Butanol
- Ácido clorhídrico
- Metanol
- Agua desionizada

3.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Preparación del extracto

- **Recolección de la muestra:** Se colectó la muestra en el departamento de Ancash, provincia de Huaraz, en el distrito de Independencia - Poblado de Huanchac.
- **Selección de la muestra:** Se seleccionó las hojas de la planta de *Polylepis incana* Kunth. Según criterios físicos, las hojas deben estar en buen estado, color, forma no deben presentar coloración extraña. Luego, se procedió a limpiarlas con pinceles una por una, asegurándose de que las hojas estén en óptimas condiciones para ser empacadas en las bolsas de papel craft.
- **Disecación de la muestra y estabilización de la muestra:** Las hojas seleccionadas se empaquetaron en bolsas de papel craft y se expusieron a disecar al aire libre por un mes. Las hojas secas se colocaron en la estufa a 40°C.
- **Pesado y triturado de la muestra:** El peso total fue de 56 gr, y se procede a triturar la muestra por medios mecánicos (triturado con la mano).
- **Maceración de la muestra:** La muestra triturada se colocó en un envase color ámbar para luego agregar el alcohol de 96° hasta cubrir la muestra (2cm por encima de la muestra); se agita tres veces por día, durante 10 días.
- **Filtrado de la muestra:** Se filtró el total de la solución utilizando algodón y gasa en un embudo por un tiempo aproximado de 40 minutos y se obtuvo un concentrado del extracto el mismo que se llevó a la estufa.
- **Secado de la muestra:** La solución obtenida del filtrado se llevó a estufa 40°C por 3 días. Se obtuvo de esta forma el extracto etanólico seco 20 gr de las hojas de *Polylepis incana* Kunth.
- **Preparación de la muestra patrón:** Se filtró 2ml de la muestra etanólico en un tubo de ensayo y se agregó etanol hasta clarificar. Esta se denominó la muestra patrón la cual se distribuyó en cinco tubos de ensayo para realizar el tamizaje fitoquímico.

3.5.2 Ensayo de solubilidad

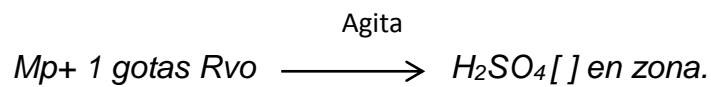
Una cantidad mínima de la muestra seca se colocó en cinco tubos de ensayo para luego adicionarle diferentes solventes el cual nos revelaría con cual sustancia es más soluble y poder trabajar el tamizaje fitoquímico. (Anexo N° 7)

3.5.3 Tamizaje Fitoquímico

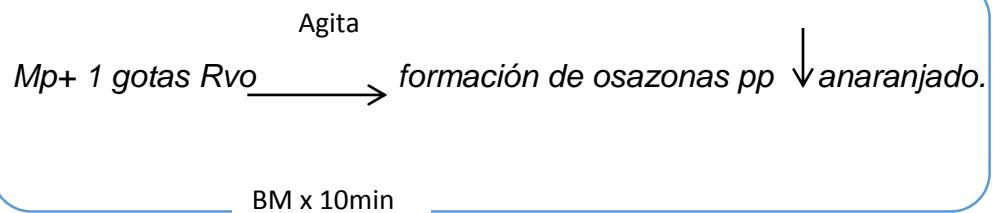
El tamizaje fitoquímico se realizó con la muestra patrón preparado siguiendo el siguiente esquema: (Anexo N°8)

1. Carbohidratos Generales

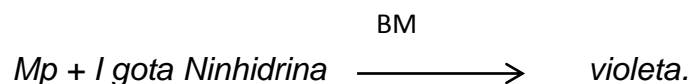
a. Molish o α naftol.



b. 2,4 DNFH.

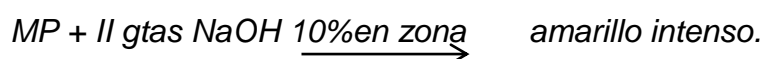


2. Aminoácidos



3. Metabolitos Secundarios

a) Cumarinas:



b) Taninos:



c) Flavonoides:

- **SHINODA:**

MP + III (trozos) mg metálico + III gotas HCl conc.

- **Pb (CH₃COO)₂ 1%**

MP + I gta Rvo. → PP ↓ blanco lechoso.

d) Compuestos Fenólicos:

Reacción con FeCl₃ 5%

MP + I gta Rvo en zona → amarillo-azul.

e) Alcaloides (acidular con el HCl 1% x 5 minutos c/tubo)

a. Dragendorff:

MP + I gta Rvo. → PP ↓ anaranjado.

b. Mayer: *MP + I gta Rvo → PP blanco lechoso.*

↓

3.5.4 Análisis Cromatográfico

Se disolvió una cantidad del extracto en etanol y sembramos en dos puntos de la cromatoplaque de Silicagel 60 G, a 1 cm aprox. del borde inferior de la placa, después se colocó en la cuba cromatografía con la fase móvil Cloroformo: Metanol (3:1). Después del recorrido por la fase móvil, se retiró la y se procedió a revelarla en luz UV 365nm y finalmente con FeCl₃.

3.5.5 Método para determinar la actividad antioxidante

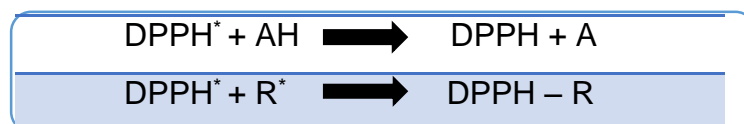
3.5.5.1 Cuantificación de fenoles totales por el Ensayo de Folin-Ciocalteu

- A. Tratamiento previo:** Se pesa 1g del extracto seco, y se diluye con 50mL de etanol en una fiola, posteriormente se sónica para mayor dilución del extracto.
- B. Cuantificación de fenoles totales:** La concentración total se midió con un espectrofotómetro Helios Z UV-Visible a una longitud de onda de 760 nm. Y se usó como oxidante el reactivo de Folin-Ciocalteu. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro UV-Vis
- C. Preparación de la curva de calibración:** Se utilizó ácido gálico como estándar para preparar una solución madre de 100 ppm (0.1 mg/mL). Se pesó 25 mg de estándar de ácido gálico y se llevó a una fiola de 25 mL, la cual se enrasó con agua destilada. Luego se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a una fiola de 10 mL la que se enrasó con agua destilada para obtener una solución de 100 ppm de ácido gálico. De esta solución, se tomaron 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L y 500 μ L para preparar las diluciones de 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm y 5 ppm, respectivamente.
- D. Procedimiento:** Antes de aforar los estándares a 10mL, agregar 1.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu a cada uno y sonicar por 5 minutos. Luego, agregar 6.25 mL de solución de carbonato de sodio 20% a cada dilución y enrasar a 10 mL, dejar en reposo por 2 horas protegido de la luz.
Nota: Preparar un blanco de 0 ppm con 1.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 6.25 mL de sol. Na_2CO_3 20% en una fiola de 10 mL
- E. Preparación de la muestra:** Tomar una alícuota de 2 mL y llevar a una fiola de 50 mL. Luego, tomar 1 mL de esta solución y llevar a una fiola de 10 mL. Finalmente, tomar una alícuota de 2.5 mL, agregar 3.75 mL de reactivo Folin, sonicar por 5 minutos a temperatura ambiente y agregar 3.75 mL de sol. Na_2CO_3 20%, dejar en reposo por 2 horas a temperatura ambiente protegido de la luz. Además se debe preparar un blanco tomando una alícuota de 2.5 mL de la dilución final y enrasando a volumen 10 mL.

3.5.5.2 Método de DPPH

A. Fundamento

Consiste en atrapar un átomo de hidrogeno que proviene del donador, este ensayo químico realizado in vitro tiende a cambiar su color de origen violeta al color amarillo de manera que desciende la absorbancia a 515nm⁶⁰, dándose la reducción de la siguiente manera:



B. Preparación de las concentraciones.

Se realizó el pesado de las muestras en tubos de ensayo (5 tubos) 0 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg,

Se procede a tapar los tubos con la muestra respectiva con papel aluminio y para asegurar con cinta.

Se rotulan los tubos con el peso respectivo, nombre de la muestra y solvente utilizado.(anexo 3)

C. Preparación de soluciones

Actividad antioxidante DPPH

Se utilizó el método del 1,1-difenil-2-picril hidrazilo hidratado (DPPH) en solución etanólica a concentración de 8 mg/mL, cinco diluciones etanólicas del extracto a concentraciones de 3µg/ml, 6µg/ml, 9µg/ml, 12µg/m, 15µg/ml y un blanco en etanol para calibración del espectrofotómetro UV/visible a cero y su posterior lectura de absorbancia a 517nm en espectrofotómetro. La vitamina C fue usado como patrón de comparación a concentraciones similares al extracto.

Se utiliza la siguiente fórmula para determinar la concentración del radical:

$$[\text{DPPH}] = (a \times \text{Abs}_{517}) + b$$

3.5.6 Método para determinar la actividad antimicrobiana

3.5.6.1 Método de difusión en agar

La técnica de eficacia antimicrobiana se realiza mediante el método de difusión en placa o método de Kirby Bauer, el cual define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Este método ha sido adaptado para evaluar la eficacia de una muestra vegetal con propiedades antimicrobianas frente a determinados microorganismos^{61, 62 y 63}.

A. Procedimiento

El procedimiento se realizó por triplicado de cada microorganismo estudiado y los resultados de la medición se reportaron sacando un promedio de los tres valores obtenidos.

B. Tratamiento de la muestra

Se obtuvo 16 gramos de extracto seco, al cual se le agregó agua destilada para disolverlo completando un volumen final de 50mL. Por lo tanto, la solución madre de trabajo fue de 320mg/mL (solución al 100%)

El extracto ya reconstituido se trabajó a 4 concentraciones:

320mg/mL (100%), 240mg/mL (75%), 160mg/mL (50%) y 120mg/mL (25%).

Para realizar las diluciones a partir del extracto reconstituido, se usó agua destilada y dichas diluciones se realizaron de la siguiente forma:

- 100%: se colocó 5mL del extracto en un vial.
- 75%: se colocó 3.75mL del extracto en un vial y se completó con 1.25mL de agua destilada
- 50%: se colocó 2.5mL del extracto en un vial y se completó con 2.5mL de agua destilada.
- 25%: se colocó 1.25mL del extracto en un vial y se completó con 3.75mL de agua destilada

Se utilizó pocillos para el análisis de difusión en placa, los cuales se llenaron con la muestra a analizar, la cantidad de muestra agregada a los pocillos fue de 30 μ L. La que se realizó por triplicado. También, se agregó el diluyente (agua destilada) en cada uno como control negativo, la cantidad de diluyente agregada a los pocillos también fue de 30 μ L.

C. Preparación del agar Mueller Hinton

El agar Mueller - Hinton debe ser preparado con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Autoclavar el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar, dejar enfriar en baño maría a 45 - 50°C. Una vez temperado, verter el preparado fresco y tibio a placas petri de vidrio estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25- 30 ml para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar debe dejarse enfriar a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar Mueller Hinton debe tener un pH entre 7,2 - 7,4. Esta medición puede realizarse sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

D. Preparación de los inóculos bacterianos

A partir de colonias puras de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, tomar una cierta cantidad de colonias y diluirlas en respectivos tubos de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que la solución resultante tenga una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de MacFarland⁶⁴ (escala turbidimétrica que consiste en una serie de tubos con turbidez creciente que permite hallar la concentración aproximada de una solución bacteriana) el cual corresponde a una concentración de 3x10⁸ ufc/mL. A partir de esta última solución, realizar una dilución de 1 en 3, de esta solución preparada, tomar 3 mL y diluirlo a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca. Todos los materiales usados deben ser estériles y también el área de trabajo. La solución resultante tendrá una concentración de 1x10⁸ ufc/mL.

E. Inoculación de las placas

Agregar 100 μL del inóculo bacteriano preparado (1×10^8 $\mu\text{fc}/\text{mL}$) a cada una de las placas y con la ayuda de una espátula de Drigalsky esparcir el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se desliza el asa en la placa en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego, se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas. Dejar secar 3 a 5 minutos antes de realizar los pocillos.

F. Preparación del antibiótico:

Se utilizó Gentamicina $10\mu\text{g}$.

G. Formación de los pocillos en las placas inoculadas

Proceder primero a esterilizar el sacabocados con alcohol, quemándolo en el mechero, luego, con mucho cuidado, realizar los pocillos, se deben hacer tres por cada placa. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de tal manera que no haya superposición de los halos de inhibición.

Luego de formados los pocillos debe colocarse la muestra. Se usó una placa para cada dilución, se hizo tres pocillos por cada placa y a cada pocillo se le agregó $30\mu\text{L}$ de la respectiva dilución de la muestra. Posteriormente, la placa se incubó a $35-37^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas.

De la misma forma se realizó con el control positivo y con la muestra blanco.

H. Interpretación de los resultados

Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en milímetros pasando por el centro del pocillo. La medición se realiza con un vernier digital. Los valores de las mediciones por triplicado deben promediarse y compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por el antibiótico.

3.5.6.2 Método de microdilución colorimétrica.

A. Microorganismos de estudio:

Se realizó el sembrado de la cepa bacteriana (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) en TSA y se dejó incubar durante 24 horas para después realizar el procedimiento de MIC, pues este procedimiento requiere trabajar con cepas bacterianas frescas.

Se necesita realizar tres pasos muy importantes⁶⁵.

- **Inoculo:**

Los microorganismos se sembraron en agar tripticasa de soya y se incubaron 24 horas a 37°C; luego, se re suspendió cada inóculo en solución salina estéril (0.9%) hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Además, se realizó de cada uno, una dilución 1:30 con caldo Müller Hinton, y se obtuvo así un inóculo 2X. Para la prueba, se consideró que por cada 10mL del inóculo 2X se agregó 50µL de resazurina (20 mg/mL).

- **Muestra:**

Se procede a pesar 100 mg de muestra seca de *Polylepis incana* Kunth y luego se le adicionó 50µL de DMSO y 950µL de caldo Müller Hinton y se trabajó trabajando con una concentración de 100 mg/mL (2X).

- **Control de esterilidad:**

A 2mL de caldo Müller Hinton, se agregó 10µL de resazurina.

B. Procedimiento

Para llevar a cabo la prueba de microdilución colorimétrica fue necesario utilizar el protocolo modificado para demostrar la menor concentración de la muestra capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias.

C. Prueba de microdilución:

Las micro placas a utilizar fueron de 96 pocillos y con fondo en forma de U las cuales estaban estériles, necesarias para la realización de esta prueba⁶⁶. La distribución de la muestra se realizó teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de micro dilución (Tabla N°12). Este micro placa posee 12 filas en las que se distribuyó de la siguiente manera:

- De la fila (1B - 1D y 1F – 1H), se agregó 200 µl del control de esterilidad (CE).
- De (2B – 2D y 2F - 2H) y (3B-3D y 3F-3H), se agregó 100 µl de la muestra.
- De la columna 3 hasta la columna 12, se agregó 100µL de caldo Müller Hinton.
- De la columna 3 hasta la columna 11, se realizaron diluciones sucesivas transfiriendo 100 µL.
- De la columna 2 hasta la columna 12, se le agregó 100 µl del inóculo (2X).
- Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 horas en condiciones aeróbicas.

Tabla N° 12: Diseño de la microdilución colorimétrica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A														
B	CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP	} BACTERIA (A)	
C	CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP		
D	CE	50	25	2.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP		
E														
F	CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP	} BACTERIA (B)	
G	CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP		
H	CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP		

Leyenda: CE: Control de esterilidad. , CP: control positivo. **Concentraciones:** µg/mL,

Fuente: Elaboración propia.

Lectura de los resultados. En el reporte de los resultados, se dio de manera visual, reportándose el cambio de color de purpura - rosado o también incoloro. Para determinar la CMI, se tomó como referencia el menor índice de concentración en el cual no hubo ningún cambio de coloración. “Según las recomendaciones de Wiegand et Para una correcta lectura se tomó los promedios de tres cifras, las que fueron calculados y reportados como la CMI”⁶⁷.

Interpretación de resultados Para la explicación del efecto se tuvo en cuenta los parámetros de Paredes y Holet “Se consideró que el extracto etanólico posee una actividad antimicrobiana cuando el CMI ≤ 1000 µg/mL. La actividad antimicrobiana se clasifica de la siguiente manera”:⁶⁸(Ver Tabla 13).

Tabla N° 13: Clasificación de la actividad antimicrobiana según el valor del CMI

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	CMI
ACTIVIDAD DÉBIL	500 a 1000 µg/mL
ACTIVIDAD MODERADA	100 < 500 µg/mL
BUENA ACTIVIDAD	< 100 µg/ML

Fuente: Paredes y Hole⁶⁸

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS PARCIALES

4.1.1 Ensayo de Solubilidad

En el ensayo de solubilidad, se puede determinar que el extracto etanólico de las hojas de las hojas de *Polylepis incana Kunth* es soluble en etanol. (Anexo N°7)

Tabla N° 14: Resultado de ensayo de solubilidad

ENSAYO DE SOLUBILIDAD	
1.- Mp + diclorometano	Poco soluble
2.- Mp + butanol	Poco soluble.
3.- Mp + metanol	Poco soluble.
5.- Mp + etanol	Soluble.
4.- Mp + agua	Poco soluble

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Se observa que la muestra presenta mayor solubilidad con etanol.

4.1.2 Tamizaje fitoquímico

En el tamizaje fitoquímico realizado a la muestra se pudo concluir que el extracto de las hojas de *Polylepis incana Kunth* tiene gran cantidad de compuestos fenólicos (+++), alcaloides (++), taninos (++) y flavonoides (++) .

Tabla N°15: Resultado del tamizaje fitoquímico.

TAMIZAJE FITOQUIMICO DE <i>Polylepis incana kunth</i>		
Muestra problema	Resultados	Metabolitos
Gelatina 1gota +mp	(++)	TANINOS
Nihidrina 1gota + mp	(-)	AMINOÁCIDOS
FeCl ₃ 1gota + mp	(+++)	COMPUESTOS FENÓLICOS
Dragendorf 1gota + mp	(++)	ALCALOIDES
Rvo mayer 1 gota + mp	(++)	ALCALOIDES
NaOH 10% 1 gota+ mp	(+)	QUINONAS
Shinoda + mp	(++)	FLAVONOIDES
H ₂ SO ₄ y MOLISH + MP	(+)	GLICÓSIDOS

Fuente: Elaboración propia,2018.

Leyenda: (+++) Muy abundante; (++) Abundante; (+) Positivo; (-) Negativo.

En el contenido de la tabla N°15 se observa el resultado de la marcha fitoquímica en donde la mayor cantidad de metabolitos secundarios encontrados son los compuestos fenólicos, seguido de, taninos, alcaloides y flavonoides.

4.1.3 Ensayo cromatografía en capa fina

Cromatografía en capa fina revelada con $AlCl_3$ y Revelado en Luz UV 365 nm del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana Kunth*

Sistema de solventes: Cloroformo: Metanol (3:1) Las manchas que se visualizan al utilizar el $FeCl_3$ indican la presencia de compuestos fenólicos.



Figura N°5: Revelado de la placa Cromatográfica

Fuente: Elaboración propia, 2018

Actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana kunth*.

4.1.4 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Factor de dilución (Fd): 25000

Vol muestra: 2 mL; Vol final en la lectura: 2.5 mL

Se obtuvo los siguientes resultados de una muestra de extracto por duplicado.

Tabla N°16 Resultado de cuantificación de fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu

	Abs	[mg ácido gálico/ gr extracto]	Media	Desv. estándar	%RSD
Muestra 1	0.311	1.479	1.443	0.0205	1.42107
Muestra 2	0.300	1.406			

Fuente: Elaboración propia, 2018.

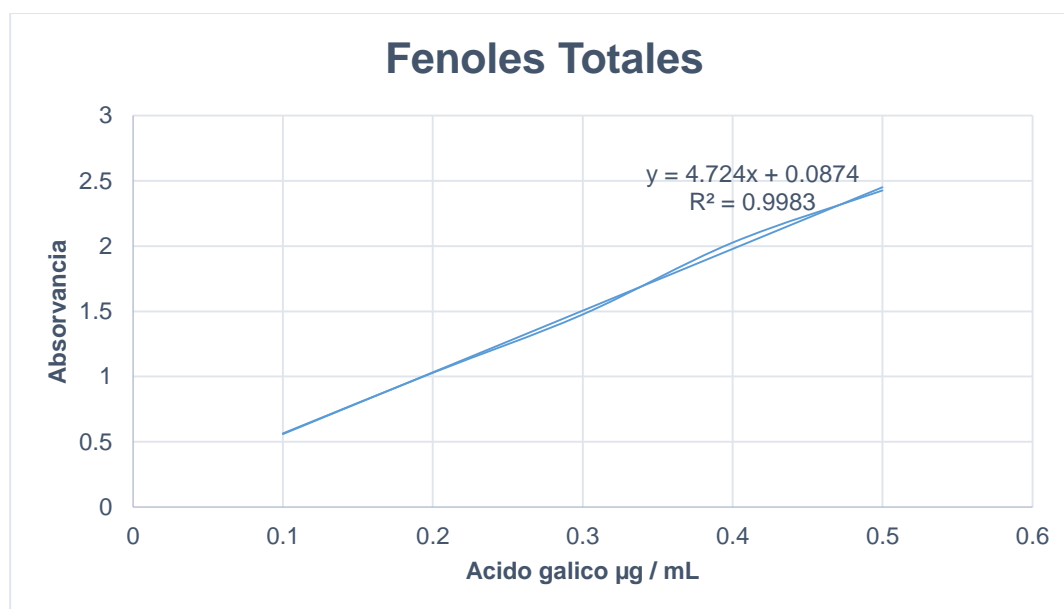


Figura N°6: Gráfica de la cuantificación de fenoles totales mediante el ensayo método de Folin-Ciocalteu

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Cálculos:

$$[\mu\text{g ácido gálico} / \text{mL de extracto}] = \frac{[\mu\text{g/mL}] \times \text{Fd} \times \text{Vol final}}{\text{Vol. Muestra}}$$

Tanto en la tabla como en la figura observamos la media calculada resultante de la fórmula aplicada, donde el resultado obtenido de 1.443 evidencia la presencia de gran cantidad de compuestos fenólicos presentes en nuestro extracto.

4.1.5 Actividad Antioxidante DPPH

Tabla N° 17: Datos de las concentraciones y absorbancias del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth.

DPPH MUESTRA λ 517nm

Abs 0 DPPH 0.919

Muestra en Rx (M/3)	Muestra en tubo (M)	Absorbancias Promedio	% Captación	
0	Control (DPPH+ETOH)	0.622	0	IC 50=3.71
1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	0.557	10.4501608	
2 $\mu\text{g/mL}$	6 $\mu\text{g/mL}$	0.451	27.545552	
3 $\mu\text{g/mL}$	9 $\mu\text{g/mL}$	0.366	41.1039657	
4 $\mu\text{g/mL}$	12 $\mu\text{g/mL}$	0.279	55.1982851	
5 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	0.217	65.0589496	

Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la tabla N°17, se observan los porcentajes de captación del radicales libres DPPH para cada concentración de la muestra y el IC50 que expresa la concentración en la que se neutraliza el 50 % de los radicales libres DPPH siendo este de 3.71 $\mu\text{g/mL}$.

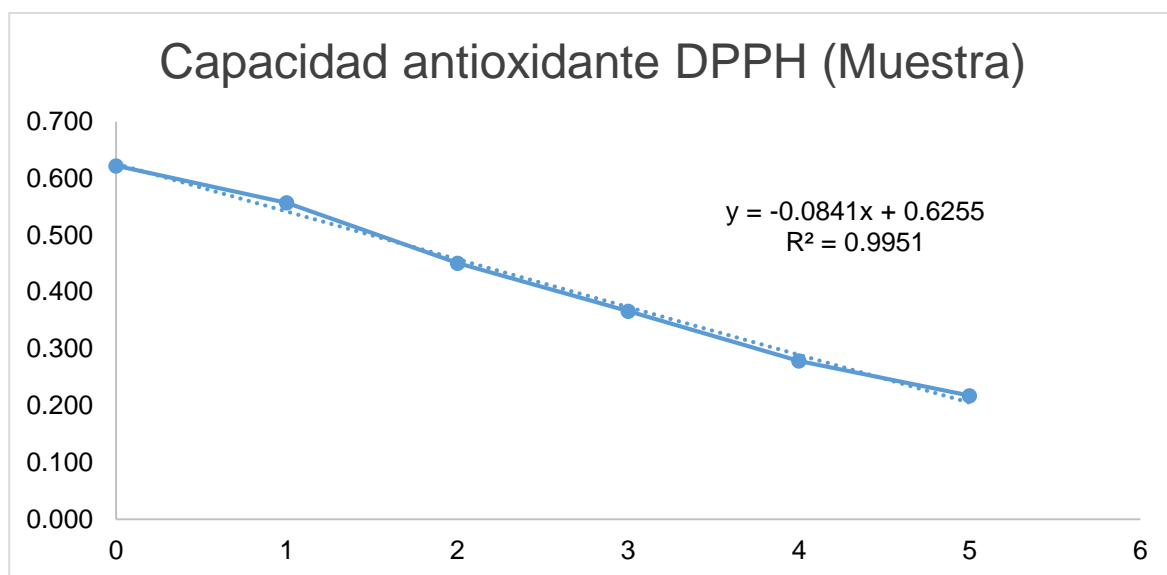


Figura N° 7: Actividad antioxidante de *Polylepis incana* Kunth por el método de DPPH.

IC 50=3.71 µg/mL,

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Tabla N°18: Datos de las concentraciones y absorbancias del estándar de vitamina C.

DPPH St Vit C

$\lambda = 517\text{nm}$

Abs 0 - DPPH : 0.91

Muestra en Rx (M/3)	Muestra en tubo (M)	Promedio	% Captacion
0	Control (DPPH+ETOH)	0.619	0
0.8 µg/mL	2.4 µg/mL	0.505	18.5145318
1.2 µg/mL	3.6 µg/mL	0.431	30.3552207
1.6 µg/mL	4.8 µg/mL	0.356	42.5188375
2 µg/mL	6 µg/mL	0.283	54.3057051
2.4 µg/mL	7.2 µg/mL	0.218	64.8546825

Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la tabla N°17, se observan los porcentajes de captación del radicales libres DPPH para cada concentración vitamina C y el IC50 que expresa la concentración en la que se neutraliza el 50 % de los radicales libres DPPH siendo este de 1.84 $\mu\text{g/mL}$.

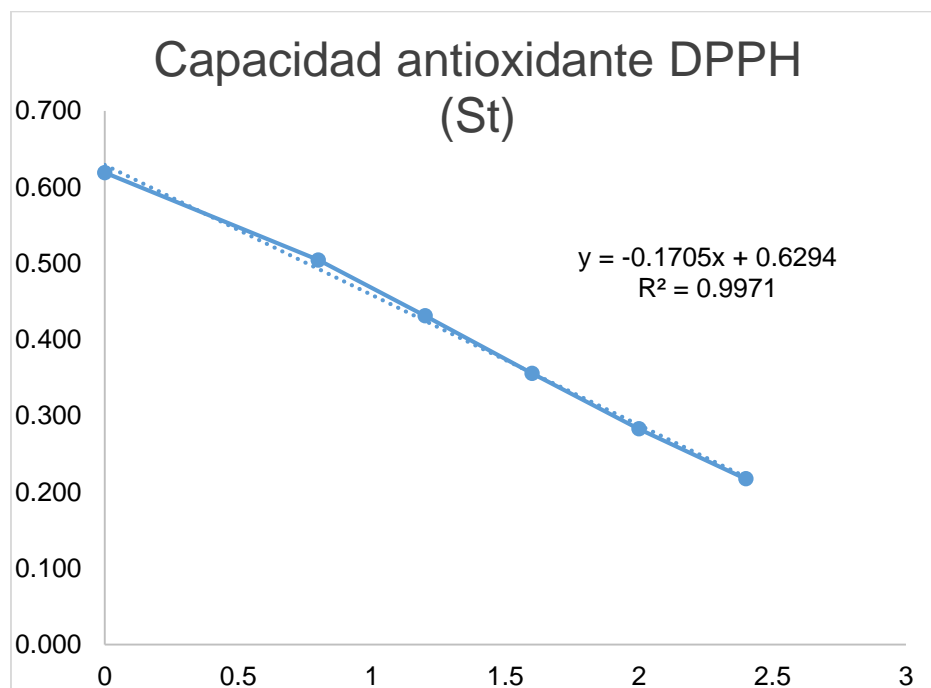


Figura N° 8: Actividad antioxidante del estándar de vitamina C
IC 50 = 1.84

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Se observa la gráfica de absorbancia vs concentración del estándar de vitamina C utilizada en el ensayo de DPPH.

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana kunth*.

4.1.6 Análisis Microbiológico

Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cuantitativa, se tomó como referencia los diámetros de halo de inhibición, y para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cualitativa, se tomó como referencia la escala de Duraffourd (utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición).³¹. Nula (-) si es inferior o igual a 8 mm 2; Sensible (Sensible =+), de 9 a 14 mm 3; Muy sensible, (muy sensible = ++), de 15 a 19 mm 4. Sumamente sensible (S.S=+++), si fue igual o superior a 20 mm³¹.

Tabla N°19: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Polylepis incana Kunth* en *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 por el método de difusión en agar.

Microorganismos	Controles			Muestra			Resultados
	Diámetro de Inhibición (mm)			Extracto			Promedio
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027	Gentamicina 10µg			100% (320mg/mL)			
	21	21	21	6	6	6	6
				75% (240mg/mL)			
				6	6	6	6
				50% (160mg/mL)			
				6	6	6	6
	Agua destilada			25% (120mg/mL)			
6	6	6	6	6	6	6	

Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la tabla N°19 contiene el diámetro de inhibición formado por la cepa *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 en las cuatro concentraciones trabajadas, frente al halo de inhibición formado por la gentamicina.

Tabla N°20: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Polylepis incana Kunth* en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por el método de difusión en agar.

Microorganismos	Controles			Muestra			Resultados
	Diámetro de Inhibición (mm)			Extracto			Promedio
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Gentamicina 10µg			100% (320mg/mL)			100%
	20	19	19	24	24	23	23.6mm
				75% (240mg/mL)			75%
				23	22	23	22.6mm
				50% (160mg/mL)			50%
				19	20	19	19.3m
	Agua destilada			25% (120mg/mL)			25%
6	6	6	19	19	19	19mm	

Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la tabla N°20 contiene el diámetro de inhibición formado por la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en las cuatro concentraciones trabajadas, frente al halo de inhibición formado por la gentamicina; donde el mayor resultado obtenido es a una concentración del 100%.

Tabla N° 21: Determinación del resultado de CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP
CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP
CE	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098	CP

Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la tabla N°22, se toma la concentración más baja a la cual no se produjo el cambio de color y se toma como el valor de la CMI (0.78) para luego ser calculado el promedio

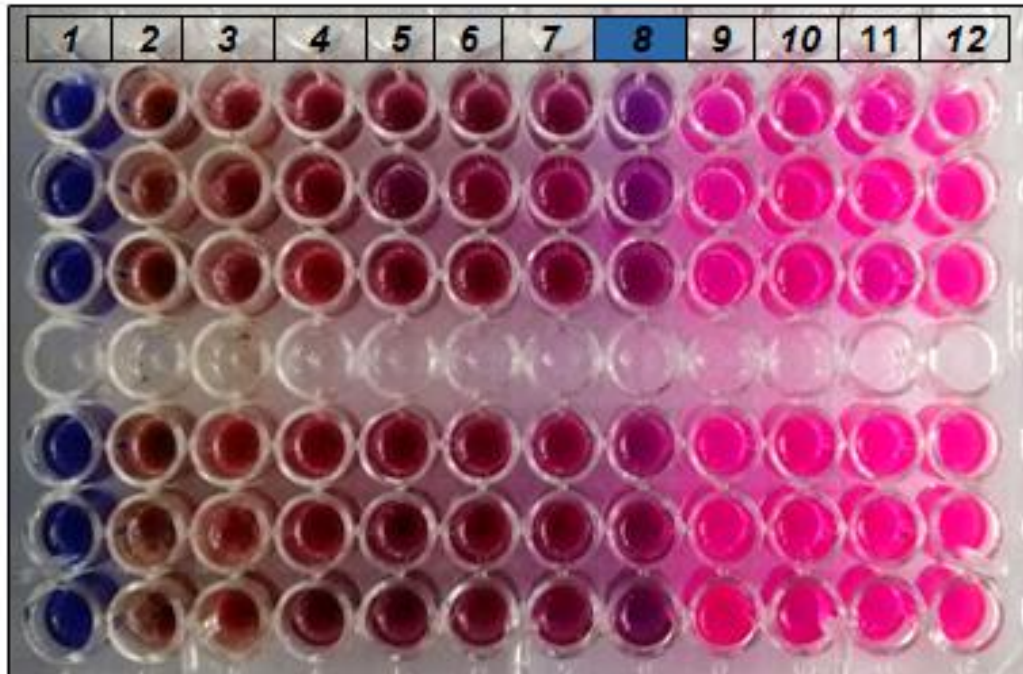


Figura N° 9: Procedimiento de la CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC

100mg	Muestra
50 µL	DMSO
950 µL	Caldo MH
CONCENTRACION 100 mg/ml	

PROMEDIO	0.78 +0.78 +0.78/3
CMI	0.78 mg/mL
Resultado	
Final en µ/ mL	780 µg/mL

4.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El tamizaje fitoquímico realizado al extracto etanólico de las hojas de *Polylepis Incana Kunth* evidenció gran cantidad de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos y flavonoides. (Tabla N° 15). Bareño y cols (2010)⁶ encontraron, además, la presencia de saponinas, y en pequeñas cantidades de triterpenos y esteroides. Según la cromatografía de capa fina se pone en evidencia la presencia de compuestos fenólicos al ser revelados con FeCl₃ atribuyéndole la actividad antioxidante que pueda tener esta especie según estudios realizados por *Murat Uygun*³¹.

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó según el método de neutralización del radical DPPH descrito por Brand-Williams donde se obtuvo un índice de captación (IC₅₀) de 3.71 µg/mL, el cual corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y con un porcentaje de captación de máximo de 65.06% (15 µg/ ml) del radical DPPH Fig.7).

La cuantificación de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu fue de 1.443mg/Eq de ácido gálico/gr de extracto, al no haber un rango específico de comparación, se tomó como referencia los resultados obtenidos por Aristimuño para la especie *Polylepis australis* Bitter (Queñoa) siendo 6,8 mg EAG/gr E. y para el DPPH un porcentaje de depuración superior al 87 % (a 200 µg/ ml),⁴ los cuales evidencian que el extracto de *Polylepis Incana Kunth* tiene mayor capacidad antioxidante respecto a la especie *Polylepis australis* Bitter.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se realizó el método de difusión en pozos de agar para cuatro concentraciones al 100%, al 75%, al 50% y al 25%. Como placa control se usó la gentamicina 10ug y se obtuvo para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 actividad nula, y para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se obtuvo un halo de inhibición de 23.6 mm a una concentración de (320 mg/mL) al 100% a partir del método de difusión en pozos de agar. Se trabajó el método de microdilución colorimétrica (MIC) y se obtuvo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 0.78 mg/mL, según los parámetros de Paredes y Holet nuestro extracto cumple con su acción antimicrobiana al ser menor de “1000 µg/mL

Resultados similares reportó Caceda (2012)⁶ del estudio realizado al extracto de las hojas de *Polylepis rugulosa* para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 un halo de 11.2mm y la CMI de “4,375 mg/mL”, sin embargo, Daud , et al. (2008)⁵ en el estudio realizado del extracto alcohólico de las hojas de *Polylepis australis* Bitter (Queñoa) reportó para *Staphylococcus aureus* un halo de inhibición de 8-11 mm con una CMI de 1,25mg/mL y para *Pseudomonas aeruginosa* un halo de 6-9 mm con una CMI de 2,5 mg/MI. Estos resultados no coinciden con los encontrados en la investigación respecto a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC ATCC 9027 probablemente la diferencia se deba a que a pesar de ser del mismo género pertenecen a distinta especie.

El extracto etanólico realizado de las hojas de *P. incana* Kunth evidenció mayor actividad para *Staphylococcus aureus* corroborando los estudios antes mencionados en el caso de la *Pseudomonas aeruginosa* no se evidenció actividad lo cual es debido a que las bacterias gramnegativas poseen una membrana resistente a varios antibióticos.

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

- 1.El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth presenta metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, quinonas y alcaloides.
- 2.El extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* Kunth tiene actividad antioxidante, la cual se evidencia mediante el índice de captación (IC50) de 3.71 µg/mL, el cual corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Se cuantificó el contenido de fenoles totales presentes en el extracto mediante el ensayo de Folin Ciocalteu y se obtuvo 1.44mg/EAG / gr de extracto seco.
- 3.El extracto etanólico de las hojas *Polylepis incana* Kunth tiene actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus* (grampositivo), pero no evidencia actividad antimicrobiana frente a *Pseudomona aeruginosa*.

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar más investigación sobre la actividad antioxidante de otros órganos de la planta de *Polylepis incana* kunth, y realizar diferentes métodos de extracción.
- Realizar una separación y reconocimiento de metabolitos secundarios específicos responsables de la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de la planta *Polylepis incana* kunth.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kessler, M. Bosque de *Polylepis*. Botánica Económica de los Andes Centrales Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – 2006; p. 110-120.
2. Sánchez M. "Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems" Food Science and Technology International. (2002) pp. 121-39
3. Daud T, Habib I, Sánchez R et al. Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). Rev Cubana Plant Med. 2007; 12(4): p.1-4 ISSN 1028-479 [Consultado 01 de setiembre 2017]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v12n4/pla07407.pdf>
4. Aristimuño M, Reynoso M, Habib N, Daud, A et. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de dos especies vegetales de uso en medicina popular- CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Argentina (2008) [Consultado 01 de setiembre 2017].
https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=30621&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=2745172
5. Daud T, Habib I, Sánchez R et al. Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). Rev Cubana Plant Med ISSN 1028-4796. 2008; 13(3): p.1-11 [Consultado 01 de agosto 2017]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v13n3/pla06308.pdf>
6. Cáceda Q. Evaluación de la actividad antibacteriana "in vitro" del extracto alcohólico de las hojas de *Polypesis rugulosa* ("queñua") frente a cultivos bacterianos uropatógenos aislados en el Hospital Hipólito Unanue - Tacna. Revista Ciencia & Desarrolla 2012; 14: 51-58. [Consultado 01 de agosto 2017]. Disponible en: <http://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/CYD/article/download/270/227>.

7. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000; 355: p. 1179-1180.
8. Mark R, McCalland B. Can antioxidants vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(7/8): p. 1034-1053.
9. Tereschuk M, Quarenghi M, González M, Baigorí M. . Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes del noa*. *Boletín latinoamericano y del caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2007 6(6): pp. 364-366 CHILE [Consultado 2 nov. 2017]. Disponible en : <http://www.redalyc.org/pdf/856/85617472026.pdf>
10. Herve P, Córdova W, González L, Payo L. Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. *Rev Cubana Farm* [Internet]. 2006 Ago. [consultado 07 Nov 2017]; 40(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152006000200007&lng=es.
11. Modak B, Arrieta A, Torres R, Urzua A. Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso De *Heliotropium Sinuatum*: efecto del tipo de estructura. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 2002; 47 (1) Concepción CHILE. [Consultado 10 nov. 2017]. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442002000100005>
12. Bremer R. Vasquez R & Rojas R. *The angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: apg ill. Botanical journal of the linnean society*. 2009; 161(2): p. 105-121.
13. Castro J. "Caracterización del bosque de *Polylepis de Jurau*, microcuenca de Paria, Ancash" [Tesis] Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina (2014) [Consultado 20 De Agosto 2017]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2356/K10-C3552-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
14. Betancourt J y Rojas M. Rizogénesis in vitro a partir de yemas de *Polylepis incana* Kunth., y *Polylepis pauta* Hieron., con la ulterior determinación de la especie viable para crecimiento in situ en la zona de Papallacta. [Tesis] EC.2011 [Consultado el 14 Oct. 2017]. Disponible en <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3598/1/QT03005.pdf>.

15. Kessler M. Bosques de *Polylepis* Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. BO. 2006: p.110-120. [Consultado 01 de agosto 2017]. Disponible en: <http://beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2007.pdf>
16. Mendoza W, Cano A. Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) en los Andes peruanos Rev. Perú. biol. (Agosto 2011) 18(2): p.197 - 200 Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM ISSN 1561-0837
17. Arévalo R y García B. Hablemos de nuestros árboles: Potencial y caracterización campesina de árboles nativos andinos. Huaraz, PE, TMI. 2001: p 27
18. Quispe M. "Propagación vegetativa de esquejes de queñua (*Polylepis besseri* Hieron) en base a la aplicación de dos enraizadores naturales y tres tipos de sustratos en el vivero de la comunidad de Huancané" [Tesis] La Paz – Bolivia Universidad Mayor de San Andrés Facultad de agronomía carrera Ingeniería Agronómica: 2013
[Consultado 21 de agosto 2017]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/4136/1/T-1887.pdf>
19. Simon H, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis. (2000): 5, p.415-418.
20. Kraaij M, van der Kooij S, Reinders M, Koekkoek K, Rabelink T, van Kooten C, Gelderman K. (Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology* (2011). 49, 549-557.
21. Bouaziz C, Sharaf el dein O, El Golli E, Abid-Essefi S, Brenner C, Lemaire C, Bacha H. "Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*". 2008: 254, 19-28.

22. Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging*. (2012). 33, 199.e1-199.e12.
23. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:79 , ,15-
24. Pryor W. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiology*. 1986; 48: 657-670.
25. Slater T. Free radical mechanisms in tissue injury. *Journal Biochemistry*. 1984; 222: p.1-15.
26. Brewer M. "Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Institute of Food Technologist - Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2011; 10: 221–247.
27. Ballard T. "*Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins*". Tesis Doctoral. Blacksburg, Virginia. Estados Unidos. 2008: 156
28. Paredes S y Roca F. *Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. Bioquímica 98 Offarm 2002 Vol 21*.
29. Lock O. Investigación Fitoquímica, Método en el Estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial PUCP. Lima. 1994: p. 111-145.
30. Lee C Y. *Phenolic Compounds en Encyclopedia of food Science and Technology*. Vol 3. Hui, Y. H. (Editor) 1992: p. 2055-2061. Wiley & Sons Inc., New York, EUA.
31. Decker E.A.1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants. *Nutritional Reviews*. 55 (1): 396-398
32. Correa A. Estudio de la actividad "in vitro" de compuestos fenólicos presentes en el vino y de seis antimicrobianos en aislados clínicos de "Helicobacter pylori".(2015)
33. Martínez Flórez S J, González Gallego J M, Culebras y M J Tuñón Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes *Nutr. Hosp*. XVII (6) (2002). 271-278

34. Pérez Trueba G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed 2003,22:48-57.
35. Escamilla J, Christopher Yane C, Elvis Cuevas M, Guevara F. Jorge Rev Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Fac Med UNAM 2009 : Vol. 52:2 disponible en Monografía [Consultado 20 Oct 2017] ; Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
36. Saskia ABE, van Accker y Bast AALT: Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: Flavonoids in health and Disease. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1998, 9:221-251
37. Estrada R, Ubaldo D, Araujo A. "Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central". Rev. Salud Mental Vol. 35, No. 5 : 2012 ; 35: pp 375-384
38. Arora A, Byrem T M, Nair M G. y Strasburg G M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Arch.Biochem.Biophys. 373, 102-109.
39. Oteiza P I, Erlejman A G, Verstraeten, S V, Keen C L y Fraga C G. (2005). *Flavonoid membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface* Clin.Dev.Immunol. pp 19–25.
40. Cartaya O y Reynaldo I. Flavonoides: *Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba vol. 22, núm. 2, 2001, pp. 5-14* [Consultado 06 Dic 2017] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>
41. Lock Sing Olga. *Colorantes Naturales*, Pontificia Universidad Católica del Perú, 1997: 72.
42. Ruiz & Moreno. Tratado de SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial Medico Panamericana. Buenos Aires (2005).
43. Ruiz de Gopegui E. "Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en Staphylococcus Spp." en Centros sanitarios de Mallorca durante los últimos 15 años (1999-2013)[Tesis Doctoral] - 2015 [Consultado 30 Dic 2017] Disponible En: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/384005/Tergb1de1.Pdf?sequence=1>

44. Ryan KJ, Ray CG (Editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed. edición). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
45. Bodi M, Gamacho, J. Pseudomonas aeruginosa Tratamiento combinado frente a M. Medicina Intensiva. 2007: p.83-87
46. Soberón G. Pseudomonas aeruginosa, Universidad Nacional Autónoma de México. 2015. [Consultado 20 Dic 2017] ; Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
47. Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of Staphylococcus aureus. J Clin Infect. 2003; 111: 1265-1273.
48. Casellas JM. "Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología". Rev Panam Salud Publica. 2011; 30(6):519-28.
49. Roginsky V, Lissi E A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem. 92, 235-254
50. Huang D. Ou B. Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. 2005
51. Fukumoto L R, Mazza G. (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. 48:3597-3604.
52. Camila Uribe-Holguín. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas de *Pentacalia Corymbosa* Y *Pentacalia Nitida* (asterales: asteráceae). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias 2010.
53. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28 (1995) pp 25-30
54. Luz Stella Ramirez. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Cientia Et Technica 42, Universidad Tecnológica de Pereira. Agosto de 2009. [Consultado 10 Dic 2017] 42: 263-268. Disponible en <http://docplayer.es/43545313-Metodologias-para-evaluar-in-vitro-la-actividad-antibacteriana-de-compuestos-de-origen-vegetal.html>
55. Leonardo J M. "El Agente Infeccioso" Rev. Med. Hosp. Nal. Niños 1977; 12 (2); 115-118.
56. Jawetz E. Quimioterapia antimicrobiana. Manual de microbiología médica. 9ed. México. 1989: pp110-53.

57. Rathore H S, Begun T, J. Planar Chromatogr. 4 (1991) 451.
58. Picazo J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecc y MicroClínica Juan.
59. Cheesman Kh, Slater Tf. Free Radicals In Medicine. Br Med Bull 1998;49:118-21
- 60.** Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para Determinar Capacidad Antioxidante Horiz Med 2015; 15 (1): 57-60
61. Nordarse R y col. Determinación del poder bactericida de la crema de vancomicina al 0,5 % frente a Staphylococcus aureus. Revista Cubana de Medicina Militar. [Internet] 2009 [Consultado 27 enero 2018];38(3-4)73-78. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v38n3-4/mil083-409.pdf>
62. Cavalieri S y col. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. [Internet]. Seattle, Washington; 2005 [Consultado el 27 enero 2018].242p. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=270
63. Davis y col. Effects of Commonly Used Topical Antimicrobial Agents on Acinetobacter baumannii: An In Vitro Study. Military Medicine, [Internet] 2008 [Consultado el 30 de enero 2018] 173, 1:74–78, disponible en: <http://militarymedicine.amsus.org/doi/pdf/10.7205/MILMED.173.1.74>
64. Ostrosky, E y col. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia [Internet]. 2008 [citado el 07 de febrero de 2018]. 18(2): 301-307. Disponible en URL: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n2/26.pdf>
65. CLSI. “*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*”: Ninth Edition. Vol. 32, CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory 2012. Pp 88
66. Ruiz J. Actividad Antifúngica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.

67. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances." *Nat Protoc.* 2008; 3(2): pp163–75.
68. Paredes P et al. "Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. *Evidence-based Complement Altern Med.*" 2016

ANEXOS

ANEXO N°1: Matriz de consistencia

FORMULACION DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODO DE INVESTIGACION
<p>General: ¿Tendrá actividad antioxidante y antimicrobiana el extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth?</p> <p>Específicos. 1. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth presentara metabolitos secundarios?</p> <p>2. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth, tendrá actividad antioxidante?</p> <p>3. ¿El extracto etanólico de las hojas <i>Polylepis incana</i> Kunth, tendrá actividad antimicrobiana frente a los microorganismos <i>Staphylococcus aureus</i> (grampositiva) y <i>Pseudomona aeruginosa</i> (gramnegativa)?</p>	<p>General: Determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth.</p> <p>Específicos: 1. Identificar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth.</p> <p>2. Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth mediante el método de radicales libres - DPPH y cuantificar el contenido de fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu.</p> <p>3. Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas <i>Polylepis incana</i> Kunth, frente a los microorganismos <i>Staphylococcus aureus</i> (grampositiva) y <i>Pseudomona aeruginosa</i> (gramnegativa).</p>	<p>General: El extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth tiene actividad antioxidante y antimicrobiana.</p> <p>Específicas 1. El extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth tiene metabolitos secundarios.</p> <p>2. El extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth presenta actividad antioxidante.</p> <p>3. El extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth presenta actividad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (grampositiva) y <i>Pseudomona aeruginosa</i> (gramnegativa).</p>	<p>Variable independiente Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las de <i>Polylepis incana</i> Kunth.</p> <p>Variable dependiente: • Actividad antioxidante • Actividad antimicrobiana</p>	<p>VI. Tamizaje fitoquímico de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Polylepis incana</i> Kunth.</p> <p>VD. • Cuantificación de fenoles totales • Capacidad antioxidante equivalente Vitamina C. • Capacidad antimicrobiana</p>	<p>VI. • Flavonoides • Compuestos fenólicos • Ensayos de solubilidad • Cromatografía en capa fina.</p> <p>VD. • Miligramo de Equivalentes de Acido Gálico/gr de extracto seco • Concentración de DPPH • Diámetro del halo de inhibición en mm • Concentración mínima inhibitoria.</p>	<p>- Enfoque: Cuantitativo</p> <p>- Tipo: Experimental</p> <p>- Diseño: Transversal</p> <p>- Instrumentos Información bibliográfica, pappers, revistas, tesis.</p> <p>- Técnicas - Método de Folin - Ciocalteu. - Método DPPH - Método in vitro - Método de difusión en agar - Método de dilución en caldo MIC</p>

ANEXO N°2: Certificación botánica

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta proporcionada por las Srtas. DEBORA ANTONIA HUAMAN JIMENEZ y MARIA PRESMERITA CUBAS VILLANUEVA, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Polylepis incana* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Rosales
Familia: Rosaceae
Género: *Polylepis*
Especie: *Polylepis incana* Kunth

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 04 setiembre 2017


Bigo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
C.B.P. 2719

ANEXO N° 3: Certificado de cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: *S. aureus* ssp *aureus* ATCC 6538 PK/5
Lot Number: 633937

Product Number: R4607016
Expiration Date: 2019-09-30
(YYYY-MM-DD)

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

Purity:

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

Viability And Quantification:

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

Macroscopic And Microscopic Morphology:

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

Biochemical Analysis:

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

CFU/loop: >10(4)

Gram Reaction: Gram Positive Cocci

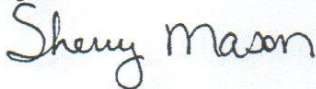
Passage: 3

Biochemical Profile: Vitek 2C GP

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

ANEXO N° 4: Certificado de cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: P. aeruginosa ATCC 9027 PK/5
Lot Number: 650614

Product Number: R4605210
Expiration Date: 2019-09-30
(YYYY-MM-DD)

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

Purity:

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

Viability And Quantification:

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

Macroscopic And Microscopic Morphology:

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

Biochemical Analysis:

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

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Negative Rod

Biochemical Profile: Vitek 2C GN

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed

Sherry Mason

Product Performance Technologist

ANEXO N° 5: *Polylepis incana* kunth en su estado natural antes de ser recolectada



Fig. N°10: Ramas de *Polylepis incana* kunth



Fig.N°11: Árbol de *Polylepis incana* kunth



Fig. N°12: Hojas de *Polylepis incana* kunth

ANEXO N° 6: Limpieza, secado y preparación del extracto de hojas secas de *Polylepis incana* Kunth.



Figura N°13: Limpieza de las hojas de *Polylepis incana* kunth



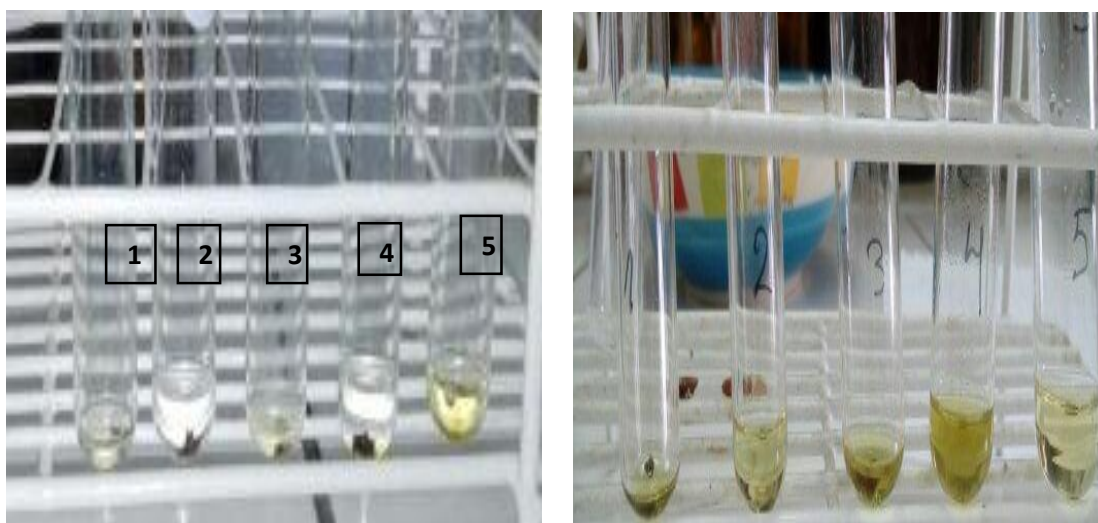
N°14: Hojas secas de *Polylepis incana* kunth

Fig.



Fig. N°15: Filtrado del extracto de las hojas de *Polylepis incana* kunth

ANEXO N° 7: Prueba de solubilidad *Polylepis incana* Kunth



Leyenda:

Reactivo	Resultado	Interpretación
1.- Mp + diclorometano	(+)	poco soluble
2.- Mp + butanol	(+)	poco soluble
3.- Mp + metanol	(+)	poco soluble
4.- Mp + etanol	(+ +)	soluble
5.- Mp + agua	(+)	poco soluble

Fig.N°16: Resultado de las pruebas de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* kunth

ANEXO N°8: Tamizaje fitoquímico de *Polylepis incana kunth*.

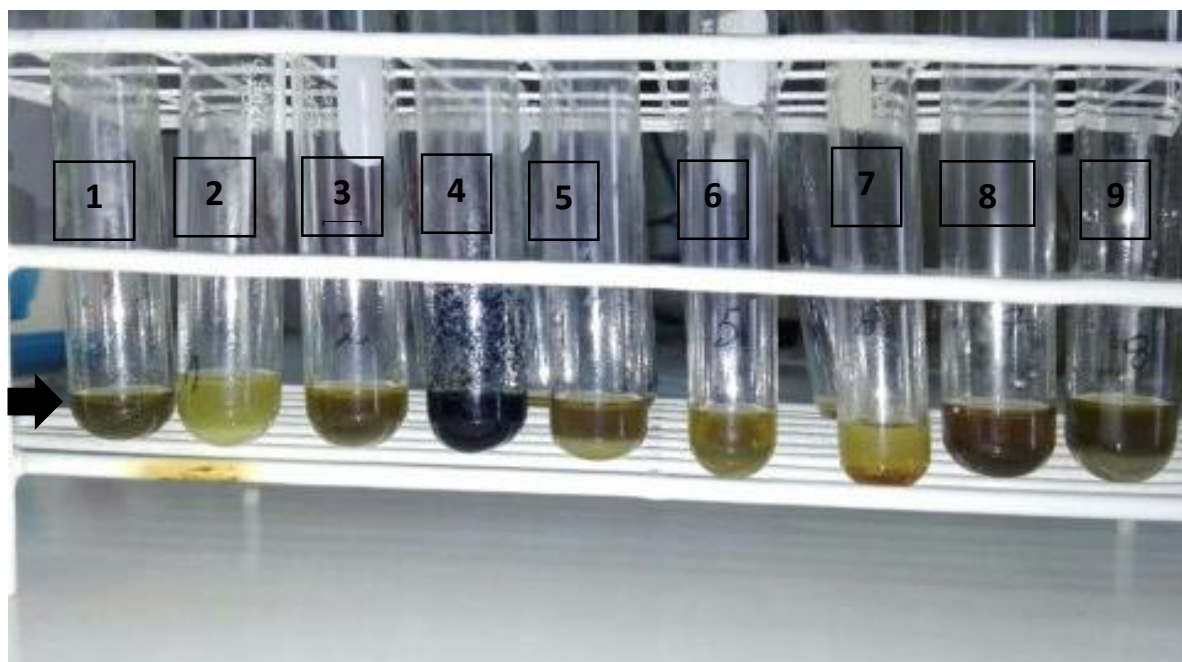


Figura N° 17: Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana kunth*

Leyenda :

TAMIZAJE FITOQUIMICO DE <i>Polylepis incana kunth</i>		
1.-Muestra problema	Resultados	Metabolitos
2.-Gelatina 1gota +mp	(++)	TANINOS
3.-Nihidrina 1gota + mp	(-)	AMINOACIDOS
4.-FeCl₃ 1gota + mp	(+++)	COMPUESTOS FENOLICOS
5.Dragendorf 1gota + mp	(++)	ALCALOIDES
6.-Rvo mayer 1 gota + mp	(++)	ALCALOIDES
7.-NaOH 10% 1 gota+ mp	(+)	QUINONAS
8.-Shinoda + mp	(++)	FLAVONOIDES
9.-H₂SO₄ y MOLISH + MP	(+)	GLICOSIDOS

ANEXO N° 9:

Diluciones para el procedimiento de difusión en Agar

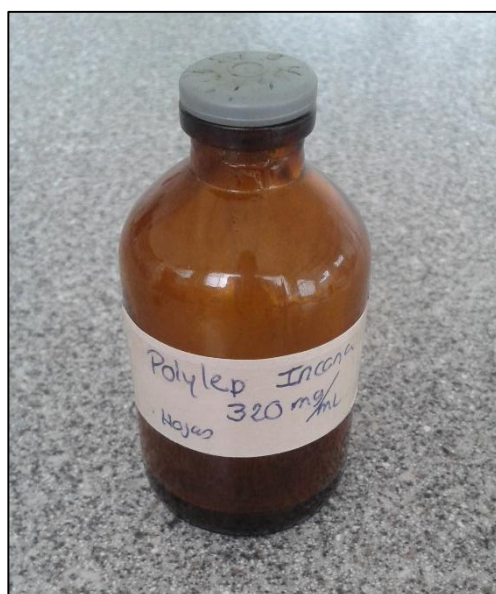


Fig N°18: Frasco del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polylepis incana* kunth al 100%



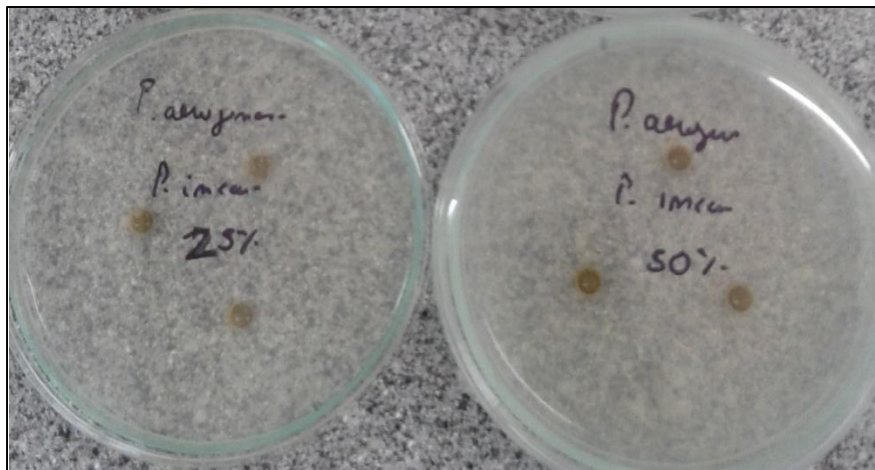
Fig N°19: Frasco del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polylepis incana* kunth al 75%,50%y 25%

ANEXO N°10:

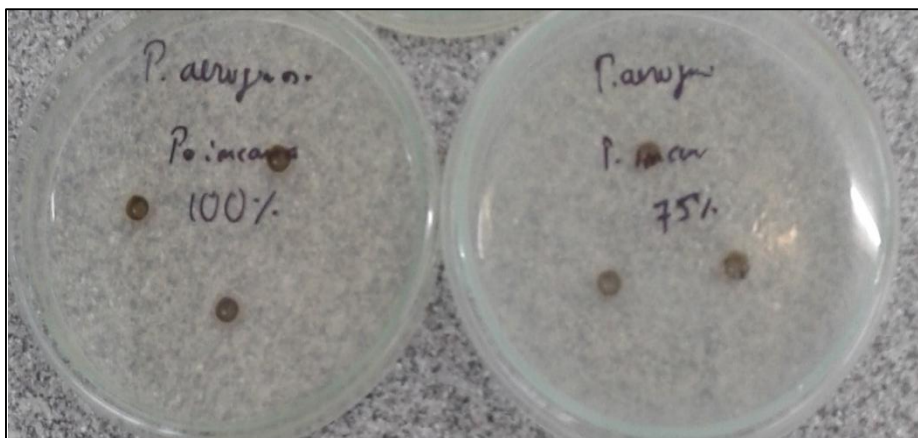
Resultados de la difusión en agar del extracto etanólico de las hojas de *Polylepis incana* kunth



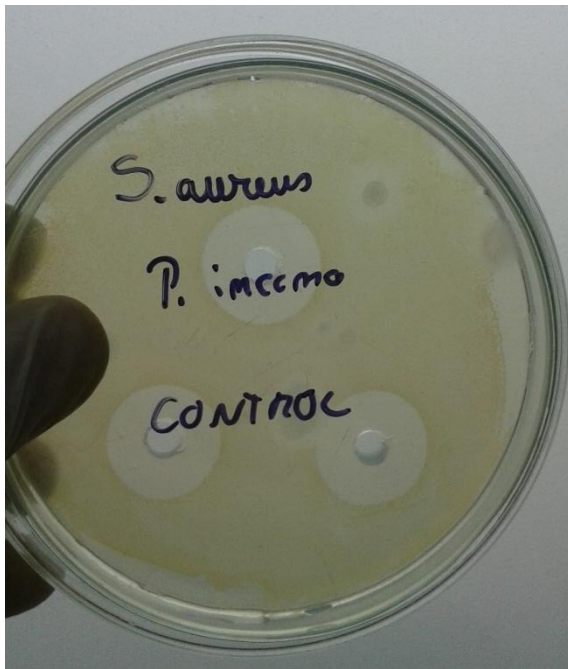
FigN°20: Placa de Control con *Pseudomonas aeruginosa*



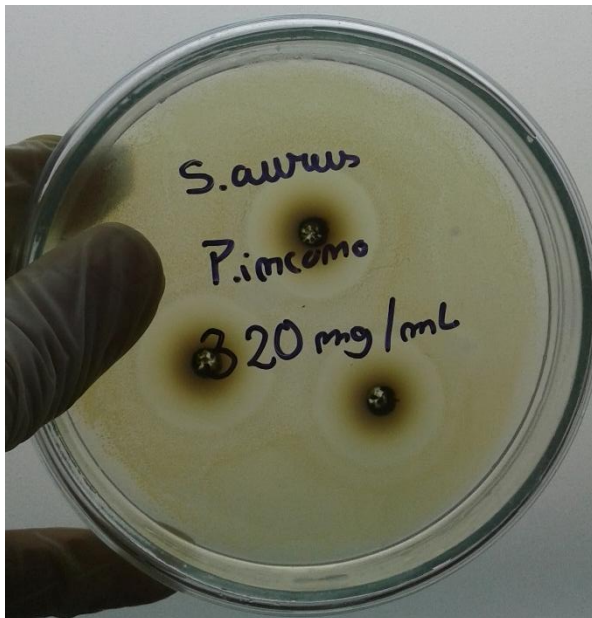
FigN°21: Placa de al 25% y 50% del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polylepis incana* kunth con *Pseudomonas aeruginosa*



FigN°22: Placa de al 100% y 75% del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polylepis incana* kunth con *Pseudomonas aeruginosa*



FigN°23: Placa Control con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



FigN°24: Placa de al 100% del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polyplepis incana kunth* con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

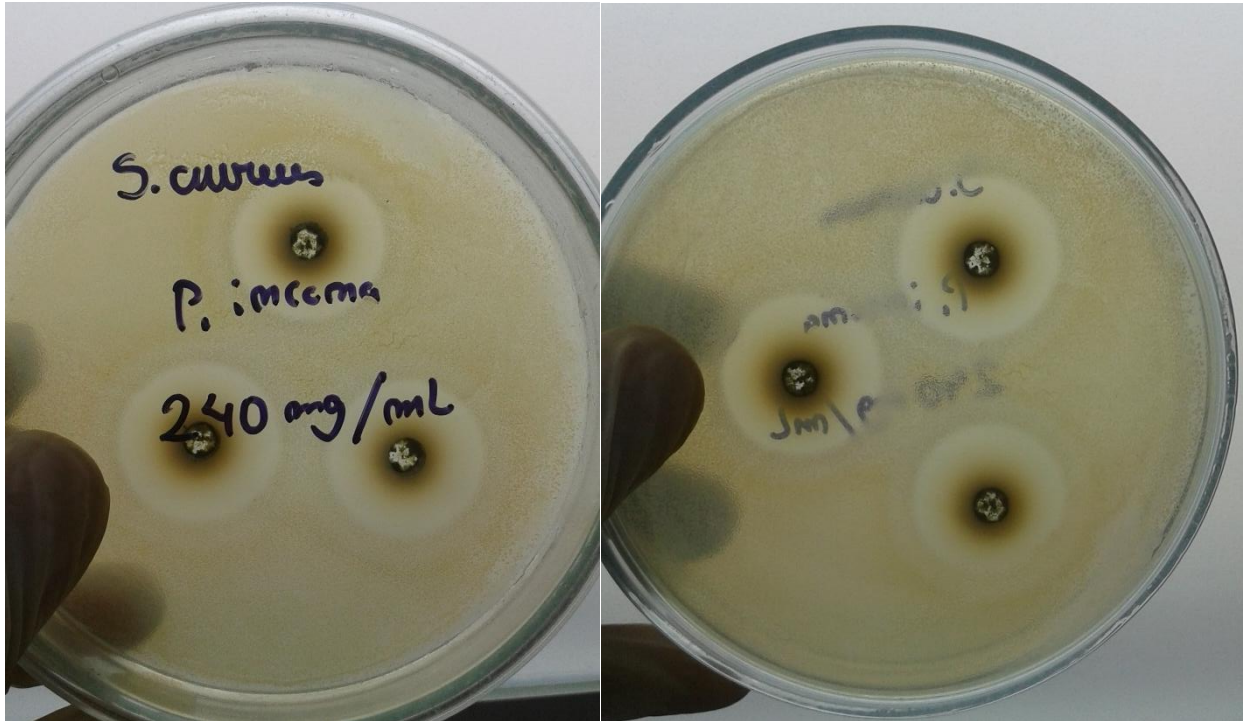


Fig. N°25: Placa de al 75% del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polylepis incana kunth* con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

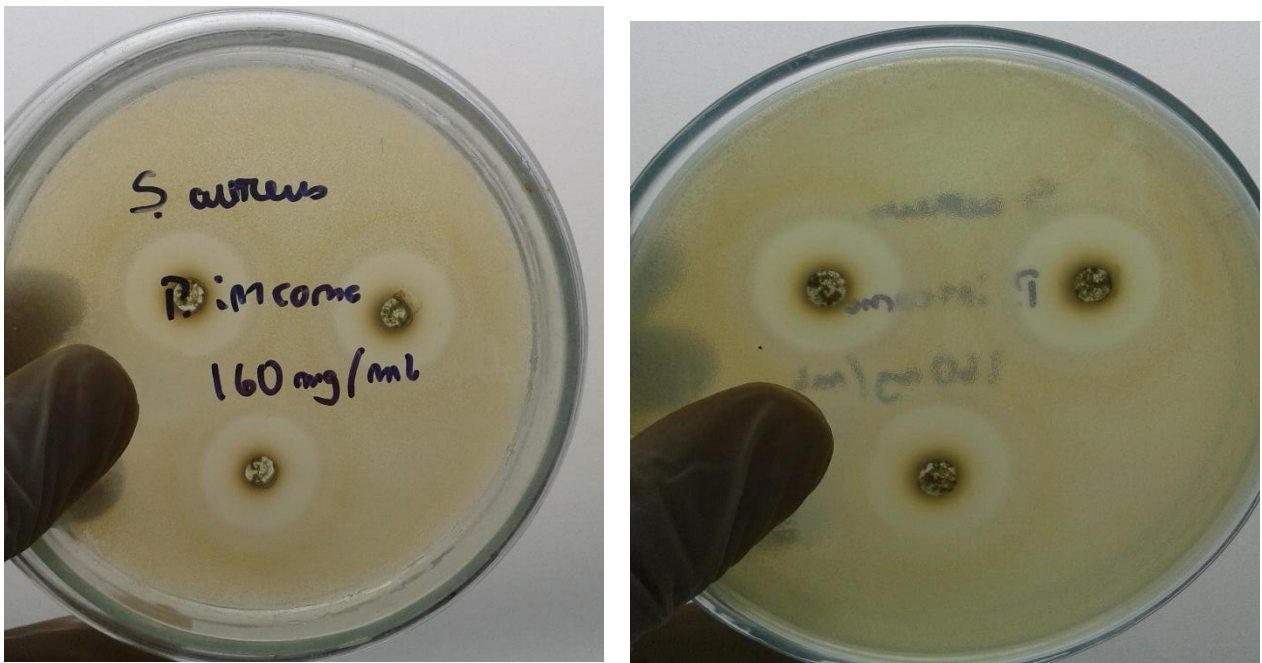


Fig. N°26: Placa de al 50% del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polylepis incana kunth* con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

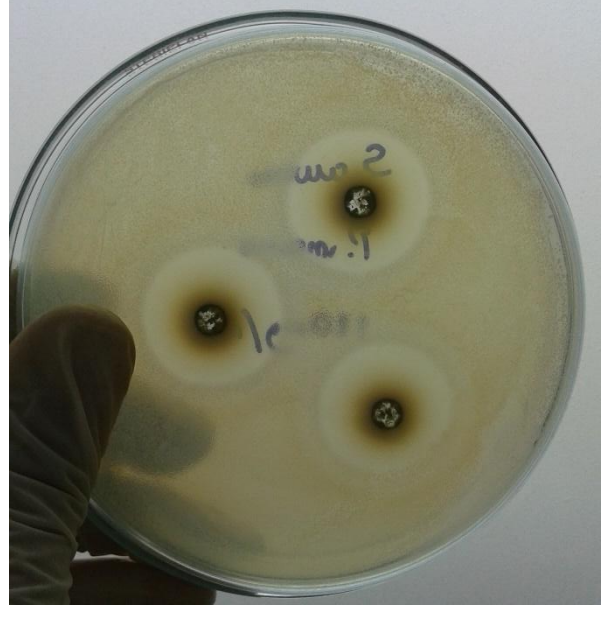
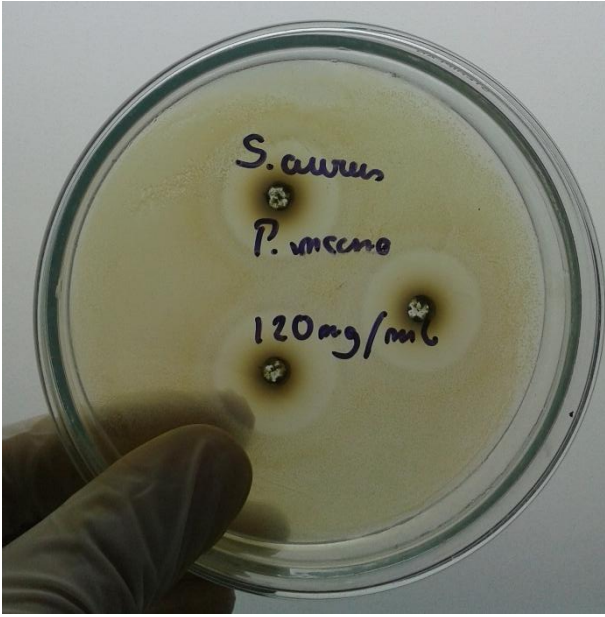


Fig.N°27: Placa de al 25% del extracto etanólico diluido de las hojas de *Polyplepis incana* kunth con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ANEXO N° 11:

Laboratorio de microbiología UNMSM y equipos utilizados en MIC y el método de difusión en agar.



Fig.N°28: Laboratorio de microbiología



Fig. N°29: Micropipeta multicanal



Fig. N°30: Cabina de flujo laminar TELSTAR



Fig. N°31: Ultrasonido BRANSON

ANEXO N°12: Realización del procedimiento de MIC y el método de difusión en agar en el laboratorio de la UNMSM

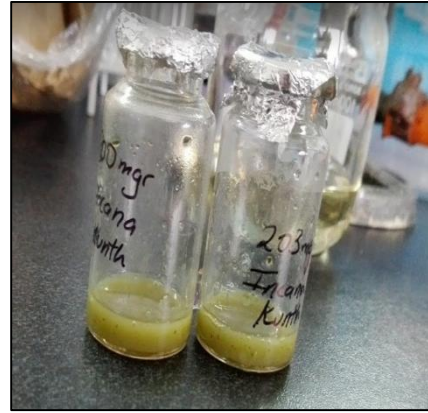


Fig. N°32: Placa de agar con una cepa de *Staphylococcus aureus*



Fig. N° 33: Realizando el sembrado de las cepas



Fig. N°34: Realizando el MIC

ANEXO N°13: Realización del procedimiento MIC

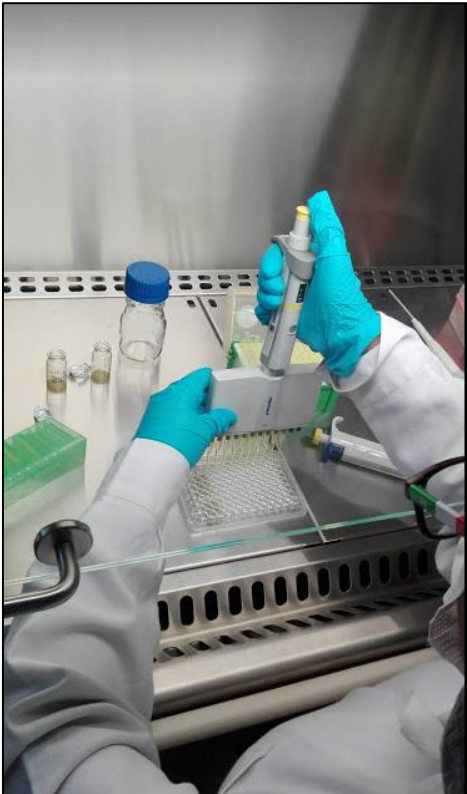
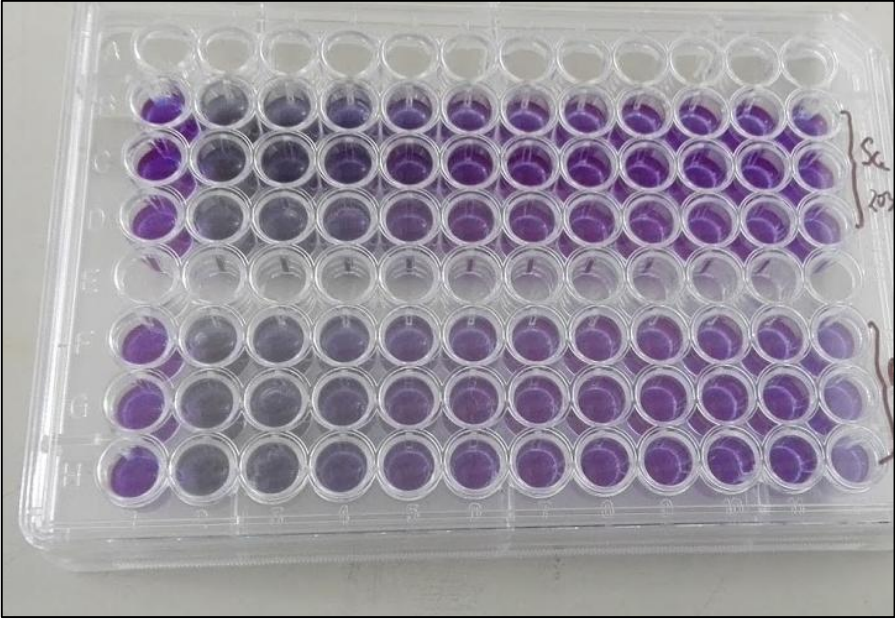


Fig. N°35: Realizando las diluciones en la cabina para procedimiento MIC



ANEXO N° 14: Microplaca utilizado para procedimiento de MIC

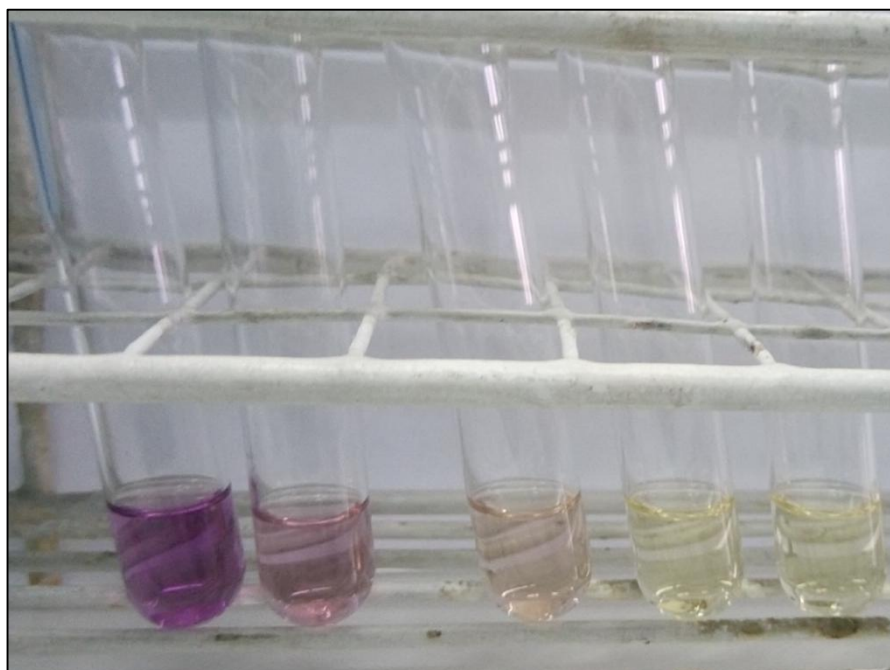


ANEXO N°15: Realización del procedimiento de DPPH



Fig.N°36: Pesado de las muestra para trabajar el método de DPPH

ANEXO N°16: Disoluciones realizadas con DPPH



ANEXO N°17: Espectrofotómetro utilizado en procedimiento de DPPH



ANEXO N°18: Procedimiento de cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu.

Dilución de la muestra



Fig.N°37: Iz.Frasco con la muestra del extracto seco de *Polylepis incana* Kunth. Centro. Baño maría. Der. Frasco con el extracto diluido.

ANEXO N°19: Preparado del blanco para el método de fenoles totales.



Fig.N°38: Fiolas cubiertas con papel platino para asegurar que la luz no interfiera con la reacción

ANEXO N° 20: Equipo utilizado en el procedimiento de cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu

