

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby (tikllaywarmi) FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* CEPAS ATCC 27853.

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

PRESENTADO POR:

Br: LAURA MAYDEE HUILLCA QUISPE

ASESORA:

- Dra. CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ

CO - ASESORES:

- Mgt. YANET CUENTAS ROMAÑA
- Q.F. JOSÉ OLIVERA TRUJILLO

PATROCINADOR:

- CONVENIO ARES - UNSAAC

CUSCO – PERÚ

2020

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincera gratitud a todos los que han colaborado en la realización de esta investigación en especial dar las gracias: A Dios que ha sido mi fortaleza y aliento de vida durante todo este proceso.

Agradezco a mi prestigiosa Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco Gracias por ser mi segundo hogar y permitirme ser parte de esta comunidad universitaria.

A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por compartir sus conocimientos en la etapa universitaria.

A la Dra. Carla del Carpio Jiménez, por aceptarme su dirección, asesoramiento, amabilidad, por prestarme su dedicación y apoyo en todo momento en el presente trabajo de tesis.

A mis Co- asesores: Q.F. José Olivera Trujillo y Mgt. Yanet Cuentas Romana por su orientación, consejos, apoyo y sugerencias respecto a la elaboración de esta investigación.

Al convenio ARES-UNSAAC por el apoyo económico para la realización de esta investigación.

A mis familiares quienes me brindaron su comprensión, apoyo y aliento hasta la culminación de la presente investigación.

Finalmente, mis agradecimientos a mis amigas, Luz Delia Huaranca , Maria Adela Huilca, Katia Huamani y Elisa Denis Mamani a mis amigos por confiar, por brindarme su amistad, compañía, enseñanzas y vivencias que nos recuerda lo bello que es la vida, agradezco a cada una de ellas por el espacio dedicado de vuestro tiempo.

Laura M. Huilca Quispe

DEDICATORIA

A Dios, por no dejarme llevar por las circunstancias, darme lo necesario para seguir adelante y ver que los problemas son un incentivo más para salir adelante y darme serenidad en los momentos necesarios.

A mi Abuelita Maria Huillca Mamani, a mis padres Filomeno Huillca Soto y Laureana Quispe Huillca, por confiar siempre en mí, por ser mi fortaleza, que hicieron y siguen haciendo todo en la vida para que pueda cumplir con mis metas.

A mi Hermano Abelardo Huillca Quispe y a mis hermanas, Yelit Huillca Quispe, Neribeth Huillca Quispe y en especial para Yuliza Huillca Quispe, por brindarme su apoyo, comprensión y estar en los momentos más difíciles y siempre aconsejándome con palabras de aliento.

A mi Co – asesor :José Olivera Trujillo por su apoyo incondicional en el presente trabajo de investigación

A mis amigas y amigos, por brindarme su amistad, consejos, enseñanzas, compañía en momentos difíciles y compartir momentos de alegría .

Laura M. Huillca Quispe.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	XIII
Resumen.....	XIV
Summary.....	XVI
Introducción.....	XVIII

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES

1.1	Planteamiento del problema.....	1
1.2	Formulación del problema	2
1.3	Objetivos	3
1.3.1	Objetivo general.....	3
1.3.2	Objetivos específicos	3
1.4	Justificación e importancia de la investigación.....	4
1.5	Hipótesis	5
1.6	Limitaciones	5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1	Antecedentes del estudio.....	6
2.1.1	Antecedentes a nivel internacional.....	6
2.1.2	Antecedente a nivel nacional	8
2.1.3	Antecedente a nivel local	9
2.2	Estado de la cuestión	13
2.3	Bases teórico y científicas	14
2.3.1	Aspectos botánicos de la especie en estudio.....	14
2.3.2	Descripción general de la especie bacteriana en estudio	17
2.3.3	Crecimiento microbiano	22
2.3.4	Medición del Crecimiento Microbiano.....	26
2.3.5	Medición de la actividad antimicrobiana	27
2.3.6	Modelos experimentales <i>in vitro</i>	27
2.3.7	Control Microbiológico.....	30
2.3.8	Descripción del Farmaco Patrón comparativo en el Presente Estudio.....	30
2.3.9	Consideraciones generales de los liposomas.....	32
2.3.10	Preparación de Liposomas.....	39
2.3.11	Otros métodos para obtener liposomas.....	41
2.3.12	Estabilidad de los Liposomas.....	42

2.3.13	Determinación de la tamaño y forma de los liposomas por microscopio ...	42
2.4	Marco conceptual	44

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales biológicos	45
3.1.1	Material vegetal.....	45
3.1.2	Material microbiológico	45
3.2	Materiales e instrumentos de laboratorio	45
3.2.1	Patrón comparativo	45
3.2.2	Materiales e instrumento de laboratorio.	45
3.2.3	Equipos de laborarorio	46
3.2.4	Solventes y Reactivos	47
3.2.5	Insumos para la elaboración de liposomas	48
3.2.6	Metodología de la investigación (diseño de investigación)	49
3.2.7	Diseño de elaboración del liposomas	51
3.2.8	Identificación, definición y operacionalización de las variables.....	53
3.2.9	Variables implicadas	53
3.2.10	Variables no implicadas	55
3.2.11	Criterios de inclusión y exclusión	58
3.3	Procedimiento experimental	62
3.4	Preparación de la muestra vegetal.....	63
3.4.1	Recolección de la muestra	63
3.4.2	Selección de la muestra	63
3.4.3	Secado de la muestra	63
3.4.4	Molienda y tamizado de la muestra	63
3.4.5	Obtención del extracto hidroalcohólico al 70%	63
3.4.6	Determinación del porcentaje de extracción (%)	64
3.4.7	Determinación de la humedad (% h).....	64
3.4.8	Análisis fitoquímico cualitativo.....	65
3.4.9	Pruebas de solubilidad	66
3.4.10	Control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	67
3.5	Determinación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	71
3.5.1	Activación de las cepas bacteriana ATCC N° 27853	71
3.5.2	Conservación de las bacterias	71
3.5.3	Estandarización de la curva de crecimiento bacteriano.....	71

3.5.4	Ensayo preliminar de sensibilidad bacteriana para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	71
3.5.5	Preparación de las placas Petri y procedimiento	72
3.5.6	Estandarización de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby tikllaywarmi</i> frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.	73
3.5.7	Pre- formulación de liposomas	75
3.5.8	Elaboración de liposomas mediante el método de hidratación de película.	76
3.5.9	Evaluación de la actividad antibacteriana de liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i> frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.....	80
3.5.10	Método de dilución en caldo	80
3.5.11	Método turbidez -espectrofotométrico	81
3.5.12	Determinación del porcentaje de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853 :	81
3.5.13	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	82
3.5.14	Técnicas para el análisis estadístico de los resultados	82

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1	Determinación del porcentaje de humedad de <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i>	83
4.2	Porcentaje de extracción de las hojas y tallos de <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i>	84
4.3	Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i>	85
4.4	Prueba fitoquímica cualitativa del extracto hidroalcohólico al 70% DE <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i>	87
4.5	Control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i>	89
4.6	Determinación de la actividad antibacteriana	90
4.6.1	Resultados de la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853.	90
4.6.2	Resultados de la prueba piloto de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico al 70 % de <i>Senecio rhizomatus Rusby " tikllaywarmi"</i> frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	92
4.6.3	Estandarización de las concentraciones antibacterianas	96
4.6.4	Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas del extracto hidroalcohólico AL 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby "tikllaywarmi"</i> frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853.....	98

4.6.5	Elaboración de liposomas con el extracto hidoalcohoólico al 70% <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	104
4.6.6	Evaluación actividad antibacteriana de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.....	108
4.6.7	Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.	113
4.6.8	Control microbiológico de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% DE <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”.	119
4.6.9	Resultados del estudio de características organolépticas y la estabilidad acelerada de los liposomas elaborados.	120
4.6.10	Resultados de la observación microscopica de liposomas al (microscopio a 40X)	124
5	Conclusiones	130
6	Sugerencias y recomendaciones	132
7	Bibliografía	133
8	Anexos	143
9	Archivo fotográfico	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 :Análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	66
Tabla N° 2 :Control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	67
Tabla N°3: Preformulación de liposomas con diferentes proporciones de sus componentes.	75
Tabla N° 4 : Preparación de tubos para la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.....	80
Tabla N° 5 : Porcentaje de humedad de las hojas y tallos de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”.	83
Tabla N° 6 : Resultados del porcentaje de extracción de las hojas y tallos de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	84
Tabla N° 7 : Resultados de la solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70%de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”.....	85
Tabla N° 8 : Resultados de análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”.	87
Tabla N° 9 : Resultados del control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	89
Tabla N° 10: Absorbancias para la estandarización de la curva de crecimiento <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853.....	90
Tabla N° 11 : Resultados de la prueba piloto del extracto hidroalcoholico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “ tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853.	92
Tabla N° 12 : Análisis de varianza (anova) para la prueba piloto de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i>	

<i>Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.	94
Tabla N° 13 :Prueba de post hoc deTukey para el ensayo de la actividad antibacteriana prueba piloto del extracto hidroalcohólico 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “ tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853	95
Tabla N° 14 :Resultados de la estandarización de la concentración del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.....	97
Tabla N° 15 : Resultados de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853 con las concentraciones estandarizadas.	98
Tabla N° 16 : Resultado de los halos inhibición de los fármaco patrón amikacina para <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.....	100
Tabla N° 17 . Análisis de varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriano in vitro del extracto de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” con las concentraciones estandarizadas	101
Tabla N° 18 : Resultado de la prueba de post hoc de Tukey para la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.	102
Tabla N° 19 : Resultados obtenidos para la recta de regresión lineal	104
Tabla N° 20 : Resultados del porcentaje de encapsulación para cada formulación de liposomas pilotos portadores de extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	106
Tabla N° 21 : Elaboración de liposomas con extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	107
Tabla N° 22 : Lectura de las absorbancias de las diferentes concentraciones de los liposomas. Elaborados con el extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	108

Tabla N° 23 : Resultados del porcentaje de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> 27853 frente a diferentes concentraciones de liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	108
Tabla N° 24 Análisis de varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	111
Tabla N°25 : Prueba de post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana para las diferentes concentraciones de los liposomas elaborados con el con el extracto de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	112
Tabla N° 26 : Resultados de la lectura de las absorbancias de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	113
Tabla N° 27 : Resultados del porcentaje de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> 27853 frente a diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	113
Tabla N° 28 : Análisis de varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	115
Tabla N° 29 : Prueba de post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana para el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	116
Tabla N° 30 : Comparación de la actividad antibacteriana entre los liposomas elaborados y el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	117
Tabla N° 31 : Resultados del control microbiológico de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	119
Tabla N° 32 : Resultados del estudio de las características organolépticas de las formulaciones y la estabilidad acelerada de los liposomas a diferentes concentraciones a una temperatura de 4°C.	120

Tabla N° 33 : Resultados del estudio de las características organolépticas de las formulaciones y la estabilidad acelerada de los liposomas a diferentes concentraciones a una temperatura de 40°C.	122
--	-----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1 : Curva de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepa ATCC 27853.91	
Gráfico N° 2 : Regresión lineal para el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	105
Gráfico N° 3: Resultados determinación de la actividad antibacteriana in vitro liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.....	109
Gráfico N° 4: Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 : <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	14
Figura N° 2 : <i>Pseudomona aeruginosa</i>	17
Figura N° 3 : Curva de crecimiento	24
Figura N° 4 : Estructura de los Liposomas.....	33
Figura N° 5 : Liposomas de concentración 12 mg.....	124
Figura N° 6 : Liposomas de concentración 25 mg.....	125
Figura N° 7 : Liposomas de concentración 50 mg.....	126
Figura N° 8 : Liposomas de concentración 100 mg.....	127
Figura N° 9 : Liposomas de concentración 200 mg.....	128

ÍNDICE DE FLUJOGRAMA

Flujograma N° 1 : Procedimiento general de la investigación	62
Flujograma N° 2 : Control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi”	68
Flujograma N° 3: Control microbiológico del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi” según el criterio de higiene (coliformes fecales).....	69
Flujograma N° 4 : Control microbiológico de extracto al 70 % de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi” en base al criterio de alerta o límites críticos (hongos y levaduras).	70
Flujograma N° 5 : Procedimiento de la actividad antibacteriana in vitro por el método de pozos excavados del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi”	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1 : Certificado de la identificación botánica de la especie vegetal	143
Anexo N° 2 : Pruebas para el análisis fitoquímico.....	144
Anexo N° 3 : Ficha de análisis fitoquímico cualitativo	146
Anexo N° 4 : Ficha de pruebas de solubilidad	147
Anexo N° 5 : Control microbiológico de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi”	148
Anexo N° 6 : Ficha de datos de medición de los halos de inhibición.....	149
Anexo N° 7 : Ficha para la recolección de datos del crecimiento bacteriano frente a las diferentes formulaciones de los liposomas	150
Anexo N° 8 : Certificado de autenticidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. ...	151
Anexo N° 9 : Certificado de colesterol	152
Anexo N° 10: Medios de cultivo	153
Anexo N° 11: Ficha de registro para datos de evaluación organoléptica y la estabilidad acelerada de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio Rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi”	154
Anexo N° 12 : Criterio de Toda y col.....	155

ABREVIATURAS

ATCC	: American Type Culture Collection.
CMI	: Concentración Mínima Inhibitoria.
OMS	: Organización Mundial de la Salud.
UCI	: Unidad de cuidados intensivos
ANOVA	: Analisis de varianza
µg	: Microgramos.
mL	: Mililitros.
mm	: Milímetros.
Mg	: miligramo
UFC	: Unidades Formadoras de Colonias.
pH	: Potencial de Hidrogeniones.
MH	: Caldo Mueller Hinton.
OPS	: Organización Panamericana de la Salud.
BIH	: Infusión Cerebro Corazón.
SPSS	: Statistical Package For Social Sciencies.
DIGEMID	: Dirección General De Medicamentos, Insumos y Droga.
nm	: Nanómetros
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ADN	: Ácido Desoxirribonucleico
ARN	: Ácido Ribonucleico

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene por finalidad determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Se realizó el porcentaje de humedad de la especie vegetal de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” determinándose un valor de 87.5%. En el estudio fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” se obtuvo la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, glucósidos, quinonas y azúcares reductores, posteriormente el extracto mencionado fue sometido a un control microbiológico, para descartar presencia de microorganismos tales como: *Salmonella* sp, coliformes fecales, hongos y levaduras, mostrando que el extracto obtenido está libre de contaminación.

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” por el método de pozos excavados empleando como fármaco patrón amikacina 30µg, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto en estudio sobre *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853 con un valor de 0.125 mg y el halo máximo de 17.306 mm a una concentración de 160 mg.

La elaboración de liposomas, se realizó por el método de Bangham, se utilizó como componentes, fosfatidilcolina de soya, colesterol y el extracto de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” a una proporción de 12:4:6 p/p/p. Para su evaluación en cuanto a su porcentaje de encapsulación, se realizó un análisis de espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis), obteniéndose un 98% de encapsulación.

En cuanto a su forma, tamaño se realizó mediante un microscopio, se obtuvo como resultados tamaños diferentes y cantidad variada según cada concentración, así mismo los liposomas preparados fueron sometidos a un control microbiológico donde se muestra que no presentan ningún microorganismo o patógeno que pueda alterar su composición. En la prueba de estabilidad acelerada durante (30 días) a

una temperatura de 4°C resulto sin reportes de alteraciones en sus características organolépticas y pH, lo que determina que es un producto estable, mientras que a una temperatura de 40°C, si hubo variaciones organolépticas y variación de pH, lo cual compromete su estabilidad.

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas mediante el método de macro-dilución en caldo y la turbidez (lectura al espectrofotómetro UV-Visible), se emplearon concentraciones de 12 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg y 200 mg de extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi" en las diferentes formulaciones, se comparó con un fármaco patrón amikacina. Los resultados mostraron que las 5 concentraciones inhibieron el crecimiento bacteriano, obteniéndose el 7% de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 200 mg y 11 % de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 100 mg, son las concentraciones que tuvieron mejor efecto antibacteriano evitando el desarrollo del microorganismo comparado con el fármaco patrón amikacina donde hubo un crecimiento de 18%, indica que los liposomas tienen un buen efecto antibacteriano impidiendo el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Se concluye que los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi" tuvieron efecto antibacteriano frente a *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853.

PALABRAS CLAVE: Actividad antibacteriana, *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi", liposomas, *Pseudomonas aeruginosa*.

SUMMARY

The purpose of this research work is to determine the in vitro antibacterial activity of liposomes made with 70% hydroalcoholic extract from *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi" against *Pseudomonas aeruginosa* strains ATCC 27853

The moisture percentage of the *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi" plant species was determined, determining a value of 87.5%. In the qualitative photochemical study, of the 70% hydroalcoholic extract of *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi" the presence of phenolic compounds, tannins, flavonoids, glycosides, quinones and reducing sugars was obtained, subsequently the mentioned extract was subjected to a microbiological control, for rule out the presence of microorganisms such as: *Salmonella sp*, fecal coliforms, fungi and yeasts, showing that the extract obtained is free of contamination.

The antibacterial activity of the 70% hydroalcoholic extract of *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi" was evaluated by the method of excavated wells using as standard antibiotic amikacin 30µg, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract under study on *Pseudomonas aeruginosa* strains ATCC 27853 was determined with a value of 0.125mg and the maximum halo of 17,306 mm at a concentration of 160mg.

The liposome elaboration, was carried out by the method of Bangham, was used as components, soy phosphatidylcholine, cholesterol and *Senecio rhizomatus* Rusby extract "tikllaywarmi" at a ratio of 12: 4: 6 p / p / p. For its evaluation in terms of its encapsulation percentage, a visible ultraviolet spectrophotometry (Uv-Vis) analysis was performed, obtaining 98% encapsulation, in the organoleptic analysis, no alterations were reported.

As for its shape, size was made by a microscope obtaining different sizes and varied quantity according to each concentration, likewise the liposomes prepared were subjected to a microbiological control do not present any microorganism or pathogen that can alter its composition also for the test of Accelerated stability for (30 days) at a temperature of 4 ° C resulted in no reports of alterations in its characteristics, which

determines that it is a stable product, while at 40 ° C there were organoleptic variations and pH variation which compromises its stability.

The in vitro antibacterial activity of the liposomes was evaluated by means of the macro-dilution method in broth and turbidity (reading to the UV-Visible spectrophotometer) concentrations of 12mg, 25mg, 50mg, 100mg and 200mg of hydroalcoholic extract of *Senecio rhizomatus Rusby* were used "tikllaywarmi" in the different formulations, compared to an amikacin standard drug. The results showed that the 5 concentrations inhibited bacterial growth, obtaining only 7% growth of *Pseudomona aeruginosa* at a concentration of 200 mg, and 11% growth of *Pseudomona aeruginosa* at a concentration of 100 mg, are the concentrations that had the best Antibacterial effect preventing the development of the microorganism compared to the standard drug amikacin where there was a growth of 18%, indicates that liposomes have a good antibacterial effect preventing the growth of *Pseudomona aeruginosa* strains ATCC 27853.

It is concluded that liposomes made with the 70% hydroalcoholic extract of *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" had antibacterial effect against *Pseudomona aeruginosa* strains ATCC 278533.

KEY WORDS: Antibacterial activity, *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi", liposomes, *Pseudomona aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera a la medicina natural y tradicional, como la medicina más inocua, efectiva, además de tener un costo racional, ser asequible y aceptada por la población. Siendo las plantas la base de los sistemas de la medicina tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre, por cientos de años. Se estima que alrededor del 80 % de la población en los países en desarrollo dependen casi completamente de la medicina tradicional para sus necesidades primarias de salud. (1)

Numerosos grupos de investigación a nivel mundial están enfocados en la búsqueda de alternativas naturales para el tratamiento de las múltiples enfermedades que aquejan a la humanidad, fundamentados en las múltiples ventajas que ofrecen los metabolitos secundarios de origen natural sobre los compuestos de origen sintético. En este sentido, las plantas constituyen la más ancestral y fructífera fuente para la obtención de sustancias activas .(2) (3)

Estudios realizados anteriormente de la especie vegetal de *Senecio rhizomatus* Rusby “tiklaywarmi”, demuestran que posee efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Propinebacterium acnes*, también se han reportado resultados óptimos de efecto anti ulceroso, gastro protector y antioxidante.

Las infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa* que es uno de los patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infeccioso, constituyen un problema de gran trascendencia económica y social, además de ser un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable. Ellas son de importancia clínica y epidemiológica porque condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad e inciden en los años de vida potencialmente perdidos de la población que afectan, a lo cual se suma el incremento en los costos de atención. (4)

Es así que surge la necesidad de ver diferentes enfoques para generar nuevos antimicrobianos activos frente a este patógeno por ello podemos mencionar una posible alternativa en el campo de la nanomedicina, los liposomas (vesículas basadas en lípidos, generalmente fosfatidilcolina), son sistemas de escala

nanométrica, para superar la incapacidad de la mayoría de las terapias convencionales de entregar las concentraciones terapéuticas de medicamentos sin provocar efectos tóxicos graves en los órganos y tejidos normales, por ello los sistemas vesiculares han recibido la máxima atención durante las últimas décadas. (5)

Por lo mencionado anteriormente y con antecedente de uso popular de *Senecio rhizomatus* Rusby “ tikllaywarmi ”, se plantea la elaboración de liposomas sintetizadas a partir de fosfatidilcolina mediante la hidratación con buffer fosfato pH 7.4, la encapsulación del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, un estudio cuasi experimental, con actividad antibacteriana sobre *Pseudomona aeruginosa* con características fisicoquímicas estables y también realizar un estudio comparativo entre el extracto libre y los liposomas para determinar la presencia de sus propiedades antibacterianas. (6)

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES

1.1 Planteamiento del problema

Con el avance de la tecnología hasta la escala nanométrica surgen nuevas vías para el diseño y desarrollo de sistemas antimicrobianos basados en nanopartículas, con gran aplicación en el sector biomédico. En este sentido las plantas medicinales representan una fuente potencial de sustancias bioactivas, por su biodiversidad y riqueza en metabolitos secundarios, brindan la posibilidad de obtener moléculas con potencial actividad antimicrobiana. La industria farmacéutica y las investigaciones muestran un interés específico por los productos naturales, que emergen como posibles potenciales candidatos a nuevos fármacos. (3) (7)

Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* ha sido reconocido como un patógeno oportunista más común, siendo una de las principales causas de las infecciones nosocomiales y neumonía asociada al ventilador, es responsable del 10% de todas las infecciones adquiridas en el hospital. (8)

La Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) informó de una serie de infecciones causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos en personas que fueron sometidos a procedimientos invasivos en Tijuana (México), el 11 de febrero del 2019 se notificó 20 casos en nueve estados de los Estados Unidos, 16 de ellos confirmados y 4 sospechosos. (9) Anivel local se informó sobre un brote de *Pseudomonas aeruginosa*, registrado en el hospital de Contingencia del Antonio Lorena de Cusco, sería la causa de muerte de al menos 6 pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). (10)

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* a menudo son graves y potencialmente mortales, difíciles de tratar debido a que posee un alto nivel de resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos a través de la permeabilidad restringida de la membrana externa, y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos como las β -lactamasas que lo hacen especialmente virulento comparado con otros microorganismos. (11) (12).

Es así que la resistencia bacteriana constituye un problema creciente de salud pública a escala mundial. A pesar de los esfuerzos de muchas entidades de la salud para su disminución, continúa emergiendo y proliferándose. Debido a esta situación surge la necesidad de la búsqueda de nuevos antimicrobianos, por ello en este estudio se evalúa la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” que constituyan el desarrollo de una alternativa terapéutica con potencial aplicación de liposomas que permita optimizar las propiedades antibacterianas del extracto en estudio. (13)

Dentro de la medicina tradicional la especie vegetal *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” no ha sido estudiada por completo y con el fin de generar conocimiento en cuanto a sus posibles propiedades farmacológicas ya que se le atribuye propiedades antimicrobianas dentro de la medicina tradicional, teniendo en cuenta que estudios de su misma familia y género presentan actividad antibacteriana. (14)

Es así que al incorporar el extracto en estudio en un vehículo como los liposomas que son estructuras vesiculares formadas por una o varias bicapas de naturaleza lipídica, que tienen la capacidad de encapsular compuestos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica, permite proteger la molécula (extracto) encapsulado, gracias a la alta biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan, se pretende mejorar las desventajas del uso de extractos totales de la planta, prevenir sus posibles efectos indeseados, evitar su degradación química del extracto que podría mejorar su perfil farmacocinético. (15)

1.2 Formulación del problema

¿Presentarán actividad antibacteriana *in vitro* los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de rendimiento del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.
2. Determinar el porcentaje de humedad, establecer la solubilidad y análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.
3. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepa ATCC 27853 en comparación con un fármaco patrón (amikacina).
4. Formular y elaborar liposomas con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.
5. Realizar el análisis organoléptico y control microbiológico de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.
6. Evaluar la estabilidad acelerada de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” a diferentes temperaturas a 4°C y 40°C durante el periodo de 30 días.
7. Realizar la observación microscópica del tamaño y la forma de los liposomas.
8. Comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” sin encapsular y con un fármaco patrón (amikacina).

1.4 Justificación e importancia de la investigación

Conocimiento:

La OMS recomienda el desarrollo, la aplicación de políticas, reglamentos y directrices que permitan la construcción de la base de conocimientos, el fortalecimiento de la garantía de calidad, el uso adecuado y la eficacia de las plantas medicinales (16)

Por ello es importante mencionar que la investigación tiene por objetivo dar un aporte de información al conocimiento, contribuir a la revalorización de la especie vegetal, que se vino utilizando de generación en generación mediante la investigación y evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” y de los liposomas elaborados con el extracto en estudio aprovechando los metabolitos que posee.

La formulación de liposomas con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” pueda posibilitar mayor estabilidad y biodisponibilidad del extracto con apreciables ventajas como la liberación sostenida en el tiempo del principio activo, la reducción de la toxicidad del extracto sin encapsular, la protección frente a fenómenos biológicos como la degradación enzimática y/o química, así mismo se puede tener cambios en su farmacocinética, lo que permitiría dar un valor agregado a la especie vegetal *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” (17) (15)

Prioridad:

Los antibióticos son uno de los medicamentos más consumidos a nivel mundial, pero en el siglo actual presentan un problema debido al gran aumento de resistencias antimicrobianas lo que hace que se incrementen los costos médicos, se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad. Por ello surge la necesidad de la búsqueda de nuevos antimicrobianos de origen vegetal, que al ser encapsuladas en liposomas puedan mejorar la actividad antibacteriana de la especie vegetal en estudio, que sea una fuente científica de investigaciones futuras que puedan ser alternativas terapéuticas. (18)

Aplicabilidad

Bajo la tendencia mundial de producir medicamentos a partir de materias primas naturales esta investigación busca elaborar liposomas a base de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” como posible alternativa terapéutica y así poder beneficiar a la población con una propuesta de producto cuyo principal componente es un activo natural.

Además, con el extracto obtenido a partir de esta planta y la elaboración de lipomas se pretende dar un valor agregado a la especie vegetal e incrementar su valor económico en el mercado local y nacional, de esta manera se pueda crear nuevas alternativas de trabajo e ingreso para el agricultor que viene sufriendo pérdidas de rentabilidad en sus cultivos tradicionales y orientar su uso como agente antimicrobiano que contenga una base científica con el cual se respalde. (19)

1.5 Hipótesis

Los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” presentan mayor actividad antibacteriana *in vitro* comparado con el fármaco patrón (amikacina) frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853

1.6 Limitaciones

La etapa de crecimiento y desarrollo de la especie vegetal *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” es estacionaria, debido que aún no es cultivada, por lo que se limita su disponibilidad en determinadas épocas del año.

La determinación del porcentaje de encapsulación del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* en los liposomas se realizó por espectrofotometría UV-Vis, haciendo un barrido espectrofotométrico para determinar la longitud de onda máxima y que representa al metabolito o grupo fitoquímico mayormente presente en el extracto, el cual no se identificó, ni cuantificó en el presente trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.1.1 Antecedentes a nivel internacional

Navarro G, Cabral P, Malanga A. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico. Universidad de la República, Laboratorio Farmacéutico. Uruguay, [Artículo técnico, 2018. (20)

El objetivo fue diseñar y preparar, liposomas convencionales que contengan un fármaco anfifílico. Mediante el método de rehidratación manual (hand-shaken), se preparó a partir de una solución de fosfatidilcolina de huevo y colesterol (10:4 p/p) en mezcla de cloroformo: metanol (9:1v/v), se eliminó la fase orgánica por rota evaporación a 50 °C y se seca al vacío durante 12 horas. La reducción de tamaño se realizó mediante ultrasonido se llevó a cabo tomando muestras a 5, 10, 15 y 20 minutos, en tanto que la determinación de la distribución de tamaño de las vesículas se realizó mediante difracción de luz láser. Posteriormente se realizó la determinación de diclofenaco sódico libre mediante espectrofotometría UV a $\lambda=272$ nm para así calcular el porcentaje de fármaco encapsulado en los liposomas.

Se obtiene como resultado, una suspensión primaria multilaminar de liposomas. Al comparar los diámetros medios liposomales, se observa que los liposomas extruidos son de menor tamaño y el rango de diámetros en que aparecen es más estrecho que para los obtenidos mediante ultrasonido y el aumento de la sonicación por encima de cinco minutos no disminuye de manera significativa los tamaños medios de los liposomas ni en rango de tamaños. El porcentaje de captura de diclofenaco sódico en la membrana fue de $74,6 \pm 5,8$ % y en la fase acuosa fue de $72,5 \pm 2,3$ %. (20)

Se concluye que mediante los procesos propuestos se pueden obtener liposomas convencionales en forma reproducible. La distribución de tamaños óptima se obtuvo con el proceso de extrusión. Los parámetros de distribución de tamaño vesicular y cesión del fármaco, no presentan diferencias significativas entre sí. La encapsulación del fármaco produce una liberación controlada que sugiere una forma de vehiculización alternativa a aplicar en diferentes formas farmacéuticas (20)

Mai Alhajlan, Moayad Alhariri, Abdelwahab Omri. Eficacia y seguridad de la claritromicina liposómica y su efecto sobre los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Department of Chemistry and Biochemistry, Laurentian University, Sudbury, Ontario, Canada, [Artículo] 2015. (21)

El objetivo fue investigar la eficacia de las formulaciones de claritromicina liposomal con diferentes cargas superficiales contra aislados clínicos de *Pseudomona aeruginosa* de los pulmones de pacientes con fibrosis quística (FQ).

Se realizó por el método de deshidratación rehidratación, y sus tamaños se midieron usando la técnica de dispersión de luz dinámica. Las estabilidades de las formulaciones en fluido biológico se evaluaron durante un período de 48 h. La CMI y las concentraciones bactericidas mínimas (CMB) de formulaciones libres y liposomales se determinaron con cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. Las citotoxicidades de las preparaciones de liposomas y el fármaco libre se evaluaron en una línea celular epitelial pulmonar (A549).

Como resultado se obtuvo el diámetro promedio de las formulaciones fue de 222 nm, con eficiencias de encapsulación que variaron de 5.7% a 30.4%. Los liposomas retuvieron más del 70% de su contenido de drogas durante el período de 48 h. Las cepas altamente resistentes de *P. aeruginosa* se volvieron susceptibles a la claritromicina encapsulada en liposomas (CMI, 256 mg / litro versus 8 mg / litro; $P < 0,001$). La claritromicina liposomal redujo el crecimiento bacteriano dentro de la biopelícula en 3 a 4 unidades logarítmicas ($P < 0.001$), redujo significativamente la producción de factor de virulencia y redujo las sacudidas bacterianas, el enjambre y las motilidades de natación. Los liposomas atrapados en claritromicina fueron menos citotóxicos que el fármaco libre ($P < 0.001$).

Se concluye que las nuevas formulaciones podrían ser una estrategia útil para mejorar la eficacia de la claritromicina contra las cepas resistentes de *P. aeruginosa* que comúnmente afectan a las personas con fibrosis quística

2.1.2 Antecedente a nivel nacional

Soto Montoya M. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de un gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus*(asterácea). E.P. de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. 2015 (22)

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antimicrobiano del gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus Rusby*, se recolectó en la zona de Chavín de Huantar, distrito de Huari, Departamento de Ancash, con la cual se hizo un extracto etanólico de hojas para la determinación de metabolitos secundarios utilizando reacciones en tubo y Cromatografía en Capa Fina para la determinación de Alcaloides.

Como resultados se encontró alcaloides, flavonoides y saponinas esteroidales y mediante la lectura e interpretación de zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano. Con el extracto etanólico se elaboró un gel antimicrobiano a concentraciones de 12,5 y 25 mg/mL; se evaluó su efecto antimicrobiano mediante el método de difusión en agar, utilizando para ello cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestra clínica hospitalaria y de la comunidad.

Se comprobó el efecto antibacterial significativo del gel a concentración de 25 mg/mL frente a cepa de la comunidad de *S. aureus*, el halo de inhibición formado fue de 20 mm y con la cepa hospitalaria el halo de inhibición formado fue de 18 mm

Se concluye entonces que el gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus Rusby* tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestra clínica hospitalaria y de la comunidad.

2.1.3 Antecedente a nivel local

Salcedo Quispe Y. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* y citotoxicidad de los extractos acuoso y etanólico al 70% de las hojas de *heliotropium arborescens* L. “hierba del alacrán”. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco [Tesis]. 2017 (23)

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* y la citotoxicidad de los extractos acuosos y etanólico al 70% de las hojas de *heliotropium arborescens* L “hierba del alacrán”.

Metodología: La sensibilidad bacteriana se realizó por el método de difusión en agar excavado-placa, evaluando diferentes concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, y 6.25 mg/mL, colocando 50 µL del extracto acuoso y etanólico al 70% frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y ***Pseudomona aeruginosa***, empleando como controles positivos oxacilina, ampicilina y amikacina.

El resultado de la sensibilidad bacteriana para el extracto acuoso presentó halos de inhibición de 0.00 mm en todas las cepas aisladas, a las diferentes concentraciones del extracto. Mientras que el extracto etanólico al 70 % presentó halos de inhibición promedio de 20.33 mm para *S. aureus* 13.33 mm para *S. pneumoniae*, 14.6 mm para *E. coli*, 14. 67 para *K. pneumoniae*, 14.67 mm para *P. mirabilis* y **16.33 mm para *P. aeruginosa*** a la concentración de 100mg/mL, colocando 50 µL del extracto.

La CMI del extracto etanólico al 70%, se encontró en la concentración de 6.25 mg/mL para *S. aureus* y *E. coli* y 12.5 mg/mL para *S. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *Pseudomona aeruginosa*. La CMB del extracto etanólico al 70% se encontró en la concentración de 12.5 mg/mL para *E. coli*, 25mg/mL para *S. aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y 50 mg/ml para *S. pneumoniae* y *P. mirabilis*.

Se concluye que el extracto etanólico al 70% presenta actividad antibacteriana frente a las cepas aisladas gram positivas y gram negativas.

Llocallasi Huamani A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de éter de petróleo y etanólico al 70 % de las hojas de *Mustisia acuminata* Ruiz & Pav “chinchircuma” frente a cepas aisladas de *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, [tesis] 2017. (24)

El presente estudio tuvo como objetivo la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de éter de petróleo y etanólico al 70 % de las hojas de *Mustisia acuminata* Ruiz & Pav “chinchircuma” frente a cepas aisladas de *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*.

La metodología: se realizó por el método de maceración, para ello se utilizaron dos disolventes: etanol al 70% y éter de petróleo, con un porcentaje de rendimiento de 24.71% y 43.22% respectivamente. Luego se realizó la sensibilidad microbiana por el método de difusión pozo-placa, evaluando diferentes concentraciones del extracto etanólico al 70% y etéreo frente *E. coli*, *k. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, y *C. albicans*. Resultando que el extracto etanólico al 70% presentó halos de inhibición de 19.67 mm para *E. coli*, 16.33 mm *K. pneumoniae*, **24.67 mm para *P. aeruginosa*** y 24.67 mm para *C. albicans* a la concentración 100 mg/ mL, colocando 50µL del extracto. Mientras que el extracto de éter de petróleo presentó halos de inhibición promedio de 12 mm para *E. coli*, 15.33 mm para *K. pneumoniae*, **14mm para *P. aeruginosa*** y 15.33 mm para *C. albicans* a la concentración de 100mg/ml colocando 50 µL del extracto, se obtuvieron con ANOVA valores de $p=0.00$, lo que indica que existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del extracto.

La concentración mínima inhibitoria fue determinada por el método de macro dilución en caldo y la concentración mínima bactericida por el método de dilución en agar, con el extracto etanólico al 70% se obtuvo para *E. coli*, una CMI de 12.5 mg/mL y una CMB de 25 mg/mL, para *K. pneumoniae* una CMI de 12.5 mg/mL y una CMB de 25 mg/ mL para ***Pseudomona aeruginosa* una CMI de 25 mg/mL y una CMB 50mg/MI.**

Para el extracto de éter de petróleo se obtuvo como resultado para *Pseudomona aeruginosa* una CMI de 12.5mg/mL y una CMB de 25mg/mL.

Se concluye que el extracto etanólico al 70% presenta actividad antibacteriana.

Espinoza Salcedo V. Chambi Bellota L. Efecto gastroprotector y toxicidad aguda del *Senecio rhizomatus Rusby* “ticllay huarmi”. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco, [tesis] 2002. (25)

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto gastroprotector del extracto seco hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “ticllay huarmi” sobre las úlceras gástricas tanto agudas como crónicas y su posible toxicidad aguda en animales de experimentación.

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar donde se mostró presencia de flavonoides, taninos y alcaloides principalmente. Para el efecto gastroprotector se trabajó el primer modelo de inducción de úlceras agudas fue por ligadura de píloro. Se utilizaron 36 ratas machos, se utilizó, dosis de 50, 150, 300 y 500 mg/kg del extracto seco hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby*, como patrón ranitidina a una dosis de 20 mg/kg y como control agua. Se obtuvo un porcentaje de inhibición ulcerosa de 62,99 % a la dosis de 50mg/kg y un efecto anti secretor, con un porcentaje de 29,12% a la misma dosis.

El segundo modelo de inducción de úlcera crónica, grupo control recibió únicamente agua los grupos problema recibieron dosis de 50 y 200 mg/kg de extracto seco hidroalcohólico *Senecio rhizomatus Rusby*, el grupo patrón se le administró subsalicilato de bismuto (bismutol). Se obtuvo un efecto gastroprotector de la mucosa gástrica a la dosis de 50 mg/kg ya que se evidenció cicatrización de las úlceras reducidas en el ensayo.

La prueba de toxicidad aguda por vía oral, en animales de experimentación (ratones), bajo el criterio de Williams, califico a la especie de estudio como prácticamente atóxica, con una dosis letal media (DL 50), por vía peroral estaría sobre los 15000 mg/ Kg.

Se concluye de la investigación que el extracto seco hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby*, posee efecto gastroprotector de la mucosa gástrica en ratas albinas y no presenta toxicidad aguda en animales de experimentación.

Ninatay Huaman k y Ardiles Ayala L. Estudio comparativo *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de *Pelargonium hortorum* LH Bailey (Geranium) y *Senecio rhizomatus* Rusby (tiqllaywarmi) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Propinebacterium acnes* y determinación de su capacidad antioxidante. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco, [tesis] .2018 (26)

El objetivo fue comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos liofilizados de las especies *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey (Geranio) y *Senecio rhizomatus* Rusby (tiqllaywarmi), sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Propinebacterium acnes* ATCC 6919 y determinar su capacidad antioxidante.

Dentro de la metodología se evaluó mediante el método de pozos excavados, primero se realizó la prueba piloto para luego estandarizar las concentraciones que se utilizaron en el trabajo final, para así determinar la CMI, de cada extracto sobre las bacterias en estudio.

Obteniéndose como resultados: Porcentaje de humedad de 80%; porcentaje de extracción de 16.81%; en la solubilidad es de naturaleza polar; para el análisis fitoquímico cualitativo, presenta abundante cantidad de quinonas, azúcares reductores y moderada cantidad de flavonoides y fenoles para *Senecio rhizomatus* Rusby (tiqllaywarmi).

Al determinar la CMI para el extracto acuoso liofilizado de *Senecio rhizomatus* Rusby (tiqllaywarmi), fue de 4.5mg/25µL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con halo de inhibición máximo de 16.43mm y 6.30mg/25µL para *Propinebacterium acnés* ATCC 6919 con halo de inhibición máximo de 14.07mm comparándose con los medicamentos patrón clindamicina y doxiciclina los cuales presentaron mayor actividad antibacteriana frente al extracto en estudio. Se concluye que el extracto acuoso liofilizado de la especie de *Senecio rhizomatus* Rusby (tiqllaywarmi), presenta actividad antibacteriana sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Propinebacterium acnes* ATCC 6919.

2.2 ESTADO DE LA CUESTIÓN

El uso medicinal del género *Senecio* es muy antiguo, en un reporte de la región de Iraq (Slamidar) se encontró polen que data de la época del hombre de Neanderthal (sesenta mil años AC). Se estableció originalmente por Linneo con 25 especies ahora se conocen más de 3000, toma su nombre del verbo latino *senecere*, que significa volverse viejo. En el Perú se registraron 175 especies de *Senecio*, de los cuales 97 son endémicas del Perú. Otros autores mencionan que existen unas 106 especies del género en nuestro país que representa aproximadamente el 60% de la diversidad de *Senecio* en Sudamérica.(27).

La especie vegetal en estudio en la medicina tradicional andina se fundamenta en la dicotomía caliente /frio (basada en el principio de opciones binarias), es así que la especie vegetal de *Senecio rhizomatus Rusby* se clasifica como caliente, por ello es usada para tratar enfermedades frías como el resfrío común, el asma, la bronquitis y las bronconeumonías; padecimientos musculoesqueléticos como: reumatismo, calambres y artritis; síntomas digestivos como: diarrea, vómito y dolor cólico causado por frío dentro de la medicina tradicional. (28)

Por otro lado, la ciencia vivió en las dos últimas décadas una nueva revolución, el paradigma “nano”, representado por dos nuevas disciplinas denominadas nanociencia y nanotecnología. Los liposomas fueron descubiertos en 1961 por Alec D. Bangham mientras estudiaba un tipo de biomoléculas (los fosfolípidos) y su relación con la coagulación sanguínea. Desde entonces, se han convertido en herramientas versátiles en Biología, Bioquímica y Medicina. (29)

Los liposomas y las estructuras de vesículas relacionadas se consideran actualmente uno de los portadores de fármacos más prometedores para los nuevos sistemas terapéuticos y la administración controlada. El uso de los liposomas como *carriers* de fármacos se ha dirigido a reducir los efectos tóxicos colaterales de las drogas en órganos sensibles, tales como corazón y riñones, y así mejorar su farmacocinética. (30)

Así mismo se está llevando a cabo numerosos estudios sobre las diversas cuestiones relacionadas con el suministro pulmonar, no solo para los péptidos y proteínas terapéuticas, sino también para los antibióticos utilizados en las infecciones respiratorias.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica, en este estudio se pretende evaluar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” y de liposomas frente a *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853.

2.3 BASES TEÓRICO Y CIENTÍFICAS

2.3.1 Aspectos botánicos de la especie en estudio

A. Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase:	Steridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asterácea
Género:	Senecio
Especie:	<i>Senecio rhizomatus</i> Rusby

Fuente: Herbario Vargas CUZ. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (ANEXO 1)

Figura N° 1 : *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”



Fuente: Propia (Ocongate-Cusco).

Descripción: Tallos, hojas, capullo e inflorescencia de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

2.3.1.1 Sinonimia de nombre de la especie conocida y nombre común de la planta

- **Nombre común:** Llancahuasha, llancahuasi, yancahuasa, ticllahuasca, tikllaywarmi, ticllaihuarmi, ticllaywarmi. (22)
- **Nombre científico:** *Senecio rhizomatus* Rusby.

2.3.1.2 Descripción botánica de la especie

Senecio rhizomatus Rusby es una hierba perenne, postrada de familia de las asteráceas, que llega a medir 20 cm de alto, raíz adventicia fibrosa que nace del tallo subterráneo. (25)

- **Tallos.**- Ascendentes o erectos, cubiertos de tricomas glandulares, subterráneos (rizoma) y aéreo de rizoma alargado ramoso horizontal u oblicuo de 3-4 mm de diámetros protegido por las vainas de las primeras hojas, pubescente ligeramente estriado. (25)
- **Hojas.**- Basales y alternas, pecioladas, base abrazadora, algo dentadas, pilosas de disposición alterna de peciolo largo alcanza hasta 16 cm de longitud, limbo de forma obovada, bordes finamente dentados, haz verde brillante y glabro, envés de color morado y de aspecto aterciopelado por la gran cantidad de vellosidades que posee. (22)
- **Inflorescencia.** -Capítulos terminales, discoideos, de 20 x10 mm; involucreo acampanado con numerosas brácteas involucrales dispuestos en dos series lanceoladas, más o menos todas iguales afuera pubescente, glabra y purpúreas en los márgenes. (26)
- **Flores.** - El tallo florífero alcanza 19 cm de altura, lleva brácteas abrasadoras de contorno lanceolado y 3 a 5 cabezuelas homogamas. Muy numerosas amarillas isomorfas, con corolas tubulosas, hermafroditas, actinomorfas, pentadentadas, cáliz plumoso; estambres con anteras unidas, ovario ínfero y estilo dividido en dos ramas (22)

2.3.1.3 Ecología de la Especie

A. Hábitat: Hierba terrestre, se desarrolla en suelos húmedos y generalmente asociada a roquedales donde se protege de la luz solar directa o muy cerca de la laguna siempre pegada a roquedales que circunda a esta, crece asociada a la paja de agua (poacea) llamada yacuqsha a 4000 - 4900 m.s.n.m. Florece, en otoño e invierno, raras veces en primavera o verano. (22)

B. Distribución geográfica: En las zonas alto andinas (Ocongate), en altitudes a más de 4000 msnm, Valle del Paucartambo, hacienda de Ccapana a más de 4000 msnm, Cerro de Pasco (Atococha) Junín, Puno, en el valle del Huascarán Jauja, La Libertad, Huancavelica, Ancash, Apurímac, se extiende hasta la puna de Bolivia. (26)

2.3.1.4 Composición Fitoquímica

Presenta metabolitos secundarios: Taninos, alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, glucósidos, azúcares reductores, resinas, quinona, lactona sustancias pectinas, ceras, aceites, sales minerales y ácidos orgánicos. (22)

2.3.1.5 Dosis y Usos Medicinales Populares

Dependiendo la afección en la que es empleada y el lugar de esta en el cuerpo:

- ❖ Neumonía y bronquios, en infusión las hojas tallos y flores (se toma hasta sentir mejoría) y en inhalaciones.
- ❖ Heridas, las ramas molidas se ponen encima del área de afección.
- ❖ Enfermedades pulmonares y tos en infusión la hoja con leche se toma dos o tres veces al día
- ❖ Afecciones cutáneas, acné y forúnculos se utilizan las hojas en maceración
- ❖ Torceduras se utiliza toda la planta en forma de emplastos
- ❖ Quemaduras como macerado, lavados y baños;
- ❖ Úlceras gástricas en decocción;
- ❖ Para curar heridas en decocción, las hojas sancochadas son aplicadas en forma de cataplasma.
- ❖ Se recomienda no tomar la infusión en forma crónica y no ingerir la maceración porque produce enfermedad al hígado. (22)

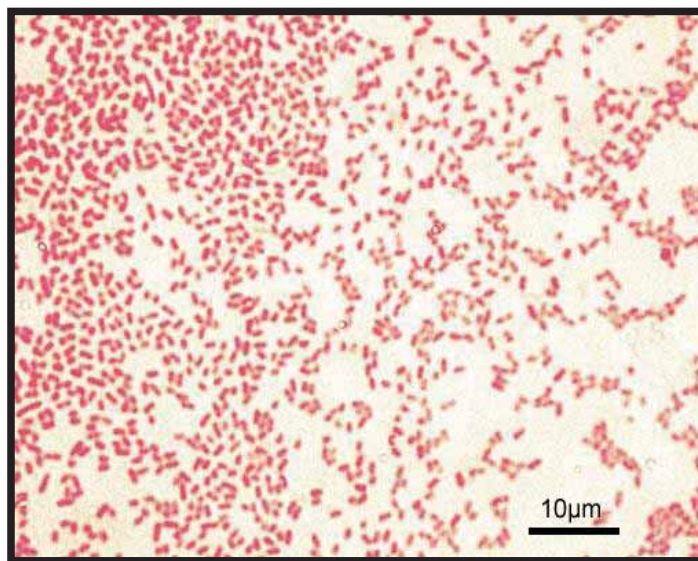
2.3.2 Descripción general de la especie bacteriana en estudio

2.3.2.1 *Pseudomona aeruginosa*

A. Clasificación científica

Reino	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Pseudomonales
Familia	: Pseudomonadaceae
Genero	: Pseudomonas
Especie	: <i>Pseudomona aeruginosa</i> (31)

Figura N° 2 : *Pseudomona aeruginosa*



Fuente: Karen C. Carroll, Jeffery A. Hobden, Steve Miller, Stephen A. Morse. Microbiología Médica. 27 ed. México, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A .2016.

2.3.2.2 Características generales de *Pseudomona aeruginosa*

Son bacilos gram negativos, móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares, aerobio estricto, catalasa y citocromo oxidasa positivo, no forman capsulas algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles. (32)

Las *Pseudomonas* tienen una amplia distribución en el suelo el agua, las plantas y los animales. Es un patógeno oportunista más importantes en el medio hospitalario frente a estados de inmunodepresión o cuando el paciente es expuesto a reservorios del ambiente hospitalario. *Pseudomona aeruginosa* a menudo está presente en pequeñas cantidades en la micro biota intestinal normal y en la piel del ser humano normal, es un saprofito, causa enfermedades en individuos con neutropenia, es el principal microorganismo patógeno de su grupo. (31)

Puede provocar infecciones graves como: bacteriemia, neumonía, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario e infecciones cutáneas en personas quemadas. Estas infecciones, generalmente nosocomiales, tienen un curso fulminante y una letalidad extremadamente alta a pesar de un tratamiento adecuado con antibióticos. (31)

Cuadro N° 1 : Factores de virulencia de *Pseudomona aeruginosa*

Factores de virulencia	Actividad biológica
Alginato	Polisacárido capsular que permite a las bacterias infectantes adherirse a las superficies de las células epiteliales pulmonares y formar biopelículas que, a su vez, protegen a las bacterias de los antibióticos y el sistema inmune del cuerpo.
Pili	Apéndices de superficie que permiten la adherencias del microorganismo a los receptores del gangliósidos GM-1 sobre las superficies de las células epiteliales de huésped.
Exotoxina A	Destrucción tisular, inhibición de la síntesis proteica, interrumpe la actividad celular y la respuesta de los macrófagos.
Enterotoxina	Interrumpe la actividad gastrointestinal normal y provoca diarrea.
Exoenzima S	Inhibe la síntesis proteica
Fosfolipasa C	Destruye la membrana citoplasmática, destruye las sustancias tensoactivas pulmonar, inactiva las opsoninas.
Elastasas	Escinde las inmunoglobulinas y los componentes del complemento, interrumpe la actividad de los neutrófilos.
Piocianinas	Suprime a otras bacterias e interrumpe la actividad de los cilios respiratorios. Produce daño oxidativo de los tejidos,(como el pulmón).

Fuente: Procop G, Koneman E, Churchill D, Janda W, Koneman Diagnóstico Microbiológico.7° edición, Wolters Kluwer Health. España. 2017.

2.3.2.3 Fisiología y estructura

Son bacilos gram negativos rectos o ligeramente curvados (0.5 a 1.0 por 5.0 μm) con flagelos polares que les hacen móviles. Estos microorganismos no son fermentadores, utilizan los hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio en el que el oxígeno es el aceptor terminal de los electrones. Aunque se definen como aerobios estrictos, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina como aceptor terminal de electrones. (33)

Algunas cepas tienen un aspecto mucoso por la abundancia de polisacáridos de la capsula. Estas cepas son especialmente frecuentes en los pacientes con fibrosis quística. Algunos producen pigmentos difusibles (p ej. Piocianina (azul), fluoresceína (amarillo), piorrubina (marrón). Produciendo en ocasiones un olor dulce o parecido al de las uvas o a la tortilla de maíz, forma colonias redondas y lisas con un color verdoso fluorescente. (32)

2.3.2.4 Epidemiología

Se puede encontrar en ambientes de agua dulce (arroyos, lagos y ríos), así como en sumideros, duchas, equipos respiratorios, incluso contaminando el agua destilada. Los seres humanos pueden ingerir la *P. aeruginosa* de tales fuentes; sin embargo, no se adhiere bien al epitelio intacto normal y con un sistema inmunológico saludable rara vez forma parte de la flora normal de los seres humanos sanos. (33)

2.3.2.5 Patogenia

P. aeruginosa es patógena sólo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales, por ejemplo, cuando hay solución de la continuidad de mucosas y de la piel por lesión directa del tejido, cuando se utilizan catéteres intravenosos o sondas urinarias; o cuando hay neutropenia, como en el caso de quimioterapia antineoplásica. (32)

La bacteria se adhiere a las mucosas o la piel y las coloniza, produce invasión local y enfermedad sistémica. Estos procesos son favorecidos por las fimbrias, las enzimas y las toxinas antes descritas.

El lipopolisacárido desempeña un papel directo en la producción de fiebre, choque, oliguria, leucocitosis y leucopenia, coagulación extravascular diseminada y síndrome de dificultad respiratoria del adulto. *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* son resistentes a muchos antimicrobianos. (32)

2.3.2.6 Manifestaciones clínicas

P. aeruginosa produce infección de heridas y quemaduras y origina pus de color verde azulado, meningitis, cuando se introduce por punción lumbar; e infecciones urinarias cuando se introduce por catéteres e instrumentos o en soluciones de irrigación. La afectación del sistema respiratorio, sobre todo por respiradores contaminados, produce neumonía necrosante violeta. (33)

Las bacterias a menudo se encuentran en la otitis externa leve en nadadores. Puede generar otitis externa invasora (maligna) en diabéticos. La infección ocular puede desencadenar la destrucción rápida del ojo, es más frecuente después de lesiones o procedimientos quirúrgicos. (32)

La necrosis hemorrágica de la piel, suele presentarse en los casos de septicemia por *P. aeruginosa*; las lesiones, llamadas ectima gangrenoso, están rodeadas por eritema y a menudo no contienen pus. Se puede ver *P. aeruginosa* en muestras de lesiones por ectima teñidas con tinción de Gram . (32)

2.3.2.7 Tratamiento

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son cada vez más resistentes a ciertos antibióticos, y el organismo puede adquirir resistencia durante la terapia. Deben usarse dos agentes de diferentes clases cuando el riesgo de resistencia a los antibióticos es alto (p. Ej., En sepsis grave, septicemia y neutropenia en pacientes hospitalizados).

La infección por *Pseudomonas* se puede tratar con una combinación de un betalactámico antipseudomonal (p. Ej., Penicilina o cefalosporina) y un aminoglucósido (amikacina, gentamicina). (34)

Los carbapenems (por ejemplo, Imipenem, meropenem) con quinolonas antipseudomonales se pueden usar junto con un aminoglucósido. Con la excepción de los casos que involucran pacientes febriles con neutropenia, en los que se usa monoterapia con ceftazidima o un carbapenem (Imipenem, meropenem), se recomienda un régimen de 2 medicamentos. (35)

Los patrones de susceptibilidad de *P. aeruginosa* varían según las diferentes zonas geográficas y se deben realizar pruebas de susceptibilidad como un complemento para seleccionar el tratamiento antimicrobiano. (34)

2.3.3 CRECIMIENTO MICROBIANO

2.3.3.1 Fisiología del crecimiento microbiano

Es el incremento ordenado de la suma de todos los componentes de un organismo. El aumento de masa por si solo podría no indicar un crecimiento real, ya que las células podrían estar incrementado su contenido únicamente en productos de reserva tales como el glucógeno, absorber agua o almacenar lípidos o polisacáridos. En un medio adecuado, en el cual se ha adaptado perfectamente las bacterias se encuentran en un estado de crecimiento equilibrado. (36)

En el periodo de crecimiento equilibrado, una duplicación de la biomasa va acompañado de una duplicación de las demás propiedades medibles de la población. La multiplicación de las células es consecuencia de fisión binaria, esta incrementa el número de las bacterias individuales que conforman una población, conocida como cultivo (32)

2.3.3.2 Curva de crecimiento en cultivos discontinuos

Si un volumen fijo de medio liquido, se inocula con células microbianas provenientes de un cultivo que ya ha crecido hasta su saturación, se determina y grafica de forma periódica el número de células viables por mililitro se obtiene una curva como la que se muestra en la figura N° 3. (37)

Este tipo de cultivo se conoce como cultivo discontinuo es un sistema de cultivo cerrado con recursos finitos, al que no se le añade más cantidad de medio más que la inicial en consecuencia las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de residuos aumentan (32)

2.3.3.3 Fases del crecimiento bacteriano

A. Fase de latencia

Es el periodo de adaptación de los microorganismos a un nuevo ambiente es de escasa o nula división celular. Sin embargo, durante este tiempo las células no están inactivas. La población microbiana atraviesa un periodo de intensa actividad metabólica que comprende sobre todo síntesis de enzimas y diversas moléculas . (37)

Una fase de latencia previa al comienzo de la división celular puede ser necesaria para que las células que poseen una cantidad reducida de ATP, cofactores esenciales, y ribosomas, sean sintetizadas antes de que se inicie el crecimiento. La duración de la fase de latencia varía considerablemente según la condición del microorganismo y la naturaleza del medio. (38)

B. Fase exponencial

Los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético el tipo de medio y las condiciones en que crecen. La velocidad de crecimiento es constante durante la fase exponencial, es decir el nuevo material celular se sintetiza a una tasa constante, pero es catalítico por sí mismo y la masa incrementa de manera exponencial.

La representación logarítmica del crecimiento durante esta fase exponencial es una línea recta, es el momento en que las células presentan mayor actividad metabólica. Esto continua hasta que se agota uno o más nutrientes del medio o hasta que se acumulan productos metabólicos tóxicos que inhiben el crecimiento . (32)

C. Fase estacionaria

El número total de microorganismos viables permanece constante. Este hecho puede ser resultado del equilibrio entre la división y la muerte de las células o, simplemente que la población deje de dividirse, aunque siga activa. Metabólicamente, la cantidad de células se incrementa con lentitud, aunque el recuento viable permanece constante (37)

En este periodo se generan dos factores, limitación de nutrientes y acumulación de productos tóxicos de desecho interrumpe por completo el crecimiento Si la población no se reproduce ni muere, el número de células permanece constante y dependerá del balance que logren las células con el medio ambiente, s un periodo de equilibrio. (32)

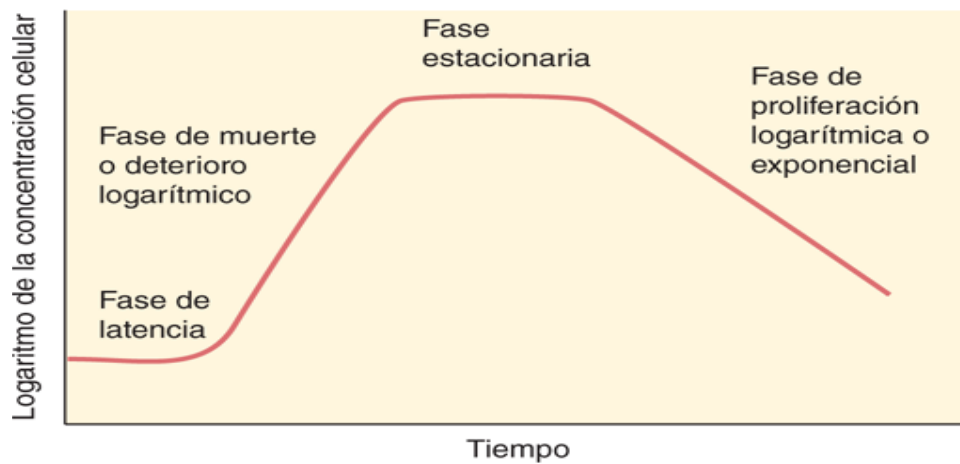
D. Fase de muerte o de declive logarítmico

Las células bacterianas mantenidas en un estado en el que no hay crecimiento llegan a morir. La muerte es consecuencia de varios factores uno importante es agotamiento de las reservas celulares de energía.

Al igual que el crecimiento, la muerte es una función exponencial (representación logarítmica). La velocidad de muerte de las bacterias es muy variable y depende tanto del ambiente como del organismo en concreto (36)

Con frecuencia después de que la mayoría de las células han muerto, la tasa de mortalidad disminuye de forma drástica de tal manera que un pequeño número de supervivientes puede persistir durante meses incluso años. (36)

Figura N° 3 : CURVA DE CRECIMIENTO



Fuente: Karen C. Carroll, Jeffery A. Hobden, Steve Miller, Stephen A. Morse. Microbiología Médica. 27 ed. México, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A. 2016.

2.3.3.4 El Cepario

Los ceparios son el sitio de depósito no solo de cepas de referencia, sino también de microorganismos aislados, caracterizados e identificados a partir de muestras de origen humano, obtenidas de investigaciones realizadas en diferentes periodos de tiempo, habilitando así su categoría como cepas de referencia. La preservación de los microorganismos de la colección debe garantizar su viabilidad en estado inactivo, puro y homogéneo, bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética, es decir, sin variaciones fenotípicas ni mutaciones con respecto a las condiciones originales. (39)

Por ejemplo:

- ATCC: American Type Culture Collection – Rockville
- NCIC: National Collection of industrial Bacterial – Survey, Inglaterra.
- JFCC: Japanese Federation of culture collection of Microorganism Japon.
- CCTM: Collection National -lille, Francia.
- RIA: USRR Research Institute for Antibiotics- Moscu, Russia.
- NCBI: Colección Nacional Industrial- Aberdeen, Escocia.
- DCM: Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Guttienger, Alemania.

Las cepas de referencia pueden ser utilizadas para confirmar la identificación de bacterias aisladas, son cepas que se encuentran perfectamente caracterizadas por diferentes metodologías y conservadas por diferentes técnicas en las cuales permanecen con sus características autóctonas intactas. Además, también se utilizan para verificar el cumplimiento de las normas de calidad y demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe utilizar cepas de referencia de microorganismos suministrados por una colección nacional o internacional reconocida. Las cepas de referencia deben cumplir los siguientes requisitos : Características típicas, características estables y reproducibilidad de cepas. (40)

2.3.3.5 Cepas ATCC

Las cepas ATCC (American Type Culture Collection), constituye la colección más grande e importante del mundo estas cepas bacterianas pueden ser utilizadas como control en una gran variedad de utilidades, lo cual nos permite conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en el laboratorio. (40)

2.3.3.6 Mantenimiento del Cepario

Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento del cepario ya que el mismo constituye una ayuda importante en la validación de equipos, materiales reactivos y habilidad del personal. Debe existir un plan metódico de transporte de cepas, archivo de cada uno de los cultivos, características bioquímicas. sensibilidad a los antibióticos, origen de la cepa, método de identificación, fecha de siembra y de próximo transporte. (39)

2.3.4 Medición del Crecimiento Microbiano

El cálculo del número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopía, número de colonias), masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular, turbidimetría) o actividad celular (grado de actividad bioquímica en relación al tamaño de la población).

Todos estos métodos se clasifican en dos apartados: métodos directos y métodos indirectos.

A. Métodos directos:

- Recuento del número de células en una cámara Thoma
- Peso seco celular.
- Determinación de nitrógeno o de proteínas totales.
- Determinación de DNA.

B. Métodos Indirectos:

- Recuento de colonias en placa.
- Recuento sobre filtro de membrana.
- Liberación de dióxido de carbono.
- Concentración de un enzima constitutivo.
- Incorporación de precursores radiactivos.
- Medida de la turbidez. (41)

2.3.5 Medición de la actividad antimicrobiana

No existen una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como se establece para antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. (42)

Los métodos más comúnmente utilizados en laboratorio por su sencillez son:

La técnica de difusión por discos en agar, es utilizada para generar datos cualitativos principalmente, y los métodos de dilución en medio líquido de cultivo y en agar, ambos métodos nos permiten conocer datos cuantitativos. (43)

2.3.6 Modelos experimentales *in vitro*

2.3.6.1 Método de difusión en placa:

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. (42)

Este método es cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos.

Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. (44)

Indicaciones:

- Se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales.
- En estudios epidemiológicos, aunque hasta el momento no se halla descrito mecanismos de resistencia para dicho organismo.

- Cuando a pesar de conocerse la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación (sensibilidad de *S. pyogenes* a eritromicina en pacientes alérgicos a la penicilina).
- En el estudio de nuevos antibióticos.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. (32)

2.3.6.2 Método de difusión en placa excavada (Bauer, Kirby)

Este método se basa en el agente antimicrobiano contenidos en pozos del medio de cultivo se produce un halo de Inhibición del crecimiento, cuyo diámetro es proporcional a la acción del agente antimicrobiano. (43)

El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la concentración de la solución de antimicrobiano, sino también del espesor de la capa de agar, del PH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del producto en este medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria o microorganismo en estudio. (43)

2.3.6.3 Medición de los halos e interpretación de los mismos

Luego de corroborar que las cepas ATCC se encuentran en rango procedemos a realizar la lectura a través de la medición de los halos de inhibición, existen tablas proporcionadas por la NCCLS que, según el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano, definen categorías de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia. (42)

2.3.6.4 Método de dilución en caldo

Las técnicas de dilución en caldo, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un antibacteriano, frente a un cultivo. Por tanto, es un método referencial para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Se requiere de una serie de tubos con caldo a los cuales se les agrega el antimicrobiano en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada

uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar. (45)

La lectura e Interpretación de los Resultados: El punto final se define a simple vista, por la falta de turbidez del caldo, para ello comparar cada tubo con el tubo de control de crecimiento (42)

2.3.6.5 Turbimetría

Es un método práctico para controlar el crecimiento bacteriano. Cuando las bacterias se multiplican en un medio líquido este se torna turbio o nebuloso por las células.

En una suspensión microbiana, la cantidad de microorganismos encontrados está directamente relacionado con la turbidez e inversamente relacionado con la cantidad de luz que pasa por la misma. De tal manera, se establece con bastante exactitud el número de microorganismos presentes en una suspensión mediante la determinación de la turbiedad. (46)

El instrumento utilizado para medir la turbidez es el espectrofotómetro (o colorímetro). En el espectrofotómetro un haz de luz se transmite a través de una suspensión bacteriana a una célula fotoeléctrica. Cuando la cantidad de bacteria aumenta, menos luz alcanza a la célula fotoeléctrica. (47)

Este cambio de luz se registra en la escala del instrumento como porcentaje de transmisión. También se puede determinar como una medición logarítmica del instrumento denominada absorbancia (densidad óptica), o como un valor derivado del porcentaje de transmisión. La absorbancia se utiliza para graficar el crecimiento bacteriano es Cuando las bacterias se encuentra en fase logarítmica de crecimiento o declinación la representación de la absorbancia frente al tiempo forma una línea casi recta. (47)

2.3.7 Control Microbiológico

Los criterios para el control microbiológico recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para productos farmacéuticos afines y fitofármacos son los siguientes:

Cuadro N° 2 : Control Microbiológico

CRITERIOS	BACTERIAS	CANTIDAD PERMISIBLE
Criterio imperativo: Este microorganismo no debe presentarse. La presencia de este indica un riesgo elevado.	Salmonella	Ausente
Criterio indicativo de higiene: La presencia excesiva indica que la higiene en el proceso ha sido deficiente. Por lo que el producto podría rechazarse.	Coliformes Fecales (E. coli)	Ausente Rango aceptado: 10 – 10 ² UFC /g
Criterio alerta o límites críticos: Significa que el producto no debe exceder los límites especificados en este rubro.	Aerobios mesófilos. Hongos y levaduras.	10 ⁴ – 10 ⁵ UFC/g 10 ² – 10 ³ UFC/g

Fuente: MINSA/ DIESA. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, 2008, Lima.

Leyenda: UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

- Criterio indicativo
- Criterio de alerta o límites críticos.
- Criterio imperativo. (48)

2.3.8 Descripción del Farmaco Usado Como Patrón comparativo en el Presente Estudio.

2.3.8.1 Amikacina

Es un aminoglucósido semisintético, derivado de la kanamicina, aunque de más amplio espectro antimicrobiano y que se caracteriza por su resistencia a las enzimas inactivadoras de aminoglucósidos. Es activo contra casi todos los bacilos aerobios gramnegativos de la comunidad y del hospital, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, y casi todas las cepas de *Serratia* y *Proteus*. Asimismo, es bactericida para casi todas las cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* resistentes a gentamicina y tobramicina. (49)

Son menos susceptibles las cepas de *Acinetobacter*, *Providencia*, *Flavobacter* y *Pseudomonas* que no sean aeruginosa. En general, tiene poca actividad contra microorganismos anaerobios y bacterias facultativas en condiciones de anaerobiosis. Su acción contra las bacterias grampositivas es limitada. (49)

2.3.8.2 Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos se difunden a través de los canales de porinas en la membrana externa de los microorganismos sensibles. Estos microorganismos tienen también un sistema dependiente de oxígeno que transporta los medicamentos a través de la membrana citoplasmática. Detrás de la célula se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo en el acoplamiento del aparato ribosómico funcional ocasionando que la subunidad 30S del ribosoma completo lea de modo erróneo el código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria. (50)

La incorporación de los aminoglucósidos en el interior de la bacteria, especialmente en los cocos grampositivos, es mayor al coadministrarse con antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana, como son los betalactámicos y los glicopéptidos.

2.3.8.3 Farmacocinética

En general, los aminoglucósidos se administran por vía intramuscular se absorben totalmente, obteniéndose la concentración máxima (C_{máx}) sérica entre 30 y 90 min. Por vía intravenosa se recomienda administrarlos mediante perfusión durante 15-30 min, y si la dosis es elevada (caso de monodosis), el tiempo de perfusión se debe incrementar hasta 30-60 min para evitar la aparición de bloqueo neuromuscular. (51)

Los aminoglucósidos por su hidrofilia, las concentraciones tisulares pueden ser subterapéuticas y la penetración en todo casi todos los líquidos es variable. La alteración del mismo, como sucede en caso de insuficiencia cardíaca, ascitis, quemados o insuficiencia renal, obliga a modificar la dosis. (50)

En su distribución unida a proteína en un 0 - 11%, con un volumen de distribución de 0.25 - 0.4 L / kg, principalmente en fluido extracelular (altamente hidrofílico) ; penetra la barrera hematoencefálica cuando las meninges se inflaman ; cruza la placenta, difusión relativa de agentes antimicrobianos de la sangre al LCR: buena solo con inflamación (excede las CMI habituales) (52)

En cuanto a su eliminación tiene una vida media 2-3 horas cuando la función renal es normal, se excreta por la orina en un 94 - 98%. (52)

2.3.8.4 Reacciones adversas

Dentro de los más frecuentes se encuentra la nefrotoxicidad (poliuria, oliguria) neurotoxicidad (parestesias, convulsiones), ototoxicidad (puede ser irreversible): auditiva (hipoacusia inicialmente a tonos de alta frecuencia, tinnitus), vestibular (vértigos, náusea, vómito, ataxia, inestabilidad en la marcha). (53)

Poco frecuente: hipersensibilidad (mayormente cutánea, muy raramente anafiláctica), algunas atribuibles a la presencia de bisulfito de sodio en las formulaciones parenterales, teniendo más riesgo las personas con asma bronquial. Raras: bloqueo neuromuscular (depresión respiratoria, debilidad muscular). (53)

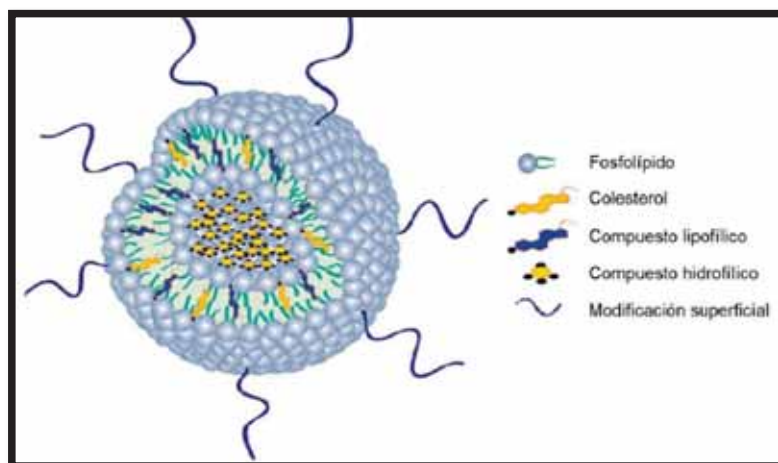
2.3.9 Consideraciones generales de los liposomas

Los liposomas fueron descubiertos en el año de 1965 por Bangham y colaboradores, quienes constataron que ciertos lípidos pueden formar estructuras membranosas artificiales cuando están en presencia de un exceso de agua. Estas estructuras vesiculares, altamente organizadas, están constituidas por una pared formada por lamelas o bicapas lipídicas concéntricas que están separadas por un número igual de espacios de contenido acuoso. Para su elaboración habitualmente se utilizan fosfolípidos, con o sin la incorporación de colesterol o de otros materiales, introducidos en la pared del liposoma con el fin de dotar a las partículas de alguna propiedad particular, ejemplo carga superficial. (54)

2.3.9.1 Concepto de Liposomas

Los liposomas son vesículas submicroscópicas con una cavidad central acuosa envuelta por una o numerosas laminas biomoleculares de fosfolípidos (formando bicapas concéntricas) separadas las unas de las otras. De forma estructura y tamaño diversos, sus dimensiones oscilan entre 0.001 μ m y 10 μ m. Esta estructura compartimental permite la incorporación de una gran variedad de sustancias hidrosolubles (zonas acuosas) o liposolubles (laminas lipídicas) quedando así protegida del medio que les rodea (degradación enzimática estabilidad química) (55)

Figura N° 4 : Estructura de los Liposomas



Fuente: Neves et al. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine (2017). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>.

2.3.9.2 Principales Componentes de los Liposomas

A. Los fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas solubles en disolventes orgánicos que en dispersión acuosa son capaces de constituir de formar espontáneamente asociaciones micelares. Estas asociaciones son en función a parámetros fisicoquímicos (temperatura), químicos (fuerza iónica, pH, composición), intervienen las fuerzas electrostáticas: Fuerzas atractivas de Vander Waals entre las colas hidrocarbonadas que favorece el empaquetamiento compacto. (56)

Los fosfolípidos poseen dos colas hidrofóbicas y un grupo polar o cabeza unido a ambas cadenas se pueden clasificar como naturales o sintéticos.

Los fosfolípidos naturales se pueden obtener de diversas fuentes, como la soja o la yema de huevo. En términos de los grupos principales polares, los fosfolípidos se clasifican como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI). Son los fosfátidos más abundantes en plantas y animales y también son los más utilizados para producir liposomas.

Sin embargo, los fosfolípidos naturales son menos estables que los fosfolípidos sintéticos. (57)

Los fosfolípidos sintéticos se pueden producir a partir de lípidos naturales. La modificación de las regiones no polares y polares de las moléculas de fosfolípidos permite la creación de una variedad ilimitada de fosfolípidos bien definidos y caracterizados . (58)

Ejemplos de lípidos sintéticos son dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) y fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC). (58)

B. Colesterol

Es una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, es un lípido esteroide por cuatro carbocíclicos condensados o fundidos, posee una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una porción apolar formada por los anillos condensados y sustituyentes alifáticos, debido a esta característica es una molécula hidrófoba, es bastante soluble en disolventes apolares como el clorofomo. (59)

La adición de colesterol (esteroles presentes en la membrana celular), permite modificar la organización (arquitectura) molecular de las laminas lipídicas. Su presencia controla la fluidez de la membrana y en consecuencia modula la capacidad de encapsulación y estabilidad física de las vesículas. (59)

Aumentar la rigidez de las membranas en “estado cristalino” (se inserta en las cadenas lipídicas, originando un aumento en el empaquetamiento y una disminución de la permeabilidad y fluidez) y reducir la rigidez de las membranas que no están en “estado gel” se inserta junto a las cabezas polares, aumentando la permeabilidad y fluidez de las cadenas. (60)

2.3.9.3 Aspectos Fisicoquímicos

Los fosfolípidos son moléculas anfílicas solubles en disolventes orgánicos, que en dispersión acuosa son capaces de constituir de forma espontánea asociaciones micelares.

Los liposomas se clasifican según su tamaño, uno difiere entre vesículas multilaminares (MLV, 0.1-10 μ m) y vesículas unilamelares, que se distinguen entre pequeñas (SUV, <100 nm), grande (LUV, 100-500 nm) o gigantes (GUV, \geq 1 μ m) vesículas y por el número de bicapas en uni, oligo, o multilaminares. (55)

Cada tipo tiene su propio método de producción, así como sus propias aplicaciones potenciales. En las preparaciones farmacéuticas, los más utilizados, por sus características generales, son los liposomas unilamelares pequeños (40-250 nanómetros), los otros tipos plurilamelares, oligo y multilamelares, tienen aplicaciones puntuales y concretas. (61)

Los liposomas difunden la luz dando un aspecto ligeramente turbio a la solución que se convierte en opalescente e incluso en lechosa si la concentración de lipomas es elevado o su diámetro aumenta.

2.3.9.4 Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación (%) es la relación entre la cantidad encapsulada del principio activo y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación .

El contenido en principio activo revela la cantidad real del principio activo en capsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. (62)

Los procedimientos para la determinación de la eficacia de encapsulación y del contenido en principio activo dependerá del polímero utilizado y del fármaco encapsulado. En general, el contenido en principio activo se determina tras la disolución de los liposomas en un disolvente apropiado seguido de la ultracentrifugación o ultrafiltración de las mismas. El principio activo se cuantifica empleando distintos métodos dependiendo de su naturaleza (espectrofotometría UV , HPLC, ELISA, etc). (63)

2.3.9.5 Usos y Aplicaciones

Los liposomas han sido objeto de un considerable interés en el campo de la medicina, bien con fines terapéuticos o como herramientas de diagnóstico.

Los liposomas han sido utilizados para proteger moléculas sensibles (p. ej. arabinósido de citosina, DNA, RNA, oligonucleótidos antisentido), para mejorar la captura intracelular y para cambiar el perfil farmacocinético y la biodistribución (tanto temporal como espacial) de la molécula encapsulada (54)

Desde el punto de vista de la administración, los liposomas pueden ser formulados como suspensiones líquidas inyectables, aerosoles, cremas o geles, que pueden ser administrados por diferentes vías, si bien lo más frecuente es que lo sean por inyección endovenosa. (6)

Cuadro Nº 3 : Formulaciones de liposomas que están en el mercado y aquellas que se encuentran en una fase avanzada de investigación clínica.

Vía Administración/ producto Estatus Administración endovenoso venoso	Molécula activa	Indicaciones
Abisome	Anfoterisina B	Infecciones fúngicas sistémicas
Daunosome	Daunorubicina citrato	Sarcoma de Kaposi
Mikasome	Amikacina	Infecciones bacterianas graves
Doxil/Caelix	Doxorubicina sulfato	Sarkoma de Kaposi y cáncer de ovarios refractario
SPI 077 Fase II	Cisplastino	Carcinoma células escamosas de cabeza y cuello
Myocet/Evacet	Doxorubicina citrato	Cáncer de mama metastásico en combinación con ciclofosfamida
Ventus Fase II	Prostaglandina E1	Síndrome de distress respiratorio agudo
OSI 211 Fase II	Lurtotecan	Leucemia mieloide refractaria. Cáncer de ovario y pulmón de células pequeñas
Marqibo	Vincristina	Linfoma no Hodgkin
Annamicina liposomal Fase II/III	Annamicina	Cáncer de mama
Aroplatin/Platar Fase I	Derivados de platino	Mesotelioma, cáncer colorectal. Tumores solidos
Atra Intra Venoso /Antragen	Acido all-trans retinoico	Leucemia promielocítica; Sarkoma de Kaposi
Visudyne	Verteporfín	Degeneración macular húmeda en combinación con laser

Fuente: Vila Jato José Luis . Nanotecnología farmacéutica realidades y posibilidades farmacoterapéuticas.Instituto de España Real Academia Nacional de Farmacia. Monografías XXVIII.editorial. Realigraf S.A. Pag-58-60.

2.3.9.6 Aplicaciones de Liposomas en Infecciones

Los liposomas se utilizan principalmente para transportar principios activos o medicamentos de la forma más selectiva posible aumentando la eficacia y disminuyendo los efectos no deseados de los mismos, especialmente su toxicidad. Su tamaño y características fisicoquímicas hacen que estas vesículas o estructuras circulen, penetren y difundan en los tejidos con gran facilidad, liberando el principio activo en ellas encapsulado de forma controlada y eficaz (55)

Por otro lado, la encapsulación de agentes antiinfecciosos en liposomas de circulación prolongada puede modificar el perfil farmacocinético y de biodistribución del fármaco y, por lo tanto, lograr una mejora de su índice terapéutico. (54)

2.3.9.7 Clasificación de liposomas

La clasificación de los liposomas se puede realizar en base a tres criterios: atendiendo a sus características fisicoquímicas, al proceso por el que han sido elaborados y a las aplicaciones de los liposomas. Para la clasificación de los liposomas en función de sus características fisicoquímicas, se tiene en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared del liposoma. (64)

Cuadro N° 4 : Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del método de preparación.


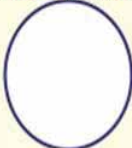




Abreviatura	Nombre completo	Método de preparación
REV	Reverse phase evaporation method	Vesículas uni u oligolamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
SPLV	Stable plurilamell vesicles	Vesículas estables plurilamelares
FATMLV	Frozen and Thawed	Vesículas multilamelares obtenidas por ciclos repetidos de congelación /descongelación
VET	Vesicles prepared by extrusión technique	Vesículas obtenidas por extrusión
DRV	Dehydration-Rehydration method	Vesículas obtenidas por deshidratación/rehidratación

Fuente: Kirby, C.G., G., Dehydration -Rehydration vesicles:a Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. Biotechnology, 1984. 2: p. 5.

A. Por el Numero de Bicapas

Los liposomas se pueden clasificar según el número de capas, según el siguiente cuadro.

Cuadro N° 5 : Clasificación de los liposomas según el numero de capas

Número de bicapas		Diámetro	Propiedades
Unilaminares (liposomas formados por una única bicapa)	SUV (vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones) 	20-80 nm	<ul style="list-style-type: none"> - Debido a su elevado radio de curvatura, una elevada proporción de fosfolípidos se halla en la monocapa externa - Presentan una importante relación superficie/lípido - Dado que el porcentaje de encapsulación es bajo, no se recomienda para moléculas hidrosolubles
	LUV (vesículas unilaminares de grandes dimensiones) 	80 nm-1 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Presentan una elevada capacidad de encapsulación - El elevado volumen del compartimento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles con eficacia
Plurilaminares (liposomas formados por varias bicapas)	MLV (vesículas multilaminares) 	400 nm- varios µm	<ul style="list-style-type: none"> - Existen variantes de MLV, tales como: <ul style="list-style-type: none"> • REV (Reverse-phase Evaporation Vesicles)  • SPLV (Stable Plurilamellar Vesicles)  • MVL µmultivesicular Liposomes 

Fuente: Szoka Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1980. 9: p. 41.

2.3.10 Preparación de Liposomas

2.3.10.1 Métodos de Elaboración de Liposomas

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías, que conducen a la formación de vesículas con características diferentes en función del procedimiento aplicado (tamaño y distribución de tamaños, lamellaridad, eficacia de asociación), lo que sugiere que diversos mecanismos pueden estar implicados en este proceso de formación. (65)

La elaboración de los liposomas se puede dividir en dos pasos: La fabricación preliminar y el acondicionamiento de las vesículas (se modifica principalmente sus características físicas). (66)

2.3.10.2 Obtención de Liposomas Método de Banghan

Banghan y colaboradores propusieron un método para la obtención de vesículas multilaminares de grandes dimensiones:

2.3.10.3 Obtención de Liposomas tipo SUV. Método De Dispersión

Simple

Se realiza en varias etapas

- **Evaporación.** - Se obtiene la bicapa lipídica a partir de disoluciones de lípido en medios no polares. como son el cloroformo o el ciclohexano. Las disoluciones de los distintos lípidos que pretenden utilizarse se mezclan en proporción adecuada. El disolvente se evapora mediante una bomba de vacío o con ayuda de una corriente de N₂ o Ar obteniéndose una fina película formada por la bicapa lipídica sobre las paredes del vial con el que se trabaja (67)
- **Hidratación de la bicapa lipídica** . La hidratación de la película se logra añadiendo un líquido y agitando. La temperatura del medio de hidratación debe ser cercana a la temperatura de transición cristalina del gel-líquido (T_c o T_M). Posterior a la adición del líquido, la suspensión formada se debe mantener a esa temperatura durante un periodo de tiempo de hidratación. Siendo los medios de hidratación más utilizados son el agua destilada, las disoluciones salinas, y los tampones. (68)

- **Extrusión de fosfolípidos.** - Es una técnica mediante la cual las vesículas unilamelares y multilamelares se hacen pasar por un filtro de policarbonato, con un tamaño de poro bien definido, en un número de veces superior a once. Este procedimiento da lugar a partículas que tienen un diámetro igual al tamaño del poro del filtro usado. (68)

2.3.10.4 Obtención de Liposomas tipo LUV - El método de evaporación en fase inversa

Utiliza un volumen muy pequeño de fase acuosa en la solución orgánica en la que están inmersos los fosfolípidos (relación molar 1:3). Tras la adición de la fase acuosa por encima de la temperatura de transición del lípido, la mezcla se sonica dando lugar a una emulsión. La fase orgánica se elimina a presión reducida dando lugar a liposomas en una fase de gel intermedio. Finalmente, tras una fuerte agitación se obtiene una disolución concentrada de vesículas muy polidispersa desde pocos nanómetros hasta 10 μm según la composición y concentración de los lípidos, la temperatura, fuerza de sonicación y tiempo.

Los liposomas obtenidos por medio de este método no son estables para el almacenamiento a temperaturas por debajo de la temperatura de transición del lípido, ya que los liposomas tienden a fusionarse. (69)

2.3.10.5 Método de dispersión simple para obtener MLV

Se trata de un protocolo que incluye varios ciclos de evaporación del disolvente y sonicación.

Se inicia con el proceso de evaporación del cloroformo en el que se encuentran los lípidos y una vez se tiene la bicapa de lípidos, se añade ciclohexano con un pequeño volumen de etanol (1-2% del volumen total) para aumentar la miscibilidad. Se liofiliza la muestra con ayuda de un sistema de vacío durante al menos 5 horas. Así, la película de lípidos otra vez formada y es el momento de pasar al proceso de hidratación de la bicapa lipídica, por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos, se agita enérgicamente mediante un sonicador. Este proceso permite obtener vesículas multilamelares, pero el tamaño y la lamellaridad es difícil de controlar. (68)

2.3.11 Otros métodos para obtener liposomas

A. Inyección de etanol o éter

Este método consiste en inyectar una solución etérea del fosfolípido en otra acuosa del agente activo a la temperatura de 55-66 °C o a 30 °C a baja presión. Una vez que se realiza la eliminación del disolvente por evaporación, se obtiene la formación espontánea de vesículas, principalmente LUV (0.005 a 0.25 μm), aunque también se forman algunas MLV por lo que se recurre generalmente a la filtración para conseguir vesículas uniformes y para eliminar los posibles restos de etanol o éter según sea el caso.

Es aplicable a numerosos lípidos y mezclas lipídicas, el uso de disolventes orgánicos y temperaturas elevadas pueden desnaturalizar o inactivar las macromoléculas, fosfolípidos insaturados son insolubles en éter. (55)

B. Diálisis del detergente

En este método los fosfolípidos se suspenden en la fase acuosa con ayuda de detergentes formando estructuras que se conocen como micelas mixtas. Para formar la micela los detergentes requieren cierta concentración conocida como concentración micelar crítica (CMC), ya que a niveles inferiores las moléculas se encuentran como monómeros. Por encima del nivel de la concentración micelar crítica (CMC) existe un equilibrio entre las moléculas libres y aquellas que están formando las micelas, fenómeno que se aprovecha para que estabilizado el sistema micelar mixto se pueden dializar moléculas libres de detergente, produciendo que el detergente que forma la estructura junto con los fosfolípidos, se muevan al medio acuoso para poder restablecer el equilibrio. (66)

2.3.12 Estabilidad de los Liposomas

La estabilidad tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" de una suspensión liposomal depende principalmente del método de fabricación utilizado en su producción, de la composición final del producto, incluido el principio activo, así como de las condiciones y características del medio receptor y, además, de la forma y lugar de almacenamiento del producto. Las características físicas, como el tamaño o diámetro medio del liposoma, y la homogeneidad de las partículas, la concentración lipídica utilizada y la temperatura del medio. (70)

Al estar constituidos por fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas insaturadas la oxidación lipídica puede verse favorecida por la presencia de metales, luz y ser minimizada por la adición, en proporciones adecuadas de antioxidantes tales como el alfa-tocoferol o los betacarotenos. Varía con el tiempo (días a algunos meses) con la composición, pureza concentración en sales del medio, temperatura, etc. No obstante con el tiempo, los liposomas se agregan en estructuras plurilaminares de mayor tamaño que acaban por separarse en forma de fase cristal líquido laminar. (56)

Sin embargo, el colesterol es afectado mínimamente por la oxidación ya que la fosfatidilcolina es un inhibidor muy efectivo.

Otro factor a considerar es la hidrólisis de los ácidos grasos, que depende del tiempo, la temperatura y el pH. Dicha hidrólisis se minimizar a pH = 6.5.

Físicamente, el principal problema consiste en la agregación de los liposomas, lo que modifica las características de permeabilidad de la pared lipídica, con la consiguiente liberación del principio activo captado (55)

2.3.13 Determinación de la tamaño y forma de los liposomas por microscopio .

La liberación de fármacos puede verse afectada por el tamaño de las partículas o moléculas involucradas. Por una parte, los liposomas pequeñas tienen una mayor relación área superficial-volumen, lo que favorece una mayor asociación del fármaco con las moléculas del órgano diana (al estar más expuesto) y por tanto, una liberación más rápida del fármaco. Por otra parte, las partículas de mayor tamaño tienen grandes núcleos, lo que permite una mayor cantidad de fármaco encapsulado por las partículas y hacen que la liberación sea más lenta.(71)

El tamaño puede ser determinado por diferentes técnicas, de acuerdo con el diámetro aproximado de las nanopartículas . La microscopía óptica convencional no es adecuada para la caracterización de nanopartículas porque su resolución esta limitada a 1 μm . Por tanto el tamaño de los sistemas nanopartículas debe ser evaluado mediante microscopía electrónica o difractometro de láser. (63)

Cuadro N° 6 : Diferentes técnicas empleadas en el análisis del tamaño de partícula

TÉCNICA	INTERVALO DE ANÁLISIS	VENTAJAS	LIMITACIONES
Microscopía electrónica (barrido electrónico)	50 nm- 100 μm	Apariencia tridimensional y morfología de la muestra	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado
Microscopía electrónica transmisión (electrónica).	50 nm- 100 μm	Mayor capacidad de aumento y mayor resolución que la SEM	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Apariencia bidimensional. Necesita alto vacío.
Microscopía electrónica	50 nm- 100 μm	No necesidad de recubrimiento conductor. Permite trabajar en modo de bajo vacío. Elevada resolución y gran profundidad de campo.	Complejidad de operación .
Señal electrónica relacionada con el diámetro al pasar la partícula a través de un orificio.	10nm- 1000 μm	Facilidad de operación.	Estrecho rango en escala nanométrica. Ajustes y cambio de componentes del aparato para efectuar el análisis a lo largo de un amplio intervalo de diámetros.

Fuente: Vila Jato José Luis. Nanotecnología farmacéutica realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Instituto de España Real Academia nacional de farmacia. Monografías XXVIII.editorial. Realigraf S.A. Pag-58-60.

2.4 MARCO CONCEPTUAL

Medicina Tradicional.- La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (72)

Principio activo: Sustancia con actividad farmacológica extraída de un organismo vivo que una vez purificada o modificada químicamente, se le denomina fármaco o medicamento. (73)

Bactericida. - La más débil concentración de una sustancia capaz de provocar la destrucción definitiva de la vitalidad de un microbio. Provocan la lisis y muerte de microorganismos. Ej.: Penicilina, Cefalosporina, Polipeptidicos.

Concentración mínima inhibitoria (CMI).- Es la concentración mínima inhibitoria de un fármaco presente en la sangre capaz de frenar una infección.

Colonia.- Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medio sólido, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.(10)

Disco de sensibilidad.- Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.

Incubación.- Mantenimiento de cultivo bacteriano en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.(28)

Inóculo.- Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.(29)

Lecitinas.- Es una mezcla compleja de lípidos neutros (triglicéridos, ácidos grasos y esteroides), lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) y carbohidratos, que dependiendo de las proporciones de los compuestos mencionados, tiene diferentes propiedades tecnológicas y fisiológicas, siendo la más importante su capacidad de emulsificación.(52)

Liposomas.- Son vesículas extraordinariamente pequeñas compuestas principalmente por fosfolípidos organizados en bicapas. Estas vesículas contienen una fase acuosa interna y están suspendidas en una fase acuosa externa (54).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS

3.1.1 Material vegetal

- Se utilizaron las hojas y tallos de la especie vegetal *Senecio rhizomatus* Rusby "tikllaywarmi", Siendo la zona de recolección, la localidad de Mahuayany, Distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis departamento del Cusco a 4979 m.s.n.m. Latitud Sur : 13° 37`24" y Longitud W: 71° 23` 07".

3.1.2 Material microbiológico

- Se utilizaron cepas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 que fueron adquiridos del laboratorio GenLab del Perú S.A.C.

3.2 Materiales e instrumentos de laboratorio

3.2.1 Patrón comparativo

Discos de sensibilidad de amikacina 30 µg.

3.2.2 Materiales e instrumento de laboratorio.

3.2.2.1 Materiales de campo:

- Bolsa de papel kraft y de polietileno.
- Cámara fotográfica.
- Prensa botánica.
- Cuaderno de campo.
- Lapicero

3.2.2.2 Materiales de laboratorio:

- Tubos de ensayo 5 mL, 10 mL y 20 mL
- Vasos de precipitado 50 mL, 100 mL, 500 mL y 1000 mL.
- Pipetas 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipetas graduadas 0.5 µl , 1000 µL
- Matraz de base redonda 250 y 500 mL
- Fiolas 50 mL, 100mL, 250 mL .
- Probetas 25, 50 y 100 MI
- Embudo de vidrio.
- Placas Petri.

- Pipetas Pasteur.
- Baguetas.
- Goteros.
- Gradillas.
- Soporte universal y llaves
- Papel filtro
- Algodón
- Botellas de vidrio de color oscuro de 4 a 5 litros de capacidad.
- Asa de siembra
- Mechero Bunsen
- Pinzas
- Pizetas
- Laminas porta objetos
- Laminas cubreobjetos
- Viales de vidrio con tapa de goma, (5mL).

3.2.3 Equipos de laborarorio

- Balanza analítica de sensibilidad 0.0001 g.OHAUS.
- Baño Maria. MEMMET. Modelo WINE22. Capacidad 20L
- Incubadora.BINDER. Modelo 16-07400. T° max 250°C
- Rotavapor.BOECO. Modelo RV0-400
- Autoclave.L INDUME LAB . T° max 134 °C
- Microscopio : Novel, modelo N-800 M
- Centrifuga.HETTICH ZENTRIFUGEN. Modelo 0124094-07.
- Horno Pasteur.k**STERIL. T° max 200 °C
- Baño de ultrasonido. BRANSON CPX2800H-E.
- Agitador magnético. BENCHMARCK BV1000.
- Agitador VORTEX VELP SCIENTIFIA MOD:WIZARD
- Vernier.

3.2.4 Solventes y Reactivos

- **Solventes para la prueba de solubilidad.**
 - Etanol de 70°.
 - Agua destilada.
 - Metanol Q.P.
 - Hexano Q.P.
 - Acetato de etilo Q.P.
 - Cloroformo Q.P.
 - Acetato de etilo Q.P

- **Reactivos para el análisis fitoquímico cualitativo**
 - Reactivo de cloruro férrico al 1%
 - Ácido sulfúrico concentrado.
 - Ácido clorhídrico concentrado.
 - Hidróxido de sodio al 1%.
 - Hidróxido de potasio al 5%.
 - Reactivo de gelatina.
 - Solución acuosa de ninhidrina al 1%.
 - Limaduras de magnesio.
 - Solución gelatina-NaCl al 1%.
 - Reactivo de Benedict
 - Reactivo Shinoda.
 - Reactivo de Borntrager.
 - Reactivo de Dragendorff.
 - Reactivo de Wagner.
 - Reactivo de Lieberman-Burchard.
 - Reactivo sudan III
 - Reactivo de fehling A y B
 - Tween 80

- **Medios de cultivo**
 - Caldo BHI (Caldo: Infusión Cerebro Corazón)
 - Agar cetrimide
 - Agar Mueller Hinton
 - Agar SS (Salmonella y Siguella)

- Agar Mac Conkey
- Agar OGYE (hongos y levaduras).

3.2.5 Insumos para la elaboración de liposomas

- Fosfatidilcolina de soya
- Colesterol.
- Buffer fosfato (7.4 pH)
- Capsulas de vitamina E.

➤ **Otros materiales**

- Jeringas descartables de 1,10 y 20mL.
- Mandil descartable
- Guantes estériles
- Gorro
- Barbijos
- Mascarilla N° 95
- Papel aluminio.
- Plumones de tinta indeleble
- Gasas
- Algodón
- Plástico films
- Cinta de esterilizacion autoclave
- Papel crepado para esterilización
- Tubos de centrifugar
- Papel indicador de pH
- Cartulina de color negro.
- Tijera estéril
- Molino de granos
- Ligas
- Detergente
- Lejía
- Papel toalla

3.2.6 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN (DISEÑO DE INVESTIGACIÓN)

3.2.6.1 Tipo de estudio

La presente investigación es de tipo experimental con diseño cuasi-experimental, donde se manipuló deliberadamente la variable independiente, liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” para observar su efecto y grado de relación con la variable dependiente (actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853).

3.2.6.2 Diseño cuasiexperimental

Es un estudio de diseño cuasiexperimental donde se analiza el efecto antibacteriano con respecto a la interacción *in vitro* de los liposomas formulados a diferentes concentraciones frente a *Pseudomonas aeruginosa* por un periodo de 24 horas comparado con el fármaco patrón amikacina .

Es de corte transversal debido que describe la relación entre las variables que son observadas en un tiempo determinado, además es prospectivo porque la relación de datos se realizó de acuerdo a la ocurrencia de los hechos.

3.2.6.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación es de tipo cuasi-experimental, por la limitada manipulación de las variables dependientes.

A. Diseño Cuasi-experimental para evaluar el ensayo de la actividad antibacteriana *in vitro* para el extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
:	:	:
G ₁₂	X ₁₂	O ₁₂
G ₁₃	X ₁₃	O ₁₃
G ₁₄	X ₁₄	O ₁₄
G ₁₅	X ₁₅	O ₁₅
G ₁₆	X ₁₆	O ₁₆

Donde:

- G₁, G₂,... G₁₄, G₁₅, G₁₆, =Cepas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 que fueron sembradas en placas petri que contienen agar Müller-Hinton.
- X₁, X₂, X₃,..... X₁₃ X₁₄ : Son diferentes concentraciones en mg/mL del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” que fueron sembradas en placas petri por triplicado por el método de pozos excavados.
- X₁₅: Concentración del fármaco patrón, “amikacina”.
- X₁₆: Blanco(solvente usado para dilución del extracto en estudio).
- O₁...O₁₂, O₁₃, O₁₆: Observación y medición de los halos de inhibición formados por las diferentes concentraciones del extracto y fármaco patrón amikacina, después de la incubación a 37°C por 24 horas.

3.2.7 DISEÑO DE ELABORACIÓN DEL LIPOSOMAS

Cuasi experimental con post prueba únicamente

Elaboración de los liposomas con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL						MEDICIÓN DE LA PRUEBA			
	X ₁	X ₆	X ₁₁	X ₁₆	X ₂₁	X ₂₇	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₁	X ₁	X ₆	X ₁₁	X ₁₆	X ₂₁	X ₂₇	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₂	X ₂	X ₇	X ₁₂	X ₁₇	X ₂₂	X ₂₈	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₃	X ₃	X ₈	X ₁₃	X ₁₈	X ₂₃	X ₂₉	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₄	X ₄	X ₉	X ₁₄	X ₁₉	X ₂₄	X ₃₀	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₅	X ₅	X ₁₀	X ₁₅	X ₂₀	X ₂₅	X ₃₁	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄

Donde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅: Formulación a diferentes concentraciones
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅: Fosfatidilcolina de soya X% .
- X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀: Colesterol en X%.
- X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅: Cloroformo X%.
- X₁₆, X₁₇, X₁₈, X₁₉, X₂₀, X₂₁: Metanol X%.
- X₂₁, X₂₂, X₂₃, X₂₄, X₂₅: Solución buffer fosfato 7.4 de pH X%.
- X₂₇, X₂₈, X₂₉, X₃₀, X₃₁: Concentraciones de extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” a X%.
- O₁: Evaluación de características al microscopio, después de 24 horas.
- O₂: Evaluación de las características microbiológicas: ausencia de microorganismos, después de 24 horas.
- O₃: Evaluación de la estabilidad acelerada a temperatura de 40°C y 4°C, después de 30 días.
- O₄: Evaluación de las características organolépticas,,: Aspecto, color, olor, pH, después de 30 días.

3.2.7.1 Diseño experimental para evaluar el efecto antibacteriano de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Para el presente estudio se elaboró un diseño con post-prueba únicamente y grupo control.

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LOS SUJETOS
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
:	:	:
G ₅	X ₅	O ₅
G ₆	X ₆	O ₆
G ₇	X ₇	O ₇

Donde

- G₁, G₂,... G₅, G₆, G₇ = Diferentes tubos preparados con caldo BHI, agua destilada, inóculo de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 y Tween 80.
- X₁,X₂ ,.....X₅: Son diferentes concentraciones de liposomas en mg/ml elaborados a partir del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.
- X₆: fármaco patrón “amikacina”.
- X₇: Grupo control (caldo BHI e inóculo de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853).
- O₁,.....O₅, O₆, O₇: Lectura espectrofotométrica a 623 nm de las diferentes tubos .
- Se siguió el mismo diseño con el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” libre sin encapsular.

3.2.8 IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

3.2.9 VARIABLES IMPLICADAS

3.2.9.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

A. Concentración del extracto hidroalcohólico al 70% *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Definición conceptual: Se define como la cantidad de extracto que es obtenida por el método de maceración (por evaporación del solvente etanol de 70° las hojas y tallos de la planta seca y pulverizada), que posee una composición química que le proporciona una acción farmacológica útil en terapéutica. (74)

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Indicador:** Peso en mg de extracto / volumen de disolvente mL.
- **Instrumento de medición:** Balanza analítica.
- **Procedimiento de medición:** Pesar la cantidad del extracto seco (mg) en una balanza electrónica, luego se harán las diluciones con el solvente adecuado y tomar una cantidad adecuada con una micropipeta.
- **Expresión final:** mg / mL.

B. Concentraciones de los liposomas formulados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Definición conceptual: Es la cantidad en mg de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” requerida como principio activo para la elaboración de liposomas. (75)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Indicador:** miligramos (mg).
- **Instrumento de medición:** Balanza analítica.

- **Procedimiento de medición de la variable:** Se procedió a pesar el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi", posteriormente, se realizó la dilución en buffer fosfato 7.4 pH, dicha solución, se incorporó a la fase lipofílica para la formación de los liposomas.
- **Expresión final:** miligramos (mg).

3.2.9.2 VARIABLES DEPENDIENTES

A. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" sobre *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Definición conceptual: Se define como la capacidad de una sustancia de origen sintético o natural que actúa en una etapa esencial y específica del crecimiento microbiano puede, inhibir el desarrollo bacteriano. (76)

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón.
- **Indicadores:** Diámetro del halo de inhibición de crecimiento.
- **Instrumento de medición:** Vernier.
- **Procedimiento de medición:** Se realizó la medición de los halos de inhibición producido por las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" sobre *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.
- **Expresión final:** mm.

B. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* sobre *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Definición conceptual: Es la capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural que tiene capacidad de inhibir el crecimiento las bacterias. (77)

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón.

- **Indicadores:** Se compara la densidad óptica (turbidez) de cada dilución con diferentes formulaciones de concentraciones de liposomas con el control (*Pseudomona aeruginosa*), después de 24 horas de incubación a 37°C.
- **Instrumento de medición:** Espectrofotómetro UV- Visible.
- **Procedimiento de medición:** Se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV- visible (turbidez) y se procede a realizar los cálculos correspondientes, para el evaluar el desarrollo de *Pseudomona aeruginosa* frente a liposomas a diferentes concentraciones.
- **Expresión final:** Porcentaje de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* .(%)

3.2.10 VARIABLES NO IMPLICADAS

VARIABLES INTERVINIENTES

A. Análisis organoléptico de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Definición conceptual: Es una valoración cualitativa que se realiza sobre una muestra basada exclusivamente en la valoración de los sentidos (vista, olfato, etc.)

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Nominal.
- **Instrumento de medición:** Estimación visual y olfativa.
- **Procedimiento de medición:** Análisis organoléptico utilizando los sentidos.
- **Indicador:** Aspecto, color, olor.
- **Expresión final:** Aspecto homogéneo, no homogéneo, color blanco, blanquecino, lechoso (característico), olor (característico).

B. Control microbiológico de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Definición conceptual: Examen destinado a evaluar la cantidad de microorganismos existentes o la ausencia en el producto mediante cultivo en placas. (78)

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Medición:** Directa.
- **Instrumento de medición:** Conteo de colonias.
- **Procedimiento de medición:** Se realizó el cultivo en placas contenidas de agares para los diferentes microorganismos.
- **Indicador:** Ausencia o presencia de *Salmonella spp* , *Echericha coli*, mesófilos viables , hongos y levaduras.
- **Expresión final:** Detección de salmonella: Ausente en 0.5 mL de solución liposomal.
 - ✓ Detección de de coliforme fecales (E. coli): Ausente en 0.5 mL de solución liposomal.
 - ✓ Recuento total de microorganismos Aerobios mesófilos = máximo 10^4 UFC / g.
 - ✓ Recuento total combinado de hongos levaduras = Máximo 10^3 UFC/g.

C. Estudio de la estabilidad acelerada de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

Definición conceptual: Se efectua para determinar el periodo de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales las materias primas y preparados oficiales se mantienen dentro de especificaciones. (55)

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Medición:** Directa.
- **Escala:** Razón
- **Procedimiento de medición:** Se realizó mediante la evaluación de las características organolépticas, medición de pH. Se evalua las muestras a temperaturas de 4°C y 40 °C.

- **Indicador:** Ausencia de fases es estable y la formación de fases indica inestabilidad, variación de pH , cambio en las características organolépticas.
- **Expresión final:** Presencia o ausencia de formación de fases.
- **Aceptable:** Ausencia de formación de fases, sin cambios en coloración, ni aparición de olor o cambio de pH.
- **Inaceptable:** Presencia de fases, cambios en coloración, aparición de olor, variación de pH.

D. Observación microscópica de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Definición conceptual: Las técnicas de imagen apropiadas proporcionan detalles importantes sobre las características morfológicas de los liposomas, deben usarse junto con otros métodos para evaluar los parámetros fisicoquímicos. (63)

- **Naturaleza:** Cualitativa.
- **Medición:** Directa.
- **Escala:** Nominal
- **Instrumento de medición:** Microscopio
- **Procedimiento de medición:** Se realizó mediante la observación de una muestra de cada solución liposomal, coloreado con el reactivo negro de Sudan III, y también se realizó mediante la medición de tamaño.
- **Indicador:** Forma característica de los liposomas
- **Expresión final:** Forma características de liposomas, variada cantidad y tamaño.

E. Porcentaje de encapsulación del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” en liposomas.

Definición conceptual .- Técnica que permite evaluar el contenido de principio activo o es la capacidad de encapsulación, hace referencia a la cantidad de principio activo encapsulado en las nanopartículas. (55)

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa

- **Escala:** Nominal
- **Instrumento de medición:** Espectofotómetro UV - Vis
- **Procedimiento de medición:** Se realizó mediante la lectura al espectrofotómetro UV-Vis, del extracto en estudio, a diferentes concentraciones .
- **Indicador:** Absorbancias del extracto total medido por triplicado.
- **Expresión final:** Porcentaje (%).

3.2.11 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

3.2.11.1 DEL MATERIAL VEGETAL

- **Criterios de inclusión:**

Se recolectó las partes aéreas de la especie vegetal de *Senecio rhizomatus Rusby* “tiklaywarmi”, las hojas, flores, tallos que no presenten daño evidente que se encuentren completas y homogéneas realizando la previa selección, tomando en cuenta que sea la especie vegetal identificada y certificada.

- **Criterios de exclusión:**

Se excluirán las muestras vegetales en mal estado, así mismo las que han sufrido daño por, hongos, plagas, o ataque de insectos que pueden afectar la calidad del extracto.

3.2.11.2 DE LAS CEPAS BACTERIANAS

- **Criterios de inclusión:** Se trabajo con cepas estandarizadas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC N° 27853 en buen estado de conservación (temperatura), libre de contaminación, certificado de autenticidad por el laboratorio GenLab. S.A.C.
- **Criterios de exclusión:** No se tomarán en cuenta las cepas bacterianas que puedan presentar contaminación.

Cuadro N° 7 : IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	NATURALEZA MEDICION ESCALA DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	
I N D E P E N D I E N T E	Concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby "tiklaywarmi"	Cantidad de extracto que es obtenida por el método de maceración que posee una composición química que le proporciona una acción farmacológica útil en terapéutica.	Peso en mg de extracto / volumen de disolvente mL.	Cuantitativa Directa/ Razón o proporción.	Balanza analítica 0.0001g de sensibilidad.	mg /ml	Pesar la cantidad del extracto seco (mg), luego se harán las diluciones con el solvente adecuado y tomar una cantidad adecuada con una micropipeta.
	Concentraciones de los liposomas formulados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby "tiklaywarmi".	Es la cantidad en mg de extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby "tiklaywarmi" requerida como principio activo para la elaboración de liposomas	Peso en mg	Cuantitativa Directa/ Razón o proporción	Balanza analítica	P/p proporción miligramos(mg).	Se procede a pesar el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby, se realizó la dilución en buffer fosfato 7.4 pH, dicha solución, se incorporó a la fase lipofílica para la elaboración de los liposomas
D E P E N D I E N T E	Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby "tiklaywarmi" sobre <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.	Se define como la capacidad de una sustancia de origen sintético o natural que actúa en una etapa esencial y específica del crecimiento microbiano puede, inhibir o matar bacterias.	Diámetro de halo de inhibición de crecimiento bacteriano.	Cualitativa Directa/ Razón o proporción	Vernier	Milímetros (mm).	Se realiza la medición de los halos de inhibición producido por las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby "tiklaywarmi" sobre <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.
E N T E	Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de los liposomas elaborados frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> cepas ATCC 27853.	Es la capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural que tiene capacidad de inhibir el crecimiento las bacterias. (63)	Peso en mg	Cuantitativa Directa/ Razón o proporción	Espectrofotómetro o UV-Visible	Porcentaje de crecimiento (%)	Se realizó la lectura en el espectrofotometro uv- visible y se realiza los cálculos correspondientes.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro N° 8 : VARIABLES NO IMPLICADAS

VARIABLES INTERVINIENTES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	NATURALEZA/ MEDICION/ ESCALA DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
Análisis organoléptico de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tiklaywarmi”.	Es una valoración cualitativa que se realiza sobre una muestra basada exclusivamente en la valoración de los sentidos (vista gusto olfato etc. Aspecto: características físicas para apreciar la homogeneidad de la formulación Olor: Característica física para determinar el aroma de la formulación	Análisis de características Organolépticas	Cualitativa Directa Nominal	Estimación visual Estimación olfativa	Aceptable Inaceptable Homogéneo No homogéneo Blanco Blanquecino Ligeramente lechoso
Control microbiológico de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tiklaywarmi “	Examen destinado a evaluar la cantidad de microorganismos existentes o la ausencia en el producto mediante cultivo en placas	Ausencia o presencia de Salmonellas Escherichia coli	Cualitativa Indirecta Nominal	Conteo de colonias	Detección de salmonella : Ausente en 10 mg de solución liposomal. Detección de de coliforme fecales (E. coli): Ausente en 10mg de solución liposomal. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos = máximo 10 ⁴ UFC / g. Recuento total combinado de hongos levaduras = Máximo 10 ³ UFC/g.
Estudio de la estabilidad acelerada de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tiklaywarmi”.	Se efectua para determinar el periodo de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales las materias primas y preparados oficiales se mantienen dentro de especificaciones.	Ausencia de fases es estable y la formación de fases indica inestabilidad.	Cualitativa Directa Razón	Apreciación visual y olfativa (Presencia de olor). Medicion de pH.	Aceptable: Ausencia de formación de fases, sin variación de pH Inaceptable: Presencia de fases, con variación de pH.

Observacion microscópica de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tiklaywarmi”.	Las técnicas de imagen apropiadas proporcionan detalles importantes sobre las características morfológicas de los liposomas, y deben usarse junto con otros métodos para evaluar los parámetros fisicoquímicos.	Forma característica de los liposomas.	Cualitativa Directa Nominal	Microscopio	-Presencia -Ausencia
---	---	--	-----------------------------------	-------------	-------------------------

Fuente: Elaboración propia.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Flujograma N° 1 : Procedimiento general de la investigación



Fuente: Elaboración propia.

3.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

3.4.1 Recolección de la muestra

La recolección de la especie vegetal, se realizó en las faldas del nevado de Sinakara a 4979 m.s.n.m, teniendo coordenadas geográficas siguientes: Latitud Sur : 13° 37`24" y Longitud W: 71° 23` 07", en la comunidad de Mahuayani, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, departamento de Cusco, donde se recolectó las partes aéreas de la especie vegetal (hojas, tallos y flores) en bolsas de papel para ser trasladadas a la ciudad del Cusco.

3.4.2 Selección de la muestra

Una vez obtenidas las muestras, se procedió a la selección de las mejores muestras y limpieza excluyendo los que posean daño observable, luego se dejó en un lugar fresco y seco.

3.4.3 Secado de la muestra

Se realizó en un secadero de malla en un ambiente sombreado y bien ventilado, donde se depositaron las plantas a una temperatura ambiente en un lugar limpio, conforme fue secando la muestra, se depositaron en bolsas de papel Kraft.

3.4.4 Molienda y tamizado de la muestra

Para la transformación del material vegetal en un polvo fino, se utilizó un molino de granos limpio y seco, previamente desinfectado con alcohol 70%, se molió el material vegetal luego, se realizó el tamizado de la muestra, para que sea homogénea, posteriormente se traspasó aun frasco de color ámbar con tapa hermética.

3.4.5 Obtención del extracto hidroalcohólico al 70%

Las plantas molidas, se sometieron a maceración con etanol al 70% durante 28 días, a temperatura ambiente y protegido de la luz solar, pasado el tiempo se procedió a filtrar. El filtrado se obtuvo por la eliminación del solvente por evaporación en un equipo de rotavapor a una presión de 500 rpm a 37 °C y luego en baño maría. (79)

3.4.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)

Se pesó 100mg de muestra vegetal, seco y molido, el cual fue sometido a maceración con etanol al 70% durante 28 días, luego se filtró hasta agotamiento, posteriormente se evaporó en baño maría hasta sequedad. (74)

Para:

$$\% \text{ DE EXTRACCIÓN} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Donde:

- Peso final: Peso del extracto seco
- Peso inicial: Peso de la planta seca

3.4.7 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD (% H)

a) Método gravimétrico: Determinación de la pérdida de agua por desecación en una estufa.

Este método consiste en calentar una muestra vegetal homogénea, previamente triturada y pesada a una temperatura de 105 °C durante una hora de secado en una estufa y se deja hasta peso constante, es decir que entre tres pesadas consecutivas realizadas tras un tiempo de desecación determinado no exista diferencia mayor a 0.5 mg/g de sustancia analizada. (80)

b) Procedimiento experimental

Se pesó 5 gramos de muestra fresca (hojas tallo y raíz) y deposita en tres placas Petri previamente rotuladas con el nombre de la planta y el número de grupo. Luego las 3 placas se depositaron en una estufa la misma que se graduó a 105 °C por una hora pasado el tiempo indicado, se retiró de la estufa las muestras y se dejó enfriar, en un desecador, posteriormente pesar, hasta obtener un peso constante para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente relación . (80)

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

Donde:

- %H= Porcentaje de humedad
- M_1 = Peso de muestra fresca
- M_2 = Peso de muestra seca

3.4.8 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

El análisis fitoquímico cualitativo, se realizó mediante pruebas fisicoquímicas de caracterización, se utilizó reactivos químicos que dió cambios de coloración o formación de precipitados, con la finalidad de identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto de las hojas de la especie vegetal en estudio. (81)

A una determinada cantida del extracto hidroalcohólico al 70° de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” que se depositaran en diferentes tubos de ensayo a las cuales se le realizará los ensayos de identificación de metabolitos. (ANEXO 2 y 3).

Tabla N° 1 : Análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVOS
Alcaloides	Dragendorff
Azucares reductores	Benedict
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico 1%
Flavonoides	Reacción de shinoda
Glucósidos	Fheling A
Quinonas	Borntrager
Saponinas	Prueba de la espuma
Taninos	Gelatina-sal
Lactonas	Hidroxamato férrico
Esteroides	Lieberman-bourchad

Fuente: Villar del fresno A. farmacognosia general. Editorial síntesis. Primera edición. Madrid –España. (ANEXO 3)

3.4.9 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para los ensayos de solubilidad se pesaron aproximadamente 10 mg del extracto seco de la especie vegetal en estudio que se depositaron en varios tubos de ensayo, a los cuales se les agrego 1-3 mL de solventes de diferente polaridad: Agua destilada, metanol, etanol, (al 70%, 96%), acetona, acetato de etilo, cloroformo, benceno y hexano. (82)(ANEXO 4)

3.4.10 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Según la norma sanitaria sobre los criterios microbiológicos de calidad sanitaria de salud, se obtiene en el siguiente cuadro los criterios a tomar en cuenta para el control de calidad del extracto en estudio. (78)

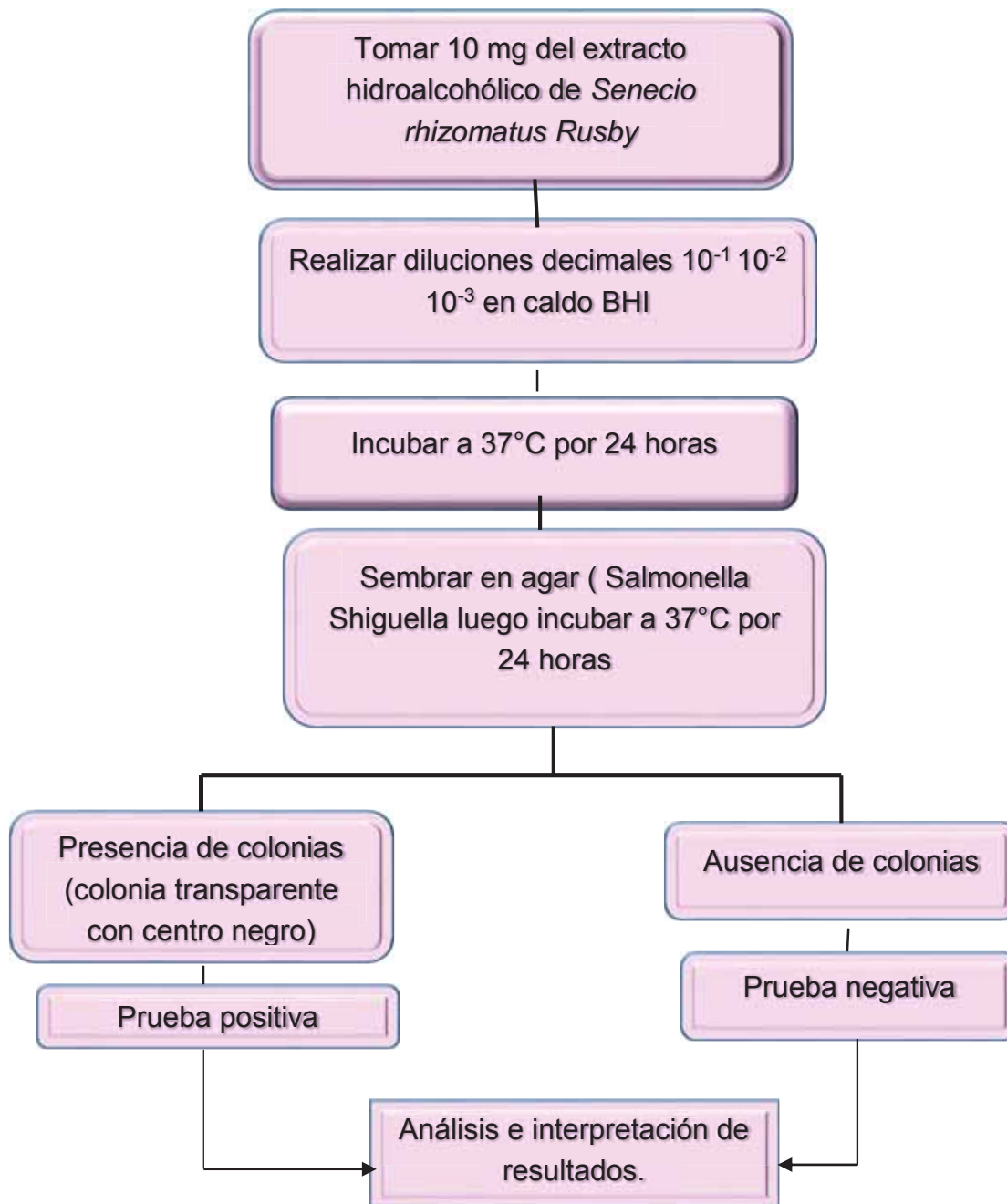
Tabla N° 2 : Control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

CRITERIOS	AGAR UTILIZADO	PESO DEL EXTRACTO	MICROORGANISMOS	RESULTADOS ACEPTADOS
Criterio imperativo: No debe presentarse caso contrario el riesgo es muy elevado	Agar SS	10mg	Salmonella / shigella	Negativo
Criterio indicativo de higiene . El exceso indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto puede ser rechazado	Agar Mac Conkey	10mg	Coliformes fecales (E. Coli)	Negativo
Criterios de alerta o límites críticos: Significa que durante el proceso de propagación del extracto no se debe exceder los límites especificados.	Agar OGY	10mg	Aerobios mesófilos Hongos y levaduras	Negativo

Fuente: MINSA/ DIESA. Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano, 2008, Lima.

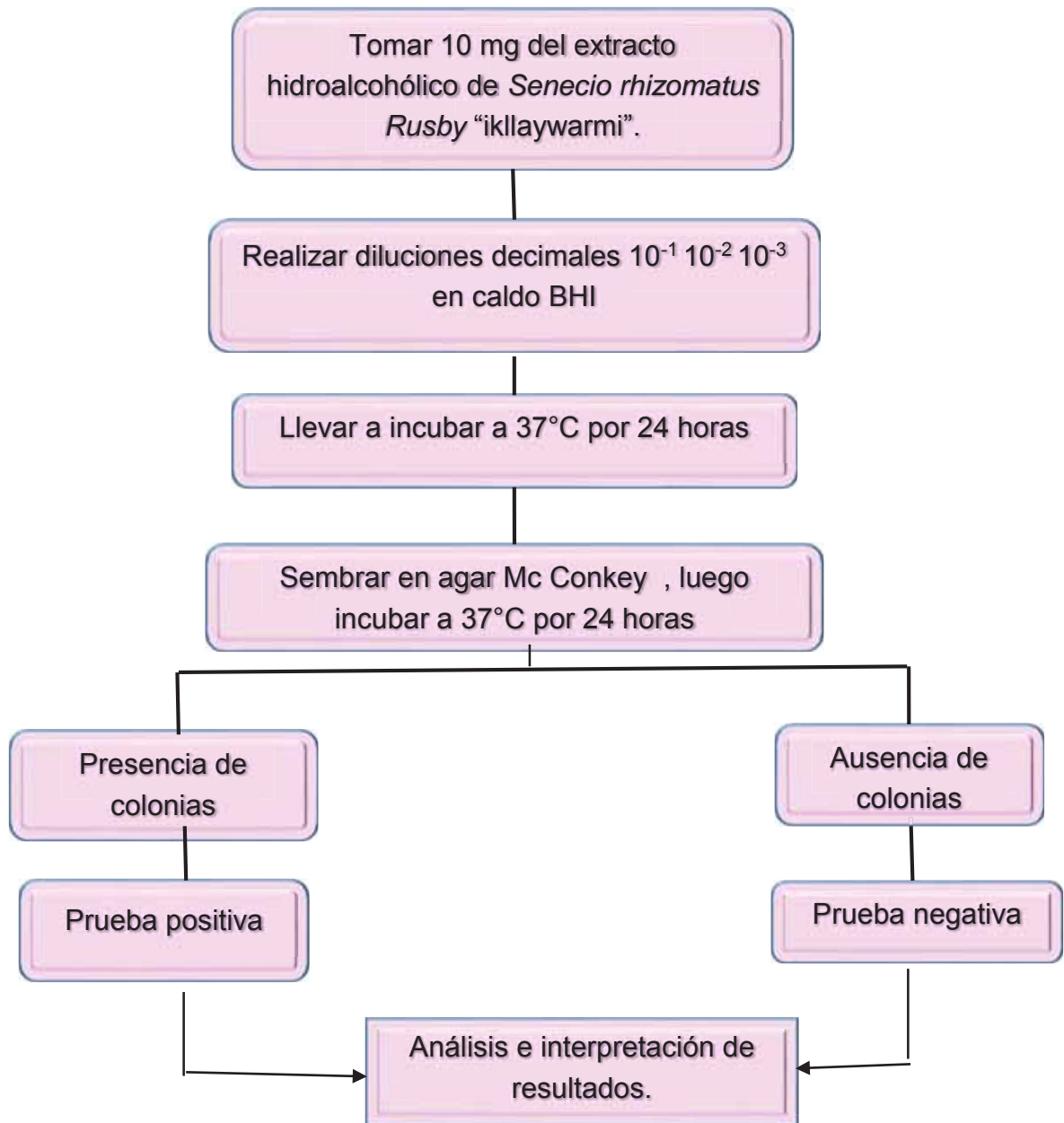
Las muestras vegetales están propensas a ser contaminados por microorganismos es así que al momento de su recolección el riesgo aumenta. Esta carga puede reducirse durante el proceso de maceración con etanol al 70%, pero esto no nos garantiza que los extractos que se obtendrán estén libres de microorganismos, por ello es necesario realizar un control microbiológico al extracto en estudio para garantizar que están libres de contaminación así mismo evitar que durante el ensayo se produzca posibles errores en los resultados.

Flujograma N° 2 : Control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”



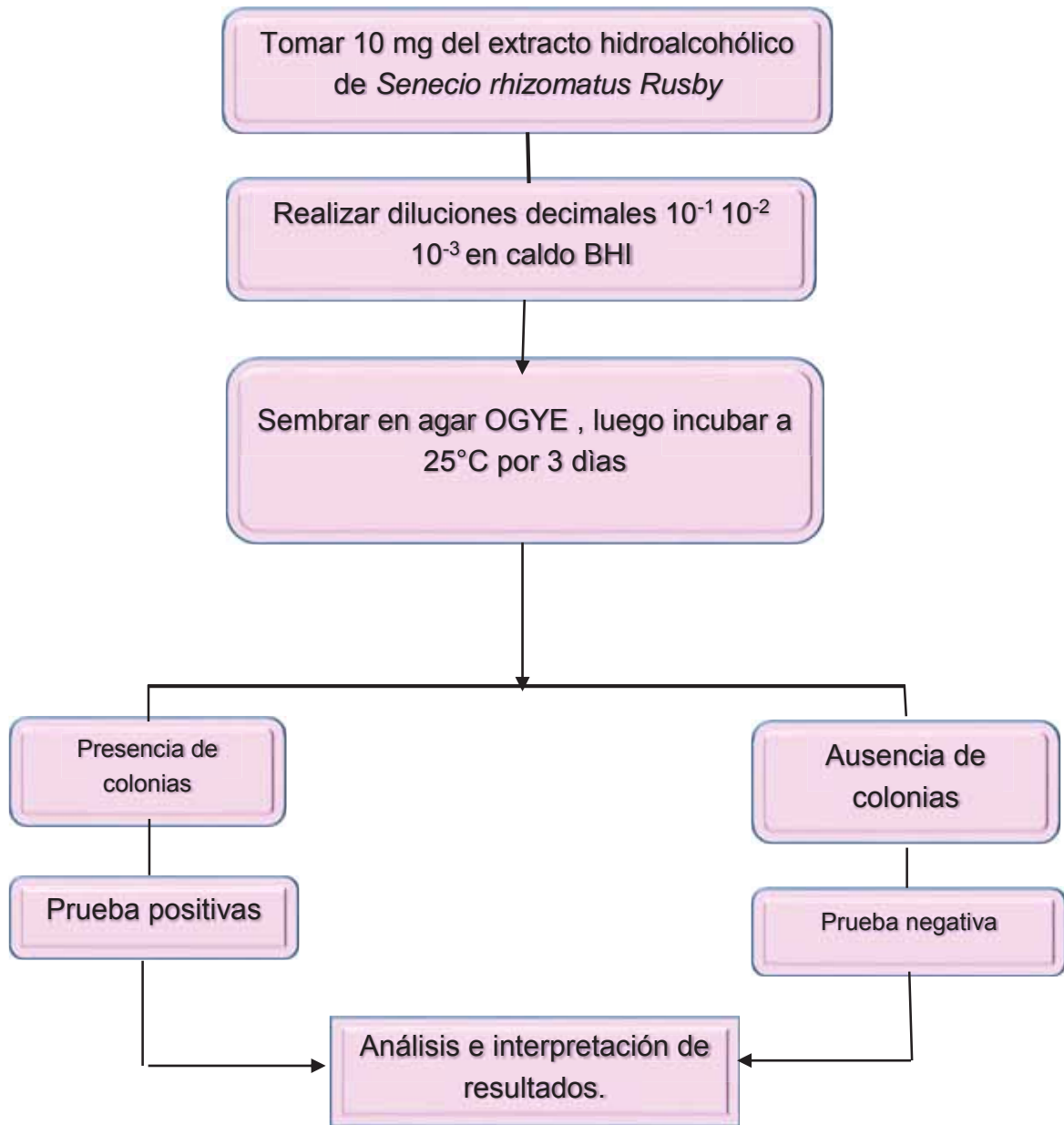
Fuente: Elaboración propia.

Flujograma N° 3 : Control microbiológico del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” según el criterio de higiene (coliformes fecales).



Fuente: Elaboración propia.

Flujograma N° 4 : Control microbiológico del extracto al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” en base al criterio de alerta o límites críticos (hongos y levaduras).



Fuente: Elaboración propia.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

3.5.1 Activación de las cepas bacteriana ATCC N° 27853

Las cepas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 fueron obtenidas de laboratorios GENLAB, para la activación de la cepa se sembró en agar ceramida, como indica en las instrucciones del laboratorio. (ANEXO N° 8) luego se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas.

3.5.2 Conservación de las bacterias

La cepa bacteriana fue conservada en un tubo de ensayo con tapa y con 4mL de agar cetrimide en pico de flauta debidamente rotulado y codificado previamente se incubado a 37°C por 48 horas para posteriormente ser conservados a 4 °C en refrigerador y repicado a un medio nuevo cada 15 días para su conservación. (24)

3.5.3 Estandarización de la curva de crecimiento bacteriano.

1. Del cultivo inicial de la bacteria en estudio, se seleccionó 2 a 3 colonias, se propagó con una asa de siembra en 5 ml de caldo de cultivo BHI, se llevó a incubación por 6 horas a 37°C.
2. se realizó el ajuste de la turbidez haciendo coincidir con el tubo 0.5 de la escala Mac Farlan hasta alcanzar la turbidez equivalente a 0.5 de la escala Mac Farland.
3. Se realizó una dilución 1/100 tomando 1 mL de este caldo con bacterias y se traspasó a un matraz con 99 mL de caldo BHI puro , y se incubo a 37°C por 24 horas.
4. La evaluación del crecimiento bacteriano se determinó haciendo lectura de la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 623nm en el espectrofotómetro UV-Visible con intervalos de 1 hora. (83)

3.5.4 Ensayo preliminar de sensibilidad bacteriana para *Pseudomona aeruginosa*

- 1) Se realizó un ensayo preliminar con diversas concentraciones del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” con la finalidad de identificar la concentración de trabajo y la concentración mínima

inhibitoria (CMI), la cual presentó actividad inhibitoria en el crecimiento de las cepas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

- 2) Según el método de placa en pozo excavado (Kirby Bauer), se siguió el mismo procedimiento utilizado para el ensayo final (concentración estandarizadas).
- 3) Las concentraciones de trabajo y concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron obtenidas a partir de la concentración inicial con las cuales se practicó en el ensayo preliminar.. (42)

3.5.5 Preparación de las placas Petri y procedimiento

- 1) Se preparó las placas petri con agar Müller-Hinton con un espesor de 4mm de espesor aproximadamente .
- 2) Las placas fueron rotuladas en la base de cada una de ellas con las diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” a probar, fármaco patrón (amikacina) y blanco.
- 3) Se obtuvo la suspensión bacteriana de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 en 10 mL de caldo de BHI de (0.5 Mc Farlad = 1.5×10^8 UFC) con lo que se procedió a la siembra mediante un hisopo estéril, en placas de agar Müller-Hinton ya preparadas.
- 4) Se procedió a la incubación a 37 ° C por 30 minutos, luego se hicieron 4 pozos por placa con ayuda pipeta Pasteur con un diámetro de 6mm, las placas para el fármaco patrón antibiótico no se hicieron pozos ya que se trabajó con discos estandarizados.
- 5) Se preparó las concentraciones del extracto hidroalcohólico 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, en mg/mL en solvente agua- metanol (80mL-20mL).
- 6) Con una micropipeta se depositan los extractos ya preparados en los pozos un volumen de 50µL.

- 7) A las placas sin pozos inoculados con la bacteria en estudio se colocaron los discos con concentraciones estandarizadas del fármaco patrón (Amikacina 30 µg).
- 8) Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas, pasado este tiempo se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano con un vernier (mm) (84)(ANEXO 6)

3.5.6 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Senecio rhizomatus Rusby Tikllywarmi*” SOBRE *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Para la estandarización se usó la siguiente formula:

$$\text{Factor de incremento} = \sqrt[r]{I}$$

Donde:

I: concentración máxima / concentración mínima.

$$r = N - 1$$

N: Número de concentraciones con las que se desea trabajar.

Las concentraciones con las que se trabajó se expresan en la siguiente manera

Concentración mínima Concentración 1

Concentración 1 X Factor de incremento = Concentración 2

Concentración 2 X Factor de incremento= Concentración 3

Concentración 3 X Factor de incremento= Concentración 4

Concentración 4 X Factor de incremento= Concentración 5

Concentración 5 X Factor de incremento= Concentración 6

Concentración 6 X Factor de incremento= Concentración 7

Concentración 7 X Factor de incremento= Concentración 8

Concentración 8 X Factor de incremento= Concentración 9

Concentración 9 X Factor de incremento= Concentración 10

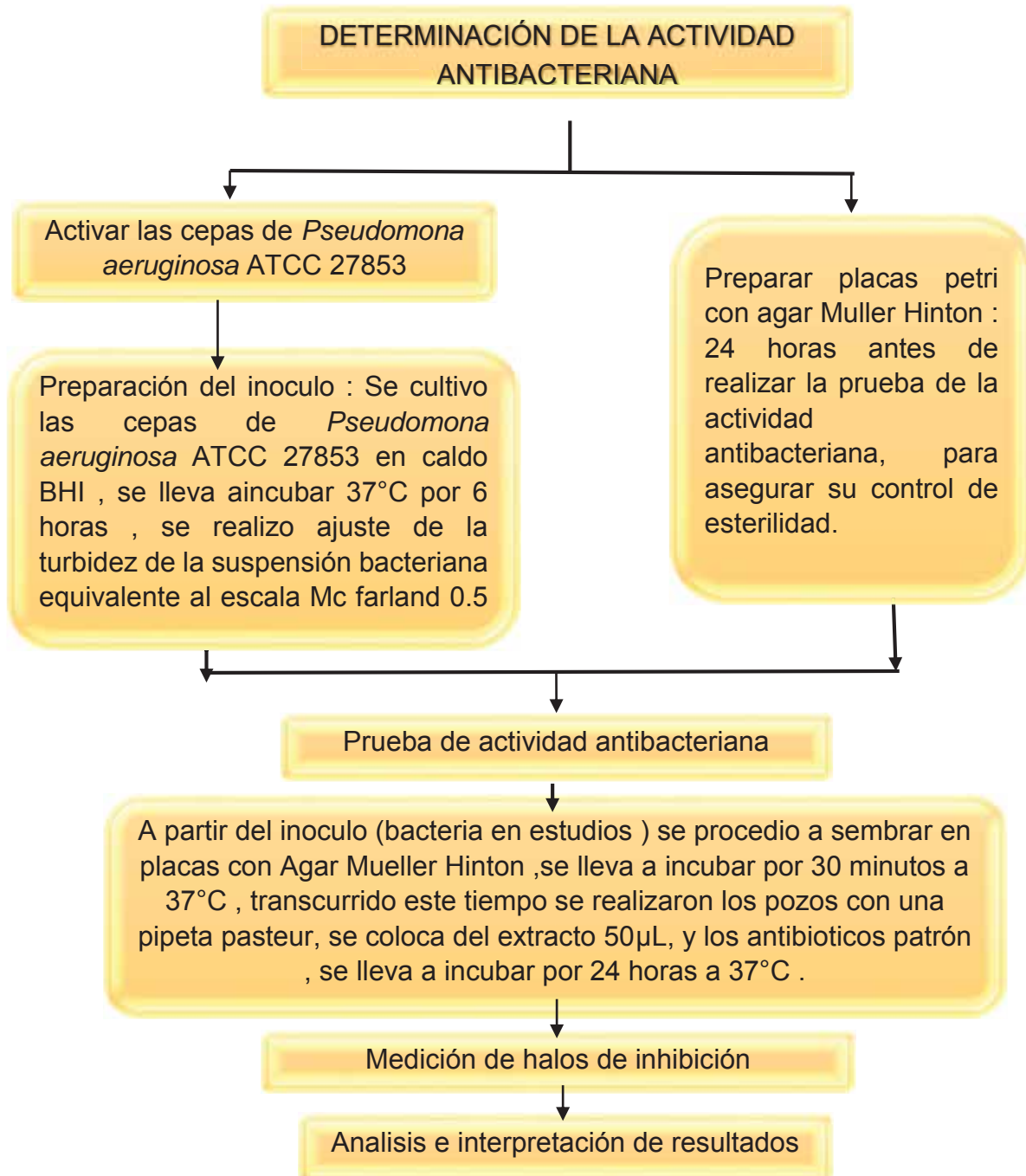
Concentración 10 X Factor de incremento= Concentración 11

Concentración 11 X Factor de incremento= Concentración 12

Concentración 12 X Factor de incremento= Concentración 13

Concentración 13 X Factor de incremento= Concentración 14

Flujograma N° 5 : Procedimiento de la actividad antibacteriana in vitro por el método de pozos excavados del extracto hiroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Ruby* “tikllaywarmi”.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.7 PRE- FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS

Existen varios métodos para la elaboración de liposomas que se encuentra en la literatura, en la presente investigación, se utilizó el método de hidratación de película de Bangham

Se plantea pre-formulaciones según la siguiente tabla N°3 donde se esquematiza seis formulaciones piloto, en las cuales se tiene diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, fosfatidilcolina de soya y colesterol ,de las cuales se escogerá la formulación que tenga mejor porcentaje de encapsulación el cual se llevará a la parte experimental. (20)

Tabla N° 3 : Pre formulación de liposomas con diferentes proporciones de sus componentes.

Formulaciones	Proporción (p/p/p)	Fosfatidilcolina de soya (mg)	Colesterol(mg)	Extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi” (mg).
Formulación 1	1:0.5:1	91	22	50
Formulación 2	2:1:1	181	44	50
Formulación-3	3:1.5:1	271.5	66.5	50
Formulación-4	6:1:1	114	10	10
Formulació-5	10:4:6	40	16	24
Formulación-6	12:4:6	24	8	12

Fuente: Elaboración propia.

3.5.8 ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS MEDIANTE EL MÉTODO DE HIDRATACIÓN DE PELÍCULA.

Los liposomas portadores del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" a diferentes concentraciones, se obtuvieron por el método de hidratación de película de Bangham y cols. (69)

Este método es específico para la preparación de liposomas plurilaminares, consta de las siguientes fases.

- A.** La primera fase constituyó fundamentalmente en la solubilización de los componentes de la pared lipídica donde se disolvió, fosfatidilcolina de soya y colesterol en una proporción (12:4 p/p) en disolventes orgánicos cloroformo: metanol en una proporción (2:1 p/p).

Como resultado se obtiene una solución (clorofórmica: metanol) del fosfolípido (fosfatidilcolina de soya y colesterol) y vitamina E.

- B.** En una segunda fase, se evaporará el disolvente en el equipo rotavapor a 37 °C, 100 rpm, 40 rpm hasta la evaporación del solvente y la formación de una película lipídica adherida a las paredes del matraz, luego se procede a secar al vacío durante 12 horas en la incubadora a 37°C.

- C.** La tercera fase constituye en la adición de la fase acuosa constituida por una solución buffer fosfato pH 7.4, donde se disolvió el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" a una temperatura de 40°C, con agitación constante.

Se produce la hidratación de la película lipídica, que se desprendió de las paredes del recipiente y se formó una suspensión de liposomas en el exceso de solución acuosa.

- D.** En la cuarta fase, consistió en la reducción de tamaño de los liposomas mediante sonicación, durante 30 minutos.

Posteriormente la suspensión resultante se deja estabilizar durante 24 horas a 4°C, antes de la separación.

- E. En la quinta fase, se realizó la centrifugación a 40.000 rpm durante 30 minutos, de los cuales se separó el sobrenadante, lo que constituye los liposomas, trasvasándose a un envase de vidrio estéril con tapa de goma, para ser almacenado a una temperatura de 4°C. (55) (20)

3.5.8.1 Método de separación: centrifugación

Una vez obtenidas las suspensiones liposomales portadores del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, se procedió a la separación del principio activo encapsulado del resto de sustancia activa libre que está situada en la fase acuosa externa que rodea a los liposomas.

Para cada muestra de formulación se preparó 10mL, dicho volumen se divide en dos tubos de 5mL cada uno. (63)

La separación de las fracciones correspondientes al agente captado y libre, se realizó por centrifugación durante diez minutos a 1000 r.p.m.

Transcurrido este tiempo se obtendrá en el tubo de centrifugación una fase acuosa y otra fracción de precipitado en el fondo.

Para la valoración se tomó 0.32mL del sobrenadante y se disuelve en 5mL de alcohol de 70%. (68)

3.5.8.2 Método de valoración: Espectrofotometría UV-Visible.

A fin de establecer la formulación de liposomas más idónea, así como porcentaje de extracto encapsulado por dichos vectores y libre en el medio también su grado de captación, se ha utilizado como técnica de valoración cuantitativa el método espectrofotométrico.

Una vez constatada la solubilidad del agente en etanol al 70%, se trazan los espectros de absorción de diversas soluciones de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, mediante barrido de escala, para determinar así la longitud de onda más adecuada.

A continuación, se preparan una serie de soluciones para comprobar si existe una relación lineal entre absorbancia y concentración, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.1-0.5mg/5mL del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, para ser posteriormente utilizado en los análisis. Esto nos permite conocer los límites de detección y la sensibilidad del método. La valoración se realiza en un espectrómetro UV-visible, el máximo de absorbancia detectada en todo el ensayo, corresponde a $\lambda = 202$ nm, empleándose como blanco, alcohol de 70°. Los valores de absorbancia determinados para cada fracción, así como los volúmenes de las mismas, permiten calcular las concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” no encapsulado, expresadas en mg/ 100mL, por extrapolación en una curva patrón de calibrado. (55)

3.5.8.3 Porcentaje de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” captado por los liposomas y libre en el medio.

Conocidos los valores de concentración de libre extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” en el medio (C libre), expresada en mg/ 100mL y el volumen de la fracción resultante de la centrifugación (V libre), la determinación del porcentaje libre se realiza de la siguiente formula. (55) (85)

$$\text{Extracto hidroalcohólico libre (EH libre)} = \frac{C \text{ libre} \times V \text{ libre}}{100ml}$$

$$\text{Porcentaje libre} = \frac{EH \text{ libre} \times 100mg (\%)}{AT \text{ total}}$$

3.5.8.4 ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Para la evaluación de la estabilidad de los liposomas, se elaboró 5 series de muestras, dichas formulaciones corresponden a las integradas por fosfatidilcolina de soya, colesterol y extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, por la técnica descrita anteriormente.

Consistió en la realización de la prueba en la fase inicial del desarrollo del producto. Empleando condiciones extremas de temperatura con el objetivo de acelerar posibles reacciones entre sus componentes y la aparición de señales que deberán ser observadas y analizadas conforme a las características específicas de la formulación.

- Se utilizó frascos de vidrio y tubos de vidrio con tapa. .
- La duración del estudio fue de 30 días a temperaturas de 4°C y 40 °C. (70)

❖ Parámetros de la evaluación de la estabilidad

- Los parámetros a ser evaluados dependen de las características del producto en estudio y de los ingredientes utilizados en la formulación, de manera general se evaluó.
- Parámetros organolépticos : Aspecto, color, olor.
- Parámetros fisicoquímicos: Valor de pH, se monitoreó de ingredientes de la formulación.
- Parámetros microbiológicos : Conteo microbiano. (70)

3.5.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LIPOSOMAS ELABORADOS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* CEPAS ATCC 27853.

3.5.10 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

A. Preparación del inóculo :

- El inóculo para este método de dilución en caldo, se preparó resuspendiendo 2 a 3 colonias de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 en 10mL en caldo BHI, se incubó por 6 horas y posteriormente se ajustó la suspensión directamente hasta alcanzar dicha turbidez 0,5 de la escala de McFarland. (86)

B. Preparación de las diluciones

- Se preparó un grupo de tubos de ensayo, en los cuales se le agregó a volúmenes según la siguiente tabla N° 4.

Tabla N° 4 : Preparación de tubos para la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853

Tubos	Tubo N°1 concentración (12mg)	Tubo N°2 concentración (25mg)	Tubo N°3 concentración (50mg)	Tubo N°4 concentración (100mg)	Tubo N°5 concentración (200mg)
Liposomas	1 mL	1 mL	1 MI	1 mL	1 MI
Agua	0.6mL	0.6mL	0.6mL	0.6mL	0.6MI
Cepa activa	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4MI
Caldo BHI	8mL	8mL	8MI	8 mL	8MI
V. Final	10mL	10mL	10 mL	10mL	10 MI

Fuente: Modificado de INEI-ANLIS, 2001

3.5.11 MÉTODO TURBIDEZ -ESPECTROFOTOMÉTRICO

1. Se preparó un tubo patrón el cual contiene 1.4mL de caldo BHI puro más 1.6 mL de agua destilada. Con esta solución se calibró el espectrofotómetro a cero.
2. Se preparó un tubo control con 0.4 mL de cepa activa, se completo hasta 10mL con caldo BHI.
3. Se preparó un tubo con fármaco patrón amikacina (500mg/2 ml) con un volumen de 0.20 μ L y se completo con caldo BHI hasta completar el volumen de 10 mL.
4. Se preparó en tubos de ensayo, soluciones que contienen concentraciones crecientes de liposomas, los cuales se mezclaron con 0.4 mL de caldo BHI que contiene la cepa activa equivalente a 5×10^7 UFC aproximadamente en la escala de Mac Farland para completar a 10 mL, según la tabla N°4 . Todos los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas y se agregó twen 80 para facilitar la dilución de los liposomas.
5. Se midieron las lecturas de las absorbancias a $\lambda = 623$ nm antes de realizar la incubación de todos los tubos preparados, después de las 24 horas de incubación a 37°C se realizó la lectura para evaluar el crecimiento bacteriano y realizar los cálculos ya que el crecimiento microbiano fue determinado comparando la densidad óptica de cada dilución con el control. (45)

3.5.12 Determinación del porcentaje de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 :

El crecimiento microbiano fue determinado comparando la densidad óptica de cada disolución con el control. (87)

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{(Abs\ 24\ h - Abs\ 0H)_i}{(Abs\ 24\ h - Abs\ 0H)_c} \times 100$$

Donde :

I : Absorbancia de las diferentes concentraciones de los liposomas formuladas

C: Absorbancia del control .

3.5.13 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

En el presente trabajo de investigación, se realizó la recolección de datos mediante la técnica de observación experimental utilizando instrumentos como la cámara fotográfica (en todo el proceso de la investigación) y las siguientes fichas de recolección de datos.

- Para la identificación botánica de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”. ANEXO N° 1.
- Para la el análisis fitoquímico cualitativo. ANEXO N°2 y 3
- Para la prueba de solubilidad. ANEXO N°4
- Para la prueba del control microbiológico del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”y de los liposomas elaborados a diferentes concentraciones. ANEXO N°5
- Para la medición de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “ticllaywarmi”. ANEXO N°6
- Para la lectura al espectrofotómetro de las absorbancias del extracto y los liposomas formulados y evaluar su actividad antibacteriana. ANEXO N°7

3.5.14 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los datos que se van a obtener en la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” y los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona eruginosa* cepas ATCC 27853. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico Statistical Packge for for Social Sciences (SPSS). versión 19. Se utilizó primeramente prueba de Normalidad de análisis de varianza de un factor (ANOVA) para confirma si las medidas provienen de una distribución normal de prueba inferencial y la prueba de Post Hoc Tukey con el 95% de confianza.

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Tabla N° 5 : Porcentaje de humedad de las hojas y tallos de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

	<i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”		
N ° de Determinaciones	1	2	3
Peso de muestra	5.001	5.002	5.000
Peso de muestra seca	0.630	0.562	0.641
Percentage de humedad	87.90%	88.76%	87.18%
Promedio de porcentaje de humedad (%)	87.78%		

Fuente : Datos experimentales del estudio

Interpretación y Análisis de resultados

En la tabla N° 5, se observa el porcentaje de humedad de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” obtenido, según el método gravimétrico dio un valor de 87.78%, este resultado indica que la especie vegetal en estudio, tiene un alto contenido de agua, por lo tanto en el proceso de secado y conservación se debe tener mucho cuidado, ya que se tiene el riesgo de que se den reacciones de hidrolisis, oxidación o deshidrogenación y condensación (especialmente con los compuestos de naturaleza fenólica) .Además hace propensa a la muestra vegetal a una mayor contaminación bacteriana, puesto que el agua contenida en las hojas favorece la proliferación de microorganismos. (82)

Según **Espinoza 2002** (25), Reportó que *Senecio rhizomatus Rusby* “ tikllaywarmi” presentó un porcentaje de humedad de 79.21% y Según **Huaman y Ardiles 2018** (26), obtuvieron un porcentaje de humedad de 80% ,el cual en ambos casos son menores a los obtenidos en el presente estudio, esta diferencia podría ser un valor que determina ciertas diferencias entre las especies, por la ubicación geográfica, la época de recolección, conservación de muestra y el método usado en la determinación del porcentaje de humedad.

4.2 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS Y TALLOS DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

Tabla N° 6 : Resultados del porcentaje de extracción de las hojas y tallos de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

<i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	
Peso de la muestra molida (mg)	100
Peso del extracto seco(mg)	20.042
Porcentaje de extracción (%)	20.042

Fuente: Datos experimentales del estudio

Interpretación de resultados

En la tabla N° 6 se observa el resultado del porcentaje de extracción del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” , obtenidos por el método de maceración en etanol al 70% donde se obtuvo un valor de 20%, siendo este un indicador considerable de extracción de metabolitos secundarios de la especie en estudio.

El porcentaje de extracción permite calcular cuánto de muestra se necesita para obtener una cierta cantidad de extracto y así determinar la cantidad necesaria para realizar los diferentes ensayos durante el trabajo de investigación.

Análisis y discusión

Se obtuvo un porcentaje de extracción menor, comparado al que obtuvo **Huaman y Ardiles, 2018** (26), de *Senecio rhizomatus Rusby* (tikllaywarmi) presentó 21.81% de porcentaje de extracción y Según **Espinoza, 2002** (25), determinó el porcentaje de extracción por el método de maceración obteniendo un valor de 26.59% este resultado es superior al obtenido en el presente estudio , lo cual se podría deberse al solvente utilizado, muestra vegetal utilizado , tiempo de maceración y método de extracción .

4.3 PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

Para la determinación de la prueba de solubilidad se utilizó solventes de mayor a menor polaridad obteniéndose el siguiente resultado.

Tabla N° 7 : Resultados de la solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”

SOLVENTE	Extracto hidroalcohólico al 70 % de <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi”
Agua destilada	+
Metanol	++
Etanol 40%	++
Etanol 70%	+++
Metanol/ agua	+++
Etanol absolute	++
Acetona	+
Eter	+
Cloroformo	+
Hexano	-

Leyenda:

- Muy soluble: +++
- Soluble: ++
- Poco soluble: +
- Insoluble: -

Interpretación de resultados e

En la tabla N° 7, se muestra los resultados de la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, frente a diferentes solventes, empezando del más polar al menos polar.

- Muy soluble, en solventes polares ; etanol al 70% y metanol:agua, cumpliéndose que, lo semejante disuelve a lo semejante.
- Soluble en metanol, etanol al 40%, etanol absoluto
- Poco soluble en éter, acetona, cloroformo.
- Insoluble en hexano, que es un solvente apolar.

Análisis y discusión

Los resultados obtenidos para la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, indican que tiene naturaleza polar además proporcionan información necesaria para la elección del mejor solvente en la disolución del extracto en estudio para la determinación de los ensayos de actividad antibacteriana.

Según **Huaman y Ardiles, 2018** (26), *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” a partir de un extracto acuoso liofilizado obtuvo que el extracto es totalmente soluble en agua y etanol 40%, soluble en etanol al 70%, poco soluble en etanol al 96%, e insoluble en acetona, cloroformo, éter y hexano en base a estos resultados el extracto presenta una naturaleza polar, debemos tomar en cuenta que es un extracto acuoso por ello se puede inferir que la naturaleza polar es similar al obtenido en la presente investigación.

4.4 PRUEBA FITOQUÍMICA CUALITATIVA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Las pruebas del análisis fitoquímico cualitativo se realizaron con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, por reactivos de identificación específicos obteniéndose los resultados por coloraciones específicas y siendo otras de precipitación.

Tabla N° 8: Resultados de análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Metabolitos Secundarios	Reactivos	Resultados
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico 1%	++
Taninos	Gelatina	+
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+++
	Vapor de NH	+++
Glicósidos	Fheling	+++
Quinonas	Hidroxido de potasio	++
Saponinas	Prueba de la espuma	+
Alcaloides	Draguendorf	+
Lactonas	Blaget	++
Esteroides	Lieberman – burchard	+
Azúcares reductores	Fheling	+++

Fuente: Datos experimentales del estudio.

Donde:

- Abundante cantidad: +++
- Regular cantidad: ++
- Poca cantidad: +
- Ausentes

Interpretación de resultados

En la tabla N° 8 se puede observar los resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, se indica abundante cantidad de flavonoides, glicósidos, azúcares reductores, una regular cantidad de quinonas, lactonas, mientras que existe poca cantidad de saponinas, taninos, esteroides y alcaloides.

Análisis y discusión

Espinosa y Chambi, 2002 (25), al estudiar el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” determinó la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y glicósidos en abundante cantidad.

Según **Huaman y Ardiles, 2018** (26), reportó para el análisis fitoquímico del extracto acuoso liofilizado de *Senecio rhizomatus* Rusby (tikllaywarmi), abundante cantidad de quinonas y azúcares reductores seguido de una moderada cantidad de flavonoides, fenoles, lactonas y glúcidos. Una escasa cantidad de taninos y saponinas también se observa ausencia de alcaloides y esteroides.

Los resultados obtenidos en la presente investigación comparadas con las otras investigaciones locales presentan diferencias en cuanto a los metabolitos encontrados. Estas diferencias pueden deberse al tipo de extracción realizada y lugar donde fueron recolectados la especie vegetal usada en la investigación. Según estos resultados la actividad antibacteriana se puede deber en mayor proporción a la presencia de flavonoides.

4.5 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”

Tabla N° 9 : Resultados del control microbiológico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”

CRITERIOS	MICROORGANISMO	RESULTADOS
Criterio imperativo: la presencia de este microorganismo indica riesgo elevado , la prueba debe resultar negativa.	<i>Salmonella</i>	Ausente
Criterio indicativo de higiene: Su presencia indica la deficiencia de higiene del producto y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)	Ausente
Criterio de alerta o límites críticos: El producto no debe de exceder los límites específicos.	Aerobios mesófilos	Ausente
	Aerobios mesófilos, hongos y levaduras.	Ausente

Fuente: Datos experimentales

Interpretación y Análisis de resultados

En la tabla N°9 se observa los resultados del control microbiológico que se realizó al extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, los resultados obtenidos nos indica que el extracto esta libre de contaminación, utilizando los tres criterios indicados donde se encuentra dentro de los límites del control de calidad a nivel microbiológico indicadas por la DIGESA. Por lo tanto, el extracto esta apto para ser utilizados en la ejecución del presente estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853, así mismo para la formulación de los liposomas.

4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

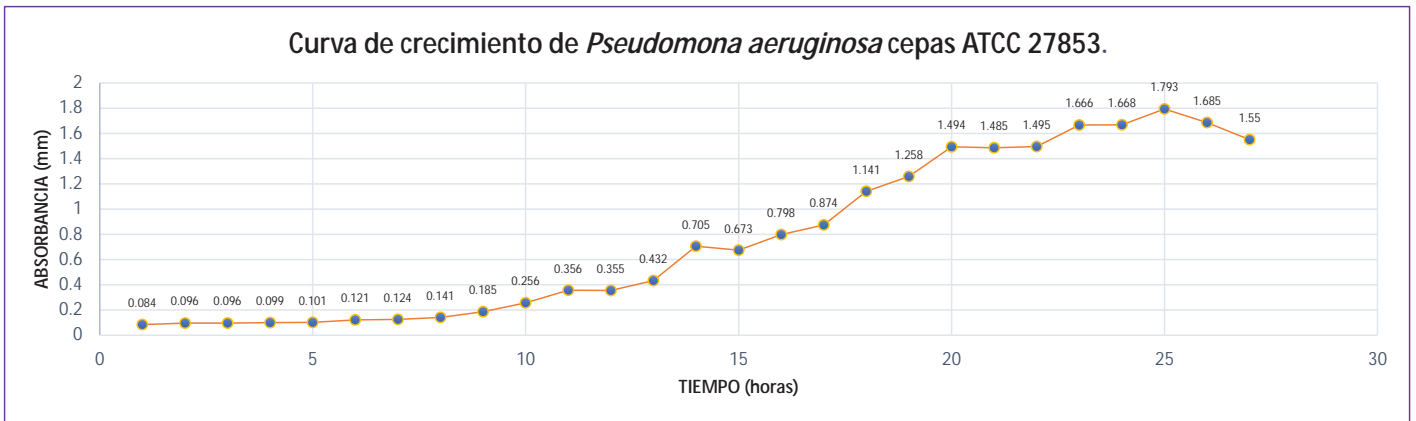
4.6.1 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Tabla N° 10 : Absorbancias para la estandarización de la curva de crecimiento *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

TIEMPO (HORAS)	ABSORBANCIAS (A 623 mm)
1	0.084
2	0.096
3	0.096
4	0.099
5	0.101
6	0.121
7	0.124
8	0.141
9	0.185
10	0.256
11	0.356
12	0.355
13	0.432
14	0.705
15	0.673
16	0.798
17	0.874
18	1.141
19	1.258
20	1.494
21	1.485
22	1.495
23	1.666
24	1.668
25	1.793
26	1.685
27	1.55

Fuente: Datos experimentales

Gráfico N° 1 : CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pseudomona aeruginosa* CEPA ATCC 27853.



Fuente: Elaboracion propia apartir de datos experimentales.

Interpretación y Análisis de resultados

En el grafico N°1 se muestra la curva de crecimiento celular de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853. Se puede identificar las siguientes fases de crecimiento : La fase de latencia que dura aproximadamente 6 horas, donde la cepa estuvo adaptandose a su ambiente nuevo, luego ingresan a la fase exponencial de crecimiento que comprende entre 6-22 horas, donde la cepa se encuentra en su maximo desarrollo, por lo tanto, mantiene activo todo su sistema enzimatico, pasado este tiempo,entre las 22 - 25 horas se puede observar la fase estacionaria, periodo donde la población celular se mantiene constante y empieza a disminuir la población de células viables, esto debido a la carencia de nutrientes y acumulación de sus desechos metabólicos. Según, **Quispe J. 2012** (88) , *Pseudomona aeruginosa*, presenta una fase de latencia de 6 horas , luego de esto ingresa a la fase exponencial de 6 - 15 horas, para después ingresar a la fase estacionaria hasta las 27 horas, lo cual es ligeramete comparable con los datos obtenidos en el presente estudio .

4.6.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70 % DE *Senecio rhizomatus Rusby* “ tikllaywarmi” FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 .

Tabla Nº 11 : Resultados de la prueba piloto del extracto hidroalcoholico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “ tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Nº de pozo	Concentración de extracto (mg/50µL)	Diámetro de halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853.			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	200	12.85	13.93	14.07	13.62
2	180	14.27	14.46	16.03	14.92
3	160	17.24	17.19	16.79	17.07
4	140	16.59	16.61	16.69	16.63
5	120	16.17	16.13	16.72	16.34
6	100	14.44	14.47	14.5	14.47
7	90	14.34	14.29	14.71	14.45
8	80	14.23	14.57	14.4	14.40
9	70	13.55	13.8	13.52	13.62
10	60	14.37	12.96	13.32	13.55
11	50	13.08	13.48	13.55	13.37
12	40	13.7	13.05	13.3	13.35
13	35	13.3	13.03	13.21	13.18
14	30	12.98	13.03	12.51	12.84
15	25	10.88	13.35	13.51	12.58
16	20	11.81	13.46	12	12.42
17	15	12.17	12.23	12.45	12.28
18	10	10.97	11.75	11.3	11.34
19	5	10.79	11.5	11.13	11.14
20	1.5	10.76	11.37	10.78	10.97
21	1	9.34	9.71	9.88	9.64
22	0.5	8.82	8.67	8.87	8.79
23	0.125	7.51	7	8.61	7.71
24	0.1	0	0	0	0.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

Leyenda:

- IG: Primer grupo de halos.
- IIG: Segundo grupo de halos
- IIIG: Tercer grupo de halos

Interpretación y Análisis de resultados

En la tabla N° 11 Se puede observar los resultados descriptivos de la prueba piloto, donde se muestra el promedio de los halos de inhibición para cada concentración de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, presenta un halo mínimo de inhibición de 7.71 mm en promedio a una concentración de 0.125 mg / 50 µL, resaltado de color amarillo, a menores concentraciones a partir de este se puede observar que no se presentan halos de inhibición dando valores de 0.00 mm de diámetro de inhibición.

Siendo el halo máximo promedio obtenido (resaltado en rojo) de 17.07 mm a una concentración de 160 mg/50µL por pozo, así mismo se puede evidenciar que a concentraciones mayores se obtiene halos menores que indica que el extracto empieza a perder actividad sobre la cepa, e incluso se observó en la parte experimental la saturación del extracto en los pozos.

Se tomó en cuenta las concentraciones mencionadas anteriormente para la estandarización de las concentraciones en la determinación de la actividad antibacteriana. De esta manera se evidencia que el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Pseudomonas aeruginosa* cepas ATCC 27853,

Tabla N° 12 : Análisis de varianza (anova) para la prueba piloto de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	846,750	24	35,281	111,628	,000
Dentro de grupos	15,803	50	,316		
Total	862,553	74			

Fuente: Datos experimentales.

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N°12, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados de la actividad antibacteriana de la prueba piloto del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a cepas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, siendo el valor de la significancia 0.000 (es menor a 0.05), por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna, y se rechaza la hipótesis de igualdad de medidas, es decir se puede aceptar que existe diferencias significativas entre los halos de inhibición formados por el extracto en estudio, lo que indica que presenta diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

Tabla N° 13 : Prueba de post hoc deTukey para la prueba piloto de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “ tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC

Concentración del extracto <i>Senecio rhizomatus</i> Rusby “tikllaywarmi”	N	Subconjunto para alfa = 0.05													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
0.100 mg	3	,0000													
0.125 mg	3		7,7067												
0.5 mg	3		8,7867	8,7867											
1 mg	3			9,6433	9,6433										
1.5 mg	3				10,9700	10,9700									
5 mg	3					11,1400	11,1400								
10 mg	3					11,3400	11,3400	11,3400							
220 mg	3						12,2200	12,2200	12,2200						
15 mg	3						12,2833	12,2833	12,2833						
20 mg	3						12,4233	12,4233	12,4233						
25 mg	3						12,4600	12,4600	12,4600						
30 mg	3							12,8400	12,8400	12,8400					
35 mg	3								13,1800	13,1800	13,1800				
40 mg	3									13,3500	13,3500	13,3500			
50 mg	3										13,3700	13,3700	13,3700		
60 mg	3											13,5500	13,5500	13,5500	
200 mg	3												13,6167	13,6167	
70 mg	3													13,6233	
80 mg	3														14,4000
90 mg	3														14,4467
100 mg	3														14,4700
180 mg	3														14,9200
120 mg	3														16,3400
140 mg	3														16,6300
160 mg	3														17,0733
Sig.		1,000	,783	,969	,078	,219	,077	,315	,111	,061	,073	,995			

27853

Fuente: Datos experimentales.

Interpretación y Análisis de resultados

En la siguiente tabla N°13, se observa los resultados de la prueba Pos Hoc de Tukey que realiza todos los contrastes de igualdad de las medidas entre rangos en el que se realiza la agrupación entre las medidas de los halos de inhibición en el que se forman 11 sub grupos de concentraciones. En cada sub grupo se observa homogeneidad ya que el valor de significancia es mayor a 0.05 . Por lo que se puede concluir que el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, si presenta actividad antibacteriana pero este no es comparable al fármaco patrón debido que este se ubica en otro sub grupo diferente.

4.6.3 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ANTIBACTERIANAS

DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE INCREMENTO PARA EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

- $I = 700/10; I = 70$
- $N = 14-1; N = 13$
- $F = \sqrt[13]{7} F = 1.39$

Interpretación y Análisis de resultados

Como se observa aplicando la fórmula matemática se obtuvo el factor de incremento siendo $F = 1.39$, con este dato se realizó la estandarización de las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla N 14.

Tabla N° 14 : Resultados de la estandarización de la concentración del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853

OPERACIÓN	N° DE CONCENTRACIÓN	RESULTADO
Concentración mínima	<i>Concentración 1</i>	0.125
Concentración 1 X F	<i>Concentración 2</i>	0.217
Concentración 2 X F	<i>Concentración 3</i>	0.376
Concentración 3 X F	<i>Concentración 4</i>	0.652
Concentración 4 X F	<i>Concentración 5</i>	1.130
Concentración 5 X F	<i>Concentración 6</i>	1.960
Concentración 6 X F	<i>Concentración 7</i>	3.398
Concentración 7 X F	<i>Concentración 8</i>	5.892
Concentración 8 X F	<i>Concentración 9</i>	10.217
Concentración 9 X F	<i>Concentración 10</i>	17.715
Concentración 10 X F	<i>Concentración 11</i>	30.719
Concentración 11 X F	<i>Concentración 12</i>	53.266
Concentración 12 X F	<i>Concentración 13</i>	92.363
Concentración 13 X F	Concentración 14	160.158

Fuente: Elaboración propia de los datos experimentales

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N°14, se muestra los valores de las concentraciones del extracto, luego de hallar el factor de incremento, con los datos obtenidos de la prueba piloto. Estas concentraciones han servido para la determinación del nuevo ensayo para evaluar la actividad antibacteriana.

4.6.4 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Tabla N° 15 : Resultados de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 con las concentraciones estandarizadas.

N° DE POZO	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/50µL)	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS <i>Pseudomona aeruginosa</i> 27853			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.125	7.33	7.20	6.95	7.16
2	0.217	7.98	8.20	7.89	8.02
3	0.376	8.44	8.70	8.35	8.50
4	0.652	9.20	9.02	9.67	9.30
5	1.130	9.50	9.46	9.51	9.49
6	1.960	10.27	9.22	9.97	9.82
7	3.398	10.34	9.95	10.51	10.27
8	5.892	10.81	11.14	10.66	10.87
9	10.217	11.26	11.80	11.57	11.54
10	17.715	12.65	12.45	12.36	12.49
11	30.719	13.37	13.00	12.93	13.10
12	53.266	14.22	14.42	13.84	14.16
13	92.363	15.90	16.02	15.91	15.94
14	160.158	17.23	17.36	17.50	17.36
15	Amikacina 30□g	26.00	24.00	23.00	24.33
16	Control negativo	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente datos experimentales:

Leyenda:

- IG: Primera medición.
- II G: Segunda medición.
- III G: Tercera medición

Interpretación y Análisis de resultados

En la tabla N°15, se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” sobre cepas *Pseudomona aeruginosa* se puede deducir que a mayor concentración se tiene un mayor diámetro de halo de inhibición.

A partir de 0.125 mg /50 uL por pozo con un halo de inhibición 7.16 mm y a una concentración de 160.16 mg / 50 uL , presenta un halo de inhibición de 17.36 mm..

De acuerdo al comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS) 2000 los diámetros críticos de amikacina 30ug para *Pseudomona aeruginosa* 27853 es sensible.

Según estos resultados la actividad antibacteriana de los extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” se debe a la presencia de compuestos fenólicos , flavonoides, taninos y el modo de acción de estos metabolitos.

Se tomó en cuenta los criterios de TODA Y COL 1994. (89) (ver ANEXO N° 12) teniendo en cuenta esta clasificación se puede observar que entre las concentraciones de 0.376 mg - 17.715 mg el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” presentó una actividad antibacteriana ligera, entre las concentraciones de 30.719 mg a 92.363 mg el extracto presentó una actividad moderada y la concentración de 160.15 mg presenta una actividad marcada.

Tabla N° 16 : Resultado de los halos inhibición de los fármaco patrón amikacina para *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Zona de diámetro de interpretación crítica (mm)				
FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
Amikacina	30 µg	≤14	15-16	17≥

Análisis e Interpretación de resultados

En la tabla N° 16 se muestra los halos de inhibición para el disco de sensibilidad de amikacina 30 µg de acuerdo al comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS) 2002 los diámetros críticos para *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 (84)

Este fármaco se utilizó como patrón en la determinación de la actividad antibacterial, lo cual nos permite saber si la cepa es resistente, intermedio o sensible al antibiótico podemos observar que los halos de inhibición obtenidos para amikacina que fue de 24 mm. De acuerdo a estos resultados la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa* es sensible al fármaco patrón utilizado.

El extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” presenta un halo de inhibición promedio máximo de 17.36 mm a una concentración de 160 mg /50 µL este valor es cercano al patrón de amikacina .Con estos datos se puede concluir que *Pseudomona aeruginosa* ATCC 278533 es sensible a extracto en estudio y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el comité Nacional de estándares de laboratorio (NCCLS), por lo que se puede inferir que el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” presenta actividad antibacteriana

4.6.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Tabla N° 17 . Análisis de varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriano in vitro del extracto de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” con las concentraciones estandarizadas

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1441,678	15	96,112	686,973	,000
Dentro de grupos	4,477	32	,140		
Total	1446,155	47			

Fuente: Datos experimentales

Leyenda:

Gl: grados de libertad

F: Distribución de fisher

Sig : Significancia

Sig:> 0.05 no existe diferencias significativas entre dos halos de inhibición.

Sig:< 0.05 existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

Interpretación y Análisis de los resultados

Según los estudios de análisis de varianza (ANOVA) en la tabla N° 17 se observa que el valor de significancia es de 0.00 este valor está debajo de 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, es decir existen diferencias significativas entre grupos entre los halos de inhibición formados por el extracto de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, indicando que presentan diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Tabla N° 18 : Resultado de la prueba de post hoc Tukey para la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Concentraciones estandarizadas de extracto de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> .	N	Subconjunto para alfa = 0.05														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
control negativo	3	,0000														
0.125 mg	3		7,1600													
0.217 mg	3		8,0233	8,0233												
0.376 mg	3			8,4967	8,4967											
0.652 mg	3				9,2967	9,2967										
1.13 mg	3				9,4900	9,4900										
1.96 mg	3					9,8200	9,8200									
3.398 mg	3					10,2667	10,2667									
5.892 mg	3						10,8700	10,8700								
10.217 mg	3							11,5433	11,5433							
17.715 mg	3								12,4867	12,4867						
30.719 mg	3									13,1000	13,1000					
53.266 mg	3										14,1600					
92.363 mg	3											15,9433				
160.158 mg	3												17,3633			
amikacina 30 mg	3															26,6667
Sig.		1,000	,304	,966	,137	,160	,092	,688	,190	,804	,086	1,000	1,000	1,000		

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

Interpretación y Análisis de resultados

En la tabla N°18, se muestra los resultados para la prueba de Pos Hoc Tukey que permite realizar las comparaciones de igualdad entre medias de los halos de inhibición y entre rangos de las diferentes concentraciones, en el que se realiza la agrupación de las medias, obteniéndose 13 sub grupos de concentraciones. Dentro de cada subgrupo, se observa la homogeneidad entre las medias ya que el valor de significancia es mayor a 0.05, indica que las diferencias no son estadísticamente significativas. Por lo que se puede inferir que la actividad antibacteriana de cada concentración dentro de cada subgrupo es similar

No obstante, al realizar la comparación entre los 13 sub grupos se tiene que existe una relación de heterogeneidad ya que el valor de significancia es menor a 0.05. Por lo tanto, entre cada sub grupo de concentración, presenta diferente actividad antibacteriana.

En la tabla N°18 se evidencia las diferentes concentraciones agrupadas en diferentes sub grupos donde a medida que se acerca al fármaco patrón es mayor la actividad antibacteriana de la concentración del extracto en estudio.

Por lo que se concluye que *Senecio rhizomatus Rusby* si presenta actividad antibacteriana, pero este no es comparable al del fármaco patrón debido a que estos mismos se ubican en otro sub- grupo.

4.6.5 ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS CON EL EXTRACTO HIDOALCOHOÓLICO AL 70% *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

4.6.5.1 COMPOSICIÓN DEL LIPOSOMA Y GRADO DE ENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO HIDOALCOHÓLICO AL 70% *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” PARA LAS PRUEBA PILOTO

La determinación del grado de captación del extracto hidroalcohólico al 70% *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, dentro de los liposomas multilaminares, se ha efectuado mediante valoración espectrometría UV-Visible, a partir de la fracción del extracto hidroalcohólico al 70% *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” no incorporado en los liposomas, que resulta de la separación por centrifugación.

Tabla N° 19 : Resultados obtenidos para la recta de regresión lineal

X	Y
0.1	0.1904
0.2	0.4971
0.3	0.7818
0.4	1.0737
0.5	1.4032

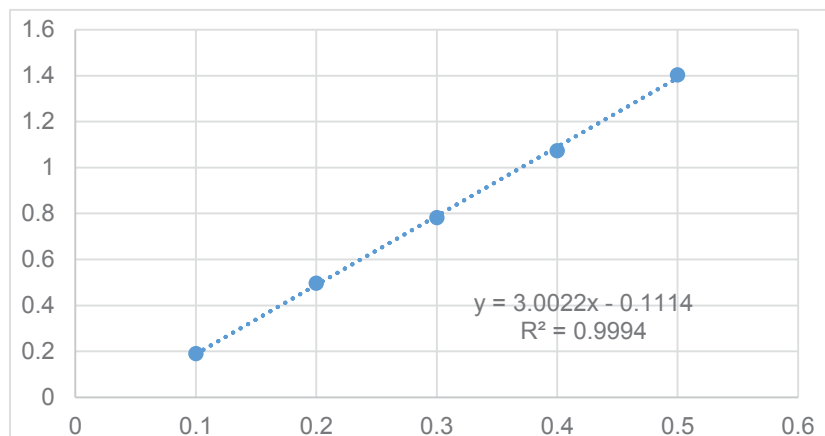
Fuente: Datos experimentales

X= Concentración de extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”. (mg)

Y=Absorbancia

Dicho proceso de valoración ha requerido la elaboración de una recta de regresión, a partir de concentración conocidas de extracto hidroalcohólico al 70% *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, y de sus correspondientes valores de absorbancia a 202 nm.

Gráfico N° 2 : Regresión lineal para el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.



Fuente: Datos experimentales.

Ecuación: $Y = mx - b$

$$Y = 3.0022x - 0.1114$$

Interpretación y Análisis de resultados

En el gráfico N°2 se muestra las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" en un rango de 0.1mg a 0.5mg y las absorbancias obtenidas de la lectura en el espectrofotómetro, estas se utilizaron para elaborar la curva de calibración que tiene una tendencia lineal y la ecuación: con un valor de R^2 es de 0.9994, siendo esta próxima al valor de 1, indica que hay una buena relación entre la concentración de extracto en estudio y su absorbancia, lo que nos da entender que la curva de calibración se realizó de manera óptima y se puede usar para interpolar los valores de absorbancia obtenidos en el estudio así al ser reemplazados en la ecuación se podrá calcular los valores de las concentraciones de las muestras.

Se realizó la regresión lineal para hallar la ecuación, lo cual permitió realizar los cálculos en la ecuación hallada, se realizó el reemplazo del valor de "Y", con el valor de las absorbancias obtenidas mencionadas en la tabla N°19, con la obtención de diferentes absorbancias, para seguir con los cálculos, y hallar el porcentaje de encapsulación.

Tabla N° 20 : Resultados del porcentaje de encapsulación para cada formulación de liposomas pilotos portadores de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

Nº	Proporción en (p/p/p) mg	Absorbancia.	Concentración de extracto libre en solución liposomal	Volumen libre sin liposoma	Volumen total liposoma y sobrenadante	Extracto libre hidroalcohólico	Porcentaje libre	Para 100 %
1	1:0.5:1	3.593	1.234	18	30	0.234	0.781	99.219
2	2:1:1	3.5947	1.234	20	30	0.247	0.823	99.177
3	3.1.5:1	3.5944	1.234	18	30	0.222	0.741	99.259
4	6:1:1	3.5956	1.235	19	30	0.235	0.782	99.218
5	10:4:6	3.5969	1.235	17	30	0.210	0.700	99.300
6	12:4:6	2.9825	1.031	20	30	0.206	0.687	99.313

Fuente: Datos experimentales.

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N° 20, se muestran los valores obtenidos para los diferentes pilotos formulados del grado de capacitación el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” por liposomas multilaminares .

Con los datos experimentales de absorbancia a 202nm, determinados espectrofotométricamente, se han calculado las concentraciones del extracto no encapsulado expresado en mg/10 mL. Conocidas la cantidad total de sustancia activa utilizada para la preparación de liposomas y por diferencias con respecto al extracto libre, se ha determinado la proporción de principio activo captado.

Siendo la de mayor encapsulación dio un valor 99.313% de proporción (12: 4: 6) donde se muestra mayor porcentaje de encapsulación, por ello se eligió dicha formulación para la elaboración de los liposomas a distintas concentraciones y probar su sensibilidad antibacteriana.

Tabla N° 21 : Elaboración de liposomas con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Formulaciones Proporción 12:4:6 p/p/p (mg)	Fosfatidilcolina de soya (mg)	Colesterol (mg)	Extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> (mg)
F-1	200	179	200
F-2	100	67	100
F-3	50	33	50
F-4	25	17	25
F-5	12	4	12

Fuente: Datos experimentales.

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N° 21 se muestran las diferentes concentraciones utilizadas para la formulación de liposomas dentro de ellas podemos mencionar que la de mayor concentración de extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” es de 200 mg/ 30 mL de buffer fosfato 7.4 pH y de menor concentración es de 12 mg/ 30 mL de buffer fosfato 7.4 pH , para lo cual se calculó las concentraciones de fosfatidilcolina de soya y colesterol según la concentración de extracto en estudio como se muestra en la tabla N° 21. Utilizándose la misma proporción para toda la formulación 12: 4: 6 p/p/p , (fosfatidilcolina de soya, colesterol, extracto), así mismo con respecto al solvente utilizado, cloroformo y metanol fue de (2:1) la cual se utilizó para las 5 formulaciones.

4.6.6 EVALUCIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS CON EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* CEPAS ATCC 27853.

Tabla N° 22 : Resultados de la lectura de las absorbancias de las diferentes concentraciones de los liposomas frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Concentración de liposomas(mg)	Absorbancias 0 horas			PROMEDIO	Absorbancia 24 horas			PROMEDIO
	I	II	III		I	II	III	
12	1.372	1.375	1.374	1.374	1.475	1.475	1.483	1.478
25	1.734	1.739	1.74	1.738	1.818	1.823	1.823	1.821
50	1.921	1.924	1.922	1.922	2.003	2.000	2.001	2.001
100	2.112	2.105	2.109	2.109	2.148	2.146	2.146	2.147
200	2.77	2.768	2.773	2.770	2.798	2.798	2.79	2.795
Amikacina	0.002	0.005	0.003	0.003	0.063	0.064	0.065	0.064
Control	0.612	0.616	0.614	0.614	0.958	0.962	0.96	0.960

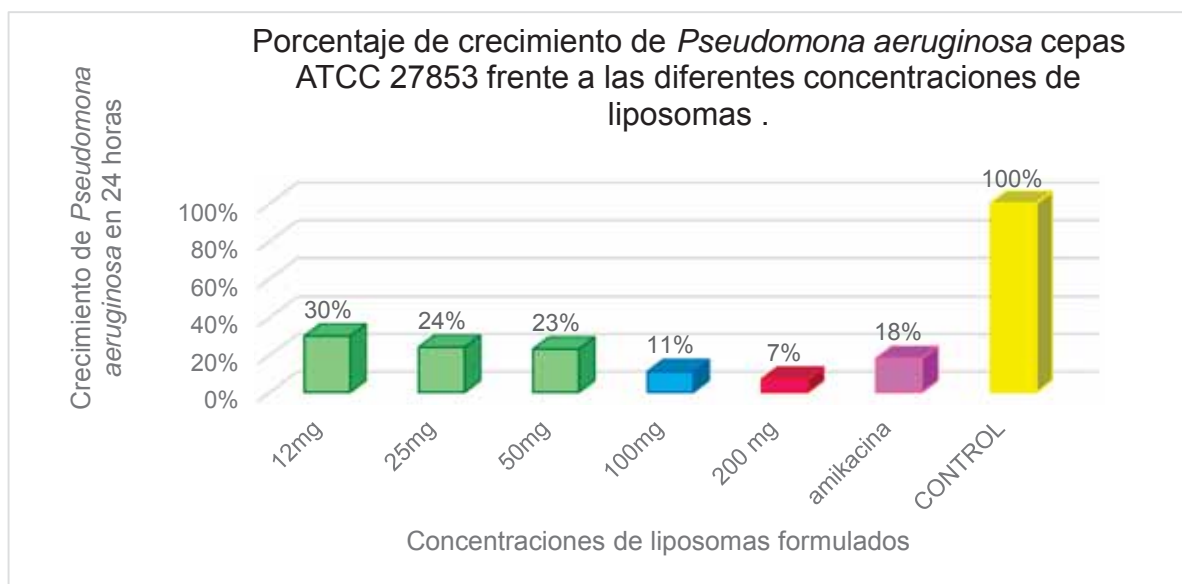
Fuente: Datos experimentales.

Tabla N° 23 : Resultados del porcentaje de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* 27853 frente a diferentes concentraciones de liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

Concentración de liposomas(mg)	Absorbancia 0 Horas	Absorbancias 24 Horas	ABS24 H-ABS 0 H	% Crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> 27853
12mg	1.374	1.478	0.104	30%
25mg	1.738	1.821	0.084	24%
50mg	1.922	2.001	0.079	23%
100mg	2.109	2.147	0.038	11%
200 mg	2.770	2.795	0.025	7%
Amikacina	0.003	0.064	0.061	18%
Control	0.614	0.960	0.346	100%

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N° 3 : Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853



Fuente: Datos experimentales

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N°23 y grafico N° 3, se reportó el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 en porcentajes frente a las diferentes concentraciones de liposomas, tomando en cuenta como el grupo control (inóculo de *Pseudomona aeruginosa* y caldo), se considera con un crecimiento bacteriano de 100% donde se desarrolla el microorganismo sin ningún interferente (antibiótico) en 24 horas a 37°C.

Según los resultados obtenidos para la concentración de 12mg, se tiene mayor crecimiento bacteriano con un valor de 30%, lo que indica que los liposomas permitieron el desarrollo de *Pseudomona aeruginosa* en el porcentaje mencionado, seguido de las concentraciones de 25 mg y de 50mg de formulación liposomal, se tiene poca diferencia con valores de 24% y 23%, para la concentración de 100 mg el valor obtenido es de 11% de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* es menor en comparación de amikacina(fármaco patrón) donde se obtuvo un crecimiento de 18 % de *Pseudomona aeruginosa*.

En cuanto al valor obtenido para Amikacina (fármaco patrón) permitió solo el 18% de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*, el cuál es superado por la concentración de 200mg con un valor de 7%, tiene un marcado efecto antibacteriano al interferir en el crecimiento y desarrollo de *Pseudomona aeruginosa*, llegando a superar el efecto del fármaco patrón amikacina.

La prueba de la acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 de la formulación de los liposomas elaborados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" redujo significativamente el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Por lo que se concluye que la encapsulación del extracto extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" permitió mejorar la actividad antibacteriana frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

Existen muchas explicaciones sobre el posible mecanismo de acción antibacteriano de liposomas cargados con sustancias con actividad antibacteriana frente a diferentes patógenos, podemos mencionar por ejemplo, que en el estudio de **Alhajlan y Alhariri, 2013** (90), en el cual se menciona que la mayor actividad de las formulaciones liposomales podría atribuirse a la fusión de los liposomas con la pared celular bacteriana, de modo que se puede administrar una alta concentración de antibiótico directamente al citoplasma bacteriano. Además, se ha observado una eficacia mejorada de las formulaciones liposomas cargadas positivamente, lo que podría explicar la interacción de la superficie del liposoma con la pared bacteriana cargada negativamente que atrae una alta concentración del antibiótico para fusionarse con la membrana celular bacteriana.

En el estudio de **Mugabe 2006** (91), establece que para definir el mecanismo de las interacciones liposoma-bacteria, se emplearon técnicas microscópicas electrónicas de transmisión (TEM), a través de las cuales se estableció que los liposomas interactúan íntimamente con la membrana externa de *Pseudomona aeruginosa* lo que lleva a la deformación de la membrana.

Tabla N° 24 : Análisis de varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	18059,578	6	3009,930	2844,550	,000
Dentro de grupos	14,814	14	1,058		
Total	18074,392	20			

Fuente: Datos estadísticos

Leyenda:

Gl: Grados de libertad

F: Distribución de Fisher

Sig.: Significancia

Sig.: > 0.05, no existe diferencia significativa entre los grupos que inhibe el crecimiento microbiano

Sig.: < 0.05 existe diferencia significativa entre los grupos que inhiben el crecimiento microbiano.

Interpretación y Análisis de Resultados

Según los resultados de análisis de la varianza ANOVA, en la tabla N° 24 se observa que el valor de significancia es de 0.00, un valor que está por debajo de 0.05 por lo que se puede afirmar que existen diferencias significativas de grupos entre los porcentajes de crecimientos de *Pseudomona aeruginosa* por cada concentración de liposomas ensayados, lo que significa que presenta diferente actividad en sus diferentes concentraciones.

Tabla N° 25 : Prueba de post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana para las diferentes concentraciones de los liposomas elaborados con el con el extracto de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Concentración Liposomas elaborados (mg)	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
200	3	7,2253					
100	3		10,9830				
Amikacina	3			17,5337			
50	3				22,8320		
25	3				24,1807		
12	3					30,0580	
Control	3						100,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	,681	1,000	1,000

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N° 25, se muestra la prueba de Post Hoc de Tukey, permite determinar cómo se agrupan los sub grupos formados por las diferentes concentraciones de liposomas, obteniéndose 6 sub grupos. Al realizar la comparación entre los 6 sub grupos se tiene que existe una relación de heterogeneidad ya que el valor de significancia es menor a 0.05. Por lo que se infiere que cada sub grupo formado, presenta estadísticamente diferente actividad antibacteriana. A la concentración de 200 mg de liposomas se tiene la máxima actividad forma el primer sub grupo con el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* solo de 7%,

Por lo que se concluye que los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” si presenta actividad antibacteriana llegando a inhibir mejor el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 a medida que se acerca al fármaco patrón (amikacina) y cuando el sub grupo se aleja del sub grupo control 100% de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

4.6.7 EVALUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* CEPAS ATCC 27853.

Tabla N° 26 : Resultados de la lectura de las absorbancias de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Concentración de extracto (mg)	Absorbancias 0 horas			Promedio	Absorbancias 24 horas			Promedio
	I	II	III		I	II	III	
12	0.058	0.06	0.062	0.06	0.36	0.36	0.359	0.360
25	0.08	0.078	0.079	0.079	0.325	0.33	0.33	0.328
50	0.158	0.159	0.159	0.159	0.286	0.283	0.282	0.284
100	0.362	0.363	0.362	0.362	0.455	0.455	0.454	0.455
200	0.726	0.726	0.725	0.726	0.804	0.802	0.802	0.803
Amikacina	0.002	0.005	0.003	0.003	0.063	0.064	0.065	0.064
Control	0.612	0.616	0.614	0.614	0.958	0.962	0.96	0.96

Fuente: Datos experimentales.

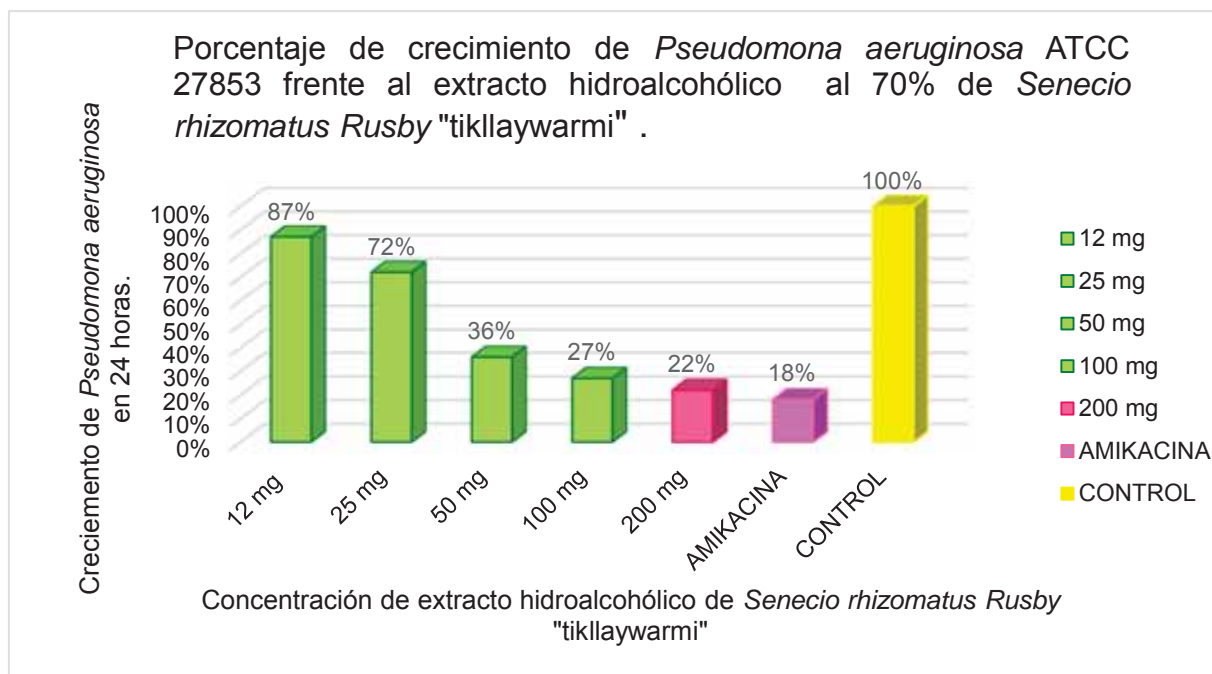
Tabla N° 27 : Resultados del porcentaje de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* 27853 frente a diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

Concentración de extracto (mg)	Absorbancia 0 Horas	Absorbancia 24Horas	Absorbancia 24 horas –Absorbancia 0 horas	% Crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> 27853.
12	0.060	0.36	0.300	87%
25	0.079	0.328	0.249	72%
50	0.159	0.284	0.125	36%
100	0.362	0.455	0.093	27%
200	0.726	0.803	0.077	22%
Amikacina	0.002	0.064	0.062	18%
Control	0.614	0.96	0.346	100%

Fuentes: Datos experimentales del estudio.

En la tabla N° 27, se observa los porcentajes de crecimiento que fueron hallados al reemplazar la fórmula de porcentaje de crecimiento mencionado anteriormente.

Gráfico N° 4 : Resultados de la determinación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853



Fuente: Datos experimentales

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N°27 se encuentra los resultados de los porcentajes de crecimiento calculados para el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

Se observa que hay un máximo valor de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con un 87% para la concentración de 12mg a medida que va aumentando, la concentración del extracto de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” va disminuyen el porcentaje de crecimiento del microorganismo, llegando a obtenerse un 22% de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* para la concentración de 200mg que es mayor al valor obtenido para el fármaco patrón amikacina, donde se obtuvo un valor de 18% de crecimiento bacteriano. .

En conclusión, el extracto de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” en las concentraciones ensayadas presenta menor actividad antibacteriana que el fármaco patrón (amikacina) que tiene un valor de 18% de crecimiento bacteriano.

Tabla N° 28 : Análisis de varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	20719,786	6	3453,298	11045,076	,000
Dentro de grupos	4,377	14	,313		
Total	20724,163	20			

Fuente: Datos estadísticos

Leyenda:

Gl: Grados de libertad

F: Distribución de Fisher

Sig.: Significancia

Sig.: > 0.05, no existe diferencia significativa entre los grupos que inhibe el crecimiento microbiano.

Sig.: < 0.05 existe diferencia significativa entre los grupos inhiben el crecimiento microbiano.

Interpretación y Análisis de resultados

Según los resultados de análisis de la varianza ANOVA , en la tabla N° 28 se observa que el valor de significancia es de 0.00, un valor que está debajo de 0.05, lo que indica que existen diferencias significativas entre los porcentajes de crecimientos obtenidos por cada concentración de extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, por lo que se puede inferir que tienen diferente actividad antibacteriana para cada concentración de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Tabla N° 29 : Prueba de post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana para el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

concentración del extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Amikacina	3	17,3100						
200 mg	3		22,3420					
100 mg	3			26,6937				
50 mg	3				36,1740			
25 mg	3					72,5323		
12 mg	3						86,7540	
Control	3							100,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N° 29, se muestra la prueba de post hoc Tukey, que realiza todo los contrastes de igualdad de medidas entre los rangos, en el que se realiza la agrupación entre las medidas de los halos de inhibición en el que se forman 7 sub grupos de concentraciones . En cada sub grupo se observa homogeneidad ya que el valor de significancia es mayor de 0.05 .

Por lo que se concluye que el extracto en estudio, si presenta actividad antibacteriana pero este no es comparable con el fármaco patrón debido que este mismo se ubica en otro grupo.

Tabla N° 30 : Comparación de la actividad antibacteriana entre los liposomas elaborados y el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”

Liposomas a diferentes concentraciones		Extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”	
Concentración de liposomas (mg)	Medida de porcentaje de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> (%)	Concentraciones de extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> “tikllaywarmi”(mg)	Medida de porcentaje de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> (%)
12	30	12	87
25	24	25	72
50	23	50	36
100	11	100	27
200	7	200	22
Amikacina	18	Amikacina	18
Control	100	Control	100

Fuente: Datos experimentales

Interpretación de Resultados

En la tabla N°30 se observa el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 frente a las diferentes concentraciones de los liposomas elaborados y las concentraciones del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Para la mínima concentración ensayada de 12 mg para los liposomas se obtuvo un valor de 30% mientras que para el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” a la concentración de 12 mg dio un crecimiento de 87% de *Pseudomona aeruginosa* siendo un valor, superior, lo que indica que los liposomas tuvieron un mayor efecto. A esta concentración.

Y para la concentración de 200mg para los liposomas dio un valor de 7% de crecimiento que es menor que el fármaco patrón tiene un valor de 18% y la del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” con un valor de 22%. Por lo que se infiere que los liposomas ensayados en la investigación tuvieron valores de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* menores que el de extracto sin encapsular en liposomas.

Lo que indica que la encapsulación del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, en liposomas mejoraron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”. En el archivo fotográfico N 24 se muestra las placas sembradas de liposomas y extracto donde se muestra dichas diferencias.

4.6.8 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Tabla N° 31 : Resultados del control microbiológico de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

CRITERIOS	MICROORGANISMO	RESULTADOS
Criterio imperativo	<i>Salmonella y Shiguella</i>	Ausente
Criterio indicativo de higiene	Coliformes totales	Ausente
Criterio de alerta o limite crítico	Aerobios mesófilos	Ausente
	Hongos y levaduras	Ausente

Fuente: Límites críticos e indicativos de higiene RM N.º 615-2003-SA/DM.

Interpretación de Resultados

En el cuadro N 3, se observa el análisis microbiológico de los liposomas formulados a diferentes concentraciones (200mg, 100mg, 50mg, 25mg y 12mg); las 5 formulaciones se encuentran dentro de los límites permisibles establecidos por los críticos e indicativos de higiene RM N.º 615-2003-SA/DM.

En el recuento de *Salmonella* y *Shiguella*, coliformes totales, hongos y levaduras, no se observó ningún crecimiento microbiológico, lo cual indica que los productos elaborados cumplen con los parámetros de calidad según los críticos e indicativos de higiene RM N.º 615-2003-SA/DM, establece que no se hallan evidencias de crecimiento microbiano, el producto examinado cumple con la prueba de esterilidad. Por tanto, los liposomas elaborados a diferentes concentraciones (200mg, 100mg, 50mg, 25mg y 12mg), es apto para ser utilizados en la ejecución del presente estudio de la actividad antibacteriana cuyos contaminantes podrían alterar los resultados de dicha actividad *in vitro* frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853 y evaluar los parámetros de estabilidad.

4.6.9 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y LA ESTABILIDAD ACELERADA DE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS.

Tabla N° 32 : Resultados del estudio de las características organolépticas de las formulaciones y la estabilidad acelerada de los liposomas a diferentes concentraciones a una temperatura de 4°C.

Concentraciones de liposomas	Características	Inicio	30 días
Liposomas 200 mg	Aspecto	Homogéneo, cremoso, opalescente	Homogéneo, cremoso. Opalescente
	Color	Amarillento lechoso	Amarillento lechoso
	Olor	Característico al extracto	Característico al extracto
	PH	7	7
Liposomas 100 mg	Aspecto	Homogéneo opalescente	Homogéneo opalescente
	Color	Lechoso	Lechoso
	Olor	Ligero olor a extracto	Ligero olor a extracto
	pH	7	7
Liposomas 50 mg	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo
	Color	Lechos blanquecino	Lechoso blanquecino
	Olor	Insípido	Insípido
	pH	7	7
Liposomas 25 mg	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo
	Color	Blanquecino	Blanquecino
	Olor	Insípido	Insípido
	pH	7	7
Liposomas 12 mg	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo
	Color	Blanquecino claro	Blanquecino claro
	Olor	Insípido	Insípido
	pH	7	7

Fuente: Datos experimentales

Análisis e Interpretación de resultados

En la tabla N° 32 se muestra el estudio de esa estabilidad acelerada, según el tiempo ensayado, a una temperatura de 4°C de conservación no hay variación en cuanto a su pH, no se evidencia la formación de dos fases, cambios de color o la presencia de olor.

Por lo que se podría indicar que las formulaciones a una temperatura de 4°C han mantenido su estabilidad durante los 30 días de estudio. Es relevante tomar en cuenta que la composición lipídica y la naturaleza del compuesto encapsulado pueden influir en las propiedades de los liposomas por tanto en la estabilidad.

Al estar constituidos por fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas insaturadas la oxidación lipídica puede verse favorecida por la presencia de metales, luz y ser minimizada por la adición, en proporciones adecuadas de antioxidantes tales como el alfa-tocoferol, en la elaboración se utilizó vitamina E que permite minimizar la auto oxidación de los liposomas favoreciendo su estabilidad.

Según **Clares Neveros 2003. (55)**, Menciona que la presencia de colesterol en la formulación de liposomas, permite retener mayor cantidad de principio activo, ya que puede modificar la organización (arquitectura) molecular de las láminas lipídicas. Su presencia controla la fluidez de la membrana y en consecuencia modula la capacidad de encapsulación y estabilidad física de las vesículas. Es así que se utiliza el colesterol dentro de las formulaciones planteadas lo que ayudaría a mantener encapsulado el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby*.

Tabla N° 33 : Resultados del estudio de las características organolépticas de las formulaciones y la estabilidad acelerada de los liposomas a diferentes concentraciones a una temperatura de 40°C.

Concentraciones de liposomas	Características	Inicio	30 días
Liposomas 200 mg	Aspecto	Homogéneo, cremoso, opalescente	Formación de dos fases (superior una fina capa cremosa amarillento sobre una solución lechosa).
	color	Amarillento lechosos	Amarillento cremoso/lechosos
	Olor	Característico al extracto	Característico al extracto
	pH	7	6
Liposomas 100 mg	Aspecto	Homogéneo opalescente	Formación de dos fases (superior forma una delgada capa cremosa sobre fase inferior solución lechosa)
	Color	Lechos	Lechoso/blanquecino
	Olor	Ligero olor a extracto	Ligero olor a extracto
	Ph	7	6
Liposomas 50 mg	Aspecto	Homogéneo	Formación de dos fases (una sobrenadante cremosa blanquecina y una fase lechosa poco traslucida).
	Color	Lechos blanquecino	Lechoso blanquecino
	Olor	Insípido	Insípido
	Ph	7	6
Liposomas 25 mg	Aspecto	Homogéneo	Formación de 2 fases (una sobrenadante blanco amarillento y en la parte inferior una solución blanca).
	Color	Blanquecino	Blanquecino/traslucido blanco.
	Olor	Insípido	Insípido
	Ph	7	6
Liposoma 12 mg	Aspecto	Homogéneo	Formación de dos fases (traslucida claro y una fase cremosa sobrenadante)
	color	Blanquecino claro	Blanquecino /traslucido
	Olor	Insípido	Insípido
	pH	7	6

Fuente: Datos experimentales.

Interpretación y Análisis de Resultados

En la tabla N° 33, en el estudio de estabilidad acelerada, a una temperatura de 40°C de conservación presentó una ligera variación en cuanto a su pH a un valor de 6, con la formación de dos fases definidas, con cambios en el color, sin la variación en cuanto al olor, por lo que se podría indicar que las formulaciones a una temperatura de conservación de 40 °C varió en la estabilidad durante los 30 días de estudio.

La bicapa lipídica de los liposomas posee fluidez y movilidad, las cuales dependen de la temperatura. A bajas temperaturas, los lípidos se encuentran en estado gel cristalino, con una estructura rígida y la movilidad reducida. Al aumentar la temperatura se produce una pre-transición de fase que tiene que ver con el aumento en la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y la aparición de ondulaciones en la superficie de los liposomas. Siendo menos probable que se produzca interacción asociativa entre las moléculas de fosfolípidos, lo que da lugar a la membrana fluida, es así que el empaquetamiento de la cadena de los hidrocarburos de la bicapa se vuelve aleatorio, reduciendo la rigidez de la membrana debido a su defecto de tipo poroso y también da lugar a una transición en la movilidad de las colas de los fosfolípidos, reduciendo la estabilidad del principio activo incorporado (92)

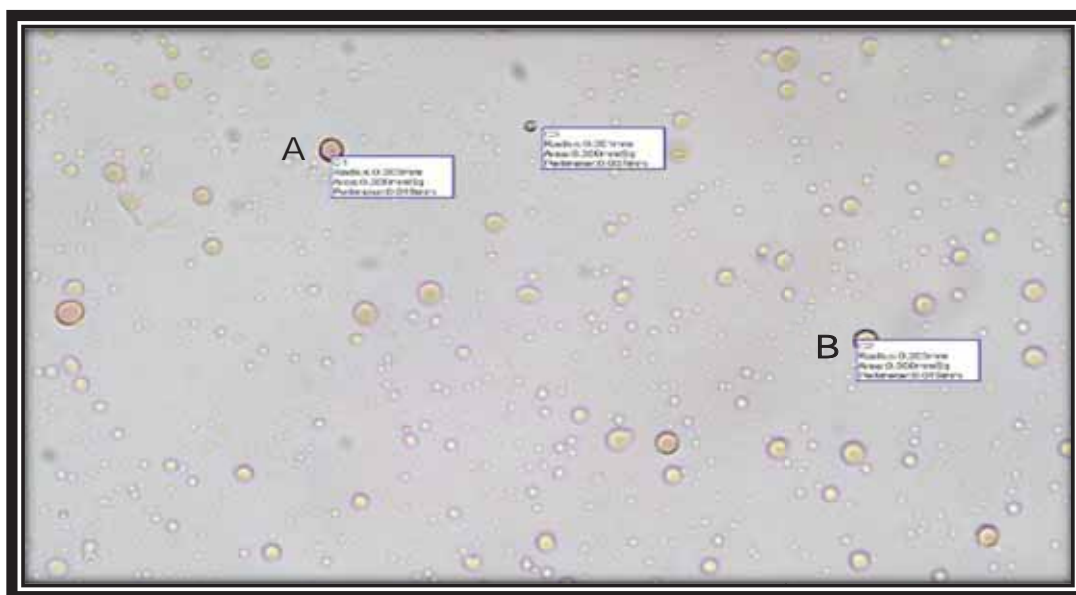
Así mismo las variaciones del pH, pueden afectar significativamente la estabilidad de los liposomas, debido que puede alterar la ionización de los lípidos desestabilizando la estructura de la bicapa, con la prolongación de los fosfolípidos que se produce en valores de pH más bajos. (93)

Físicamente, el principal problema consiste en la agregación de los liposomas, lo que modifica las características de permeabilidad de la pared lipídica, con la consiguiente, la liberación del principio activo captado. Por lo que se deduce que la influencia de la temperatura de conservación sobre la estabilidad del sistema de tal manera que los liposomas mantenidos a baja temperatura 4°C poseen una estabilidad mayor, que a una temperatura de 40°C . (55)

4.6.10 RESULTADOS DE LA OBSERVACIÓN MICROSCOPICA DE LIPOSOMAS AL (MICROSCOPIO A 40X)

En las siguientes imágenes se muestra la suspensión de vesículas lipídicas portadoras de extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, teñido con el reactivo negro de sudan III. La técnica de observación al microscopio que incorpora una cámara conectada a un ordenador, permite evidenciar la formación de vesículas lipídicas plurilaminares en toda la formulación ensayada con lo cual se corrobora la eficacia del método empleado para la elaboración de liposomas. Así mismo, aporta información sobre la estructura, tamaño y estabilidad de estos transportadores. que tienen diferentes morfologías basadas en su composición y el método de formulación.(93).

Figura N° 5 : Liposomas de concentración 12 mg

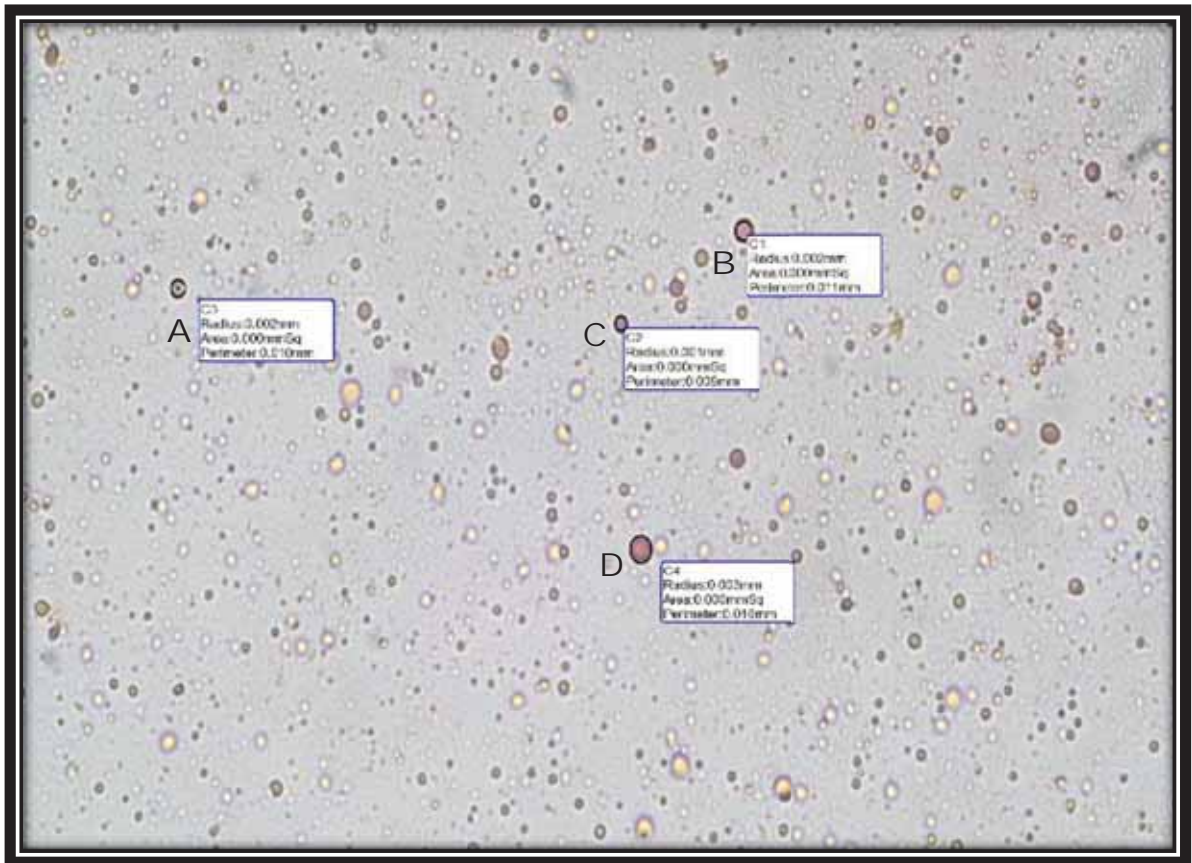


Fuente: L. Huilca.

Interpretación de resultados

En la Figura N° 5 se muestra, para la concentración 12 mg, liposomas con características típicas, que han sido coloreadas con sudan III de diferentes tamaños, para A 0.001mm y en B se observa un tamaño de 0.003 mm, se evidencia la formación de liposomas de tamaños relativamente uniformes en poca cantidad.

Figura N° 6 : Liposomas de concentración 25 mg

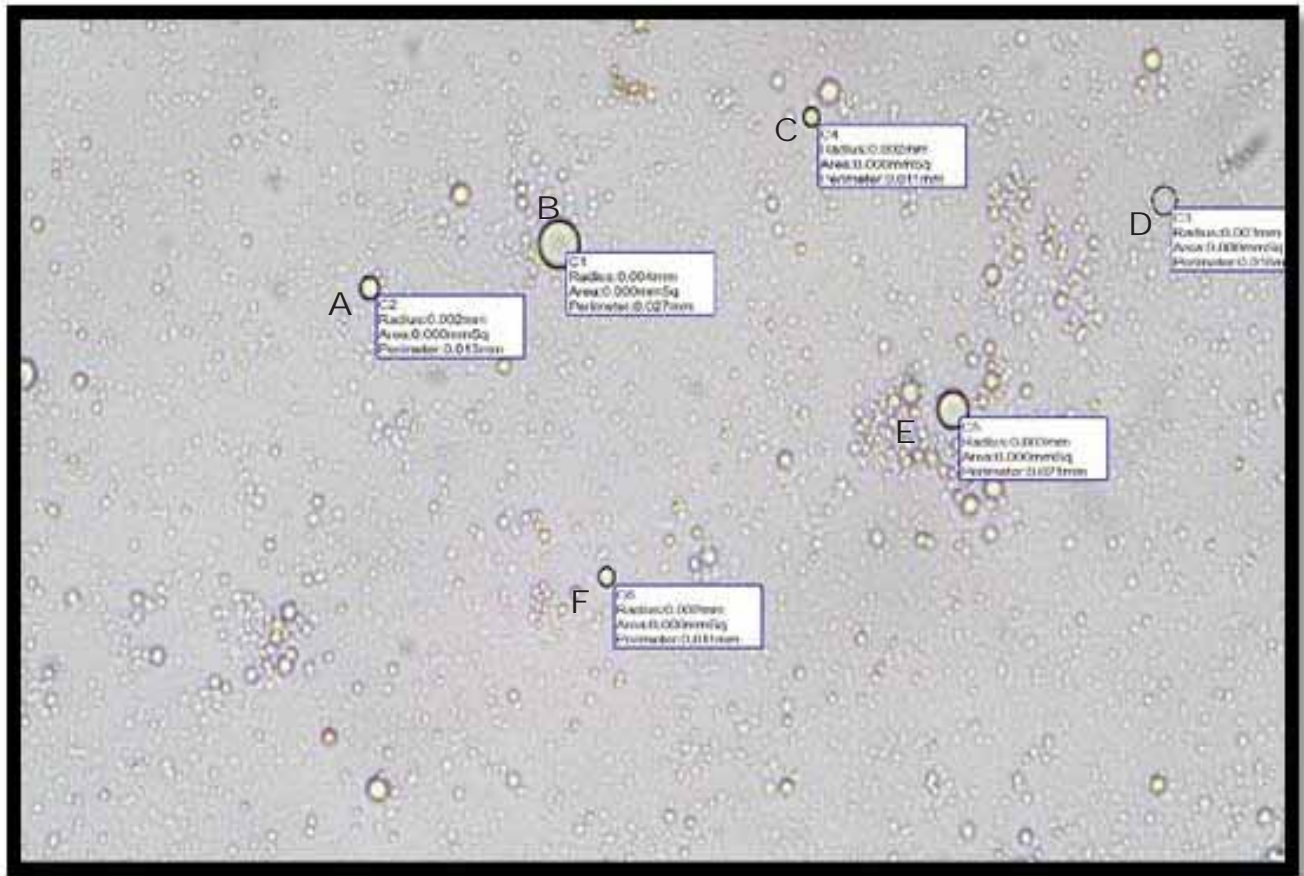


Fuente: L. Huilca.

Interpretación de resultados

En la figura N°6, se muestra la imagen obtenida por el microscopio óptico a 40X donde se muestra liposomas de diferentes tamaños para la letra A 0.002 mm, B 0.003 mm, C 0.001 mm y para D 0.003mm, con una saturación elevada con predominio de tamaño pequeño, relativamente homogéneos coloreados con el reactivo Sudan III.

Figura N° 7 : Liposomas de concentración 50 mg

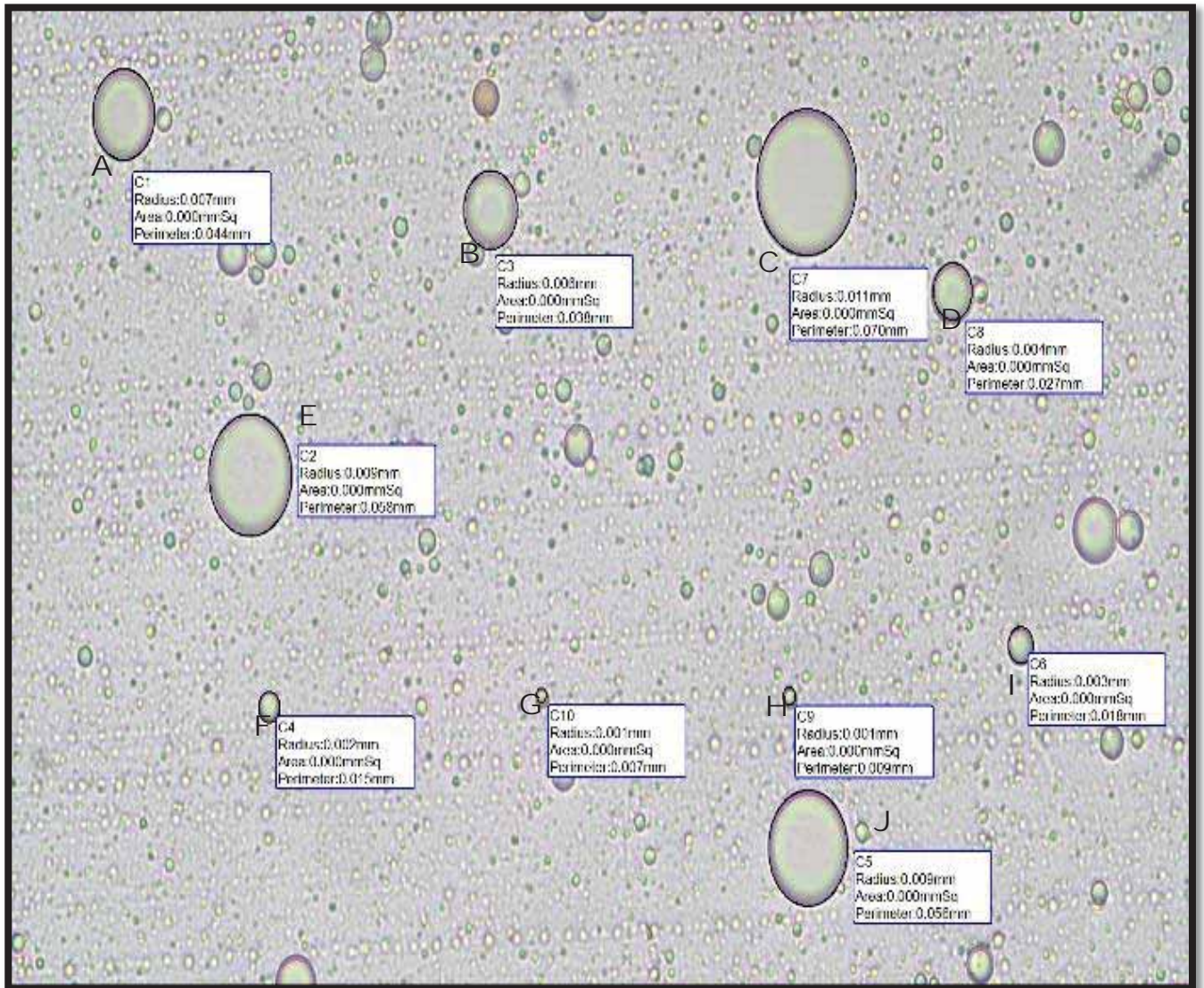


Fuente: L. Huillca.

Interpretación de resultados

En la figura N°7 se observa los liposomas formados de tamaños diferentes más variados para la letra A 0.001mm, B 0.004mm, C 0.002mm, D 0.003mm, E 0.004mm y F 0.000mm donde se puede evidenciar la formación de los liposomas en cantidad superior al de la concentración de 25 mg de concentración.

Figura N° 8 : Liposomas de concentración 100 mg

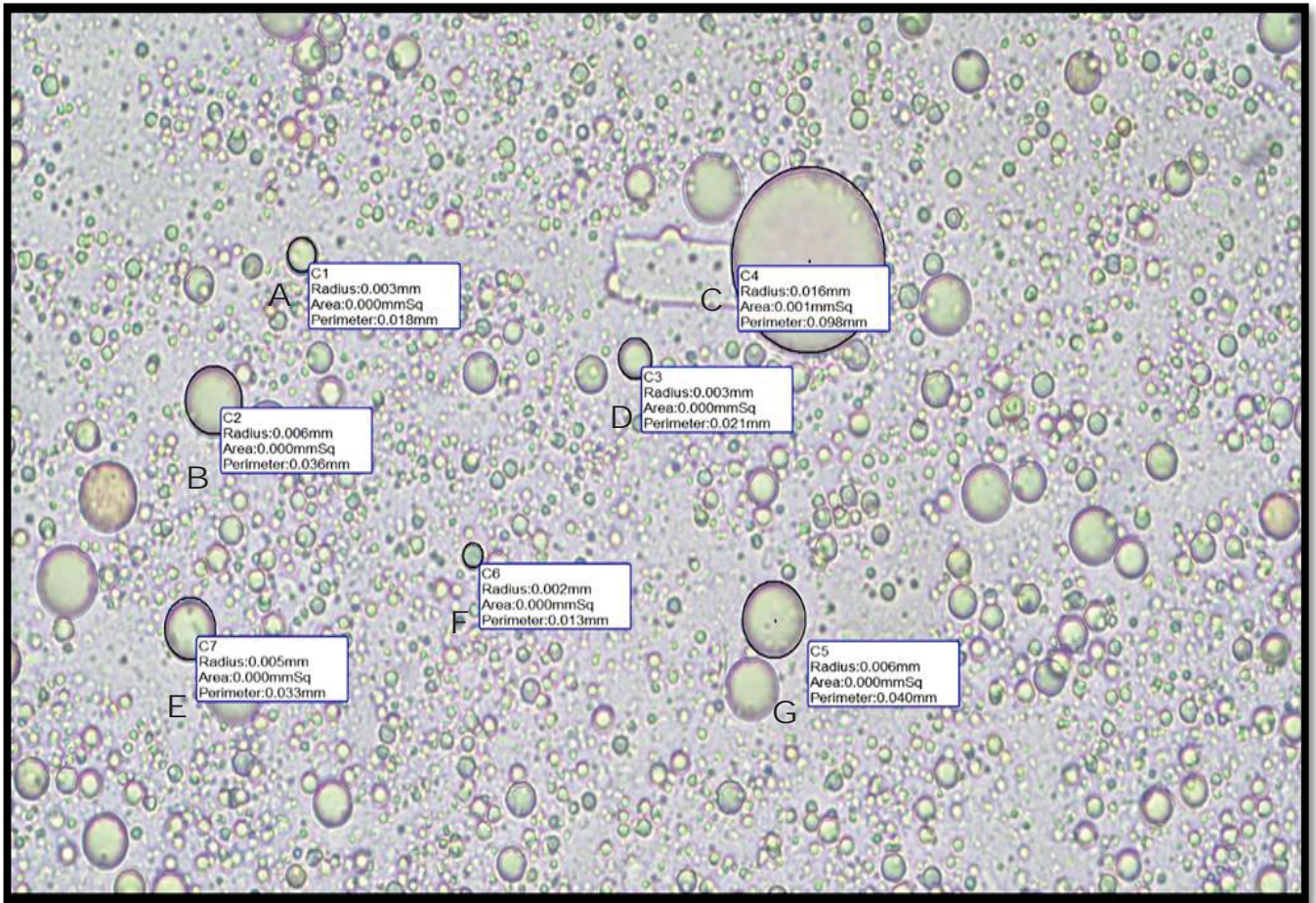


Fuente. L. Huilca.

Interpretación de resultados

En la figura N°8 Para los liposomas de 100 mg de concentración, se muestra liposomas de diferentes tamaños para, A 0.007mm, B 0.008mm, C 0.011mm, D 0.001mm, E 0.003, F 0.002mm, G 0.001 mm, I 0.003mm y J 0.009 mm de manera relativamente abundante con halos bien definidos en cada liposoma, con predominio de tamaño pequeño.

Figura N° 9 : Liposomas de concentración 200 mg



Fuente: L. Huillca.

Interpretación de Resultados

En la figura N° 9, se observa para la concentración de 200 mg diferentes tamaños de liposomas siendo para, A 0.003mm, B 0.006mm, C 0.016mm, D 0.003mm, E 0.006mm, F 0.002mm, G 0.006mm en cantidad abundante, con halos bien definidos propio de los liposomas.

Análisis y discusión de los resultados de la observación microscópica

El tamaño y la estabilidad de los liposomas afectan la distribución y el aclaramiento de las vesículas *in vivo* después de la administración sistémica.

La liberación de fármacos puede verse afectada por el tamaño de los liposomas o moléculas involucradas. Por una parte, los liposomas pequeños tienen una mayor relación área superficial volumen, lo que favorece una mayor asociación del liposoma con las moléculas del órgano diana (al estar más expuesto) y, por tanto, una liberación más rápida del principio activo. Por otra parte, los liposomas de mayor tamaño tienen grandes núcleos, lo que permite una mayor cantidad de principio activo encapsulado por las partículas y hacen que la liberación sea más lenta. (94). Dentro de esta investigación se obtuvieron liposomas de diferentes tamaños y cantidades.

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

1. Se obtuvo por el método de maceración el extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, con un rendimiento de 20 %.
2. Se determinó el porcentaje de humedad de las hojas y tallos de la especie vegetal de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” obteniéndose un valor de 88.3%. En cuanto a la prueba de la solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, es muy soluble en solventes polares en etanol al 70%, metanol /agua; soluble en metanol, etanol absoluto; poco soluble en éter, cloroformo, acetona, agua destilada e insoluble en solvente apolar, hexano y en el análisis fitoquímico cualitativo, se determinó que existe abundante cantidad de flavonoides, azúcares reductores y glicósidos, presencia moderada de compuestos fenólicos, quinonas y lactonas en poca cantidad, taninos , saponinas y esteroides y alcaloides.
3. Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico al 70 % de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” sobre *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853, obteniéndose un halo máximo de inhibición 17.4 mm a una concentración 160mg/50µL, halo menor que el fármaco patrón de amikacina que dio un halo de 26 mm a una concentración 30 µg .
4. Se elaboró liposomas con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* (tikllaywarmi), mediante el método de Bangham, con los componentes: lecitina de soya, colesterol y extracto en estudio, en una proporción de 12:4:6 p/p/p respectivamente obteniéndose una solución liposomal a concentraciones de 200 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg y 12 mg de concentraciones.

5. En el análisis organoléptico de los liposomas elaborados a distintas concentraciones de extracto en estudio y componentes presentaron un aspecto opalescente homogéneo, con una coloración blanquecina lechosa que aumenta en proporción a la concentración de componentes con olor característico al extracto, se mantuvo el valor de pH 7 y en cuanto al control microbiológico se tuvo la ausencia de crecimiento microbiano en toda las concentraciones de liposomas ensayadas.
6. Respecto a la evaluación de la estabilidad acelerada de los liposomas formuladas, a una temperatura de 4°C no presentaron variaciones en cuanto color, olor, aspecto, ni separación de fases por lo que las soluciones liposomales se mantuvieron estables en 30 días. Sin embargo, a la temperatura de 40 °C a los 30 días se tuvo la aparición de dos fases, cambios en cuanto al color y variación ligera en Ph, lo cual compromete su estabilidad.
7. Mediante la observación al microscopio, se obtuvo información sobre la forma y tamaño de los liposomas, donde se evidencia que a menor concentración se encuentra poca cantidad de liposomas de diferentes tamaños y a mayor concentración se obtuvo mayor cantidad de liposomas de tamaños más variados.
8. Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”, se obtuvo que los liposomas de mejor efecto antibacteriano fue de 200 mg donde se tiene un crecimiento de 7% de *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853, a comparación con el fármaco patrón amikacina donde se obtuvo un crecimiento de 18% y del extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” sin encapsular a 200mg, se obtuvo un crecimiento de 22% , tomado en cuenta un grupo control con crecimiento de 100% de *Pseudomona aeruginosa* en 24 horas a 37°C, la encapsulación del extracto en liposomas permitió mejorar su efecto antibacteriano al impedir el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* según los resultados reportados.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

A LA AUTORIDAD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO.

- Implementar el laboratorio de tecnología farmacéutica de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica con el equipo de extractor de liposomas para la obtención de liposomas de tamaños pequeños unilaminares y más uniformes y un equipo de Zetámetro para (medición de potencial Z de las membranas liposomales) para mejorar los estudios de estabilidad de los liposomas.

A LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA .

- Incentivar a los estudiantes de la escuela profesional a la publicación científica de trabajos de investigación en revistas científicas en, páginas web, de trabajos de tesis realizados por los estudiantes de la escuela.
- Fomentar e incentivar la realización de proyectos de investigación en el área de plantas medicinales para dar a conocer al conocimiento científico y a las comunidades que practican su uso a través de talleres y exposiciones y así revalorar el conocimiento tradicional de las plantas medicinales.

A LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA .

- Realizar estudios sobre otras propiedades farmacológica de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vivo* de los liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”
- Elaborar una forma farmacéutica a partir de los liposomas formulados con extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi” para estudio posterior *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Soria N. Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. Rev. Salud Pública Parag. [Online].; 2018 [cited 2018 12 04].(1)1-5. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/rspp/v8n1/2307-3349-rspp-8-01-7.pdf>.
2. Franco Ospina L. Bioprospección en la costa norte Colombiana : Busqueda de moléculas con actividad anti-inflamatoria, antibacteriana y citotóxica. Ciencias Amazónica. Iquitos. [Online]. Universidad de Cartagena; 2015 [cited 2019 10 5]. Disponible: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12491/45426_62085.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
3. Travieso Novelles M, Rubio Ortega A, Pino Perez O. La nanopatículas a partir de plantas como base para el diseño de nuevos antimicrobianos. Revista Cubana en Farmacia. [Online]. Cuba; 2019 [cited 2019 10 7]. Disponible en. Available from: <http://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/263/178>.
4. Hernández Genoveva A, García Vázquez E. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. Sociedad Española de Quimioterapia. 2018 Feb; 123-130(2).
5. Reyes Solís L, Sánchez R, Restrepo J. Encapsulación de la piperine presente en la especie *Piper tuberculatum* utilizando vesículas multilamelares y determinación de su poder antioxidante. Scielo. 2017 diciembre; 21(2).
6. Juárez López R. Estudios de estabilidad de un producto constituido por un sistema nanoacarreador que contiene IL-2 para el tratamiento del cáncer cérvico uterino, Universidad Nacional Autónoma de México ,tesis,[internet]. [Online].; 2014 [cited 19 01 15]. Disponible en: https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_juarez_lopez.pdf.
7. Jain C, Khatana S, Vijayvergia R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review: Department of Botany, Laboratory of Plant Pathology and Biochemistry, University of Rajasthan, India. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. [Online].; 2019 [cited 2019 05 08]. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/334807518_bioactivity_of_secondary_metabolites_of_various_plants_a_review.
8. Pang Z, Raudonis R, Glick. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Rev ScienceDirect, Volumen 37. [Online].; 11/2018 [cited 19 08 01]. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301976>.

9. Organización Mundial de la Salud. Infección por *Pseudomona aeruginosa* resistente a los carbapenémicos - México. [Online].; 2019 [cited 2020 02 14]. Disponible en : <https://www.who.int/csr/don/5-march-2019-carbapenem-resistant-p-aeruginosa-mex/es/>.
10. Mamani. Brote de bacteria *Pseudomona* en hospital de Cusco. [Internet].; 2019 [cited 2020 02 14] Disponible en : <https://rpp.pe/peru/cusco/investigan-muerte-de-6-personas-por-brote-de-bacteria-pseudomona-en-hospital-de-cusco-noticia-1208544?ref=rpp>.
11. Aloush V, Navon S, Seigman Y. Multidrug-Resistant *Pseudomona aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. Rev American Society for Microbiology. [Online].; 2016 [cited 2019 08 12]. Disponible en . : <https://aac.asm.org/content/50/1/43>.
12. Clement M, Majed H, Azghani A. Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped Aminoglycosides against Resistant Strains of *Pseudomona aeruginosa*. American Society for Microbiology [internet]. [Online].; 2016 [cited 18 12 18]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479138/>.
13. Cuesta D, Vallejo M, Guerra K, Cárdenas J, Hoyos C, Loaiza E. Infección intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudio de casos y controles. Universidad Pontificia Bolivariana. [Internet]. Medellín, Colombia; 2014 [cited 18 02 28]. disponible en. : <http://www.redalyc.org/pdf/1590/159026906007.pdf>.
14. Soto Montoya M. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de un gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby (Asteraceae). Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; 2015.
15. Iturbe Balzola A. Nuevos vectores en la aplicación vía tópica de medicamentos liposomas (I).[Trabajo de fin de grado].Facultad de farmacia. Universidad Complutense. [Internet].; 2018 [cited 2019 08 07]. Disponible en. : <http://147.96.70.122/web/tfg/tfg/memoria/ane%20iturbe%20balzola.pdf>.
16. Gallegos-Z. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos Ecuador. Scielo ,vol. 78 no.Lima. [Online].; 2017 [cited 2019 05 02]. Disponible en. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832017000300011.
17. Bozzuto G, Molinari. Liposomes as nanomedical devices. International Journal of Nanomedicine. [Online]. Distrito Federal, México.; 2015 [cited 18 12 1]. Disponible en : <http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/9Villafuerte.pdf>.
18. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. [Online].; 02/2018 [cited 2018 12 15]. Disponible en : <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%3%b3ticos>.

19. Gallegos Zurita M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. Scielo. 2016 Octubre; 77(4).
20. Navarro , Cabral P, Malanga A. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico. Universidad Nacional de Colombia.[Artículo técnico]. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2018 Nov; 37(2): p. 212-223.
21. Mai Alhajlan , Moayad Alhariri , Abdelwahab Omri. Eficacia y seguridad de la claritromicina liposómica y su efecto sobre los factores de virulencia de *Pseudomona aeruginosa*. Artículo. Canada: Laurentian University, of Chemistry and Biochemistry; 2010.
22. Soto Montoya MY. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de un gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus Rusby* (Asteraceae). tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, E.A.P. de Farmacia y Bioquímica; 2015.
23. Salcedo Quispe Y. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro y citotoxicidad de los extractos acuoso y etanólico al 70% de las hojas de *heliotropium arborescens* L. "hierba del alacrán". Tesis. Perú: Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco, E. P. Farmacia y Bioquímica; 2017.
24. Lloclasi Huamani A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de eter de petróleo y etanólico de las hojas de *Mustica acuminata Ruiz & Pav* "chinchircuma" frente a cepas aisladas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. [tesis]. Cusco-Perú: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2017.
25. Espinoza Salcedo V, Chambi Bellota L. Efecto gastroprotector y toxicidad aguda del extracto hidroalcoholico de *Senecio rhizomatus Rusby* "tiqllay huarmi". Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, E. P. Farmacia Bioquímica; [Tesis] Cusco , 2002.
26. Huaman Ninantay K, Ardiles Ayala L. Estudio comparativo *in vitro* dela actividad antibacteriana de los extractos acuosos de *Pelargonium hortorum LH Bailey* (Geranium) y *Senecio rhizomatus Rusby* (tiqllaywarmi) sobre ceoas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Propinebacterium acnes* y determinación. de su capacidad antioxidante. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, E.P. Farmacia y Bioquímica; Cusco- Perú [Tesis]. 2018.
27. Montesinos Tubée. Three new caespitose species of *Senecio* (Asteraceae, Senecioneae) from South Peru. [Internet]. Peru; [Internet].2014 [cited 2018 12 4].
Disponible: https://www.researchgate.net/publication/263406099_Three_new_caespitose_species_of_Senecio_Asteraceae_Senecioneae_from_South_Peru.

28. Eyzaguirre Beltroy. La dicotomía de caliente frío en la medicina andina. Revista PUCP. Tesis. Cusco: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Sociales ; 2016.
29. Xahuantitla Salgado L. Proceso de estabilización de liposomas que contienen IL-2 mediante criopreservación y redacción de la solicitud de patente. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza; Tesis.México. 2016.
30. Ancer Rodríguez J. Guía de Estudios de Intercambiabilidad de Medicamentos en Forma Farmacéutica de Liposomas para Administración por vía Intravenosa. consejo de Salubridad General. [Internet].; México.2018 [cited 19 05 23]. Disponible en : http://www.csg.gob.mx/descargas/pdf/priorizacion/consultiva-cientifica/guias/Guia_liposomas.pdf.
31. Procop , Koneman , Deidre , Churchill D. Koneman Diagnóstico Microbiológico. 7th ed. España: Wolters Kluwer; 2017.
32. Carroll KC, Hobden JA, Steve M. Jawetz Microbiología Médica. 27th ed. Obregón DÁ, editor. México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A.; 2016.
33. Murray P, Rosenthal , Pfaller. Microbiología Médica. 8th ed. España: Elsevier España S.A.; 2017.
34. Friedrich M. Medicamentos para las infecciones por Pseudomonas aeruginosa. Departamento de Salud del Estado de Nueva York Medscape, [Internet]. [Online].; 2018 [cited 2019 02 12]. Disponible en : <https://emedicine.medscape.com/article/226748-medication#2>.
35. Forbers B, Sahm D, Weissfelb A. Diagnóstico Microbiológico. 12th ed. T. M, editor. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2009.
36. Stanier R, Ingraham J, Wheelis M. Microbiología. Segunda ed. Villanueva Julio, editor. España- Barcelona: Reverte S.A.; 2016.
37. Gerardad T, Funke B. Introducción a la microbiología. novena ed. Cwi Silvia KM,. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2016.
38. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. cuarta ed. José Augud , editor. España: Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U.; 2013.
39. Luna Cazáresb M, Mendoza-Orozcoa. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. [Online].; 2015 [cited 2018 12 11]. Disponible en : http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562015000200007.

40. Cavanagh. ATCC Bacterial Culture Guide. Tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages. [Online].; 2015 [cited 2018 11 08]. Disponible en : https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/ATCC_Bacterial_Culture_Guide.ashx.
41. Mateos Martinez P. Crecimiento Microbiano. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca [Internet]. 2015 [cited 2019 01 12] Disponible en : <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>.
42. Picazo JJ. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica – Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. [Online].; 2015 [cited 18 11 02]. Disponible en : <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%2002.pdf>.
43. Shiva Ramayoni MC. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. España: Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Sanidad y Anatomía de animales ; 2017.
44. Ospina L.. Actividad Antibacteriana *in vitro* de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz*. © 2013 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (3): 230 - 237 ISSN 0717 7917. 30 de Mayo de 2013.
45. Malbrán C. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. [Internet].2015 [cited 2018 09 12]. Disponible en : <http://antimicrobianos.com.ar/Atb/wpcontent/uploads/2012/11/04determinacion-de-la-sensibilidad-metodo-de-dilucion-2012.pdf>.
46. Ramirez Gama. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. 1st ed. México: Editorial Trillas S.A. de C.V.A; 2015.
47. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. novena ed. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana; 2013.
48. MINSA / DIGESA. Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. [Online].; 2008 [cited 2019 05 03]. Disponible en : https://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas_Legales/alimentos/RM591MINSANORMA.pdf.
49. Carranza Rodriguez R. Vademécum Académico de Medicamentos. [Online].; 2016 [cited 2019 11 12]. Disponible en : <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1552>.

50. Whalen K, Finkel R, Panavelil T. Farmacología. 6th ed. Español: Wolters Kluwer; 2016.
51. Palomino , Pachón. Aminoglucósidos. Hospital Universitario Virgen del Rocío. [Online]. Sevilla. España.; 2015 [cited 2018 01 8]. Disponible en:
: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a6-aminoglucosidos.pdf>.
52. MedScape. Amikacina (Rx). [Online].; 2018 [cited 2019 08 20]. Disponible en
: <https://reference.medscape.com/drug/amikacin-342516#0>.
53. Centro de Atención Farmaceutica (CAF DIGEMID). Amikacina (como sulfato). [Online]. Avenida Arenales 1302 Interior 201 – Jesús María; 2016 [cited 19 1 8]. Disponible
: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/upload/uploaded/pdf/amikacina.pdf>.
54. Torres D, Seijo B. Namosistemas Lipidicos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. [Online].; 2015 [cited 2018 11 2]. Disponible en.
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/991/1025?r=test>.
55. Clares Naveros B. Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamillares portadores de Acetonido de Triamcinolona. Tesis Doctoral. [Internet].; 2003. España. Universidad de Granada [cited 17 12 29]. Disponible en
: <https://liposomas.wordpress.com/2010/11/17/tecnicas-de-fabricacion-de-los-liposomas/>.
56. Faulii TC. Tratado de farmacia galénica Al dE, editor. Madrid: Luzan 5 S; 1993.
57. Torres García J, Durán Agüero. Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. [Internet]. [Online].; 2015 [cited 2018 11 2]. Disponible en. Available from: <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/7961.pdf>.
58. Monteiro N, Martins A, Reis R. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. Journal of the Royal Society Interface. [Online].; 2014 [cited 2019 08 12]. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>.
59. Ramírez Ortiz M. Tendencias de innovación de la ingeniería de alimentos. 1st ed. México: OnniaScience; 2015.
60. Villa García M. Sistemas lipídicos microestructurados como transportadores de compuestos activos. Tesis. México: Instituto Politécnico Nacional Cicata - IPN, Centro de Investigación en ciencia aplicada y Tecnología Avanzada; 2015.

61. Pedro G. Bioanálogos - liposomas. [Online].; 2015 [cited 2017 12 23. : http://www.infinitefractal.com/movabletype/blogs/my_blog/b.html.
62. Hermoso de Mendoza E. Nanosistemas a base de poliésteres, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. [Online].; 2016 [cited 2019 08 11]. Disponible en : [file:///C:/Users/Laura/Downloads/989-4093-1-PB%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Laura/Downloads/989-4093-1-PB%20(2).pdf).
63. Vila Jato J. Nanotecnología farmacéutica realidades y posibilidades farmaceuticas Madrid: Realigraf S.A.-26-28039; 2009.
64. Martínez. R. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense De Madrid, Química Física I; Madrid, 2013.
65. Pérez García. Estudio comparativo de dos métodos de producción de liposomas para el encapsulamiento de proteína hidrolizada de leche como modelo de componente funcional de aplicación cosmética. Maestría En Formulación de Productos Químicos y Derivados. Colombia: Universidad ICESI, Facultad de Ciencia Naturales; 2017]. Disponible en : https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83509/1/T01257.pdf.
66. Sandoval Arias A. Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos. Trabajo de investigación. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia; 2015]. Disponible en : <http://bdigital.unal.edu.co/50926/1/80%27211.489.pdf>.
67. Remuñán López C, Alonso Fernández MJ, Garcia Fuentes M. Tratado de Tecnología Farmacéutica. 1116th ed. España: Síntesis S.A.; 2016.
68. Ruano Aldea M. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Química Física I ; 2013]. Disponible en : <https://eprints.ucm.es/18042/1/T34218.pdf>.
69. Fajardo Robles D, Vincent Hanson J, Arguedas Chaverri. Síntesis de liposomas para la encapsulación de aloe vera como principio activo. Tesis para Optar por el Grado de Licenciatura. República Dominicana: Universidad de Iberoamérica , Facultad de Farmacia; 2017.
70. González Enseñatón P. Estabilidad general de los liposomas. [Online].; 2014 [cited 2018 11 22]. Disponible : http://www.infinitefractal.com/movabletype/blogs/my_blog/estabilidad-general-de-los-lip.html.

71. Oropesa Nuñez R, Jáuregui Haza UJ. Las nanopartículas como portadores de fármacos: Características y perspectivas. Instituto Superior de Tecnología y Ciencias Aplicadas. [Online].; Cuba.2012 [cited 2018 12 16]. Disponible en . https://www.researchgate.net/publication/236649980_Las_nanoparticulas_como_portadores_de_farmacos_caracteristicas_y_perspectivas_Nanoparticles_as_drug_carriers_characteristics_and_perspectives.
72. Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional: definiciones. [Internet].; 2016 [cited 2019 01 22]. Disponible en . https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
73. Noriega MdP, Augusto Estrada. Polímeros en aplicaciones farmacéuticas. [Online].; 2016 [cited 2019 11 1]. Disponible en .
: <http://www.plastico.com/temas/Polimeros-en-aplicaciones-farmaceuticas+3084932>.
74. Villar del fresno A. Farmacognocia general España: Síntesis S.A; 1999.
75. R. MS. Diccionario Médico. In. España.: Ediciones científicas y Técnicas Barcelona; 1990.
76. Mosby D. Diccionario de medicina, enfermería y ciencias de la salud. 5th ed. Madrid: Matjrcout ; 2000.
77. Manuel L. Farmacología experimental y clínica. 7th ed. Buenos Aires ,Argentina: el ateneo.
78. DIGESA. Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Cusco-Perú.; 1999.
79. Look de Ugaz O. Investigación fitoquímica, Método en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2nd ed. Lima- Perú: Fondo editorial 1994; 1994.
80. Ruiz Reyes. Contribución del estudio farmacognóstico y farmacodinámico de las hojas de Mangífera indica L. al uso medicinal. tesis doctoral. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Programadoctoral en Farmacia y Bioquímica; 2009.
82. Bruneton J. Fitoquímica plantas medicinales y farmacognosia. 2nd ed. Barcelona: Acribia; 2002.
83. Rojas J, García A, López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales. Artículo. Disponible en : <https://www.redalyc.org/pdf/856/85640204.pdf>. Medellín-Colombia.: Universidad de Antioquia. , Departamento de Farmacia; 2004.

84. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. [Online].; 2002 [cited 2019 08 12]. Disponible en : <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>.
85. Esquivel Alvarado , Rodríguez Rodríguez G, Madrigal Carba. Evaluación de la composición química (Filantósidos y Lignanos) de los extractos crudos del árbol de Chilillo (*Phyllanthus Acuminatus* Vahl) procedente de diferentes sitios de Costa Rica. [Online].; 2013 [cited 2020 02 12]. Disponible en .: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4945331>.
86. Instituto Nacional de Salud. Proceso de producción. Manejo de cepario MEN R04 6022-035. [Online].; 2015 [cited 18 12 13]. Disponible en : <https://www.ins.gov.co/conocenos/sig/SIG/MEN-R04.6022-035.pdf>.
87. Ortiz G. Determinacion de la concentracion minima inhibitoria del aji Panca (*capsium chinese*) *Escheichia Coli* y *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional Agraria la Molina. Huacho (2014)..
88. Quispe Tapia J, Quiroga Zanabria D. Actividad antibacteriana sobre cepas ATCC y aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y determinación de toxicidad aguda de extracto seco hidroalcohólico de *Psidium guajava* (sahuito). tesis. Cusco: Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco., Carrera profesional Farmacia y Bioquímica
89. Toda M, Kubo Y. Components of *Camellia sinensis* Inhibit Growth and Biofilm Formation of Oral Strepto. *Pakistan Jornal Of Biological Sciences*. [Online].; 2008 [cited 2019 11 2].
90. Alhajlan , Alhariri , Omri A. Efficacy and Safety of Liposomal Clarithromycin and Its Effect on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors [Articulo de revista]. [Online].; 2013 [cited 2020 02 14]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3716163/>.
91. Mugabe C, Halwani M. Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped Aminoglycosides against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. [Online].; 2006 [cited 2020 02 13]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479138/>.
92. Navarro Serrano. Diseño y caracterización de nanopartículas termosensibles para bioimagen , transporte y liberación de fármacos. [Online].; 2017 [cited 2019 08 12]. Disponible en : <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/4318/1/TFG%20Navarro%20Serrano%200Luc%C3%ADa.pdf>.

93. Biplab Roy , Pritam Guha , Ravi Bhattarai. Influence of Lipid Composition, pH, and Temperature on Physicochemical Properties of Liposomes with Curcumin as Model Drug. [Online].; 2016 [cited 2019 03 2]. Disponible en. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/65/5/65_ess15229/_pdf/-char/en.
94. Oropesa Nuñez , Jáuregui Haza UJ. as nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. Instituto Superior de Ciencias Aplicadas. [Online]. La Habana; 2012 [cited 19 05 19]. Disponible en : <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/las-nanopartículas-como-portadores-de-fármacos-características-y-perspectivas>.

ANEXOS

Anexo N° 1 : CERTIFICADO DE LA IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA

CERTIFICACION

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ) certifica que la Alumna **Laura Maydee Huilca Quispe** Código 111282, de la Facultad Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha, sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas, en la clasificación APG IV (Angiosperm Phylogenetic Group) corresponden a:

***Senecio rhizomatus* Rusby** Familia Asteraceae. Nombre Común "Ticllay huarmi"

Clase: Equisetopsida C. Agard
Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden: Asteranae Takht.
Orden: Asterales Link
Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
Género: ***Senecio* L.**
Especie: ***Senecio rhizomatus* Rusby**

Lo que se certifica para los fines concernientes al caso.

Cusco, 22 de Febrero del 2018

Washington Galiano Sánchez M. Sc., Dr. (c).
Prof. Principal Dpto. Académico de Biología

Anexo N° 2

PRUEBAS PARA EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES: PRUEBA DE BENEDIC

A 0.5 mg de solución de extracto agregar 0.2 ml del reactivo de Benedict, calentar en baño a ebullición por 5 min y dejar enfriar. La formación de un precipitado de color rojo ladrillo indicará prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE GLICOSIDOS

A 0.5 mg de extracto se le agrega 2 ml de HCl al 1%, refluja por 5 min, enfriar y neutralizar con NaOH al 1%, luego tratar con carbón activado y luego filtrar, con porciones de 0.5ml de solución, realizar la prueba de Benedict, la formación de un precipitado rojo ladrillo indicara prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE AMINOACIOS: PRUEBA DE NINHIDRINA

A 0.5mg de extracto acidificado con HCl al 1% agregar de 2 a 3 gotas de la solución de ninhidrina al 1%, calentar por 5 min en baño de agua a ebullición. Las coloraciones rojizas, violetas o amarillas indicaran prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES: PRUEBA DE SHINODA

A 0.5mg del extracto agregar algunas limaduras de magnesio metálico más 2 o 3 gotas de HCl concentrado, indican prueba positiva coloraciones rojizas, tendientes al amarillo o azuladas. Las chalconas, auronas, catequinas, e isoflavonas nos dan prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

A 0.5mg de extracto agregar 1 o 2 gotas de cloruro férrico al 1% en solución acuosa. La presencia de precipitados o coloraciones azuladas – verdosas indican prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE QUINONAS

A 0.2 ml de extracto agregar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado, coloraciones rojizas indican pruebas positivas.

DETERMINACIÓN DE RESINAS

A 0.2ml de extracto agregar de 2 a 3 gotas del reactivo acetato de cobre. Una coloración verde esmeralda indica prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES

Para realizar las pruebas, solubilizar 0.5g de extracto con HCl al 5%, filtrar y finalmente se realiza el siguiente ensayo.

- A 0.5 ml de la solución acida, agregar 2 o3 gotas de reactivo Dragendorft. La formación de un precipitado naranja o marrón, indicara presencia de alcaloides.

DETERMINACIÓN DE TANINOS

A 0.5mg del extracto, agregar 2 o 3 gotas de cloruro férrico al 1%, la presencia de coloración o formación de precipitado indicara que la prueba es positiva. La coloración azul oscuro indicara presencia de taninos gálicos y una coloración verde la presencia de taninos catequicos.

DETERMINACIÓN DE SAPONINAS: PRUEBA DE ESPUMA

Aproximadamente 0.5mg del extracto se solubiliza en 5 ml de agua o en 5 ml de etanol al 40%, filtrar si es necesario, el filtrado agitar vigorosamente por 30 segundos. La formación de espuma persiste por 30 min, indica la presencia de saponinas.

Anexo N° 3

FICHA DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITIVO

Lugar:

Fecha: -/-----/-----/

TIPO DE PRUEBA	EXTRACTO ETANOLICO AL 70% DE <i>Senecio rhizomatus Rusby</i> "tikllaywarmi "
RESINAS	
ESTEROIDES Y TRITERPENOS	
ALCALOIDES	
AMINOACIDOS	
CUMARINAS	
QUINONAS	
COMPUESTOS FENOLICOS	
FLAVONOIDES	
TANINOS	
SAONINAS	
AZUCARES REDUCTORES	
GLICOSIDOS	

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- ✓ Abundante cantidad: +++
- ✓ Regular cantidad: ++
- ✓ Poca cantidad: +
- ✓ Ausencia: -

Anexo N° 4

FICHA DE PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Lugar:

Fecha: -----/-----/-----

Especie:

SOLVENTE	EXTRACTO ETANOLICO AL 70% DE Senecio rhizomatus Rusby "Tikllaywarmi "
AGUA DESTILADA	
ETER ETILICO	
METANOL	
ETANOL 96%	
ETANOL 60%	
ETANOL 40%	
BENCINA	
ACETONA	
ACETATO DE ETILO	
CLOROFORMO	
HEXANO	

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

- ✓ Abundante cantidad: +++
- ✓ Regular cantidad: ++
- ✓ Poca cantidad: +
- ✓ Ausencia: -

Anexo N° 5

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

CRITERIOS	AGAR USADO	PESO DEL EXTRACTO	BACTERIAS Y HONGOS	RESULTADOS
Criterio imperativo: Los microorganismos con este criterio deben estar ausentes ya que su presencia representa un daño en la salud	Agar SS		Salmonella	
Criterios indicativos de higiene: Los microorganismos con este criterio deben estar ausentes ya que su presencia indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto debe ser rechazado	Agar Mac Conkey		Coliformes fecales (E. coli)	
Criterios de alerta o límites críticos: Los microorganismos con este criterio deben estar ausentes ya que su presencia requiere la aplicación de medidas para tener el proceso bajo control.	Agar OGYE		Hongos y levaduras	

Fuente: DIGESA. Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, Cusco- Perú, 2008.

Resultados:

- **Positivo: +**
- **Negativo: -**

Anexo N° 6

FICHA DE DATOS DE MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Lugar:

Temperatura ambiente

Tiempo de incubación

Fecha ----/-----/-----/

Cepa ATCC

N° DISCO	CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/disco)	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm) EN CEPAS ATCC DE <i>Pseudomona aeruginosa</i> .		
		IG	IIG	PROMEDIO
1				
2				
3				
4				
5				
6				
FARMACO PATRON				
BLANCO				

Fuente: Elaboración propia

LEYENDA

IG: Primer grupo de placas

IIG: Segundo grupo de placas

Observaciones

.....

Anexo N° 7

DATOS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO FRENTE A LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE LOS LIPOSOMAS

LUGAR:

Temperatura de incubadora:

Tiempo de incubación:

Fecha -----/-----/-----/

TUBOS	FORMULACION DE LIPOSOMAS CONCENTRACIONES	MEDICIÓN DE ABSORBANCIA 0 HORAS			MEDICIÓN DE ABSORBANCIA 24 HORAS			DIFERENCIA DE ABSORBACIAS 0H – 24H	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO (%)
		I	II	III	I	II	III		
1									
2									
3									
3									
5									

Fuente: Elaboración propia.




Observaciones

.....

Responsable :

Anexo N° 8

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD DE LAS CEPAS DE *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Microbiologics®	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0353 Lot Number: 353-331** Reference Number: ATCC® 27853™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/10/12
Performance	
Macroscopic Features: Two colony types: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen(98%); And small and compact Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1) Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 21 mm <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>* Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <small>ATCC Accredited Reference Material Producer CERT #2655.02</small> </div> <div style="text-align: center;"> <small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <small>ATCC Accredited Testing Cert #2655.01</small> </div> <div style="text-align: center;"> <small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005</small> </div> </div>	

Anexo N° 9
CERTIFICADO DE COLESTEROL.

SIGMA-ALDRICH

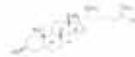
sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com
Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Cholesterol - Sigma Grade, >99%

Product Number: C8607
Batch Number: SL8W6939
Brand: SIGMA
CAS Number: 57-88-5
MDL Number: MFCD00003640
Formula: C₂₇H₄₆O
Formula Weight: 386.65 g/mol
Storage Temperature: Store at -20 °C
Quality Release Date: 27 MAR 2018
Recommended Retest Date: MAR 2024



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Very Faint Yellow	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
100 mg/mL, CHCl ₃ (APHA NMT 20)		
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Water (by Karl Fischer)	< 1.0 %	0.0 %
Purity (GC)	> 99 %	99 %
Carbon	83.0 - 84.7 %	83.8 %



Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

Anexo N° 10
MEDIOS DE CULTIVO
CALDO CEREBRO CORAZÓN (Brain Heart Infution)

Indicaciones

Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes.

Características:

- Adecuado para el cultivo de diversas bacterias exigentes como: Streptococcus pneumoniae, meningococos.
- También se utiliza para la preparación de inóculos para el uso en la susceptibilidad a los microorganismos.

Composición:

- Caldo cerebro200mg
- Caldo de corazón250mg
- Glucosa.....5.0mg
- Cloruro de sodio5.0mg
- Hidrogeno fosfato disódico2.5mg

Disolver 37 mg en 1000mL de agua destilada y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C a pH: 7.4 ±0.2°C A 25 °C.

Fuente: Extraído de las etiquetas de Medios de cultivo de Merck.

Anexo N° 11

FICHA DE REGISTRO PARA DATOS DE EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA Y LA ESTABILIDAD ACELERADA DE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS CON EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio Rhizomatus Rusby* “tikllaywarmi”.

Formulación	Características	1	30
Concentración 1	Aspecto		
	Color		
	Olor		
	Ph		
Concentración 2	Aspecto		
	Color		
	Olor		
	Ph		
Concentración 3	Aspecto		
	Color		
	Olor		
	Ph		
Concentración 4	Aspecto		
	Color		
	Olor		
	Ph		
Concentración 5	Aspecto		
	Color		
	Olor		
	Ph		

Fuente: Elaboración propia.

Anexo N° 12

CRITERIO DE TODA Y COL

Criterios de actividad antibacteriana atendiendo al halo de inhibición

ACTIVIDAD	HALO DE INHIBICION (mm)
Marcada	≥ 16
Moderada	$16 < \text{halo} < 12$
Ligera	$12 < \text{halo} < 8$
No actividad	≤ 8

Fuente: Toda M, Kubo Y, Volatile Components of camellia síntesis Inhibit Growth and Biofilm Formation of Oral Strepto. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008

ARCHIVO FOTOGRÁFICO

A. UBICACIÓN, RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO Y MACERACION: *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

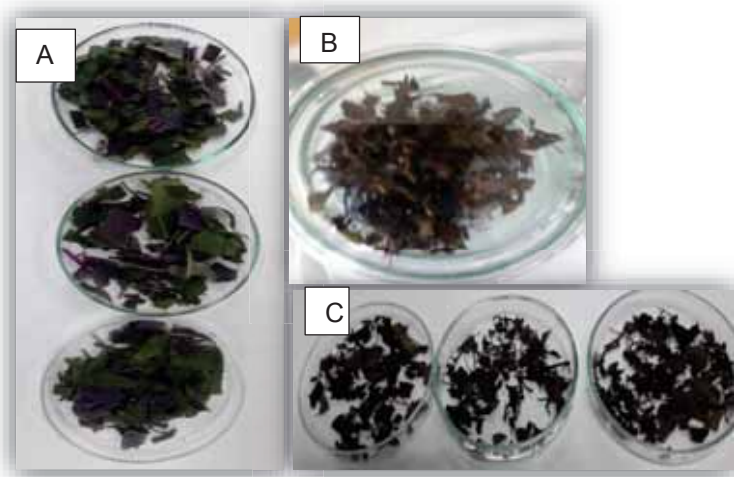
FOTOGRAFÍA N° 1



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía N° 1 A y B, se muestran las recolecciones de las hojas tallos y raíz de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, y el lugar de crecimiento en centro poblado Mahuayani, Distrito Ocongate, Provincia Quispicanchis, a 4979 m.s.n.m. Latitud Sur: 13° 37' 24" y Longitud W: 71° 23' 07". Ubicada al sur este del departamento de Cusco.

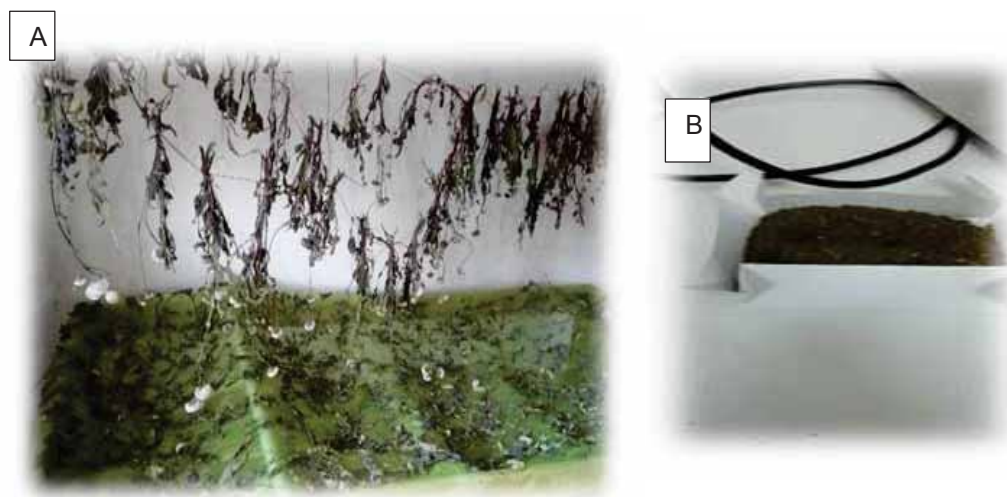
FOTOGRAFÍA N° 2



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía A, B y C, se observa las tres placas con los tallos hojas de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi" pesado y el secado para la determinación el porcentaje de humedad.

FOTOGRAFÍA N° 3

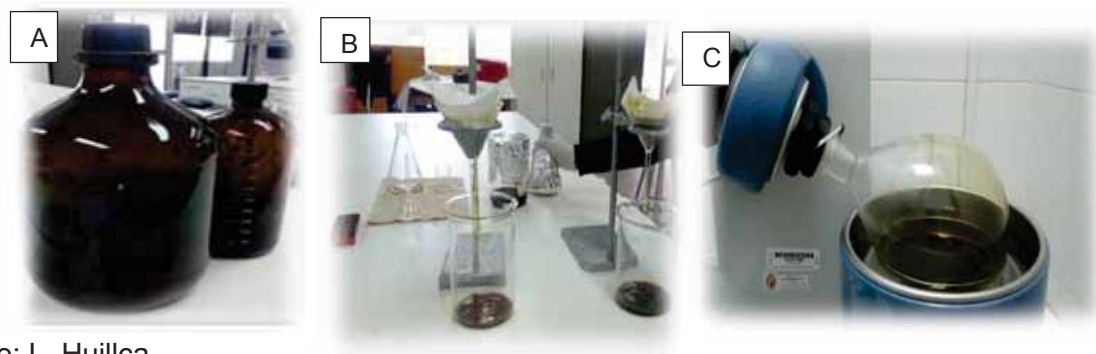


Fuente: L. Huillca.

En la fotografía A y B se observa la selección, el trozado, el secado en un ambiente aireado de las hojas y tallos de *Senecio rhizomatus Rusby* "tikllaywarmi".

B. FOTOGRAFÍAS DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

FOTOGRAFÍA N°4

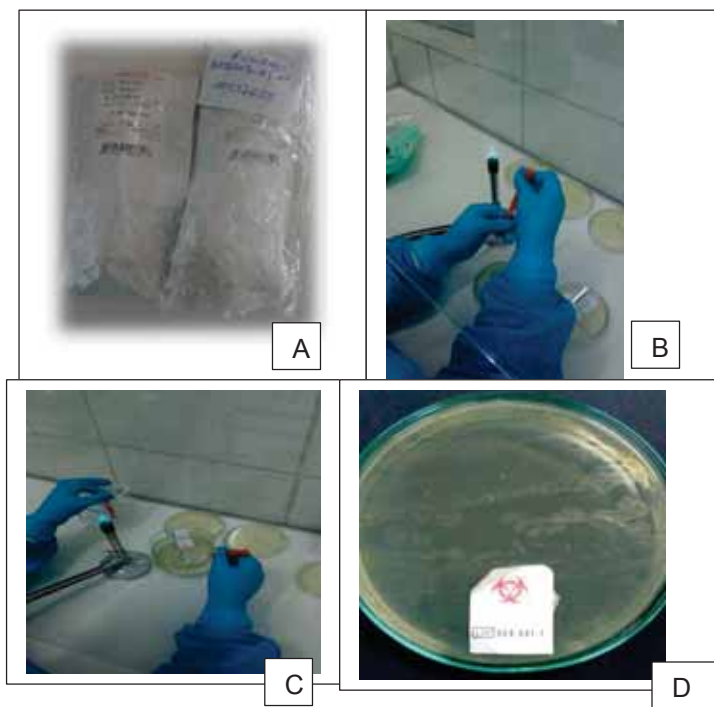


Fuente: L. Huillca.

En las fotografías A, B y C se observa, la maceración, filtración y la concentración, finalmente obtención del extracto seco hidroalcohólico al 70% de hojas y tallos de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”

E. ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *Pseudomona aeruginosa* CEPAS ATCC 27853

FOTOGRAFÍA N° 5

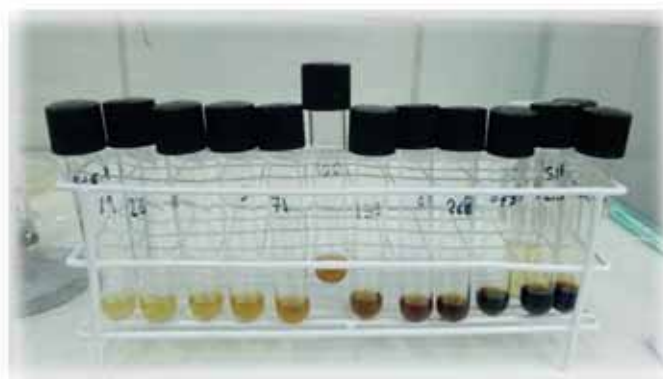


Fuente: L. Huillca.

En las fotografías A, se observa el sachet de *Pseudomona aeruginosa* cepa ATCC 27853, la reactivación de la cepa (fotografía B y C), y en la fotografía D se muestra el crecimiento de la cepa en Agar cetrimide.

C. PRUEBA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente A *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

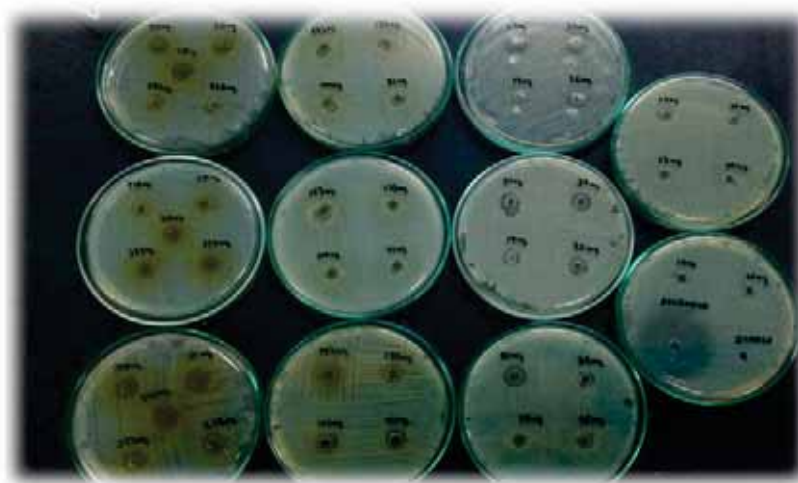
FOTOGRAFÍA N°6



Fuente: L. Huilca.

Se observa las diferentes diluciones del extracto seco hidroalcohólico al 70% *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

FOTOGRAFÍA N° 7

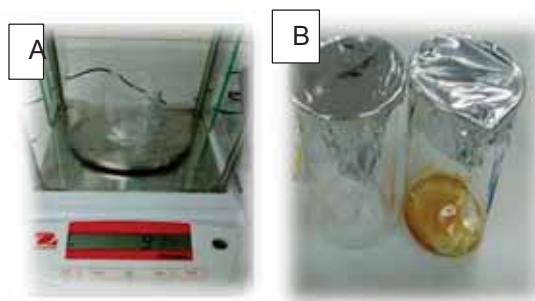


Fuente: L. Huilca.

Se observa los resultados de la determinación de la actividad antibacteriana de las concentraciones estandarizadas del extracto seco hidroalcohólico al 70% *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi” frente a *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

D. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS CON EXTRACTO HIDROALCOHOLICO al 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tiklaywarmi”

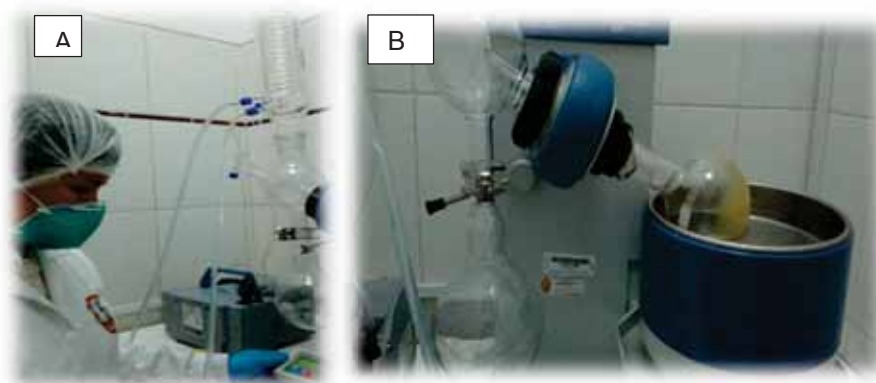
FOTOGRAFÍA N° 8



Fuente: L. Huillca.

En la siguiente fotografía A y B se observa el pesado de la fase lipídica: colesterol y fosfatidilcolina de soya.

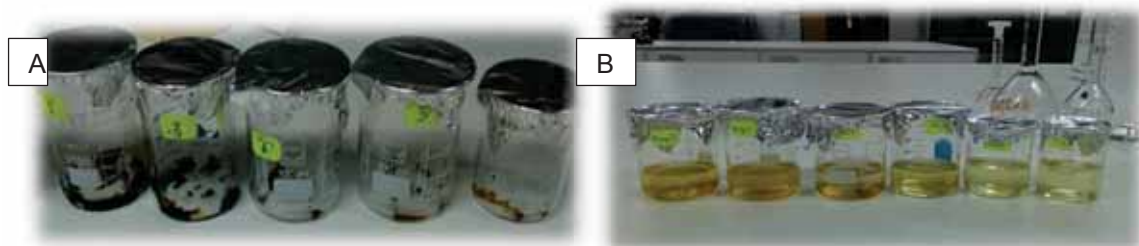
FOTOGRAFÍA N° 9



Fuente: L. Huillca.

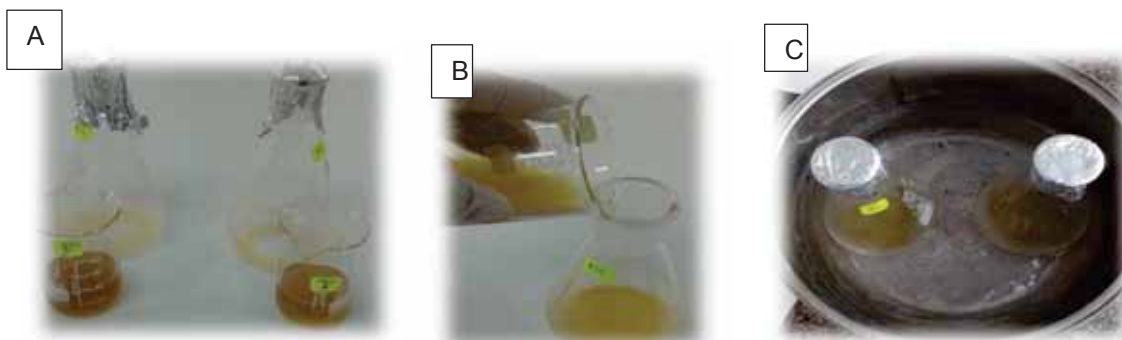
En la siguiente imagen A se observa el calibrado de equipo rotavapor para la extracción de los solventes cloroformo y metanol con los que se disolvió los componentes lipídicos (colesterol y fosfatidilcolina de soya), en la imagen B se observa la formación de la bicapa lipídica en el balón de base redonda del equipo rotavapor.

FOTOGRAFÍA N° 10



En la fotografía A se observa el extracto ya pesado para las diferentes concentraciones de formulación, en la fotografía B se observa la dilución del extracto de *Senecio rhizomatus* Rusby “tiklaywarmi”. con buffer fosfato pH 7.4, que corresponde a la fase hidrofílica para la formación de liposomas.

FOTOGRAFÍA N° 11



Fuente: L. Huillca.

En la imagen A se observa en los vasos el extracto disuelto con buffer fosfato pH 7.4 y en los matraces de la fase lipídica la fosfatidilcolina de soya y colesterol adherido en las paredes, en la imagen B Se observa la mezcla de la fase lipídica y hidrofílica y en la imagen C, se observa los matraces en baño maría a 37 °C antes de la agitación mecánica.

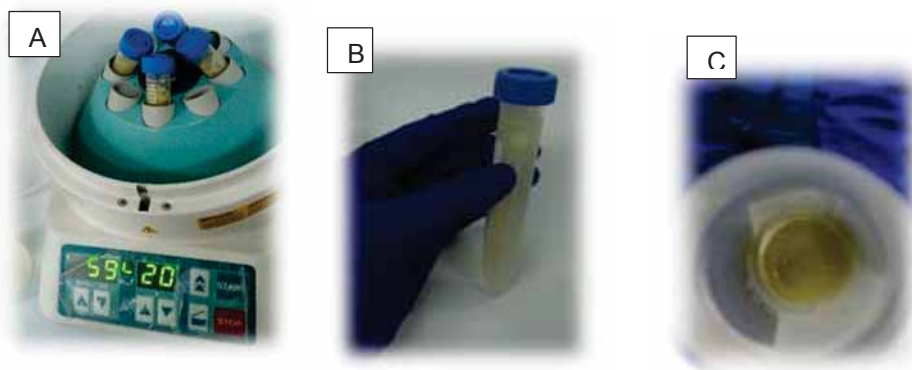
FOTOGRAFÍA N° 12



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía A se observa la agitación mecánica para la formación de liposomas, en la imagen B se observa la sonicación de la solución de liposomas para disminuir el tamaño de liposomas y en la imagen C se observa la solución final del extracto y la fase lipídica.

FOTOGRAFÍA N° 13



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía A se observa la centrifugación para la separación de la solución total y obtener los liposomas, en la imagen B se observa cómo se formó una fase sobrenadante donde se encuentra concentrado los liposomas y en la imagen C se evidencia los liposomas formados después de la centrifugación.

FOTOGRAFÍA N° 14

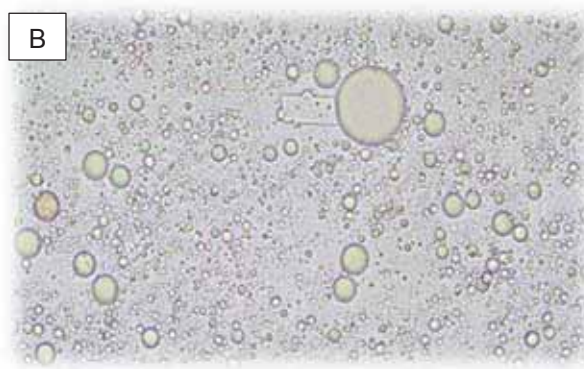


Fuente: L. Huillca.

Se observa las diferentes soluciones de liposomas obtenidos a diferentes concentraciones en la proporción de los componentes 12:6:4 p/p/p (fosfatidilcolina de soya, colesterol y extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”, dichas formulaciones se almacenan en vial. de vidrio con tapa a una temperatura de 4°C

E. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO DE LOS LIPOSOMAS FORMADOS.

FOTOGRAFÍA N° 15

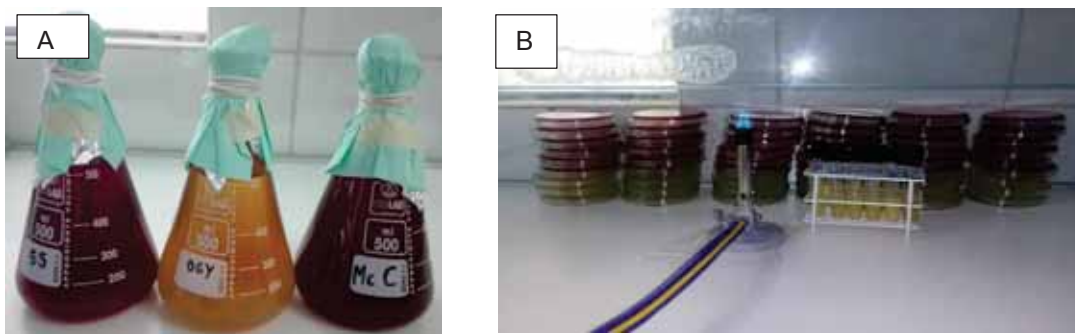


Fuente: L. Huillca.

En la fotografía A se observa el microscopio binocular utilizado para la observación microscópica y medición del tamaño de liposomas obtenidos, en la imagen B se observa los liposomas a diferentes tamaños, de forma circular, coloreados con el reactivo sudan III, que permite la mejor visualización.

F. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”.

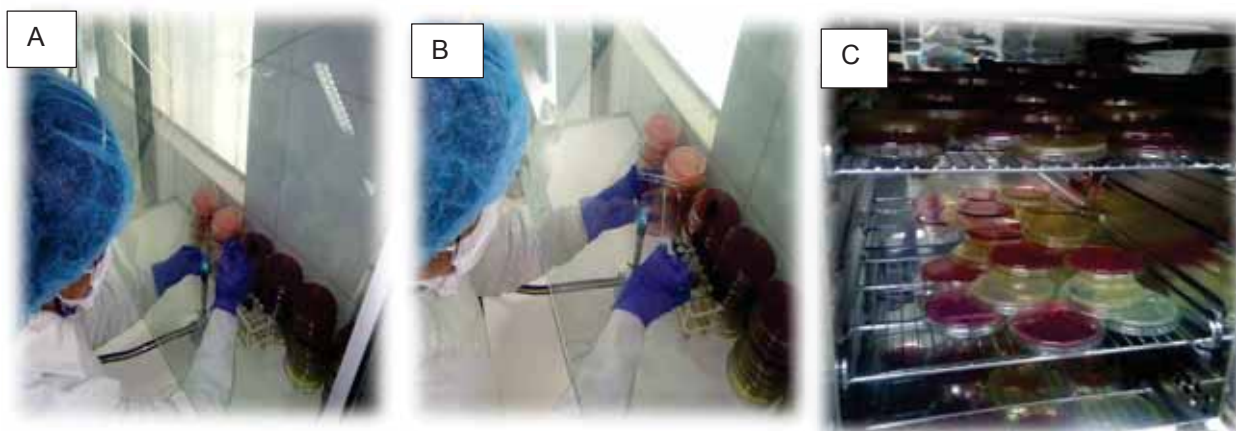
FOTOGRAFÍA N° 16



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía N° 16, A se muestra la preparación de agares (agar Mc Conkey, agar SS y agar OGYE respectivamente) y en la imagen B se muestra las placas que contienen los diferentes agares y los tubos que contienen las diferentes diluciones de los liposomas a distintas concentraciones

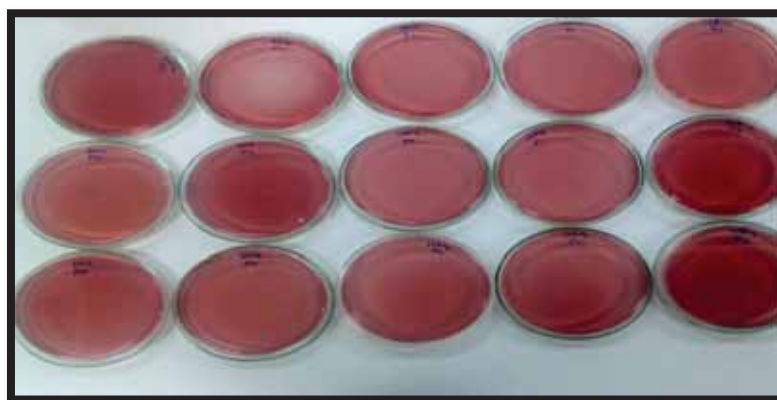
FOTOGRAFÍA N° 17



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía 17 A se observa la extracción de la muestra del liposoma diluidos con un hisopo estéril, en la imagen B se observa el sembrado en toda la superficie del agar, y en la imagen C se observa la incubación a 37 °C por 24 horas para las placas de agar Mc Conkey, agar SS y para el control de hongos y levaduras agar OGYE se incubo.

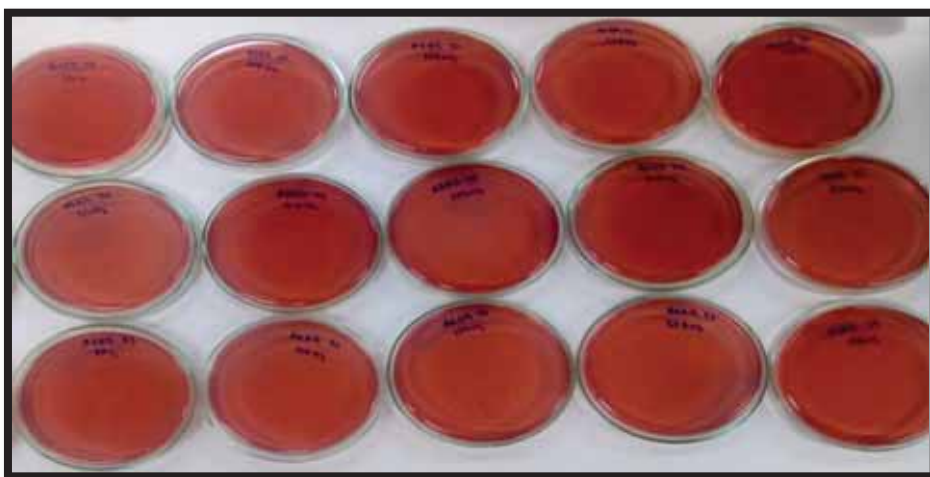
FOTOGRAFÍA N° 18



Fuente: L. Huilca.

En las fotografías N° 18 Se muestra el agar Mc Conkey, donde se tiene las diferentes placas a diferentes concentraciones de izquierda a derecha desde 12mg, 25mg, 50mg, 100mg y 200mg con diluciones de 10^{-1} 10^{-2} y 10^{-3} para cada concentración respectivamente. Donde después de la incubación se puede evidenciar que no hay crecimiento bacteriano.

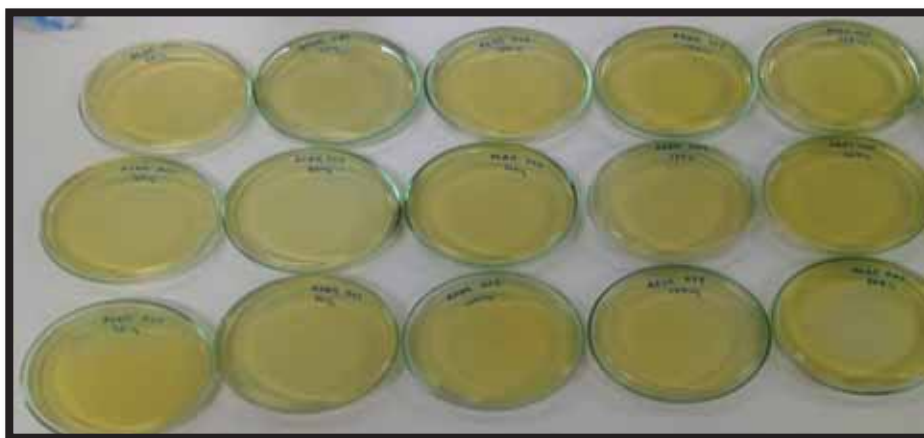
FOTOGRAFIA N° 19



Fuente: L. Huilca.

En la fotografía N° 19 se observa las placas de agar SS para las diferentes concentraciones de los liposomas formulados en diferentes diluciones (10^{-1} 10^{-2} y 10^{-3}) se evidencia la ausencia de crecimiento bacteriano por tanto la prueba dio un resultado negativo para salmonella shiguella.

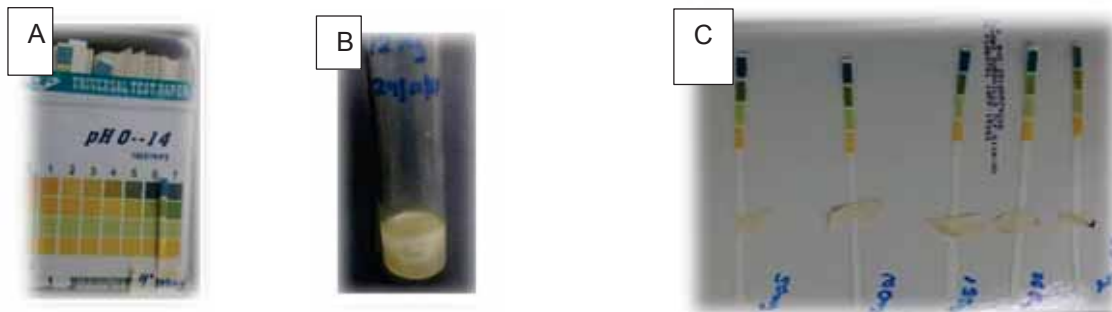
FOTOGRAFIA N° 20



Fuente: L. Huillca.

En la fotografía N°20 se observa las placas con agar OGYE después de la incubación de 48 horas para hongos y levaduras, donde no se evidencia el crecimiento de microorganismos, lo que indica que las disoluciones de los liposomas ensayados están libres de contaminación.

FOTOGRAFIA N 21

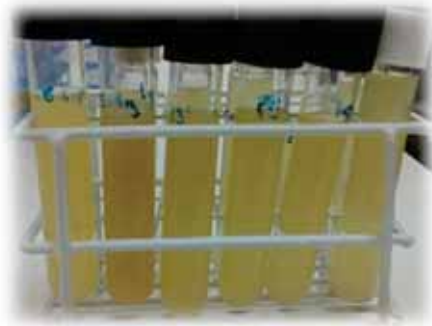


Fuente: L. Huillca.

En la imagen A se observa las tiras de pH que fueron utilizados para la medición pH de la solución de liposomas, en la imagen B se observa la solución liposomal donde se introdujo las tiras reactivas de pH, y la imagen C muestra los cambios de color que muestran el valor de pH 7 que se mantuvo la solución liposomal para 4°C.

G. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE LOS LIPOSOMAS FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

FOTOGRAFÍA N° 22

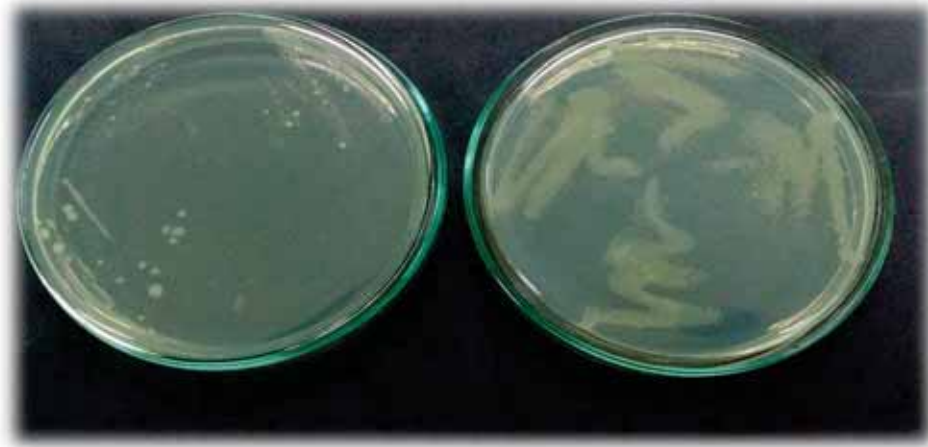


Fuente: L. Huillca.

En la fotografía N° 22 se muestra los diferentes tubos preparados con caldo BHI, agua destilada, tween 80 y solución de liposomas de diferentes concentraciones y el inóculo de *Pseudomona aeruginosa* para evaluar la actividad antibacteriana de los liposomas frente *Pseudomona aeruginosa* cepas ATCC 27853.

H. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA ENTRE LOS LIPOSOMAS ELABORADOS Y EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Senecio rhizomatus* Rusby “tikllaywarmi”

FOTOGRAFÍA N° 23




Fuente: L. Huilca

En la fotografía N °24 se observa las placas en las que fueron sembradas, un inóculo de los tubos que fueron incubados a 37 °C por 24 horas ensayados en la actividad antibacteriana de los liposomas, se puede evidenciar que en la placa izquierda que corresponde a las diferentes concentraciones de los liposomas, hay menor crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* mientras que en la placa derecha que es la placa que corresponde al sembrado de extracto existe mayor crecimiento bacteriano.

I.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LAS FORMULACIONES Y LA ESTABILIDAD ACELERADA DE LOS LIPOSOMAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES A UNA TEMPERATURA DE 4°C.

FOTOGRAFIA N° 24











Concentraciones	Características Organolépticas	pH
Liposomas 200mg		
Liposomas 100mg		
Liposomas 50mg		
Liposomas 25mg		
Liposomas 12mg		

Fuente : L. Huillca.

En la fotografía N° 24, se observa las soluciones liposomas elaborados con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Senecio rhizozmatus Rusby* "tikllaywarmi", que fueron almacenadas a una temperatura de 4° C durante 30 días, donde se evidencia que no hubo variación en cuanto a su aspecto, color y olor, tampoco de pH, manteniéndose el valor de 7.

J .- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LAS FORMULACIONES Y LA ESTABILIDAD ACELERADA DE LOS LIPOSOMAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES A UNA TEMPERATURA DE 40°C.

FOTOGRAFÍA N° 25

Características	Características Organolépticas	pH
Liposomas 200mg		
Lipoomas 100mg		
Liposomas 50mg		
Liposomas 25mg		
Liposomas 12mg		

Fuente : L. Huilca.

En la fotografías N° 25 se muestra las soluciones liposomas almacenados a 40°C por 30 días, se pudo evidenciar, que se presentó variaciones en cuanto al aspecto, color y el pH varió a un valor de 6.