

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE *Taraxacum officinale* F. H. WIGG Y SU EFECTO
BACTERICIDA *IN VITRO* EN CEPAS ATCC 35218 *Escherichia coli* Y ATCC 25923**

Staphylococcus aureus

Tesis para optar al título profesional de Biólogo

Presentada por:

Bachiller Víctor Andrés Tapia Puma

Bachiller Eddie Andre Farfan Zevallos

Asesor:

Dra. Hedy Y. Espinoza Carrasco

Co Asesor:

Qmca. Jeronima Surco Fuentes

CUSCO – PERÚ

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: Determinación de la Composición Fitoquímica del Extracto Etanolico al 96% de Tallos de Taraxacum officinale F.H. WIGG y su Efecto bactericida in Vitro en cepas ATCC 35218 Escherichia coli y ATCC 25923 Staphylococcus aureus presentado por: Edelie Ancho Farfan Zorrillo con DNI Nro.: 74492855 presentado por: Victor Andres Tapia Puma con DNI Nro.: 75209205 para optar el título profesional/grado académico de Biólogo

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 7%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 08 de Agosto de 2023

Heldy Y. Espinoza Carrasco
Firma
Post firma Heldy Y. Espinoza Carrasco
Nro. de DNI 23826797

ORCID del Asesor 0000-0002-4016-8815

ORCID del Usuario (O-218644) - 0000-0002-0753-9530

DNI: 23881408

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: https://unsaac.furmitin.com/viewer/sub_missions/oid:27259:250595423?locale=es-MX

NOMBRE DEL TRABAJO

**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN
FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLI
CO AL 96% DE TALLOS DE Taraxacum of
f**

AUTOR

Victor Tapia , Eddie Farfan

RECUENTO DE PALABRAS

20732 Words

RECUENTO DE CARACTERES

118141 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

115 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

5.0MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 2, 2023 2:24 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Aug 2, 2023 2:27 PM GMT-5

● **7% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 12 palabras)

● **7% de similitud general**

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	repositorio.unsaac.edu.pe Internet	2%
2	edoc.pub Internet	<1%
3	dspace.unitru.edu.pe Internet	<1%
4	clinical.r-biopharm.com Internet	<1%
5	repositorio.uroosevelt.edu.pe Internet	<1%
6	ww1.essalud.gob.pe Internet	<1%
7	hdl.handle.net Internet	<1%
8	pt.scribd.com Internet	<1%
9	fud.edu.ng Internet	<1%

10	repositorio.unapiquitos.edu.pe Internet	<1%
11	dspace.uce.edu.ec Internet	<1%
12	dspace.ups.edu.ec Internet	<1%
13	idoc.pub Internet	<1%
14	dspace.espoch.edu.ec Internet	<1%
15	repositorio.unap.edu.pe Internet	<1%
16	researchgate.net Internet	<1%
17	es.wikipedia.org Internet	<1%
18	repositorio.unan.edu.ni Internet	<1%
19	tesis.ucsm.edu.pe Internet	<1%
20	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet	<1%
21	repositorio.pucesa.edu.ec Internet	<1%

22	Wang, Ya-Lan, Zhang-Kai Zhou, Xiao-Niu Peng, Li Zhou, Zhong-Hua Ha... Crossref	<1%
23	dspace.ucuenca.edu.ec Internet	<1%
24	es.mongabay.com Internet	<1%
25	archer.chnu.edu.ua Internet	<1%
26	hardyrichard.blogspot.com Internet	<1%
27	alicia.concytec.gob.pe Internet	<1%
28	pesquisa.bvsalud.org Internet	<1%
29	repositorio.uap.edu.pe Internet	<1%
30	repositorio.ug.edu.ec Internet	<1%
31	repositorio.uta.edu.ec Internet	<1%

DEDICATORIA

La presente investigación se la dedico con un abrazo muy cálido y efusivo a mis padres Victor Hugo Tapia Concha y Martha Puma Condori, por quererme, entenderme, acompañarme y cuidarme a lo largo de mi vida, soy producto de su esfuerzo y este es el comienzo de los muchos méritos que celebraremos juntos.

Asimismo, este trabajo se lo dedico a mis tíos y segundos padres Alis Noemy Lopez Concha y Jose Luis Lopez Concha por todos los consejos, cariño y amistad incondicional que supo trascender los años y las distancias.

También quiero dedicar el presente trabajo a mi enamorada Ingrid Nohelia Huamaní Ibarra por todo el amor, amistad, constancia, comprensión y apoyo sincero durante esta investigación, que a conocimiento suyo comenzó como un sueño y ahora es realidad.

Le dedico el trabajo a mi hermana Noemy Rosmery Tapia Puma por alentarme cada día a ser una mejor persona y perseverar por sobre toda situación y a mi hermano Marco Antonio Tapia Guevara a quien extraño mucho y le deseo el descanso eterno en las manos de Dios.

También le dedico el presente trabajo a mis amigos incondicionales Andree Medina, Nelson Ttito, Jhonatan Mendoza, Caleb Cutipa y Yordy Hylares por alentarme a lo largo de la investigación y nunca rendirme.

Atte. Victor Andres Tapia Puma

DEDICATORIA

La presente investigación se la dedico con mucho amor y admiración a mis padres Carlos Farfan Rondon y Ana Zevallos Ortiz por su esfuerzo incansable y su infinito deseo de superación que inspiraron en mi ser la persona que soy, por su dedicación, sus consejos y sobre todo por enseñarme con el ejemplo, ustedes son y siempre serán mi mayor motivación, esto es el solo inicio; los amo.

También quiero dedicar el presente trabajo a mis hermanos Ronald y Karlo por su compañía, todas las risas y momentos que pasamos, porque juntos somos el orgullo de nuestros padres.

Así mismo dedicar el presente trabajo a mi enamorada Ana Gabriel Humpiri Aranzabal por su amor, comprensión, consejos, por todo su apoyo y aliento que me dio para no rendirme.

Atte. Eddie Andre Farfan Zevallos

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradecemos a Dios por permitirnos realizar la presente investigación y poner en nuestro camino a las personas adecuadas, asimismo, agradecemos a nuestros padres que, con su confianza, apoyo y ejemplo, nos permitieron salir adelante no solo con esta investigación sino también en nuestras vidas.

Agradecemos el apoyo constante e incondicional de la Dra. Hedy Yiyi Espinoza Carrasco y la Qmco. Jeronima Surco Fuentes, que nos guiaron a lo largo de nuestra investigación, con su muy amplio conocimiento, paciencia y amistad a la cual quedaremos agradecidos eternamente.

Agradecemos a nuestros amigos y hermanos que con su apoyo nos alentaron a nunca rendirnos y colaboraron con lo que podían, con el único objetivo de llevarnos a culminar nuestro trabajo, agradecemos a Boris Pacheco y Kelly Ojeda por el apoyo con su experiencia y consejos. Agradecemos a Rizal Conde por todos los años de amistad.

Agradecemos a nuestra alma mater por habernos dado la oportunidad de conocernos como amigos, colegas e investigadores, una amistad que comenzó en 2019 y que en agosto de 2022 comenzó con esta aventura que finalmente se concreta para orgullo de nuestros padres y conocidos.

GRACIAS

Atte. Los chuchos

CONTENIDO

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	IV
JUSTIFICACIÓN	V
OBJETIVOS	VI
Objetivo general.....	VI
Objetivos específicos	VI
HIPOTESIS.....	VII
Variables independientes.....	VII
Variables dependientes.....	VII
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 INTERNACIONALES	1
1.1.2 NACIONALES	4
1.1.3 LOCALES.....	5
1.2 GENERALIDADES	6
1.2.1 <i>Taraxacum officinale</i> F. H. WIGG.....	6
1.2.2 COMPONENTES FITOQUÍMICOS (METABOLITOS SECUNDARIOS).....	9
1.2.3 METODOS DE EXTRACCIÓN	16
1.2.4 ROTAVAPOR	18
1.2.5 EFECTO BACTERICIDA.....	18
1.2.6 PRUEBA DE KIRBY BAUER.....	20
1.2.7 ATCC 35218 <i>Escherichia coli</i> (Mingula) Castellani and Chalmers	20
1.2.8 ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Rosenbach.....	22
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	25
2.2 MATERIALES.....	25
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	25
2.2.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	25
2.2.3 REACTIVOS	25
2.2.4 MATERIAL DE LABORATORIO	26
2.3 METODOS	28
2.3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	28

2.3.2 LUGAR DE COLECCIÓN.....	29
2.3.3 METODO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES.....	29
2.3.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA MUESTRA VEGETAL	29
2.3.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL	30
2.3.6 SECADO DE LAS MUESTRAS	30
2.3.7 CALCULO DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD	30
2.3.8 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	31
2.3.9 CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO	31
2.3.10 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.....	32
2.3.11 DILUCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO.....	40
2.3.12 ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS	40
2.3.13 PRUEBA DE KIRBY BAUER.....	42
2.3.14 ANÁLISIS ESTADISTICO	45
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg (DIENTE DE LEÓN)	46
3.2 PORCENTAJE DE HUMENDAD DE TALLOS DE <i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg ...	46
3.3 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE <i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg.....	47
3.4 SCREENING FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE TALLOS DE <i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg.....	48
3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA <i>IN VITRO</i> GENERADO POR EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE <i>T. officinale</i> F. H. WIGG A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A LA CEPA ATCC 35218 <i>Escherichia coli</i>	51
3.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA <i>IN VITRO</i> GENERADO POR EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE <i>T. officinale</i> F. H. WIGG A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A LA CEPA ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i>	53
3.7 ANÁLISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS POR ANTIBIOGRAMA... 56	
3.7.1 MEDIA, MEDIANA, MODA	56
3.7.2 DESVIACIÓN ESTANDAR	58
3.7.3 PRUEBA DE CHI CUADRADO	59
CONCLUSIONES	62
SUGERENCIAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	70

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	22
TABLA 2.	Identificación bioquímica de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
TABLA 3.	Distribución de discos por placa	44
TABLA 4.	Resultados del screening fitoquímico cualitativo	48
TABLA 5.	Resultados de otros autores en la evaluación fitoquímica para metabolitos secundarios	49
TABLA 6.	Resultados de las placas inoculadas con <i>E. coli</i> y sometidas al antibiograma	51
TABLA 7.	Resultados de las placas inoculadas con <i>S. aureus</i> y sometidas al antibiograma ...	53
TABLA 8.	Resultados de las placas inoculadas con <i>S. aureus</i> y sometidas al antibiograma con factores de corrección del control negativo	54
TABLA 9.	Promedio de halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de <i>T. officinale</i> sobre la cepa ATCC 35218 <i>E. coli</i>	56
TABLA 10.	Promedio de halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de <i>T. officinale</i> sobre la cepa ATCC 25923 <i>S. aureus</i>	57
TABLA 11.	Desviación estándar de los halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de <i>T. officinale</i> sobre la cepa ATCC 35218 <i>E. coli</i>	58
TABLA 12.	Desviación estándar de los halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de <i>T. officinale</i> sobre la cepa ATCC 25923 <i>S. aureus</i>	59
TABLA 13.	Clasificación y cuantificación de los datos obtenidos por tamaño del halo a las diferentes concentraciones con la cepa ATCC 35218 <i>E. coli</i>	59
TABLA 14.	Clasificación y cuantificación de los datos obtenidos por tamaño del halo a las diferentes concentraciones con la cepa ATCC 25923 <i>S. aureus</i>	60
TABLA 15.	Prueba de chi cuadrado para los resultados obtenidos para la cepa ATCC 25923 <i>S. aureus</i>	61

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estructura vegetal de <i>Taraxacum officinale</i>	7
FIGURA 2.	Estructura de la berberina, alcaloide representativo.....	9
FIGURA 3.	Estructuras de los 3 grupos fundamentales de Quinonas.	10
FIGURA 4.	Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno del cual derivan los esteroides. 10	
FIGURA 5.	Estructura general de los triterpenos.	11
FIGURA 6.	Estructura general de los fenoles.....	11
FIGURA 7.	Estructura general de los flavonoides.....	12
FIGURA 8.	Estructura del ácido gálico, representante de los taninos.....	12
FIGURA 9.	Estructura de un disacárido reductor.	13
FIGURA 10.	Estructuras de las lactonas.....	13
FIGURA 11.	Estructura general de las cumarinas.	14
FIGURA 12.	Estructura de un disacárido reductor.	15
FIGURA 13.	Estructura general de las saponinas.....	15
FIGURA 14.	Estructura de la Baquelita, una resina representativa.....	16
FIGURA 15.	Tipos de métodos de extracción.	17
FIGURA 16.	Partes del rotavapor.	18
FIGURA 17.	Imagen de <i>Escherichia coli</i> bajo microscopía óptica a 1000x, diferenciada mediante la tinción de Gram.	21
FIGURA 18.	Imagen de <i>Staphylococcus aureus</i> bajo microscopía óptica a 1000x, diferenciada mediante la tinción de Gram.	23
FIGURA 19.	Zona de Corao.	29
FIGURA 20.	Reacción de Dragendorff.	32
FIGURA 21.	Reacción de Mayer.	33
FIGURA 22.	Reacción de Wagner.	34
FIGURA 23.	Reacción para la identificación de Quinonas.	34
FIGURA 24.	Reacción de Liebermann - Burchard.....	35
FIGURA 25.	Reacción de Shinoda.	36
FIGURA 26.	Reacción de Cloruro férrico.	36
FIGURA 27.	Reacción de Baljet.....	37
FIGURA 28.	Reacción de Ninhidrina.	38
FIGURA 29.	Reacción de Fehling.	39
FIGURA 30.	Representación de la preparación de las concentraciones.....	40
FIGURA 31.	Fotografía de la cepa ATCC 35218 <i>E. coli</i> en placa con agar sangre.	41

FIGURA 32.	Fotografía de la cepa ATCC 25923 <i>S. aureus</i> en placa con agar sangre.	41
FIGURA 33.	Distribución de discos en cada una de las placas	44
FIGURA 34.	Fotografía de <i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg (Diente de león) en la zona de Corao	79
FIGURA 35.	Tallos colectados de <i>Taraxacum officinale</i>	79
FIGURA 36.	Fotos de la muestra molida con etanol, antes y después de ser forrados.	80
FIGURA 37.	Frasco con la muestra vegetal luego de la maceración	80
FIGURA 38.	Doble filtración luego del macerado de <i>Taraxacum officinale</i> con etanol.....	81
FIGURA 39.	Filtración del extracto.....	81
FIGURA 40.	Fotografías del extracto etanólico luego de ser filtrado y comenzando su proceso de separación del etanol con la ayuda del rotavapor.....	82
FIGURA 41.	Recibiendo capacitación para el uso del rotavapor	82
FIGURA 42.	Calibrando el rotavapor	83
FIGURA 43.	Purificación y obtención del extracto etanólico	83
FIGURA 44.	Ensayo de Dragendorff negativo.....	84
FIGURA 45.	Ensayo de Mayer positivo	84
FIGURA 46.	Ensayo de Wagner positivo	85
FIGURA 47.	Análisis fitoquímico de Quinonas positivo	85
FIGURA 48.	Análisis fitoquímico de Esteroides y triterpenoides libres positivo.....	86
FIGURA 49.	Análisis fitoquímico de Flavonoides positivo.....	86
FIGURA 50.	Análisis fitoquímico de Fenoles y Taninos con presencia de taninos pirocatecolicos	87
FIGURA 51.	Análisis fitoquímico de Saponinas negativo	87
FIGURA 52.	Análisis fitoquímico de Lactonas y cumarinas positivo.....	88
FIGURA 53.	Análisis fitoquímico de Aminoácidos libres negativo.....	88
FIGURA 54.	Análisis fitoquímico de Resinas positivo	89
FIGURA 55.	Análisis fitoquímico de Azúcares Reductores positivo.....	89
FIGURA 56.	Laboratorio de aguas y alimentos.....	90
FIGURA 57.	Dimetil sulfoxido.....	90
FIGURA 58.	Diluciones a concentraciones de 100,500,250 y 125 mg/mL	91
FIGURA 59.	Discos preparados con papel filtro	91
FIGURA 60.	Discos impregnados con las diluciones a distintas concentraciones.....	92
FIGURA 61.	Preparación del inóculo A (<i>E. coli</i>) y B (<i>S. aureus</i>)	92
FIGURA 62.	Fase experimental de antibiograma.....	93
FIGURA 63.	Colocando las muestras en la incubadora	93

FIGURA 64.	Resultado del antibiograma realizado para <i>Escherichia coli</i>	94
FIGURA 65.	Antibiograma a detalle de <i>Escherichia coli</i>	94
FIGURA 66.	Resultado del antibiograma realizado para <i>Staphylococcus aureus</i>	95
FIGURA 67.	Antibiograma a detalle de <i>Staphylococcus aureus</i>	95
FIGURA 68.	Alistando el material para ser llevado al autoclave	96
FIGURA 69.	Auto clavando el material para ser usado en la evaluación bactericida	96

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Certificado de identificación taxonómica de <i>Taraxacum officinale</i>	71
ANEXO 2. Cotización de las cepas bacterianas	72
ANEXO 3. Preparación de agar Sangre para siembra de cepa ATCC 35218 de <i>Escherichia coli</i> y ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i>	73
ANEXO 4. Preparación de caldo BHI (brain heart infusion) para la conservación de bacterias 74	
ANEXO 5. Preparación agar de Mueller Hinton para la replicación de bacterias	75
ANEXO 6. Certificado de la cepa ATCC 35218 <i>Escherichia coli</i>	76
ANEXO 7. Certificado de la cepa ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i>	77
ANEXO 8. Activación de cepas ATCC	78

INDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA 1. Protocolo del trabajo de investigación.....	28
---	----

RESUMEN

Taraxacum officinale es una planta perteneciente a la familia Asteraceae, es comúnmente conocida como diente de león, achicoria o hallaq pilli. En todo el mundo es considerada como maleza, sin embargo, es comestible, puede ser usada en la medicina natural y posee usos ornamentales. El presente trabajo de investigación tiene por objetivo determinar la composición fitoquímica cualitativa del extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg y evaluar su efecto bactericida *in vitro* en cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*. Se realizó la evaluación exclusivamente con los tallos de *T. officinale* ya que los antecedentes informaron un mejor efecto bactericida con este apéndice de la planta, asimismo, las muestras vegetales fueron colectadas en el distrito de San Sebastián, en la zona de Corao por encontrarse muy lejana a la ciudad y no presentar riesgos que alteren sus componentes por la presencia de vehículos o uso de fertilizantes. Las muestras vegetales secas fueron colocadas en etanol al 96% por 8 días, para poder extraer los principios activos de *T. officinale* que luego fueron aislados con la ayuda de un rotavapor. El screening fitoquímico se realizó mediante evaluaciones cualitativas, dando reacciones positivas para los siguientes metabolitos secundarios: quinonas, alcaloides, esteroides, triterpenoides, flavonoides, taninos pirocatecólicos, cumarinas, lactonas, azúcares reductores y resinas. La evaluación del efecto bactericida *in vitro* por el método de disco difusión se realizó en las cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* por ser Gram negativa y Gram positiva respectivamente, donde los resultados demostraron que el extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* genera inhibición para *S. aureus* a concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 mg/mL, en cambio no hubo efecto inhibitorio en ninguna de las concentraciones para la cepa de *E. coli*.

Palabras clave:

Taraxacum officinale, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, screening fitoquímico, extracto etanólico, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

Taraxacum officinale es una planta cosmopolita de preocupación menor según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), utilizada en la medicina tradicional particularmente en Asia y Europa. En China, también es ovacionada como una hierba no tóxica con beneficios excepcionales por sus propiedades **(Jinchun, Z., & Jie, C,2011)**. Además, contiene una amplia variedad de fitoquímicos cuyas actividades biológicas se están estudiando activamente en distintas áreas de la salud humana, como la inulina con funciones diuréticas, la taraxina con funciones hepatoprotectoras, la eudesmanolide y gemacranolide como sustancias únicas de esta planta con funciones digestivas, además de poseer vitamina A, B, C, D entre otros muchos principios activos más. La evidencia sugiere que sus componentes tienen actividades antioxidantes y antiinflamatorias que se ven reflejados en diversos efectos biológicos. **(González-Castejón, M., Visioli, F., Rodriguez-Casado A, 2021)**

Los estudios experimentales permitieron descubrir combinaciones sinérgicas de antibióticos, su objetivo principal es acelerar la tasa de destrucción de las bacterias y reducir la inmunidad a los medicamentos. En este contexto, han resurgido las polimixinas, la fosfomicina y la gentamicina, formando la base de muchos regímenes combinados que han demostrado ser útiles. Así mismo el constante estudio en búsqueda de nuevos principios activos vegetales obtenidos a partir de extractos etanólicos de plantas han permitido tener nuevas sustancias que podrían ser usadas en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias multidrogo resistentes como la 2-fenil-croma, lignano, isoflavonas, elagitaninos, entre muchos otros, dependiendo de las características fitoquímicas de la especie vegetal. **(Salgado, P., Gilsanz, F., & Maseda, E, 2015)**

Escherichia coli es agente etiológico de diarrea, infecciones de tracto urinario, enfermedades respiratorias, neumonía, entre otras enfermedades. En entornos de atención médica, se demostró que los lavatorios y otros lugares de aguas residuales son reservorios de *E. coli* que además son resistentes a los antimicrobianos en el contexto de brotes de cepas resistentes entre los pacientes. *E. coli* es una bacteria propia de nuestra microbiota natural, por lo que su diseminación

mediante el drenaje es de vital importancia, pues esta bacteria se caracteriza por el amplio trasplante de plásmidos de resistencia, he ahí la importancia de la investigación en este microorganismo. **(Constantinides et al, 2020)**

Staphylococcus aureus es el responsable de una gran variedad de enfermedades, desde una infección cutánea leve hasta infecciones del torrente sanguíneo. La bacteriemia por *S. aureus* presenta tendencia a causar infecciones endovasculares y metastásicas, además, puede causar complicaciones en cualquier parte del cuerpo, por lo que se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad pese al tratamiento antimicrobiano apropiado. En casos muy extremos este microorganismo puede llegar a producir fibrosis pulmonar quística, forunculosis, osteomielitis y neumonía. **(Deodhar et al., 2015)**

Existe una alarmante preocupación por la diseminación intrahospitalaria de *S. aureus* y *Escherichia coli* por medio de la ropa usada por el personal de salud. Por ello se realizó un estudio en las batas blancas del personal del Centro Médico de la Universidad de Maryland y se obtuvo como resultados que el 23% estaban contaminados con *S. aureus*, de este porcentaje el 18% eran resistentes a meticilina (SARM). Por lo que las batas blancas del personal de salud pueden resultar un fómite de contaminación entre el personal de salud y los pacientes. **(Treakle et al., 2009)**

En la presente investigación se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico seco al 96% de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg y se evaluó su efecto bactericida a concentraciones de 1000, 500, 250, 125 mg/mL sobre las cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* usando el método de Kirby Bauer (Disco difusión). El propósito del presente trabajo es aportar conocimiento en el campo de la medicina alternativa, contribución al descubrimiento de nuevos bactericidas, así mismo servirá también como línea base para próximas investigaciones relacionadas al tema de estudio a nivel local y nacional.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el uso de fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias tiene efectos adversos en el cuerpo por lo que se necesita considerar métodos alternativos.

La comparación bibliográfica del análisis fitoquímico cualitativo entre **Rodríguez Pava et al., 2017, Olivera & Gutierrez, 2021, Moncayo Rivera, Ch. M., et al., 2022**, y otros autores citados en la investigación, presentaron diferencias significativas. Se aprecia que la altitud, humedad y estación del año afecta a la composición fitoquímica, además, no se cuenta con registros bibliográficos sobre la evaluación fitoquímica cualitativa en muestras de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg para la zona de Corao.

Se evidenció que en muchas investigaciones usan la estructura vegetal completa de *Taraxacum officinale*, sin embargo, **Rodríguez Pava et al., 2017** y **Harfouch, R. M., & Ghosh, S., 2021** demostraron que los tallos poseen un mejor efecto bactericida en comparación con los demás apéndices de planta.

El efecto bactericida producido por los extractos obtenidos a partir de *Taraxacum officinale* es variable, encontrándose casos en los que *Escherichia coli* es sensible y otros en los que es resistente, de igual manera para *Staphylococcus aureus* según **Rodríguez Pava et al., 2017** y **Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022**.

Escherichia coli es una bacteria que forma parte de nuestra microbiota intestinal y a la vez es patógeno en otras regiones del cuerpo por lo cual es usado ampliamente en materia de investigación (**American Type Culture Collection, 2020**). Además, no se cuenta con antecedentes en Perú donde evalúen el efecto bactericida del extracto de *T. officinale* F. H. Wigg sobre la cepa ATCC 35218.

Por otro lado, *Staphylococcus aureus* es un organismo de importancia clínica el cual es generalmente usado en la investigación de sensibilidad antimicrobiana de Gram positivos (**American Type Culture Collection, 2013**). A nivel nacional aún no se tiene un registro donde *T. officinale* F. H. Wigg genere efecto bactericida sobre la cepa ATCC 25923.

Por lo cual ponemos a cuestión la siguiente interrogante ¿Que composición fitoquímica presentará el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg proveniente de la zona de Corao y si tendrá efecto bactericida *in vitro* en cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*?

JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos sintetizados en laboratorio producen daño al cuerpo por lo que se considera que el uso de especies vegetales en infusiones o emplastos podría ser una alternativa menos dañina.

Taraxacum officinale F. H. Wigg “Diente de León” es una planta que posee efecto antimicrobiano, depurativo y entre otras muchas propiedades (ESSALUD, 2002), sin embargo, su composición fitoquímica depende de la estación del año y otros factores ecológicos. (González Castejón et al., 2021)

El extracto etanólico obtenido a partir de tallos de *Taraxacum officinale* demostró poseer un mejor efecto bactericida que el extracto etanólico de las hojas y flores. (Rodríguez Pava et al., 2017)

El constante descubrimiento de mecanismos de resistencia en bacterias, hace necesario que el sector público y privado realice investigación en el desarrollo de nuevos antibióticos. (Wencewicz, 2019). En países donde este tipo de medicamentos son de fácil adquisición, por no requerir de una receta médica para su venta y aplicación en humanos o animales, es donde fundamentalmente la farmacorresistencia empeora. (Organización Mundial de la Salud, 2020)

Escherichia coli es considerada una bacteria de importancia crítica en la investigación de fármacos, por su alta distribución a nivel mundial y como constituyente de nuestra microbiota, pese a ser un organismo simbiótico para los humanos es altamente patógeno fuera de la región intestinal. (Instituto de Salud Global Barcelona, 2020)

Staphylococcus aureus según la OMS tiene un nivel de prioridad medio, por ser un patógeno con alta tasa de desplazamiento intrahospitalario y el causante de septicemias silenciosas, llegando a afectar piel y tejidos blandos. Las cepas de *S. aureus* que no presentan mecanismos de resistencia son cruciales en la investigación pues permiten realizar la comparativa con las cepas multidrogo resistentes. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

Por lo cual en la presente investigación se determinará cualitativamente la composición fitoquímica del extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg provenientes de la zona de Corao y se evaluará su efecto bactericida *in vitro* en cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la composición fitoquímica del extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg y evaluar el efecto bactericida *in vitro* en cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos

1. Realizar la determinación taxonómica de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg.
2. Realizar screening fitoquímico cualitativo del extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg.
3. Evaluar el efecto bactericida *in vitro* generado por el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg disuelto en DMSO a diferentes concentraciones (1000, 500, 250 y 125 mg/mL) frente a la cepa ATCC 35218 *Escherichia coli*.
4. Comparar la media de los halos de inhibición generados por las concentraciones a 1000, 500, 250 y 125 mg/mL del extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg disuelto en DMSO frente a la cepa ATCC 35218 *Escherichia coli*.
5. Evaluar el efecto bactericida *in vitro* generado por el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg disuelto en DMSO a diferentes concentraciones (1000, 500, 250 y 125 mg/mL) frente a la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.
6. Comparar la media de los halos de inhibición generados por las concentraciones a 1000, 500, 250 y 125 mg/mL del extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg disuelto en DMSO frente a la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.

HIPOTESIS

La evaluación fitoquímica cualitativa para el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg muestra reacciones positivas a todos los metabolitos secundarios. Así mismo, presenta efecto bactericida para la cepa ATCC 35218 *Escherichia coli* y la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.

Variables independientes

1. Efecto bactericida del extracto.

Variables dependientes

1. Concentración del extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* F. H. Wigg.

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 INTERNACIONALES

Rodriguez Pava, C. N., et al. (2017). “Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia” usaron el extracto etanólico al 96% de tallos y hojas de *Taraxacum officinale* a concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 mg/mL, preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO), sobre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, entre otras, por el método de disco difusión, donde obtuvieron como resultado que el extracto obtenido a partir de los tallos de *T. officinale* generaba efecto antimicrobiano sobre *E. coli* a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL con halos de inhibición de 11 y 10 mm respectivamente y en *S. aureus* a concentraciones de 250, 500, 1000 mg/mL con halos de inhibición de 10, 12 y 13 mm respectivamente, mientras que las hojas de *T. officinale* no generan inhibición en *E. coli* y *S. aureus*. Además, en el estudio fitoquímico por cromatografía en columna se evidencio la presencia de quinonas, flavonoides, saponinas y triterpenos en el extracto etanólico al 96% de *T. officinale*.

Xu, P., Xu, X. B., Khan, A., Fotina, T., & Wang, S. H. (2021). “Antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and content analysis of *Taraxacum officinale* phenolic extract”. En el estudio se realizó la recolección de muestras de *T. officinale* en inmediaciones del campus de la Universidad Nacional Agraria de Sumy en Ucrania, para luego realizar la obtención del extracto fenólico de *T. officinale*. El efecto bactericida de dicho extracto se puso a prueba frente a la cepa ATCC 25923 *S. aureus* mediante el método de concentración mínima inhibitoria, demostrando que hay inhibición a partir de 12.5 mg/mL para *S. aureus*. La evaluación fitoquímica se realizó por HPLC para detección de fenoles, encontrándose ácido clorogénico, ácido caféico, rutina, luteolina y ácido ferúlico. El autor aclara la importancia de los fenoles y polifenoles en el efecto bactericida generado por los extractos vegetales.

Harfouch, R. M., & Ghosh, S. (2021). “Antibacterial Activities of Widely Spread *Taraxacum officinale* Dandelion in Al-Qadmous, Syria as Potential Therapeutic Strategy for Antibiotic Resistant Bacteria.” En el estudio se preparó el extracto etanólico de tallos y aparte hojas de diente de león, con 10 gr de la planta seca en 70 mL de etanol por 2 días a temperatura ambiente y luego se concentró cada solución en rotavapor por 3 días a 25 rpm. Luego por el método de disco difusión en agar se puso a prueba el efecto bactericida del extracto frente a las cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* donde se encontró que el extracto de tallos de *T. officinale* generan halos de inhibición de 12 mm de diámetro mientras las hojas no generan halos de inhibición sobre las cepas de *E. coli*. Para el caso de *S. aureus* los tallos de *T. officinale* generan halos de inhibición de 24 mm de diámetro mientras las hojas no generan halos de inhibición. En dicho estudio no se realizó el análisis fitoquímico.

Ayala Aguilar, J. L. (2019). “Efectividad antimicrobiana del extracto etanólico del *Taraxacum officinale* (diente de león) al 50% y 100% sobre cepas de *Staphylococcus aureus*” determinaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos a una concentración de 50% y 100%, para ello se colectaron muestras de *T. officinale* de diversos parques de la ciudad de Quito - Ecuador, dichas muestras fueron secadas a 42°C para luego ser macerados con etanol en un ambiente oscuro por 8 días, usando 250 g de planta triturada en 500 mL de etanol. En la fase experimental se puso a prueba la efectividad antimicrobiana sobre la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*. Obteniendo como resultado que el extracto etanólico de *T. officinale* al 100% y 50% tiene efecto bactericida con halos de inhibición de 13 mm y 9.4 respectivamente. En dicho estudio no se realizó estudio fitoquímico.

Hernández Moreno, et al. (2021). “Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias” buscaron demostrar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 96% de *Taraxacum officinale* a una concentración de 60 mg/mL diluido con dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* y ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* con métodos de perforación en agar,

microdilución en placa y bioautografía, donde reportaron que *T. officinale* no genera efecto bactericida sobre *E.coli* pero si sobre *S. aureus*. También, el estudio fitoquímico cualitativo del extracto etanólico al 96% de *T. officinale* demostró la presencia solo de terpenos, triterpenos y saponinas.

Azuero, A., et al. (2016). “Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador” determinaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos a una concentración de 40 mg/mL con la técnica difusión en agar, para ello se utilizó las hojas *Taraxacum officinale* extraídas al azar en las localidades de Machala y Santa Rosa, Ecuador, expuestas frente a *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Obtuvieron como resultado que *T. officinale* posee una alta actividad antibacteriana contra *E. coli*, obteniéndose halos de inhibición que oscilaban entre 10 a 14 mm. Para *S. aureus* encontraron halos de inhibición de 8 a 10 mm. Concluyeron que *T. officinale* genera efecto bactericida sobre *E. coli* y en menor medida sobre *S. aureus*. En dicho estudio no realizaron el análisis fitoquímico.

Espadero Bermeo, S. G. (2018). “Comparación de la capacidad antioxidante de 4 metabolitos secundarios presentes en *Taraxacum officinale* (Diente de León) frente a N-acetil cisteína un antioxidante comercial” se colectaron muestras de *T. officinale* en la ciudad de Cuenca - Ecuador, para realizar el extracto etanólico. En el estudio fitoquímico se halló la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides y triterpenos.

Moncayo Rivera, Ch. M., et al. (2022). “Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de diente de león (*Taraxacum officinale*) frente a microorganismos patógenos” se colectaron muestras de *T. officinale* en el Cantón el Tambo y el Cantón el Cañar, ambos pertenecientes a Ecuador, donde el aceite esencial presentó flavonoides, fenoles, taninos, alcaloides, lactonas, azúcares reductores, glicósidos y esteroides. Así mismo presentó un efecto bactericida intermedio en *Escherichia coli* ATCC 25922 con halos de inhibición de 10.60 mm, en el caso de *S. aureus* se encontró halos de inhibición de 32.00 mm, siendo el más sensible al aceite esencial de *T. officinale*.

Sohail, et al. (2014). “*In vitro* antibacterial study of *Taraxacum officinale* leaves extracts against different bacterial pathogenic strains” Tuvieron como finalidad determinar la actividad antibacteriana de los extractos de hojas de *Taraxacum officinale* frente a diferentes cepas bacterianas, usando el método de disco difusión. Obtuvieron como resultado que los extractos con cloroformo y metanol fueron efectivos contra las cepas *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *M. luteus*. También lograron deducir los metabolitos secundarios de *T. officinale* responsables de la actividad antibacteriana, los cuales fueron la presencia de alcaloides, flavonoides y taninos.

1.1.2 NACIONALES

Reaño Ortega, C. K. (2014). “Actividad antimicrobiana “*in vitro*” de los extractos etanólicos de las hojas de *Aloysia triphylla* “cedrón”, *Rosmarinus officinalis* “romero”, *Mentha spicata* “hierbabuena”, *Portulaca oleracea* “verdolaga” y *Taraxacum officinale* “diente de león”” Se colectaron muestras de *T. officinale* en la ciudad de Trujillo, provincia Trujillo, para extraer sus principios activos con etanol al 70%, posteriormente se obtuvo un extracto seco por evaporación a temperatura ambiente. En la fase experimental se preparó una solución concentrada a 10 mg/mL y se puso a prueba el efecto bactericida sobre la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, obteniendo como resultado que el extracto etanólico al 70% de *T. officinale* no genera efecto antimicrobiano sobre la cepa de *E. coli*. y *S. aureus*. En dicho estudio no se realizó el análisis fitoquímico.

Cortez Jambo, C. M., & Manayalle Saldaña M. (2022). “Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Taraxacum officinale* (Diente de león) frente a *Staphylococcus aureus*”. Se colectaron muestras de *T. officinale* de manera aleatoria, y se maceraron en alcohol de 96°, posteriormente se prepararon concentraciones a 100%, 75% y 50%. Se realizó la prueba de Kirby Bauer por concentración en micropozos para determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 96% de *T. officinale*, donde los resultados mostraron efecto bactericida en las concentraciones de 100%, 75% y 50% con halos de inhibición de 19.01, 11.27 y 9,25 mm respectivamente. En dicho estudio no se realizó el análisis fitoquímico.

García Huamán, F., & Angeles Trauco, M. (2021). “Efecto del extracto de plantas medicinales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*” determinaron el efecto bactericida del extracto etanólico usando 9 variedades de plantas frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de disco difusión en agar, las hojas de estas plantas fueron recolectadas del fundo Vitaliano ubicado en el distrito de Chachapoyas-Amazonas, estas mismas fueron secadas a temperatura ambiente y luego en estufa a 37°C, ambos por 24 horas, para luego macerarlas en etanol absoluto en una proporción de 1 L por cada 100 g de planta triturada y finalmente se almacenó por 20 días. En la fase experimental se puso a prueba 9 variedades de plantas entre ellas *T. officinale* frente a *S. aureus* y *E. coli* que fueron aisladas de muestras carne. Obteniendo como resultado que ninguno de los extractos poseía efecto bactericida frente a *E. coli* y *S. aureus*. En dicho estudio no se realizó estudio fitoquímico.

1.1.3 LOCALES

Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G. (2021). “Evaluación de la actividad antimicrobiana “*in vitro*” sobre cuatro cepas ATCC y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico al 96% de *Taraxacum officinale* (diente de león) y del aceite esencial de *Minthostachys spicata* (q’eshua muña).” recolectaron muestras de *Taraxacum officinale* en el distrito de Yucay, provincia de Urubamba, dichas muestras fueron secadas a temperatura ambiente, y posteriormente fueron maceradas con etanol al 96%. Para la obtención del extracto etanólico seco se usó un rotavapor, luego se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto, donde se encontraron fenoles, taninos, alcaloides, lactonas, azúcares reductores, glicósidos y esteroides. Para la evaluación del efecto bactericida por disco difusión se prepararon concentraciones con etanol absoluto a 400, 367, 333, 300, 267, 233, 200, 133, 67, 33, 16.67, 8.33 mg/mL y se aplicó sobre las cepas ATCC 25922 *Escherichia coli* y ATCC 90028 *Candida albicans*. Se concluyó que el extracto etanólico al 96% de *T. officinale* no genera actividad bactericida sobre las cepas antes mencionadas.

Holgado, M., Aranzabal, R., Acurio, J., Atausinche, H., Cuba, A., Vargas, J., Nauray, W., Mamani, M., Lazarte, R., Garcia, K., Farfán, W., Kancha, C. (2015). “Determinación y análisis químico de *Taraxacum* “Diente de león” en Urubamba, Calca, Anta-Cusco” Se buscó determinar la especie de “Diente de León” en las zonas de Queuña, Huaran, Calca y Yucay pertenecientes a la región de Cusco, para lo cual las muestras fueron derivadas a un especialista en España, donde determinó que la especie es *Taraxacum fernandezianum* Dahlst. A.J. Richards (1976). Para el estudio fitoquímico, se evaluó cualitativamente, donde se encontraron flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas, azúcares reductores y glicósidos.

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 *Taraxacum officinale* F. H. WIGG

1.2.1.1 Descripción Botánica

Es una planta herbácea, siempre verde, hermafrodita que puede medir 50 cm de altura, exuda un látex lechoso amargo, posee un tallo corto, subterráneo, de raíz subterránea vertical cónico pivotante multi ramificada de sabor agridulce, grande, profunda y pulpa lechosa, posee una roseta basal de hojas largas de (5 a 40 cm) de largo por (1 a 5 cm) de ancho con sabor amargo, espatulada, dentada, muy segmentada, a modo de dientes de león, de color verde brillante. Posee inflorescencia en cabezuela, con 100 a 300 florecillas, pedúnculo hueco y más largo que las hojas, las flores son liguladas de color amarillo, rodeada por una serie de brácteas recurvadas de color verde, escapos huecos terminados en un capítulo, fruto en aquenio provisto de vilano (FIGURA 1). (ESSALUD, 2002).



FIGURA 1. Estructura vegetal de *Taraxacum officinale*.
 Fuente: Koehler, H. A., 1887

1.2.1.2 Hábitat y Distribución

Planta euro-asiática, que fue introducida en América, actualmente es cosmopolita, crece en climas húmedos y templados, en terrenos secos, praderas, terrenos de cultivo y frecuentemente a la orilla de los caminos o en terrenos nitrogenados, a una altitud de 1300 a 3500 metros, siendo resistentes a enfermedades y plagas, los agricultores se centran en su erradicación más que en su cultivo dado los bajos requerimientos nutricionales y su corto tiempo de crecimiento de este organismo. (ESSALUD, 2002)

1.2.1.3 Taxonomía

Reino: Plantae

Filum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Taraxacum*

Especie: *Taraxacum officinale* F. H. Wigg

Nombres comunes: Amargón, taraxacón, jamikara, pilli pilli, chicoria amarga, botón de oro, diente de león, lechuguilla, pelosilla, cardeña, miskipilli, corona de monge, almirón y hayaq pilli. (NCBI, 2018)

1.2.1.4 Composición fitoquímica del tallo de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg

Alcaloide taraxacina, colina, triterpenos derivados del taraxastano, fitosteroles (estigmasterol, β -sitosterol), fructosa (20%), isolactucérol, acetatos y sus 16-hidroxiderivados (carnidiol, faradiol y β -amirina), ácidos fenil-carboxílicos (caféico y p-hidroxifenilacético), flavonoides (apigenol y luteolol-7-glucósidos), leucoantocianidinas, esteroides, taninos, inulina (hasta un 40%), principios amargos (lactonas sesquiterpénicas, heterósidos de germacranólidos ácidos), sales minerales (de magnesio y potasio), pectina, colina, gomas, resinas, carotenoides, vitaminas A, B y C y aceite esencial (rico en derivados triterpénicos pentacíclicos), mucílagos (1%), ácido cerótico, milísico, oleico, linoleico, linolénico, nicotínico y palmítico (ESSALUD, 2002)

1.2.1.5 Usos medicinales

T. officinale es una planta que sin importar la dosis o concentración administrada no genera toxicidad según se menciona en la guía de farmacobotánica de **ESSALUD, 2002**. Dicha planta posee propiedades diuréticas, detoxificantes coleréticas, antimicrobianas, antirreumáticas, antiinflamatorias, además de poseer efectos antihipertensivos, antiverrugas, antitumoral, hipoglucemiante, anticancerígenos (mama, útero, colon) y antipirético.

1.2.2 COMPONENTES FITOQUÍMICOS (METABOLITOS SECUNDARIOS)

Son compuestos orgánicos de origen bacteriano, micótico o vegetal que no está directamente relacionado con el crecimiento desarrollo o reproducción del organismo. Su reducción en el individuo no es causa de muerte inmediata, pero si puede causar deterioro o déficit en su habilidad de supervivencia. En este grupo de compuestos se encuentran:

1.2.2.1 Alcaloides

Compuestos nitrogenados mayormente heterocíclicos con actividad biológica intensa, algunos son tóxicos en pequeñas concentraciones y están presentes en organismos vegetales. Estos compuestos tienen origen en el metabolismo de los aminoácidos, y en caso provengan del mismo, poseerán una estructura química similar. Poseen funciones de defensa en plantas contra herbívoros y patógenos (bacterias y hongos), en animales son usados como estimulantes y narcóticos, además de ser usados activamente en la síntesis de fármacos (FIGURA 2). (**Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022**)

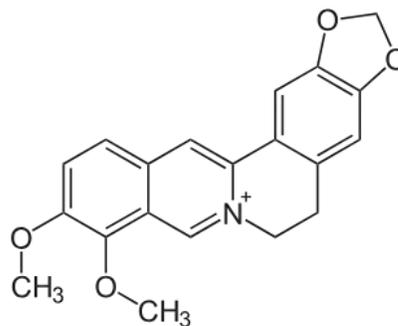


FIGURA 2. Estructura de la berberina, alcaloide representativo.

Fuente: Plantas y Hongos, 1952

1.2.2.2 Quinonas

Se encuentran en todos los organismos vivos, excepto en protistas y animales superiores. Participan de la fotosíntesis y respiración celular de vegetales, son usados como colorantes y cosméticos naturales en la industria, con colores que van desde el amarillo a pigmentos negros. En la medicina son usados como antimicrobianos, antioxidantes, antitumorales, anticancerígenos, en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y como antiinflamatorio (FIGURA 3). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

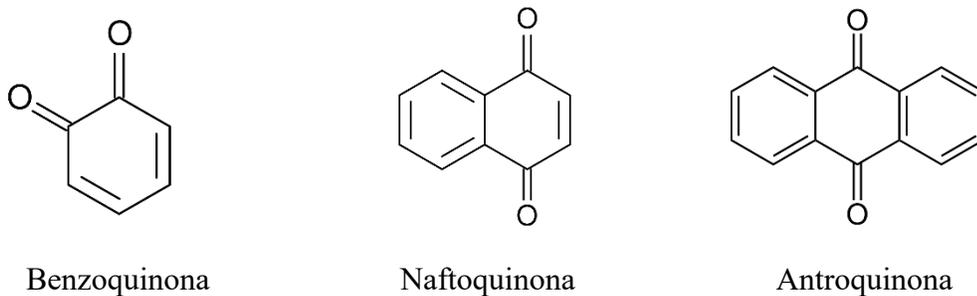


FIGURA 3. Estructuras de los 3 grupos fundamentales de Quinonas.

Fuente: Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022

1.2.2.3 Esteroides

Son sintetizados a partir del ciclo pentano perhidrofenantreno, encontrándose en plantas y animales. Son componentes de vitaminas y hormonas con funciones, reguladoras, estructurales y hormonales actuando a nivel hepático, muscular, capilar, entre otros (FIGURA 4). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

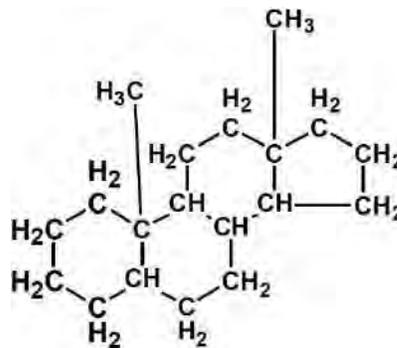


FIGURA 4. Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno del cual derivan los esteroides.

Fuente: Martínez Guerra, J. J., 2006

1.2.2.4 Triterpenos

Están compuestos por 30 átomos de carbono, con origen en 6 moléculas de isopreno, caracterizados por presentar una estructura simple, además de datar de hace 2.5 mil millones de años y presentar la familia más numerosa de compuestos. Poseen funciones como el crecimiento, desarrollo, antimicrobiano y resistencia al medio externo. Representa la fuente de olores fuertes en las plantas leñosas (FIGURA 5). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

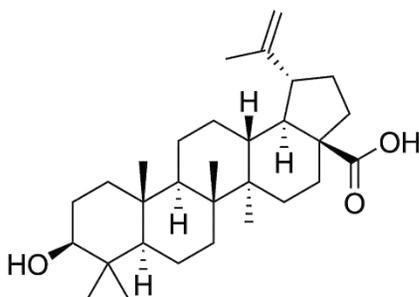


FIGURA 5. Estructura general de los triterpenos.

Fuente: Cano Flores, A., 2013

1.2.2.5 Fenoles

Son metabolitos secundarios importantes durante el crecimiento y reproducción de las plantas, actúan como protección frente a patógenos; además de tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenos (FIGURA 6). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

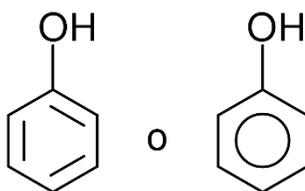


FIGURA 6. Estructura general de los fenoles.

Fuente: Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022

1.2.2.6 Flavonoides

Son pigmentos naturales obtenidos a partir de la fenilalanina, es el responsable del color de las hojas otoñales, frutos y flores. Posee funciones, antiespasmódicas, diuréticos, antiinflamatorios, antiulcerosos, anti hepatotóxicos, anticancerígeno, antialérgicos, antitrombóticos, antiviral, antibiótico, antifúngico, disminuye la cardiopatía isquémica,

ateroesclerosis y diabetes. En el sistema vascular de las plantas aumenta la resistencia y disminuye la permeabilidad, protege de los rayos UV, defensa ante el herbivorismo, favorecen la colonización de rizobacterias y micorrizas, y regula la actividad hormonal (FIGURA 7). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

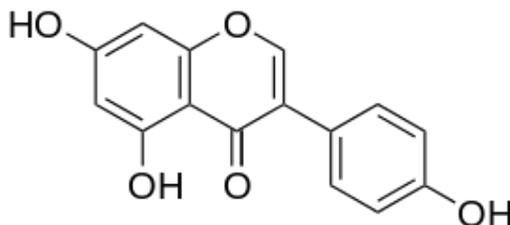


FIGURA 7. Estructura general de los flavonoides.

Fuente: Cano Flores, A., 2013

1.2.2.7 Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios que tienen por función la defensa de la planta, como también son usados para combatir las varices y hemorroides como también tiene uso antibiótico, antifúngico, antiparasitario y antiviral. Usado hace tiempo atrás para la obtención de cuero por reacción con las proteínas presentes en las pieles de animales. Entre los alimentos con alto contenido de taninos tenemos el café, chocolate o té y no es recomendable su consumo en personas con anemia por deficiencia de hierro porque interfiere en la absorción de metales, así como también puede producir estreñimiento (FIGURA 8). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

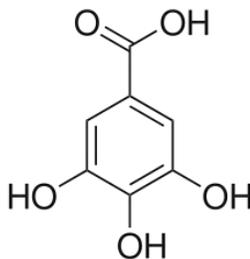


FIGURA 8. Estructura del ácido gálico, representante de los taninos.

Fuente: Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022

1.2.2.8 Polisacáridos

Son cadenas de monosacáridos que pueden cumplir funciones de reserva energética como en el caso del almidón, estructurales como la celulosa y protectoras como en el caso de la quitina. Su detección diferencial puede realizarse por la prueba de iodo-lugol (FIGURA 9). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

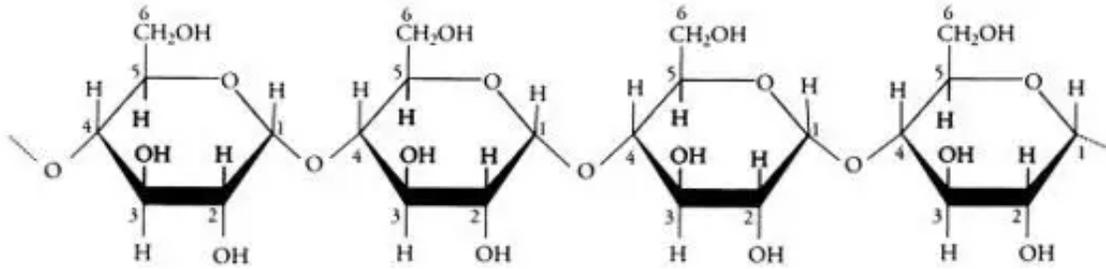


FIGURA 9. Estructura de un disacárido reductor.

Fuente: Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022

1.2.2.9 Lactonas

Son metabolitos secundarios que juegan un rol importante en la interacción de los insectos con las plantas actuando como disuasivos, atractores y antialimentarios; como también presentan actividad antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, mollusquicida, antiulcerogénica, hepatoprotectora, antihelmíntica, antidepresiva y antiprotozoaria (FIGURA 10). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

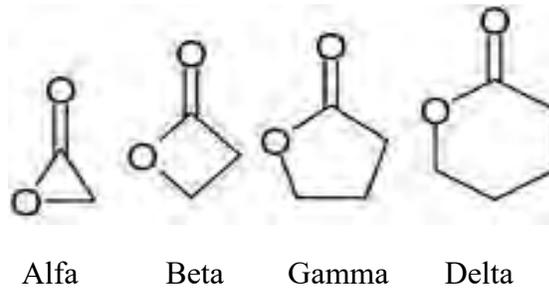


FIGURA 10. Estructuras de las lactonas.

Fuente: Cano Flores, A., 2013

1.2.2.10 Cumarinas

Se sintetizan mediante la vía fenilpropanoide, con características cristalizables de color blanco amarillento, hasta la fecha se logró aislar 800 tipos de cumarinas, que presenta un anillo bencénico unido a una piran-2-ona por lo cual al grupo también se le puede conocer como benzopironas. Presentan funciones anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios, antiarrítmicos, antibacterianos, antivirales, analgésicos, antihipertensivos, usados activamente en el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis, asma y VIH. En plantas absorbe la radiación UV por lo cual logra proteger a las plantas de agentes mutágenos (FIGURA 11). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

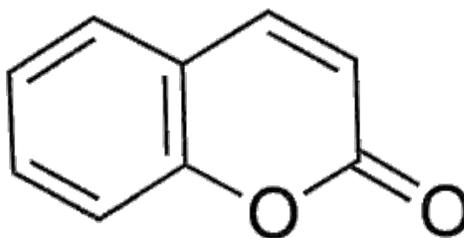


FIGURA 11. Estructura general de las cumarinas.

Fuente: Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022

1.2.2.11 Aminoácidos libres

Son estructuras no ligadas a cadenas peptídicas, con funciones bioestimulantes que aumentan la resistencia de la planta ante el entorno y cambios en el clima. Estos aminoácidos libres pueden encontrarse en todos los organismos vegetales, cumpliendo funciones de nutrición y crecimiento, además de poder contribuir en el balance electro químico de la célula. (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

1.2.2.12 Azúcares reductores

Son un tipo de glúcido con un grupo hidroxilo, capaz de reaccionar como agente reductor con otras moléculas oxidantes. Podemos encontrar en este grupo monosacáridos reductores tal es el caso como la glucosa, o podemos encontrar disacáridos reductores como la maltosa, lactosa, celobiosa, a excepción de la sacarosa (FIGURA 12). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

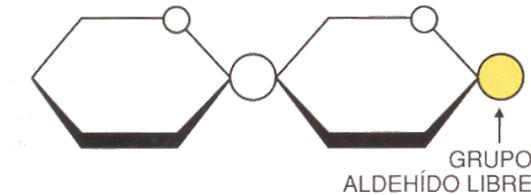


FIGURA 12. Estructura de un disacárido reductor.

Fuente: Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022

1.2.2.13 Saponinas

Son un grupo de glucósidos que se usan en fitoterapia, en la industria de cosméticos y en la medicina popular, tienen una particularidad cuando entran en contacto con la sangre ya que al entrar en contacto con el colesterol logran hemolizar la muestra por ello es tóxico una administración por vía sanguínea, si es consumido por vía oral en altas concentraciones producen irritación de la mucosa provocando diarrea, vómitos y dolor abdominal; a nivel renal produce efecto diurético, a nivel pulmonar produce un efecto expectorante (FIGURA 13). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

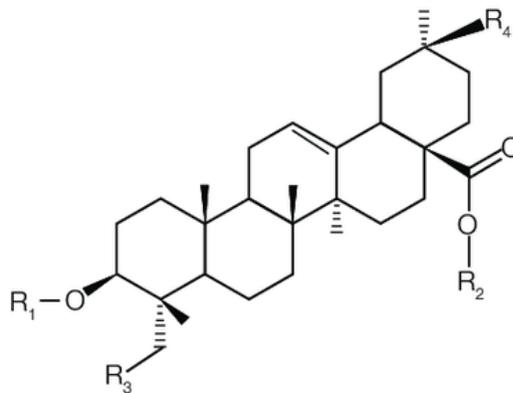


FIGURA 13. Estructura general de las saponinas.

Fuente: Martínez Guerra, J. J., 2006

1.2.2.14 Resinas

Son sustancias solidas o de consistencia pastosa, con poca solubilidad en el agua, mayormente solubles en alcohol y fácilmente solidifican al contacto con el aire. Poseen función como perfumes, adhesivos, barnices y aditivos alimenticios (FIGURA 14). (Sánchez y García Figueroa, F. L., 2022)

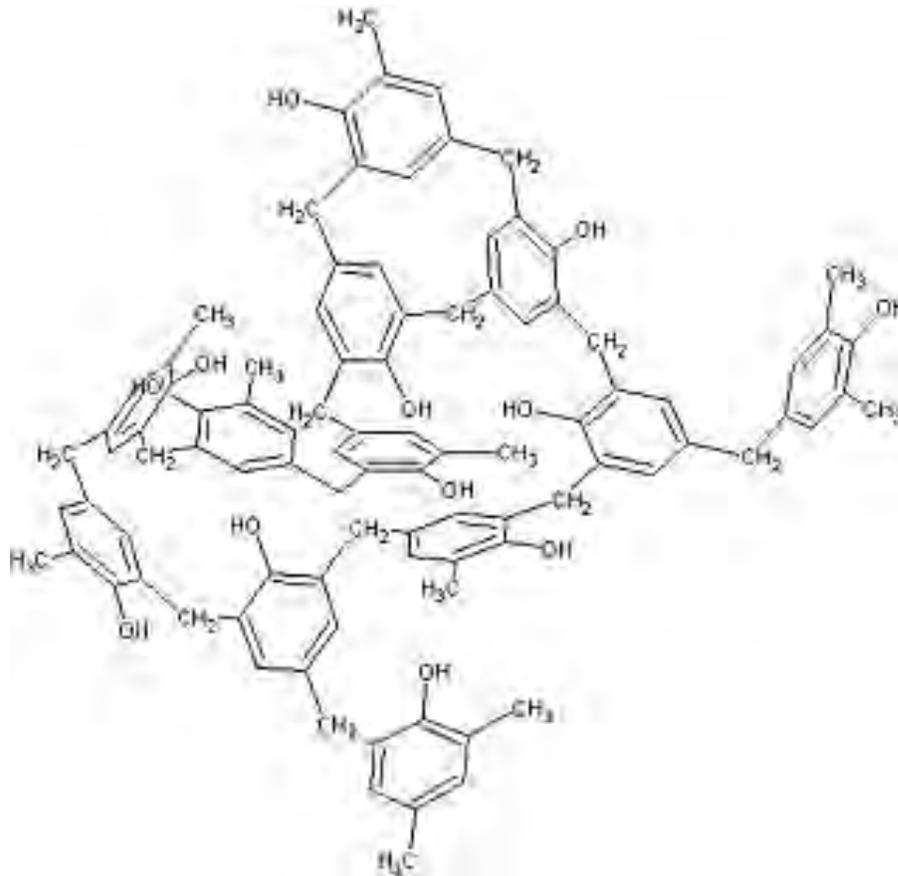


FIGURA 14. Estructura de la Baquelita, una resina representativa.

Fuente: Cano Flores, A., 2013

1.2.3 METODOS DE EXTRACCIÓN

Existen cuatro principales grupos de métodos de extracción de metabolitos secundarios: Extracción mecánica, Destilación, Extracción con disolventes y Métodos variados (Extracción asistida por ultrasonidos, Extracción asistida por microondas, Extracción con fluidos supercríticos) (FIGURA 15). (Piñero, J., Sifaoui, I., López, A., 2015)

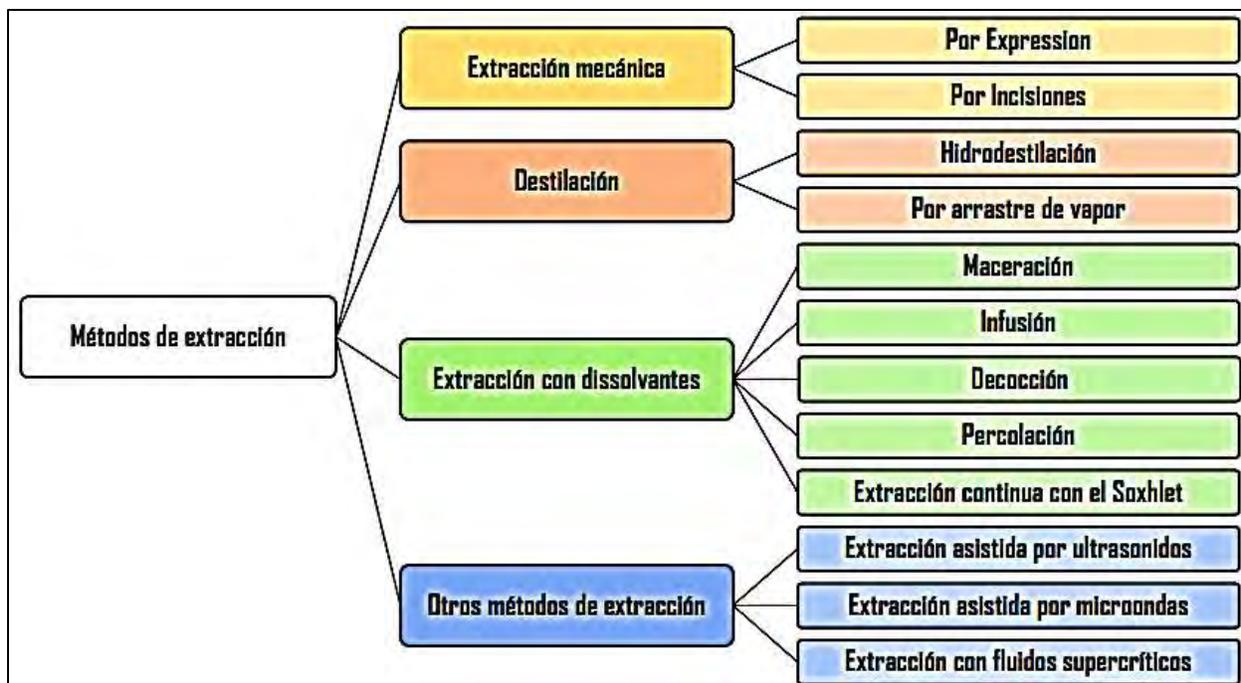


FIGURA 15. Tipos de métodos de extracción.

Fuente: Piñero, J., Sifaoui, I., López, A., 2015

1.2.3.1 Extracción por maceración

Pertenece a los métodos de extracción con disolventes y consiste en sumergir los materiales vegetales en un contenedor cerrado con un disolvente, dejándolos reposar a temperatura ambiente durante un periodo previamente definido y opcionalmente con agitación frecuente. (Piñero, J., Sifaoui, I., López, A., 2015)

1.2.3.2 Extracción por arrastre de vapor

Pertenece a los métodos de extracción por destilación y se aplica para obtener aceites esenciales. Este método se caracteriza porque no pone en contacto directo la muestra vegetal con el agua. Este método consiste en pasar el vapor de la caldera a través de la muestra vegetal, el vapor hace que las células vegetales liberen los aceites esenciales y sean vaporizados, posteriormente estos vapores son concentrados en un condensador donde se separa la fase acuosa de la parte líquida. (Piñero, J., Sifaoui, I., López, A., 2015)

1.2.3.3 Extracción por Incisiones

Pertenece a los métodos de extracción mecánica y se aplica para extraer de la planta exudados como resinas, mieles, entre otros. Este método se aplica realizando un raspado de la parte en la que se encuentre la sustancia vegetal. (Piñero, J., Sifaoui, I., López, A., 2015)

1.2.4 ROTAVAPOR

El rotavapor permite separar el disolvente de una muestra sin dañarla por procesos de presión reducida. Este sistema se encuentra conectado a una bomba de vacío el cual genera una presión negativa haciendo que el punto de ebullición del disolvente sea mucho menor. El matraz de base cilíndrica en cada giro distribuye de manera uniforme la temperatura emitida por el baño maría (FIGURA 16).

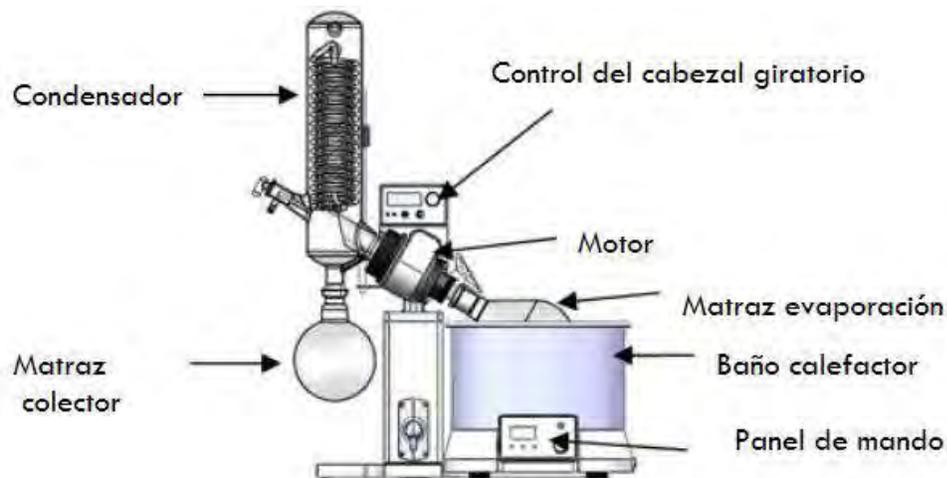


FIGURA 16. Partes del rotavapor.

Fuente: Labbox, 2022

1.2.5 EFECTO BACTERICIDA

Es la capacidad de una sustancia para inhibir de manera irreversible el crecimiento de una bacteria. Se diferencia del efecto bacteriostático porque este es reversible o transitorio a nivel de sus múltiples mecanismos enzimáticos. (Ayala Aguilar, J. L., 2019)

1.2.5.1 Efecto bactericida de los extractos etanólicos

Algunos compuestos fitoquímicos poseen propiedades bactericidas como:

- Los alcaloides isoquinolólicos interfieren con el ADN bacteriano inhibiendo la función de las proteínas y la síntesis de enzimas de transcripción. **(Sepúlveda Jiménez, G., 2003)**
- Los fenoles destruyen la pared, la membrana celular e inactivan los sistemas enzimáticos con mejor acción sobre los Gram positivos. **(Xu, P., 2021)**
- Algunas naftoquinonas como la 5- amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona tienen efecto bactericida sobre Gram positivos y Gram negativos por la presencia de un grupo carbonilo y un sustituyente que puede ser hidroxilo o amino, los cuales le permitirán realizar múltiples puentes de hidrogeno intra moleculares alterando la estructura del ADN y bloqueando canales de membrana. Otros tipos de naftoquinonas como el 3-mercapto-1,4-naftoquinona que presenta efecto bactericida en *E. coli* y *S. aureus* cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular. **(Leyva, E., 2016)**
- Esteroides como el ácido fusídico interfieren con el factor de elongación G a nivel del ribosoma, inhibiendo de esta manera la síntesis proteica. **(Calvo, J., 2009)**
- Los taninos presentan acción bactericida porque inhiben la absorción de nutrientes en las bacterias. **(Xu, P., 2021)**
- El grupo hidroxilo de los flavonoides interactúan con las proteínas de membrana, lo cual aumenta la rigidez y pérdida de la morfo-función. En organismos como *E. coli* inhibe la capacidad de generar biopelículas. **(Bernal Mercado, A. T., 2019)**
- Saponinas poseen una capacidad fisicoquímica que disminuye la permeabilidad de membrana y la desintegra. **(Valdivia, C., 2020)**

1.2.6 PRUEBA DE KIRBY BAUER

Es un método conocido también como “disco difusión” que nos permite hallar la sensibilidad de un agente bacteriano o micótico frente a un medicamento o sustancia. El método consiste en inocular sobre toda la superficie del agar en placa una determinada cantidad de bacterias ajustada a 0.5 según la escala de McFarland, para luego colocar sobre ella discos de papel filtro con antibiótico o una sustancia en evaluación para luego medir su capacidad inhibitoria. Es muy aplicado en organismos de crecimiento rápido, para poder observar el tiempo y grado de inhibición. La prueba se basa en resultados cualitativos. **(Reaño Ortega, C. K., 2014)**

1.2.7 ATCC 35218 *Escherichia coli* (Mingula) Castellani and Chalmers

1.2.7.1 Descripción

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, periflagelar, móvil, que mide de 1 a 3 μm y forma parte de la microbiota intestinal habitual del hombre, pudiéndose encontrar en el medio ambiente, alimentos y aguas contaminadas. En el campo de la investigación, *E. coli* es un organismo modelo utilizado frecuentemente en el laboratorio, por su velocidad de crecimiento y pocos requerimientos nutricionales. Además, la estructura del genoma de *Escherichia coli* es altamente flexible y es usada para experimentos de genética y biología molecular **(Croxen, M. A., et al., 2013)**. Esta cepa se utiliza en ensayos de antibióticos, con evaluación en agar Mueller-Hinton y como una cepa para el control de calidad de pruebas de susceptibilidad **(American Type Culture Collection, 2020)**. En la (FIGURA 17) contamos con una imagen de *E. coli*.



FIGURA 17. Imagen de *Escherichia coli* bajo microscopía óptica a 1000x, diferenciada mediante la tinción de Gram.

Fuente: Elaboración propia

1.2.7.2 Taxonomía

Reino: Monera

Filum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

ATCC: 35218

Según la clasificación del NCBI, 2018

1.2.7.3 Identificación bioquímica

E. coli es una bacteria oxidasa negativa, catalasa positiva, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento preferentemente es 37 °C mesotermo, fimbriado y comúnmente es móvil por flagelos peritricos. (Blount, Z. D., 2015). Esta bacteria puede ser identificada bioquímicamente por las siguientes características especificadas en la TABLA 1.

TABLA 1. Identificación bioquímica de *Escherichia coli*

PRUEBA BIOQUIMICA	REACTIVIDAD
ONPG (Lactosa)	Positivo
Reducción de nitrato	Positivo
Catalasa	Positivo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Ornitina descarboxilasa	Positivo
Indol	Positivo
Citrato	Negativo
Movilidad	Positivo
Urea	Negativo

Fuente: ABIS online, 2010.

1.2.7.4 Patogenia

Escherichia coli es el agente etiológico en el 80% de los casos de infecciones de tracto urinario (ITU), también puede producir enfermedades respiratorias e infecciones en el torrente sanguíneo. (CDC, 2022)

1.2.8 ATCC 25923 *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach*

1.2.8.1 Descripción

Son cocos Gram positivos que llegan a medir de 0.5 a 1.5 micras, los cuales se encuentran agrupados a manera de racimo de uva. Son bacterias no móviles, no son esporuladas y carecen de capsula, son anaerobias facultativas, siendo catalasas positivas. (Cervantes Garcia, E., Garcia Gónzales, R., & Salazar Schettino, P. M., 2014). Esta cepa es un aislado clínico, secuenciado y utilizado en la prueba de detección de *Streptococcus agalactiae* del grupo β -hemolítico, análisis de concentrado de humo de leña, evaluaciones en agar, evaluación de inocuidad de productos

lácteos, y antibiograma por disco difusión (American Type Culture Collection, 2013). En la (FIGURA 18) contamos con una imagen diseñada de forma tridimensional de *S. aureus*.

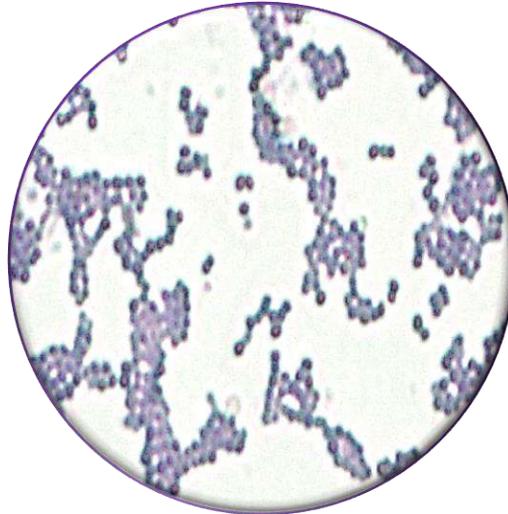


FIGURA 18. Imagen de *Staphylococcus aureus* bajo microscopía óptica a 1000x, diferenciada mediante la tinción de Gram.

Fuente: Elaboración propia

1.2.8.2 Taxonomía

Reino: Monera

Filum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus aureus*

ATCC: 25923

Según la clasificación del NCBI, 2020

1.2.8.3 Identificación bioquímica

Las características bioquímicas de *S. aureus* se detallan en la TABLA 2.

TABLA 2. Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*

PRUEBA BIOQUIMICA	REACTIVIDAD
ONPG (Lactosa)	Positivo
Reducción de nitrato	Positivo
Catalasa	Positivo
Arginina dihidrolasa	Positivo
Producción de acetoina	Positivo
Fibrinolisisina (25 a 74 %)	Positivo
Producción de ácido D-Lactico	Positivo
Manitol	Positivo
Manosa, Trealosa, Ribosa, Turanosa, Fucosa	Positivo

Fuente: ABIS online, 2020.

1.2.8.4 Patogenia

Staphylococcus aureus es el agente causal de infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, lesiones cutáneas, infecciones nosocomiales como también infecciones por intoxicación alimentaria causado por la liberación de enterotoxinas. **(ABIS online, 2020)**

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La preparación y obtención de los extractos y la fase experimental con los microorganismos se realizó en los laboratorios de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas y el laboratorio LQ 204 de bioquímica en la Facultad de Ciencias, ambas facultades pertenecientes y ubicadas dentro de la ciudad universitaria de Perayoc de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- *Taraxacum officinale* F. H. Wigg “Diente de León”
- *Escherichia coli* (Mingula) Castellani and Chalmers – ATCC 35218
- *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Rosenbach - ATCC 25923

2.2.2 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mueller Hinton (Liofilchem)
- Agar Base Sangre (Liofilchem)
- Caldo BHI (Liofilchem)

2.2.3 REACTIVOS

- Acetato de cobre
- Ácido clorhídrico al 1%
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Anhídrido acético
- Benceno
- Cloroformo
- Cloruro de sodio

- Dimetilsulfóxido (DMSO) al 99%
- Etanol Absoluto
- Etanol de 96°
- Hidróxido amónico
- Hidróxido de potasio al 5%
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de sodio al 5%
- Lugol
- Magnesio en polvo
- Ninhidrina al 2%
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Sulfato cúprico
- Tartrato de sodio y potasio
- Tricloruro férrico al 10%

2.2.4 MATERIAL DE LABORATORIO

2.2.4.1 Equipos

- Incubadora (H. W. Kessel S. A. modelo EK-610)
- Rotavapor (PACK-CARD 6890 N)
- Baño María (Hubner)
- Autoclave (Phoenix modelo AV-75 PLUS 121X 15)
- Balanza analítica (H. W. Kessel S. A. modelo EK-200)
- Calentador eléctrico (SKR)
- Micropipetas y puntas de 5 – 50 µL (DRAGON-LAB)

- Micropipetas y puntas de 10 – 100 μ L (DRAGON-LAB)

2.2.4.2 Material de vidrio

- Frasco de vidrio con tapa de goma
- Tubos de ensayo con capacidad de 5 mL
- Lunas de reloj
- Matraz de 250 mL
- Matraz de 500 mL
- Probeta de 100 mL
- Pipeta de 50 mL
- Bagueta

2.2.4.3 Otros materiales

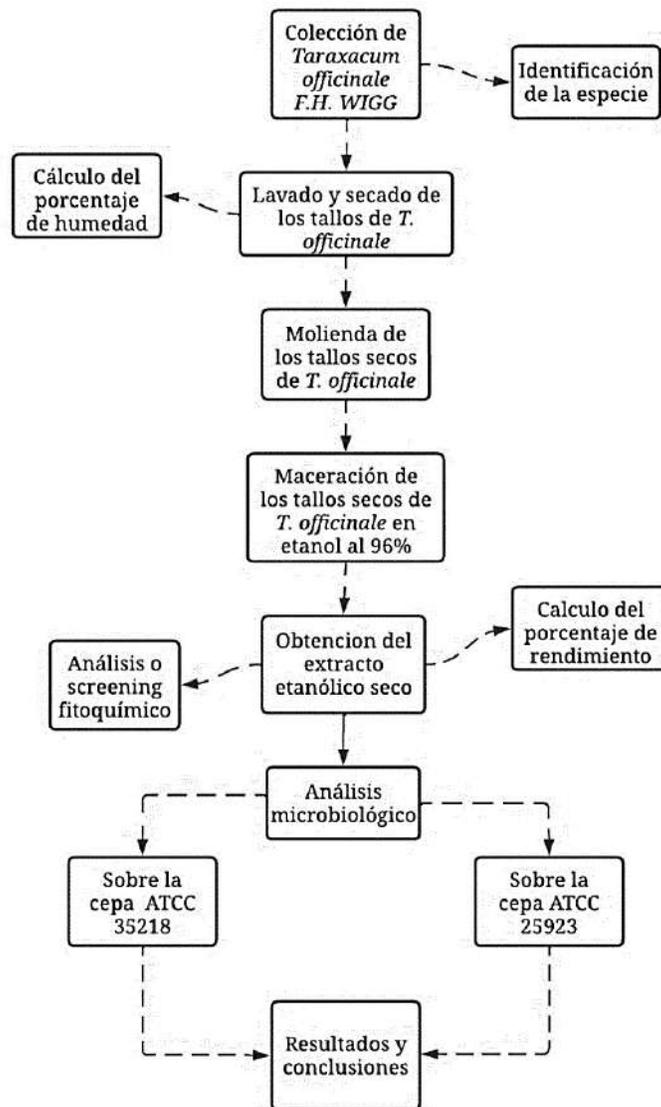
- Bolsas de papel de 30 x 40
- Papel aluminio
- Paleta metálica
- Gasa
- Algodón
- Papel Kraft
- Pabilo
- Papel filtro
- Discos de sensibilidad de fosfomicina de 200 μ g
- Hisopos estériles
- Placas de Petri de 100 x 15 mm
- Agua destilada

2.3 METODOS

2.3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de tipo experimental, de nivel exploratorio y diseño cuasiexperimental debido a que se manipulará deliberadamente una o más variables independientes y no se asignará al azar la dosis del extracto etanólico al 96% del *T. officinale* F. H. Wigg “Diente de León”. Los detalles de cómo se procedió durante la investigación lo resumimos en el (FLUJOGRAMA 1).

FLUJOGRAMA 1. Protocolo del trabajo de investigación



Fuente: Elaboración propia

2.3.2 LUGAR DE COLECCIÓN

Las muestras vegetales, correspondiente a los tallos de *T. officinale* F. H. Wigg, fueron recolectadas del 1 al 12 de marzo de 2023 en horas de la mañana, durante la época de lluvias, en la zona de Corao del distrito de San Sebastián, provincia Cusco, región Cusco. Con las coordenadas de -13.504780" y latitud sur. -71.910740" longitud oeste (FIGURA 19).



FIGURA 19. Zona de Corao.

Fuente: Elaboración propia

2.3.3 METODO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES

Las muestras vegetales se recolectaron de manera manual, sin la ayuda de tijeras, seleccionando solo los tallos de los individuos en estado de floración, con una longitud de tallo mayor a 15 cm de largo y depositados en bolsas de papel. (Olivera Delgado, L. I. & Gutierrez Felix, E. G., 2021).

2.3.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA MUESTRA VEGETAL

Para la identificación taxonómica las muestras fueron clasificadas por mejor ejemplar y posteriormente extraídas desde la base, conservando cada parte en buen estado para una correcta identificación. Luego fueron puestas en papel kraft y presionadas para su secado por 7 días. Una

vez culminado el proceso de secado, fueron llevadas al especialista en el Herbario Vargas CUZ para su identificación.

2.3.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

Se usaron tallos de *T. officinale* F. H. Wigg, excluyendo completamente flor y hojas. Además, se excluyeron los tallos que se encontraban parasitados, dañados y atacados por insectos. Los tallos en buen estado fueron debidamente lavados con agua destilada, para eliminar impurezas como polvo y residuos extraños sin dañar la estructura del tallo (Olivera Delgado, L. I. & Gutierrez Felix, E. G., 2021).

2.3.6 SECADO DE LAS MUESTRAS

Los tallos fueron secados a temperatura ambiente por 24 horas y luego secados en estufa a 37°C por 5 días para no dañar los metabolitos secundarios. (Azuero, A., et al., 2016).

2.3.7 CALCULO DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Se calculó el porcentaje de humedad por un método gravimétrico donde se consideró el peso de los tallos luego ser recolectados (Peso fresco) y el peso de los tallos luego de ser sometidos al proceso de secado en estufa (Peso Seco) para aplicar la siguiente formula: (Olivera Delgado, L. I. & Gutierrez Felix, E. G., 2021)

$$\%Hmd = \frac{P_f - P_s}{P_f}$$

Donde:

%Hmd = Porcentaje de humedad

Pf = Peso fresco

Ps = Peso seco

2.3.8 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

2.3.8.1 Molienda y almacenamiento

El material seco fue triturado con el objetivo de tener un mayor campo de extracción de metabolitos secundarios. El material generado fue almacenado en un frasco rotulado hasta su posterior uso. **(Rodríguez Pava, C. N., et al., 2017)**

2.3.8.2 Maceración

Se usaron 250 g de material seco molido de tallos de *T. officinale* F. H. Wigg para ser macerados en 500 mL de etanol al 96% en un frasco de vidrio transparente con tapa de goma y capacidad de un litro, el cual fue forrado posteriormente con aluminio para evitar el ingreso de radiación, crecimiento de microorganismos, generar desbalances de temperatura y alteración en la composición de compuestos fotosensibles. Fueron macerados durante 8 días en un ambiente oscuro. Una vez culminado el periodo, la solución fue filtrada para posteriormente ser incorporada en un rotavapor a 40°C y 175 mbar con el fin de evaporar todo el etanol **(Rodríguez Pava, C. N., et al., 2017)**.

2.3.9 CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Se calculó el porcentaje de rendimiento por un método gravimétrico donde se consideró el peso de los tallos de *T. officinale* luego de ser sometidos al proceso de secado en estufa (Peso Seco) y el peso del extracto etanólico luego de finalizar su separación del diluyente en el rotavapor para luego aplicar la siguiente formula: **(Olivera Delgado, L. I. & Gutierrez Felix, E. G., 2021)**

$$\%P_r = \frac{P_f}{P_i}$$

Donde:

%Pr = Porcentaje de rendimiento

Pf = Peso final del extracto etanólico obtenido en el rotavapor

Pi = Peso seco

2.3.10 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

2.3.10.1 Alcaloides

- ❖ Reacción de Dragendorff: Se preparó 1 mL de solución al 1% de ácido clorhídrico en agua y se homogeneizó con 500 mg de extracto etanólico. Luego de la obtención de la solución ácida se agregó 3 gotas de reactivo de Dragendorff. (Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021). La reacción se basa en la combinación de los alcaloides con metales pesados, para lo cual se necesita como medio de reacción una solución acuosa ácida. Para la precipitación de los alcaloides se necesita ácidos de elevado peso molecular como el reactivo de Dragendorff (yodobismutato potásico) (FIGURA 20). (Valdivia, C., 2020)

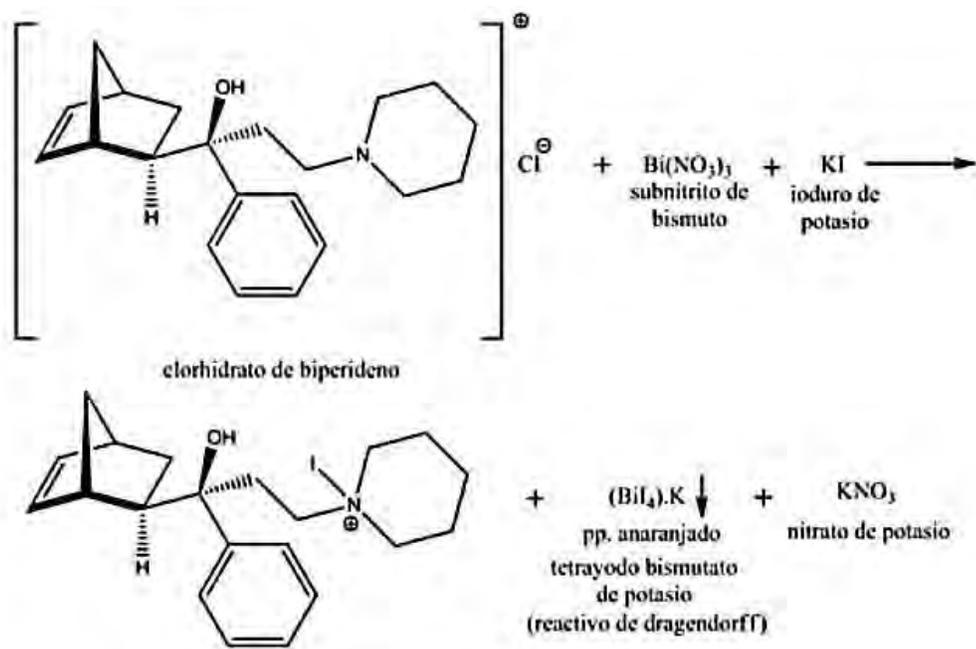


FIGURA 20. Reacción de Dragendorff.

Fuente: Valdivia, C., 2020

- ❖ Reacción de Mayer: Se preparó 1 mL de solución al 1% de ácido clorhídrico en agua y se homogeneizó con 500 mg de extracto etanólico. Luego de la obtención de la solución ácida se agregó 250 mg de NaCl, se agitó y se filtró. A lo obtenido se agregó 3 gotas de la solución de Mayer. (Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez

Felix, E. G., 2021). El átomo de nitrógeno del alcaloide que posee un par solitario de electrones y facilita la formación de un enlace covalente coordinado con el ion metálico potasio del reactivo de Mayer (tetrayodomercurato de potasio) y como consecuencia de dicho enlace se crea un complejo de color crema que aparece en forma de precipitados (FIGURA 21). **(Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)**

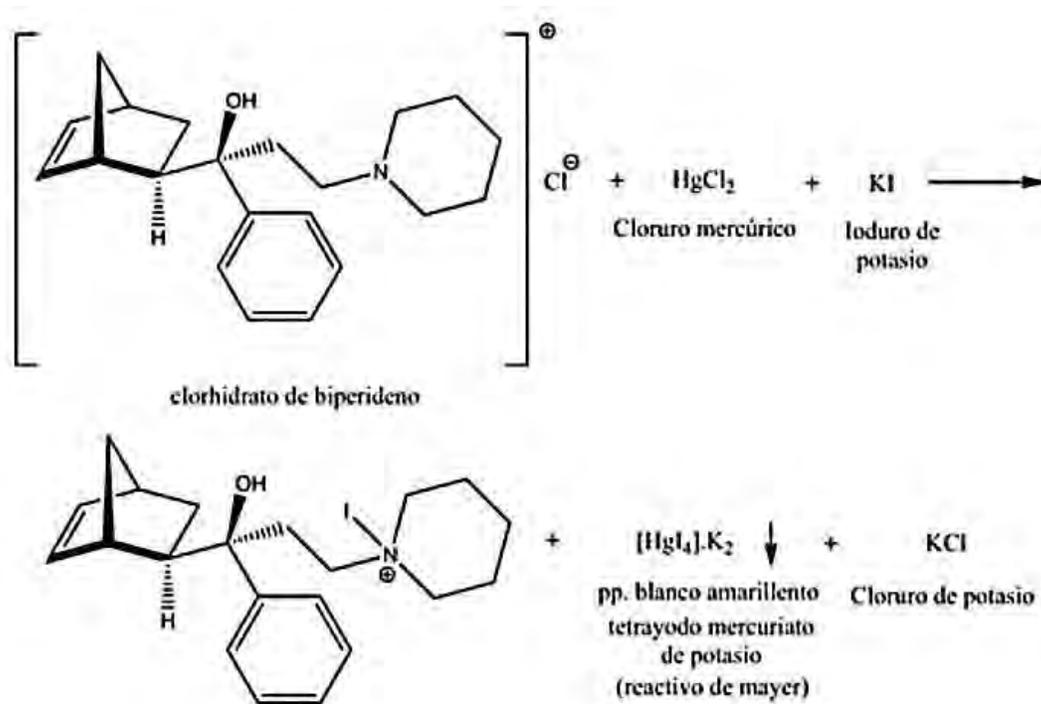


FIGURA 21. Reacción de Mayer.

Fuente: Huamaní Cárdenas, C. A., 2010

- ❖ Reacción de Wagner: Se preparó 1 mL de solución al 1% de ácido clorhídrico en agua y se homogeneizó con 500 mg de extracto etanólico. Luego de la obtención de la solución ácida se agregó 3 gotas de reactivo de Wagner (Yodato potásico). **(Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021).** En esta reacción el yodo del reactivo en presencia del alcaloide forma un triyoduro el cual se verá atraído por el anillo protonado del alcaloide haciendo que este precipite por el peso molecular adquirido (FIGURA 22). **(Carranza Vega, D. E. & Huayanay Viera, J. A., 2009)**

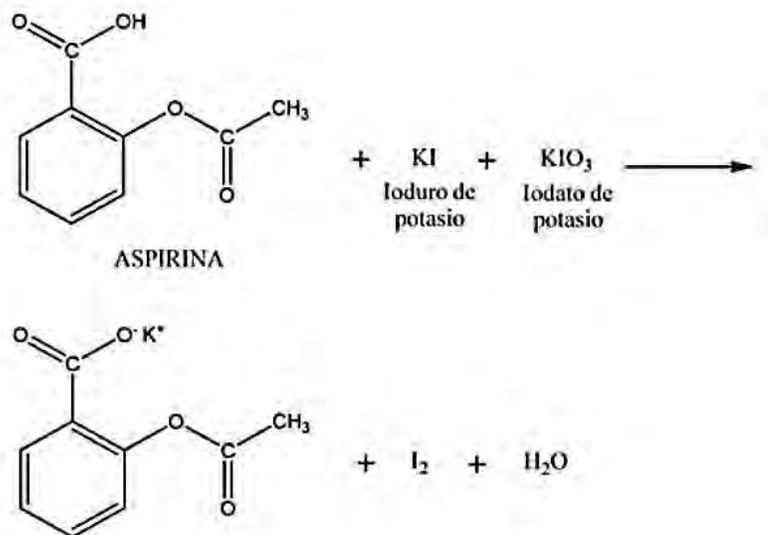


FIGURA 22. Reacción de Wagner.

Fuente: Carranza Vega, D. E. & Huayanay Viera, J. A., 2009

2.3.10.2 Quinonas

Se realizó mediante la Reacción de Quinonas, para lo cual se introdujo 5 mg de extracto seco en 0.1 mL de etanol absoluto y 0.2 mL de la solución de hidróxido de sodio al 5%. (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010). A diferencia de la reacción de Borntrager Kraus, este método permite identificar cualquier tipo de quinona mediante el cambio de color en la molécula que puede ser amarillo, rojo o violeta correspondiente a longitudes de onda de entre 450 a 668 nm (FIGURA 23). (Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)

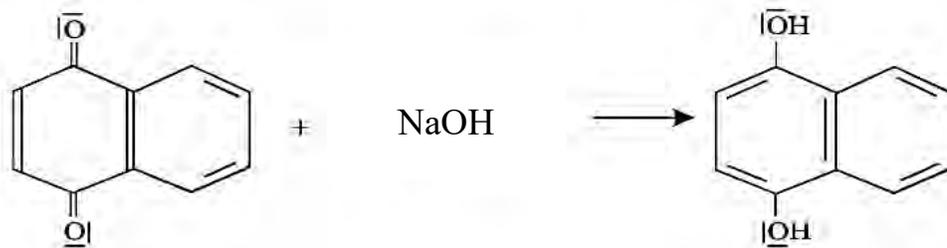


FIGURA 23. Reacción para la identificación de Quinonas.

Fuente: Huamaní Cárdenas, C. A., 2010

2.3.10.3 Esteroides y triterpenoides libres

La reacción de Liebermann - Burchard puede permitirnos reconocer los triterpenos y/o esteroides que presente el extracto etanólico seco, para lo cual se usó 1 mL de cloroformo y 1000 mg de extracto etanólico seco. Posteriormente se le agregó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló, con cuidado se dejó caer por un lado de la pared 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, esto sin agitar el tubo. **(Bermejo de Zaa, A. A., et al., 2014)**. La reacción de Liebermann – Burchard necesita un medio ácido fuerte para que el esteroide sufra una oxidación gradual y producto de la protonación del grupo hidroxilo ocurre un cambio de color a rojo con un máximo de absorbancia de 620 nm (FIGURA 24). **(Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)**

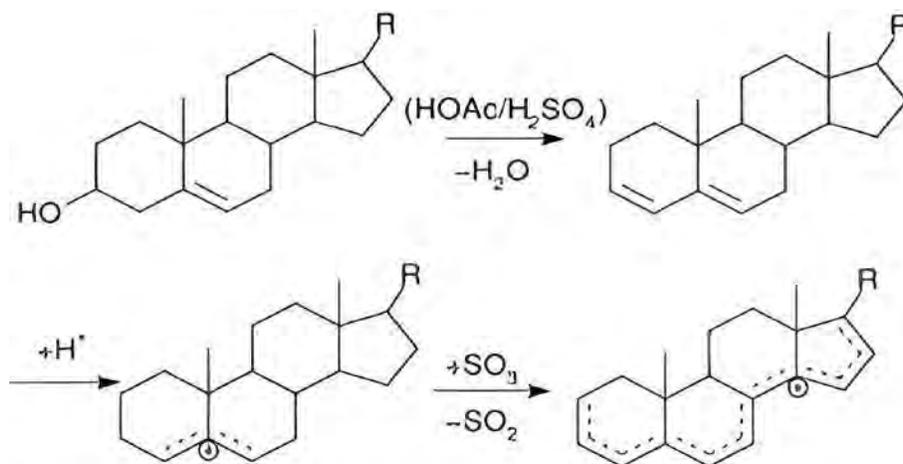


FIGURA 24. Reacción de Liebermann - Burchard.

Fuente: Huamaní Cárdenas, C. A., 2010

2.3.10.4 Flavonoides

Se realizó con la reacción de Shinoda, para lo cual se suspendió 1000 mg del extracto etanólico seco en 1 mL de una relación alcohol-agua 1:5, luego se procedió a filtrar. A dicho filtrado se le agregó 500 mg de magnesio en polvo, luego se le agregó gota a gota HCl concentrado. **(Carbajal Rojas, L., et al., 2009)**. En esta reacción el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico concentrado, produciendo hidrogeno molecular, el cual se elimina en forma de gas, mientras el que el cloruro de magnesio reacciona con el flavonoide, disociándose y formando un

enlace iónico el cloro con el anillo del flavonoide (FIGURA 25). (Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)

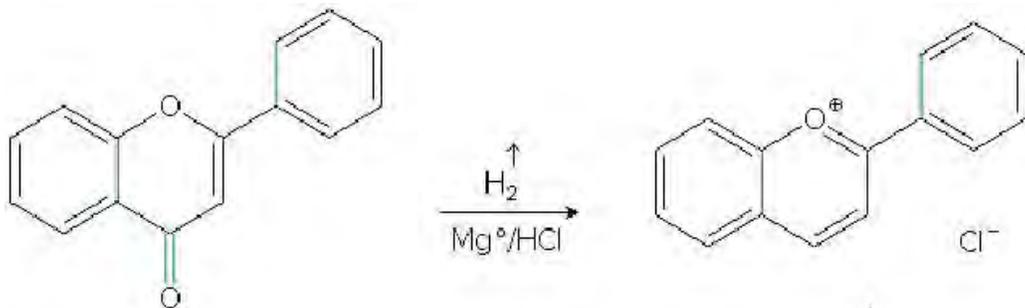


FIGURA 25. Reacción de Shinoda.

Fuente: Huamaní Cárdenas, C. A., 2010

2.3.10.5 Fenoles y taninos

Se usó la reacción de cloruro férrico, 1000 mg de extracto etanólico seco se suspendió en 3 gotas de una relación alcohol-agua 1:5. Posteriormente se agregó 3 gotas tricloruro férrico al 10% en agua destilada. (Bermejo de Zaa, A. A., et al., 2014). En esta reacción el cloruro férrico es neutralizado con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado, luego debe ser disuelta en agua, posteriormente la disolución neutra de cloruro forma un complejo coloreado transitorio o permanente de color púrpura, verde o azul (FIGURA 26). (Carranza Vega, D. E. & Huayanay Viera, J. A., 2009)

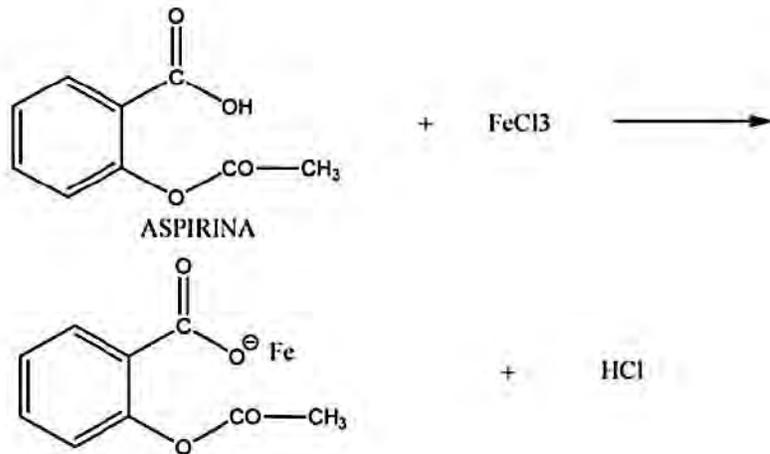


FIGURA 26. Reacción de Cloruro férrico.

Fuente: Carranza Vega, D. E. & Huayanay Viera, J. A., 2009

2.3.10.6 Saponinas

Se realizó mediante la prueba de espuma, para lo cual se suspendió 1000 mg de extracto etanólico seco en 1 mL de alcohol al 96% y agregó 5 mL de agua destilada, y luego se agitó fuertemente durante 10 min. (Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021). Este tipo de moléculas tiene la propiedad físico-química de disminuir la tensión superficial por lo cual producen abundante espuma. (Valdivia, C., 2020)

2.3.10.7 Lactonas y cumarinas

Se usó la reacción de Baljet, 1000 mg de extracto etanólico seco se suspendió en 1 mL de una relación alcohol-agua 1:5. Se agregó 1 mL de reactivo de Baljet. (Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021). La reacción se basa en la formación de un complejo entre el ácido pírico y el ciclo lactónico de estos compuestos (FIGURA 27). (Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)

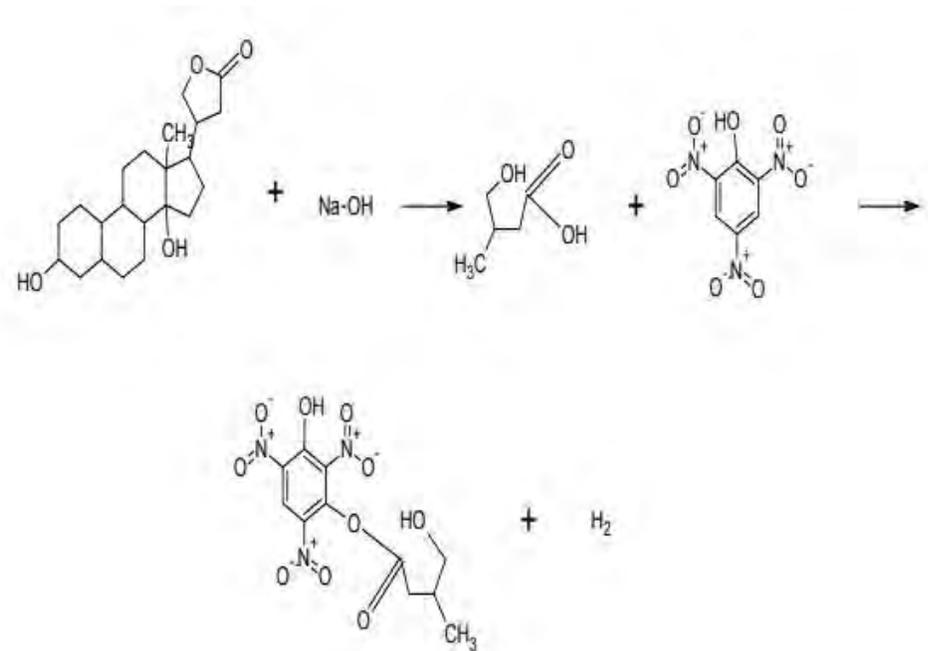


FIGURA 27. Reacción de Baljet.
Fuente: Huamaní Cárdenas, C. A., 2010

2.3.10.8 Aminoácidos libres

Se realizó la reacción de Ninhidrina, usamos 1000 mg de extracto etanólico seco y se suspendió en 2 mL de ninhidrina al 2% en agua. La mezcla se incubó por 10 min en baño maría, donde si se visualiza un color azul violáceo es positivo. **(Bermejo de Zaa, A. A., et al., 2014)**. En esta reacción el grupo amina del aminoácido se libera y forma un complejo con la ninhidrina, para luego posteriormente liberar 2 hidrógenos y generar el enlace con otra molécula de ninhidrina (FIGURA 28). **(Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)**

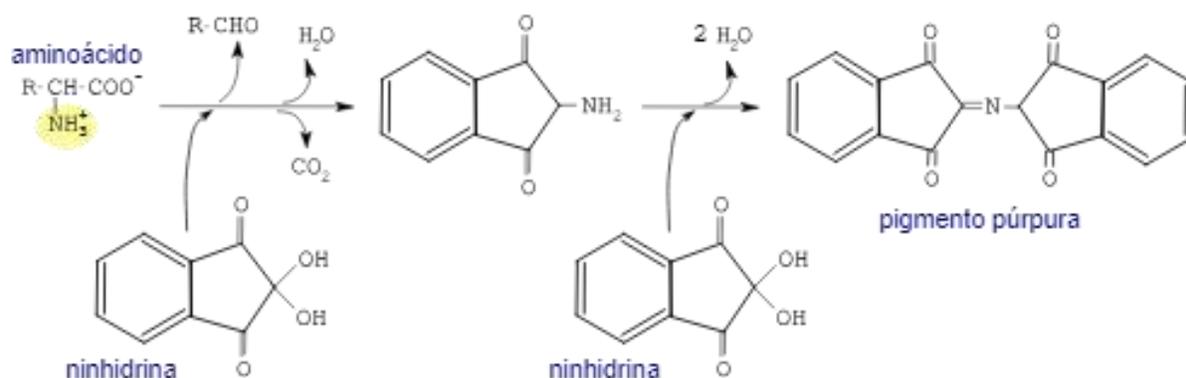


FIGURA 28. Reacción de Ninhidrina.

Fuente: Huamaní Cárdenas, C. A., 2010

2.3.9.9 Azúcares reductores

Se realizó la reacción de Fehling, preparando:

- Solución A: 350 mg de sulfato cúprico hidratado cristalizado se disuelve en 10 mL de agua
- Solución B: 1500 mg de tartrato de sodio y potasio con 400 g de hidróxido de sodio se disuelven en 10 mL de agua

Para la evaluación de azúcares reductores se pesó 1000 mg de extracto etanólico seco y se suspendió en 1 mL de agua. Se le agregó 1 mL de la solución A y 1 mL de la solución B. Luego se incubó a baño maría por 10 min. **(Bermejo de Zaa, A. A., et al., 2014)**. La reacción aprovecha el poder reductor del grupo aldehído, que pasa a un ácido, reduciendo la sal de cobre (II) a óxido de cobre (I) formando así un precipitado rojo (FIGURA 29). **(Valdivia, C., 2020)**

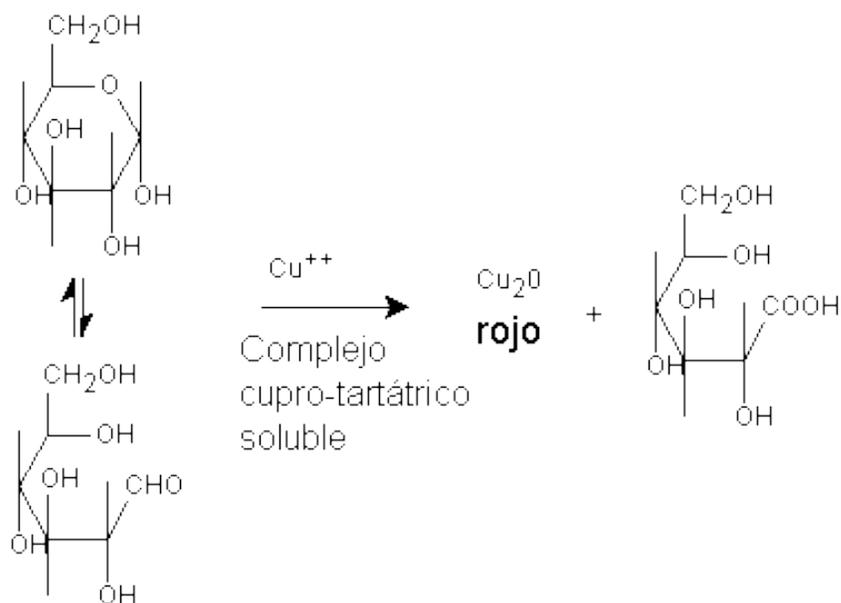


FIGURA 29. Reacción de Fehling.

Fuente: Valdivia, C., 2020

2.3.10.10 Polisacáridos

Reacción de yodo lugol; se preparó 250 mg de extracto etanólico seco y se suspendió en 1 mL de agua destilada, luego se agregó 0.5 mL de reactivo de lugol, posteriormente se flameó suavemente en un mechero de alcohol. **(Bermejo de Zaa, A. A., et al., 2014)**. Esta reacción ocurre cuando el yodo se introduce entre las espiras de las moléculas de los polisacáridos, generando un cambio de color a un azul violeta. **(Huamaní Cárdenas, C. A., 2010)**

2.3.10.11 Resinas

La reacción para identificación de resinas se realiza con 0.5 mL de agua destilada y 500 mg de extracto etanólico seco, luego se homogenizó para poder agregar 200 mg de acetato de cobre. **(Bermejo de Zaa, A. A., et al., 2014)**. En esta reacción el acetato se encarga de reducir el complejo de las resinas lo cual deja átomos de cobre libres, que terminan por oxidarse con el oxígeno del ambiente y genera un cambio de color de verde a esmeralda. **(Valdivia, C., 2020)**

2.3.11 DILUCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente altamente polar y se obtiene como subproducto de la fabricación de pulpa de celulosa, asimismo, puede ser usado para conservar el principio activo de un medicamento. (Rodríguez Pava, C. N., et al., 2017). Además, se determinó que el DMSO no posee efecto bactericida por lo cual no interfiere en los resultados obtenidos (Bullaín Galardis, M. M., 2014). En la (FIGURA 30) detallamos como se usó DMSO al 99% como diluyente para preparar las concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 mg/mL según estipula el clinical and laboratory standards institute (CLSI). (Rodríguez Pava et al., 2017)

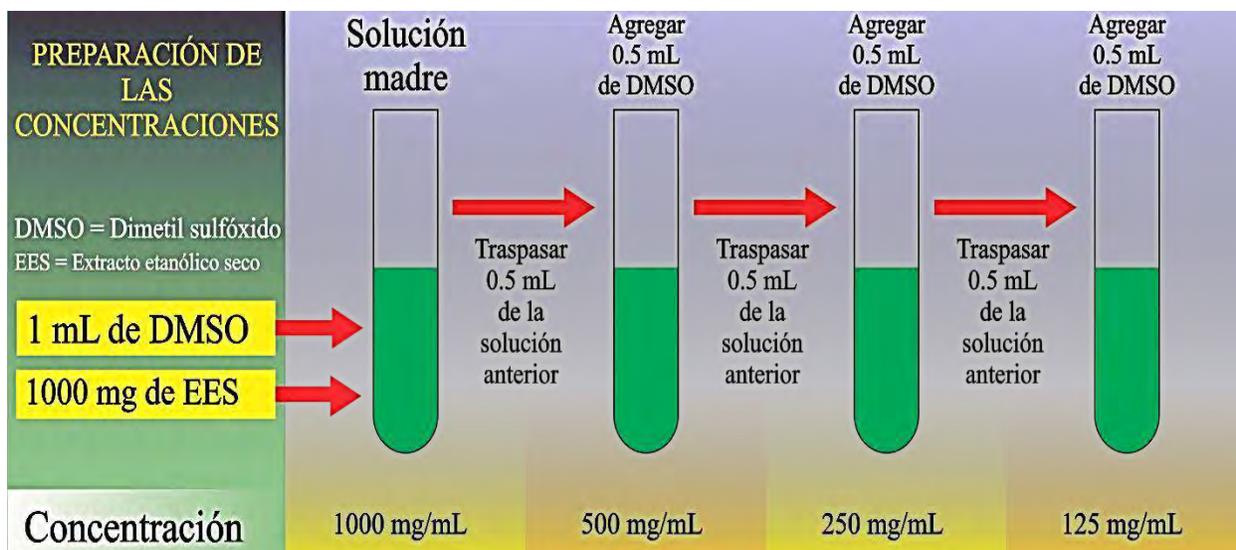


FIGURA 30. Representación de la preparación de las concentraciones.

Fuente: Elaboración propia

2.3.12 ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas ATCC 35218 y 25923 fueron compradas en la marca GenLab. (ANEXO 2)

2.3.12.1 ATCC 35218 *Escherichia coli*

El producto viene en presentación de cultivo de preceptrol. Se rehidrató el precipitado con 0.5 mL de caldo BHI (ANEXO 4). Luego se transfirió el contenido a un tubo de ensayo estéril con 5 mL de caldo BHI. Para cultivar la cepa en placa, se usó agar sangre (ANEXO 3) (American Type Culture Collection, 2020). En la (FIGURA 31) mostramos las colonias que crecieron de *E. coli* sobre el agar sangre. La cepa está certificada (ANEXO 6)



FIGURA 31. Fotografía de la cepa ATCC 35218 *E. coli* en placa con agar sangre.

Fuente: Elaboración propia

2.3.12.2 ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*

El producto viene en presentación de cultivo de preceptrol. Se rehidrató el precipitado con 0.5 mL de caldo BHI (ANEXO 4). Luego se transfirió el contenido a un tubo de ensayo estéril con 5 mL de caldo BHI. Para cultivar la cepa en placa, se usó agar sangre (ANEXO 3) (**American Type Culture Collection, 2013**). En la (FIGURA 32) mostramos las colonias que crecieron de *S. aureus* sobre el agar sangre. La cepa esta certificada (ANEXO 7)



FIGURA 32. Fotografía de la cepa ATCC 25923 *S. aureus* en placa con agar sangre.

Fuente: Elaboración propia

2.3.13 PRUEBA DE KIRBY BAUER

El método de Kirby-Bauer o disco difusión es un método cualitativo, para determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a los medicamentos de tipo antimicrobiano, a partir de una concentración estandarizada o conocida, este método es mayormente usado para microorganismos de crecimiento rápido, el cual consiste en colocar discos impregnados con antibiótico en placas de agar inoculadas con el microorganismo en evaluación, el cual puede ser medido en un rango Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R). **(Vazquez-Pertejo, M., 2020)**

Las medidas de los halos de sensibilidad generados en el estudio fueron comparadas con la escala de Duraffourd para determinar la sensibilidad de la bacteria al extracto etanólico, donde las medidas correspondientes en la escala son: sensibilidad nula (≤ 8 mm), sensible (8 – 14 mm), muy sensible (15 – 20 mm) y Altamente sensible (>20 mm) **(Ayala Aguilar, J. L., 2019)**

2.3.13.1 Preparación del inóculo bacteriano

Se usó dos tubos de ensayo con 3 mL de agua destilada esterilizada, en uno se agregó colonias de *E. coli* (Suspensión A) y al otro colonias de *S. aureus* (Suspensión B). La turbidez fue ajustada al equivalente del estándar de 0.5 en la escala de McFarland el cual corresponde a una media de 1.5×10^8 UFC/mL. El medio de cultivo usado en la prueba de sensibilidad fue el Agar Mueller Hinton de la marca Liofilchem (ANEXO 5), y se prepararon 1000 mL para 40 placas respetando la relación de 34.0 g de agar por cada 1000 mL de agua destilada **(Sacsquispe Contreras, R. E., y Velásquez Pomar, J., 2002).**

2.3.13.2 Preparación de discos en blanco e inoculación en discos

Se usó papel filtro N° 3 de 125 mm en marca Whatman, el cual fue perforado generando pequeños círculos de 5 mm de diámetro, los cuales se denominaron como “Disco en blanco”. Luego fueron esterilizados por calor seco en placas de vidrio a 150°C por 2 horas y media. Cuando los discos en blanco se enfriaron se les agregó 5 μ L de un aditivo líquido que podría ser el extracto etanólico o el control negativo y se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente. **(Harfouch, R. M., & Ghosh, S., 2021).** En el presente estudio se prepararon 240 discos en blanco de los cuales

40 discos fueron inoculados con la concentración de 1000 mg/mL, 40 discos fueron inoculados con la concentración de 500 mg/mL, 40 discos fueron inoculados con la concentración de 250 mg/mL, 40 discos fueron inoculados con la concentración de 125 mg/mL, 40 discos fueron inoculados con el control negativo y 40 discos quedaron como respaldo en caso de daño.

2.3.13.3 Control positivo

Se usó como control positivo Fosfomicina de 200 µg por ser un antibiótico recomendado para el tratamiento de infecciones causadas por Gram negativos multirresistentes y Gram positivos, con la capacidad de interrumpir la síntesis de la pared celular mediante la inhibición de fosfoenolpiruvato sintetasa, interfiriendo de esa manera con la producción de peptidoglicano e inhibiendo su crecimiento en placa. **(Werth, B., 2022)**

2.3.13.4 Control negativo

Se usó como control negativo DMSO al 99%. En 40 discos en blanco de papel filtro se agregó 5 µL del control negativo y se dejó secar por 24 horas. **(Harfouch, R. M., & Ghosh, S., 2021)**

2.3.13.5 Distribución de discos en placas

Con la ayuda de un hisopo estéril se inoculó por agotamiento en superficie 20 placas con la suspensión A y otras 20 con la suspensión B dando un total de 40 placas. Una vez inoculado se dejó la placa en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente para proceder a colocar los discos de sensibilidad y los controles positivo y negativo en la superficie de la placa a una distancia de 30 mm entre cada disco y 20 mm de los bordes de la placa. **(Ayala Aguilar, J. L., 2019)**. Se realizó la experimentación en 20 placas para cada cepa, obteniendo en cada placa 6 discos según la distribución de la TABLA 3, en la (FIGURA 33) se muestra una descripción gráfica de la distribución de discos en placa.

TABLA 3. Distribución de discos por placa

Placa de <i>Escherichia coli</i>	Placa de <i>Staphylococcus aureus</i>
1 disco con concentración de 1000 mg/mL	1 disco con concentración de 1000 mg/mL
1 disco con concentración de 500 mg/mL	1 disco con concentración de 500 mg/mL
1 disco con concentración de 250 mg/mL	1 disco con concentración de 250 mg/mL
1 disco con concentración de 125 mg/mL	1 disco con concentración de 125 mg/mL
1 disco con DMSO al 99% (Control Negativo)	1 disco con DMSO al 99% (Control Negativo)
1 disco de fosfomicina de 200 microgramos (Control Positivo)	1 disco de fosfomicina de 200 microgramos (Control Positivo)

Fuente: Elaboración propia

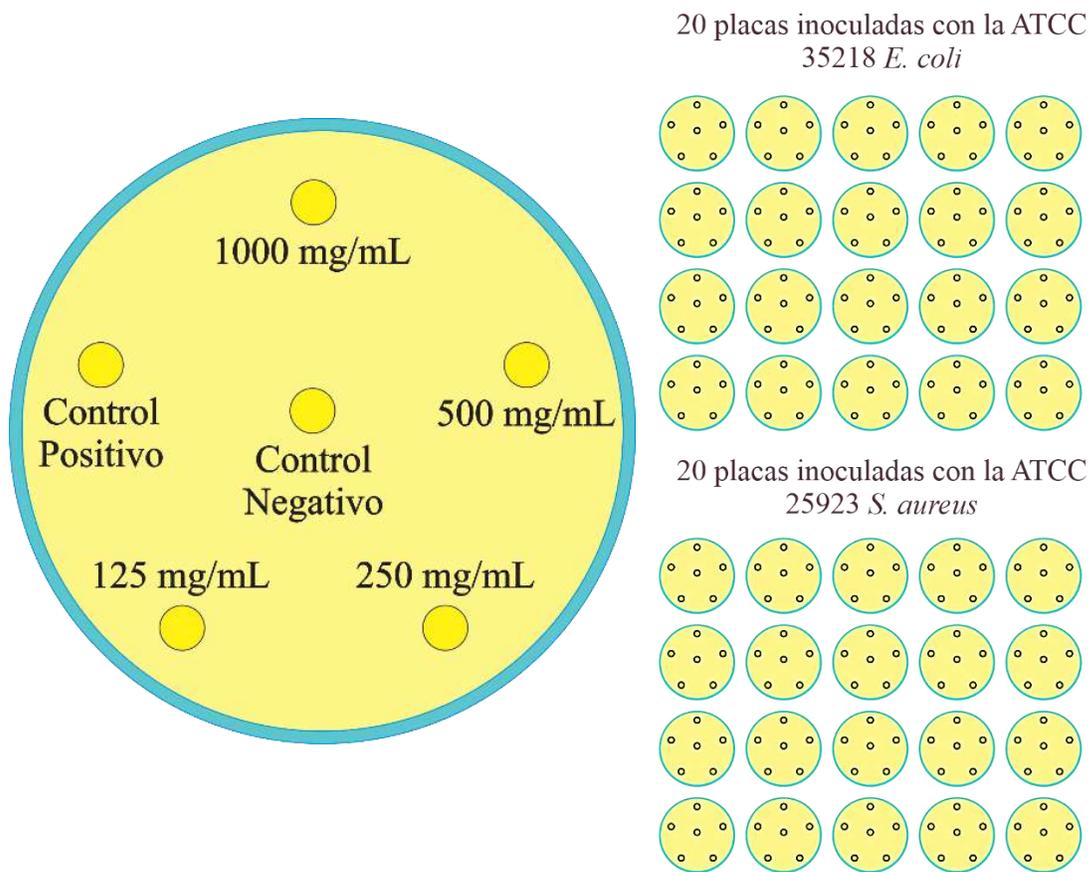


FIGURA 33. Distribución de discos en cada una de las placas

Fuente: Elaboración propia

2.3.13.6 Lectura de las placas

En cada una de las placas se tomó las medidas del halo de inhibición para cada disco en base al diámetro y con la ayuda de un vernier digitalizado (**Sacsquispe Contreras, R. E., y Velásquez Pomar, J., 2002**). Luego dichas medidas fueron clasificadas según la escala de Duraffourd (sensibilidad nula (≤ 8 mm), sensible (8 – 14 mm), muy sensible (15 – 20 mm) y Altamente sensible (>20 mm)) (**Ayala Aguilar, J. L., 2019**)

2.3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recolectados fueron sistematizados en el programa Microsoft Excel para realizar la distribución de frecuencia absoluta, porcentual, análisis de varianza y test de Chi cuadrado, medida de tendencia central y dispersión, trabajando con un nivel de confianza de 95%. (**Werth, B., 2022**)

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Taraxacum officinale* F. H. Wigg (DIENTE DE LEÓN)

Se recolectaron las muestras vegetales en la zona de Corao del 1 al 12 de marzo de 2023 en horas de la mañana, verificando de posea las características principales de la especie (hojas dentadas, inflorescencia amarilla y tallo liso) y priorizando los especímenes de tallo largo. Se seleccionó 2 muestras de diente de león con características muy representativas, que fueron extraídas conservando toda su estructura, para posteriormente realizar el proceso de herborización y ser trasladadas al Herbario Vargas CUZ para su identificación y certificación taxonómica, donde el especialista determinó que la especie era *Taraxacum officinale* F. H. Wigg y emitió la certificación correspondiente (ANEXO 1).

3.2 PORCENTAJE DE HUMEDAD DE TALLOS DE *Taraxacum officinale* F. H. Wigg

Se colectaron 3248 g de tallos de *T. officinale* en peso fresco, tras un proceso de secado las muestras pesaron 437 g. Con los datos obtenidos podemos hallar el porcentaje de humedad donde:

$$\%Hmd = \frac{(3248 - 437)}{3248} * 100 = 87.47\%$$

Se considera que un alto porcentaje de humedad está relacionado con muchos procesos de deterioro vegetal por hongos, insectos, oxidación, etc. Es una desventaja obtener productos a partir de esta especie vegetal por la alta demanda de agua y riesgo de deterioro que posee.

Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021, usaron toda la estructura vegetal (tallos, hojas y flores) y obtuvieron un porcentaje de humedad de 83.76% para las muestras de *T. officinale* recolectadas en la zona de Yucay, Urubamba por lo cual consideramos que los dientes

de león en ambientes donde no hay lluvias recurrentes o generalmente son secos, es donde mas agua almacenan.

3.3 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE *Taraxacum officinale* F. H. Wigg

Producto del secado de los tallos de *T. officinale* se obtuvo un peso seco de 437 g, tras el proceso de extracción etanólica de metabolitos secundarios y su separación del disolvente con ayuda del rotavapor obtuvimos un peso de 11.0773 g. Con los datos obtenidos podemos hallar el porcentaje de rendimiento donde:

$$\%Pr = \frac{11.0773}{437} * 100 = 2.53\%$$

El porcentaje de rendimiento es muy bajo por lo cual no sería recomendable extraer los metabolitos secundarios de los tallos de *T. officinale* hallados en la zona de Corao, pues para poder purificar los diferentes grupos de compuestos deberíamos coleccionar una muy grande cantidad lo cual podría afectar al ecosistema.

Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021, usaron la totalidad de la estructura vegetal sin exceptuar ninguna parte y obtuvieron un porcentaje de rendimiento de 7.66% para las muestras de *T. officinale* obtenidos en la zona de Yucay por lo cual consideramos que el tiempo de maceración de las muestras vegetales es influyente, dado que ellas realizaron la maceración por 30 días y nosotros solo 8 días.

3.4 SCREENING FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE TALLOS DE *Taraxacum officinale*

F. H. Wigg

Los resultados de las múltiples reacciones químicas fueron sistematizados en la TABLA 4 para lo cual se consideró el tipo de metabolito secundario, método, rangos de referencia y resultados.

TABLA 4. Resultados del screening fitoquímico cualitativo

METABOLITO SECUDARIO	METODO	RANGO DE REFERENCIA	RESULTADOS
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	Turbio = Positivo (+) Transparente = Negativo (-)	(-)
	Reacción de Mayer	Turbio = Positivo (+) Transparente = Negativo (-)	(+)
	Reacción de Wagner	Turbio = Positivo (+) Transparente = Negativo (-)	(+++)
Quinonas	Reacción para identificación de quinonas	Violeta = Positivo (+) Rojo = Positivo (+) Amarillo = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-)	(+++) Amarillo
Esteroides y triterpenoides libres	Reacción de Liebermann - Burchard	Cambio de color = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-)	(+++) Verde azulado
Flavonoides	Reacción de Shinoda	Rojo = Positivo (+) Violeta = Positivo (+) Naranja = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-)	(+) Naranja
Aminoácidos libres	Reacción de Ninhidrina	Azul violáceo = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-)	(-)
Fenoles y taninos	Reacción de Cloruro Férrico	Taninos pirocatecólicos: Verde intenso = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-) Taninos pirogalotánicos: Azul = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-) Fenoles: Rojo = Positivo (+) Sin cambio de color = Negativo (-)	(+) Verde intenso
Saponinas	Prueba de Espuma	Positivo = Espuma mayor a 2 mm permanente por un periodo de 2 a más minutos. (+) Negativo = Sin espuma (-)	(-)
Lactonas y cumarinas	Reacción de baljet	Cambio de color a rojo = Positivo (+) Precipitado rojo = Positivo (++) Sin cambio de color = Negativo (-)	(+) Rojo

Azúcares reductores	Reacción de Fehling	Turquesa = Positivo (0.0 – 0.5%) Verde = Positivo (0.6 – 1.0%) Verde limón = Positivo (1.1 – 1.5%) Amarillo = Positivo (1.6 – 2.5%) Naranja = Positivo (2.6 – 3.5%) Rojo = Positivo (3.6 – 4.0%) Café = Positivo (> 4.0%) Sin cambio de color = Negativo	(++) Naranja
Polisacáridos	Reacción de Yodo – Lugol	Morado oscuro = Positivo Sin cambio de color = Negativo	(-)
Resinas	Reacción para identificación de resinas	Verde esmeralda = Positivo Sin cambio de color = Negativo	(++)

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (-) No se detecta
- (+) Poca cantidad
- (++) Moderada cantidad
- (+++) Cantidad abundante

Siete autores mencionados en los antecedentes realizaron el análisis fitoquímico los cuales detallamos en la TABLA 5:

TABLA 5. Resultados de otros autores en la evaluación fitoquímica para metabolitos secundarios

AUTOR ->	Nuestro trabajo	Holgado, M., et al. (2015).	Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G. (2021)	Espadero Bermeo, S. G. (2018)	Moncayo Rivera, Ch. M., et al. (2022)	Hernández Moreno, et al. (2021)	Rodríguez Pava, C. N., et al. (2017)	Sohail, et al. (2014)
Quinonas	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Flavonoides	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Saponinas	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Triterpenos	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Fenoles	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Taninos	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
Alcaloides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
Lactonas	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Azúcares reductores	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Esteroides	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Resinas	Positivo	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar
Polisacáridos	Negativo	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar	Sin evaluar
LUGAR ->	CUSCO			ECUADOR			COLOMBIA	PAKISTAN

El análisis fitoquímico de las muestras colectadas en Ecuador y Pakistán no presentaron quinonas, sin embargo, las muestras colectadas en Cusco (Corao) y Colombia si presentaron. Esto podría deberse al tipo de suelo.

La presencia de flavonoides, esteroides, lactonas, fenoles y saponinas es muy variable incluso si las muestras son colectadas en una misma área. **Holgado, M., et al., 2015** y **Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021** colectaron muestras en Urubamba (Yucay) y difieren ante la presencia de flavonoides y saponinas. Ambos autores no mencionan la época del año en la que realizaron la colecta, ni tampoco el estadio del diente de león.

Holgado, M., et al., 2015 y **Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021** no encontraron la presencia de triterpenoides en las muestras colectadas en Urubamba (Yucay) sin embargo las muestras colectadas en Cusco (Corao) si mostraron la presencia de los metabolitos secundarios antes mencionados.

Los azúcares reductores, taninos y alcaloides se encuentran en las muestras colectadas de Cusco (Corao) y Urubamba (Yucay), según nuestra investigación, **Holgado, M., et al., 2015** y **Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G., 2021** lo que sugiere que el suelo en estas áreas favorece la síntesis de este compuesto sin que la altura o condición climática afecte.

Compuestos como las resinas y polisacáridos no fueron evaluados en otros trabajos de investigación, sin embargo, la guía formulada por **ESSALUD, 2002** menciona que las resinas se encuentran formando parte de *T. officinale* alrededor del país, mas no menciona la lista de zonas donde realizaron la colección y evaluación.

3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* GENERADO POR EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE *T. officinale* F. H. WIGG A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A LA CEPA ATCC 35218 *Escherichia coli*

Se realizó la evaluación en 20 repeticiones con las concentraciones antes mencionadas, para lo cual sistematizamos los resultados obtenidos en la TABLA 6.

TABLA 6. Resultados de las placas inoculadas con *E. coli* y sometidas al antibiograma

# de placa	Tamaño del halo generado en milímetros:					
	Control Positivo (Fosfomicina)	Control negativo	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
1	34.4 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
2	34.1 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
3	35.6 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
4	35.6 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
5	34.9 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
6	19.6 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
7	35.9 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
8	36.5 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
9	35.0 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
10	35.7 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
11	35.0 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
12	37.0 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
13	34.0 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
14	34.0 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
15	35.2 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
16	37.4 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
17	36.1 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
18	21.6 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
19	34.3 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
20	34.0 (AS)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)

Fuente: Elaboración propia

La clasificación de valores en la TABLA 6 se realizó de acuerdo a la escala de Duraffourd, donde ≤ 8 es Resistente (R), 8 – 14 es Sensible (S), 15 – 20 es Muy Sensible (MS) y >20 es Altamente Sensible (AS).

Rodriguez Pava, C. N., et al., 2017 trabajó con cepas aisladas en hospital y demostró que el extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* genera efecto bactericida sobre *E. coli*, sin embargo, en nuestros resultados podemos apreciar que, en todas las placas el extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* no generó efecto bactericida en *E. coli* en ninguna de las concentraciones pese a trabajar con una cepa tipificada.

Harfouch, R. M., & Ghosh, S., 2021 trabajó con cepas aisladas en hospital y demostró que el extracto etanólico de tallos de *T. officinale* genera efecto bactericida sobre *E. coli*, sin embargo, en nuestros resultados podemos apreciar que, en todas las placas el extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* no generó efecto bactericida en *E. coli* en ninguna de las concentraciones.

Hernández Moreno, et al. 2021 trabajó con la cepa ATCC 25922 de *E. coli* y demostró que el extracto etanólico al 96% de *T. officinale* a una concentración de 60 mg/mL no genera efecto bactericida. Tomando en cuenta este resultado nosotros optamos por usar concentraciones mayores y aun así no encontramos efecto bactericida.

Azuelo, A., et al. 2016 trabajó con una cepa estandarizada ATCC (en la investigación no refiere el código) y uso extracto metanólico de hojas de *T. officinale* a una concentración de 40 mg/mL encontrando en la prueba de disco difusión halos de inhibición de 10 a 14 mm concluyendo que la bacteria si presenta sensibilidad. De estos resultados deducimos que el extracto metanólico posee una mejor sinergia con los metabolitos secundarios del *T. officinale*.

Moncayo Rivera, Ch. M., et al. 2022 trabajó con la cepa ATCC 25922 de *E. coli*, pero a diferencia de la demás revisión bibliográfica, usó el aceite esencial de *T. officinale* y obtuvieron como resultado efecto bactericida intermedio para *E. coli* con halos de inhibición de 10.60 mm. Deducimos que el aceite esencial puede presentar mejores metabolitos secundarios.

Olivera Delgado, L. I., & Gutierrez Felix, E. G. 2021 trabajaron con cepas estandarizadas y demostraron que el extracto etanólico al 96% de *T. officinale* a concentraciones como 400, 367, 333, 300, 267, 233, 200, 133, 67, 33, 16.67, 8.33 mg/mL, no generó efecto bactericida a ninguna concentración. Nosotros tampoco encontramos efecto bactericida.

3.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* GENERADO POR EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE *T. officinale* F. H. WIGG A DIFERENTES CONCENTRACIONES FRENTE A LA CEPA ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*

Se realizó la evaluación en 20 repeticiones con las concentraciones antes mencionadas, para lo cual sistematizamos los resultados obtenidos en la TABLA 7.

TABLA 7. Resultados de las placas inoculadas con *S. aureus* y sometidas al antibiograma

# de placa	Tamaño del halo generado en milímetros:					
	Control Positivo (Fosfomicina)	Control negativo	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
1	38.0	6.4	8.4	6.2	5.2	5.5
2	39.8	5.4	8.8	7.5	6.3	6.0
3	40.8	5.8	8.9	7.9	7.9	7.1
4	39.0	5.1	9.8	9.3	8.9	7.1
5	43.0	5.8	9.2	9.5	8.9	7.3
6	41.9	5.7	9.3	10.5	9.3	10.0
7	43.2	6.4	10.0	10.6	9.7	10.2
8	38.0	5.9	10.2	10.9	10.1	10.3
9	42.9	5.2	10.4	11.0	10.1	11.3
10	47.6	5.4	11.0	11.2	10.3	11.6
11	40.7	5.3	11.2	12.0	10.3	11.7
12	41.4	5.6	11.3	12.1	12.5	12.1
13	46.8	5.8	12.1	13.4	13.2	12.7
14	49.2	6.7	12.4	13.8	14.0	13.1
15	34.2	6.2	13.2	14.0	14.0	13.8
16	44.9	6.3	14.3	14.4	14.1	14.1
17	46.6	5.9	15.1	14.2	16.1	13.1
18	47.6	6.0	15.2	14.4	16.1	16.4
19	47.0	6.7	14.8	14.8	17.1	16.4
20	40.4	6.3	19.2	15.1	17.5	16.5

Fuente: Elaboración propia

El control negativo presenta halos de inhibición por lo cual debemos restarle el valor obtenido en cada uno de los resultados de la placa, exceptuando al control positivo pues este no fue inoculado con DMSO.

En la TABLA 8 mostramos los valores obtenidos en laboratorio con el factor de corrección en cada una de las placas

TABLA 8. Resultados de las placas inoculadas con *S. aureus* y sometidas al antibiograma con factores de corrección del control negativo

# de placa	Tamaño del halo generado en milímetros:					
	Control Positivo (Fosfomicina)	Control negativo	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
1	38.0 (AS)	0.0 (R)	2.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)	0.0 (R)
2	39.8 (AS)	0.0 (R)	3.4 (R)	2.1 (R)	0.9 (R)	0.6 (R)
3	40.8 (AS)	0.0 (R)	3.1 (R)	2.1 (R)	2.1 (R)	1.3 (R)
4	39.0 (AS)	0.0 (R)	4.7 (R)	4.2 (R)	3.8 (R)	2.0 (R)
5	43.0 (AS)	0.0 (R)	3.4 (R)	3.7 (R)	3.1 (R)	1.5 (R)
6	41.9 (AS)	0.0 (R)	3.6 (R)	4.8 (R)	3.6 (R)	4.3 (R)
7	43.2 (AS)	0.0 (R)	3.6 (R)	4.2 (R)	3.3 (R)	3.8 (R)
8	38.0 (AS)	0.0 (R)	4.3 (R)	5.0 (R)	4.2 (R)	4.4 (R)
9	42.9 (AS)	0.0 (R)	5.2 (R)	5.8 (R)	4.9 (R)	6.1 (R)
10	47.6 (AS)	0.0 (R)	5.6 (R)	5.8 (R)	4.9 (R)	6.2 (R)
11	40.7 (AS)	0.0 (R)	5.9 (R)	6.7 (R)	5.0 (R)	6.4 (R)
12	41.4 (AS)	0.0 (R)	5.7 (R)	6.5 (R)	6.9 (R)	6.5 (R)
13	46.8 (AS)	0.0 (R)	6.3 (R)	7.6 (R)	7.4 (R)	6.9 (R)
14	49.2 (AS)	0.0 (R)	5.7 (R)	7.1 (R)	7.3 (R)	6.4 (R)
15	34.2 (AS)	0.0 (R)	7.0 (R)	7.8 (R)	7.8 (R)	7.6 (R)
16	44.9 (AS)	0.0 (R)	8.0 (S)	8.1 (S)	7.8 (R)	7.8 (R)
17	46.6 (AS)	0.0 (R)	9.2 (S)	8.3 (S)	10.2 (S)	7.2 (R)
18	47.6 (AS)	0.0 (R)	9.2 (S)	8.4 (S)	10.1 (S)	10.4 (S)
19	47.0 (AS)	0.0 (R)	8.1 (S)	8.1 (S)	10.4 (S)	9.7 (S)
20	40.4 (AS)	0.0 (R)	12.9 (S)	8.8 (S)	11.2 (S)	10.2 (S)

Fuente: Elaboración propia

La clasificación de valores en la TABLA 8 se realizó de acuerdo a la escala de Duraffourd, donde ≤ 8 es Resistente (R), 8 – 14 es Sensible (S), 15 – 20 es Muy Sensible (MS) y >20 es Altamente Sensible (AS).

Rodriguez Pava, C. N., et al., 2017 trabajó con cepas aisladas en hospital y demostró que el extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* genera efecto bactericida sobre *S. aureus*, donde por el método de disco difusión encontraron halos de 10, 12 y 13 mm a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/mL respectivamente. En nuestra investigación no encontramos sensibilidad en las concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 mg/mL pese a que utilizamos el mismo disolvente (DMSO).

Xu, P., et al., 2021 trabajó con ATCC 25923 *S. aureus* y demostró que el extracto fenólico de *T. officinale* genera efecto bactericida sobre *S. aureus* a partir de la concentración de 12.5 mg/mL en adelante, sin embargo, se debe considerar que los fenoles presentan actividad bactericida por sí mismos.

Harfouch, R. M., & Ghosh, S., 2021 trabajó con cepas aisladas en hospital y demostró que el extracto etanólico de tallos de *T. officinale* genera efecto bactericida sobre *S. aureus*.

Reaño Ortega, C. K. 2014 trabajo con una cepa aislada de hospital y demostró que el extracto etanólico al 70% de *T. officinale* a una concentración de 10 mg/mL no genera efecto bactericida, de igual manera nosotros tampoco encontramos efecto bactericida pese a que nuestras concentraciones fueron mucho mayores.

García Huamán, F., & Angeles Trauco, M. 2021 trabajo con cepas aisladas de muestras de carne en donde demostraron que el extracto etanólico de *T. officinale* no genera efecto bactericida sobre *S. aureus*, de igual manera tampoco encontramos efecto bactericida pese a trabajar con una cepa ATCC. En el trabajo no precisaron la concentración del extracto ni los métodos que se emplearon para aislar la cepa.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS POR ANTIBIOGRAMA

Para determinar la efectividad bactericida *in vitro* del extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* seco sobre las cepas ATCC 35218 *E. coli* y ATCC 25923 *S. aureus* a concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 mg/mL se realizó 20 repeticiones para obtener un valor estadístico significativo.

3.7.1 MEDIA, MEDIANA, MODA

Se realizó los estadísticos como la media para hallar el promedio aritmético de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico, la mediana para hallar un punto medio entre estos valores, la moda para determinar el valor repetido y los límites para determinar el menor y mayor valor. En la (TABLA 9 y 10) se muestran los resultados para cada cepa.

TABLA 9. Promedio de halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* sobre la cepa ATCC 35218 *E. coli*

	Media	Mediana	Moda
Concentración de 1000 mg/mL	0.00	0.00	0.00
Concentración de 500 mg/mL	0.00	0.00	0.00
Concentración de 250 mg/mL	0.00	0.00	0.00
Concentración de 125 mg/mL	0.00	0.00	0.00
Control positivo	33.80	35.00	34.00
Control negativo	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia

En la TABLA 9 que representa los halos de inhibición del extracto etanólico para *E. coli* observamos que la media, mediana y moda poseen el mismo valor de 0 porque la cepa ATCC 35218 *E. coli* no demostró sensibilidad a nuestro extracto etanólico a ninguna de las concentraciones propuestas, por el contrario, nuestro control positivo obtuvo resultados de: 33.80 para media, 35.00 para mediana, 34.00 para moda.

TABLA 10. Promedio de halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* sobre la cepa ATCC 25923 *S. aureus*

	Media	Mediana	Moda
Concentración de 1000 mg/mL	5.85	5.65	9.20
Concentración de 500 mg/mL	5.75	6.15	8.10
Concentración de 250 mg/mL	5.69	4.95	7.80
Concentración de 125 mg/mL	5.42	6.30	6.40
Control positivo	42.65	42.40	38.00
Control negativo	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia

En la TABLA 10 que representa los halos de inhibición del extracto etanólico para *S. aureus* obtuvo resultados a una concentración de 1000 mg/mL de: 11.35 para media, 11.10 para mediana, 0.00 para moda; a una concentración de 500 mg/mL de: 11.72 para media, 11.60 para mediana, 14.20 para moda; a una concentración de 250 mg/mL de: 12.51 para media, 11.30 para mediana, 14.00 para moda; a una concentración de 125 mg/mL de: 11.68 para media, 11.65 para mediana, 16.40 para moda; para nuestro control positivo se obtuvo valores de: 42.65 para media, 42.40 para mediana, 38.00 para moda; y para nuestro control negativo se obtuvo valores de: 5.90 para media, 5.85 para mediana, 5.80 para moda.

3.7.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Hallamos la desviación estándar para saber cuál es la variación que presentan los halos lejanos al promedio, mediante la siguiente formula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Donde:

σ = desviación típica

n = número de datos u observaciones

x_i = *i*ésimo dato

\bar{x} = media o promedio aritmético

En (TABLA 11 y 12) colocamos los resultados de la desviación estándar para cada concentración

TABLA 11. Desviación estándar de los halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* sobre la cepa ATCC 35218 *E. coli*

	Desviación estándar
Concentración de 1000 mg/mL	± 0.00
Concentración de 500 mg/mL	± 0.00
Concentración de 250 mg/mL	± 0.00
Concentración de 125 mg/mL	± 0.00
Control positivo	± 4.60
Control negativo	± 0.00

Fuente: Elaboración propia

En la TABLA 11 se observa la desviación estándar para *E. coli* generados por nuestro extracto etanólico en donde no se observa oscilaciones en todas nuestras concentraciones debido a que la cepa no demostró sensibilidad a nuestro extracto, a diferencia del control positivo que obtuvimos una desviación estándar de 4.60 que representa cuan alejado está del valor medio.

TABLA 12. Desviación estándar de los halos de inhibición del extracto etanólico al 96% de tallos de *T. officinale* sobre la cepa ATCC 25923 *S. aureus*

	Desviación estándar
Concentración de 1000 mg/mL	± 2.64
Concentración de 500 mg/mL	± 2.48
Concentración de 250 mg/mL	± 3.37
Concentración de 125 mg/mL	± 3.23
Control positivo	± 3.97
Control negativo	± 0.00

Fuente: Elaboración propia

En la TABLA 12 observamos que la desviación estándar para la concentración de 1000 mg/mL fue de 2.74, para la concentración de 500 mg/mL fue de 2.75, para la concentración de 250 mg/mL fue de 3.50, para la concentración de 125 mg/mL fue de 3.14, para el control negativo fue de 0.48 y para el control positivo fue de 3.97. Obtuvimos que en la concentración de 250 mg/mL hubo una mayor desviación.

3.7.3 PRUEBA DE CHI CUADRADO

Con la prueba podemos corroborar la veracidad de nuestra hipótesis. Debemos tomar en cuenta que la prueba de antibiograma permite articular 2 grupos fundamentales por la escala de sensibilidad de Duraffourd (Sin sensibilidad y Sensible) y deben ser aplicados en los resultados obtenidos en los ensayos para cada concentración. En la (TABLA 13 y 14) realizamos la cuantificación de halos según la escala de sensibilidad frente a la concentración.

TABLA 13. Clasificación y cuantificación de los datos obtenidos por tamaño del halo a las diferentes concentraciones con la cepa ATCC 35218 *E. coli*

	Sensible	No es sensible	TOTAL
1000 mg/mL	0	20	20
500 mg/mL	0	20	20
250 mg/mL	0	20	20
125 mg/mL	0	20	20
0 mg/dL	0	20	20

Fuente: Elaboración propia

En la TABLA 13 obtuvimos que a la concentración de 1000 mg/mL había 0 elementos sensibles, a la concentración de 500 mg/mL había 0 elementos sensibles, a la concentración de 250 mg/mL había 0 elementos sensibles y a la concentración de 125 mg/mL había 0 elementos sensibles por lo cual no podemos realizar la prueba de chi-cuadrado, pues se aprecia la nula sensibilidad del extracto etanólico sobre *E. coli*.

TABLA 14. Clasificación y cuantificación de los datos obtenidos por tamaño del halo a las diferentes concentraciones con la cepa ATCC 25923 *S. aureus*

	Sensible	No es sensible	TOTAL
1000 mg/mL	5	15	20
500 mg/mL	5	15	20
250 mg/mL	4	16	20
125 mg/mL	3	17	20
0 mg/dL	0	20	20

Fuente: Elaboración propia

En la TABLA 14 obtuvimos que a la concentración de 1000 mg/mL había 5 elementos sensibles, a la concentración de 500 mg/mL había 5 elementos sensibles, a la concentración de 250 mg/mL había 4 elementos sensibles y a la concentración de 125 mg/mL había 3 elementos sensibles. Con los datos obtenidos procedemos a realizar la prueba de chi cuadrado como se aprecia en la TABLA 15.

TABLA 15. Prueba de chi cuadrado para los resultados obtenidos para la cepa ATCC

25923 *S. aureus*

TABLA DE CONTINGENCIA						
	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	0 mg/dL	TOTAL
Sensible	5	5	4	3	0	17
No es sensible	15	15	16	17	20	83
TOTAL	20	20	20	20	20	100

TABLA DE FRECUENCIA PORCENTUAL						
	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	0 mg/dL	TOTAL
Sensible	25%	25%	20%	15%	0%	17%
No es sensible	75%	75%	80%	85%	100%	83%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%	100%

TABLA DE FRECUENCIAS ESPERADAS						
	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	0 mg/dL	TOTAL
Sensible	3	3	3	3	3	17
No es sensible	17	17	17	17	17	83
TOTAL	20	20	20	20	20	100

CALCULO DEL CHI CUADRADO						
	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	0 mg/dL	TOTAL
Sensible	0.7529	0.7529	0.1059	0.0471	3.4000	
No es sensible	0.1542	0.1542	0.0217	0.0096	0.6964	
TOTAL						6.0950

Chi cuadrado =	6.0950
Grado de libertad =	4
Error =	0.05
Confianza =	0.95
Valor crítico =	9.4877
Coefficiente de Cramer =	0.2760

Fuente: Elaboración propia

Se obtuvo en la TABLA 15 un valor de chi cuadrado menor que el valor crítico, por ende, la hipótesis es rechazada. En cuanto al valor hallado en el coeficiente de Cramer siendo menor a 0.3, se demuestra que no existe relación alguna entre el efecto inhibitorio y la concentración de extracto etanólico.

CONCLUSIONES

1. Los especímenes recolectados, son efectivamente de la especie *Taraxacum officinale* F. H. Wigg, según la certificación taxonómica del Herbario Vargas CUZ (ANEXO 1).
2. El porcentaje de humedad es igual a 87.47% del peso total fresco de una muestra de *Taraxacum officinale*, mientras el porcentaje de rendimiento es igual a 2.53% del peso seco total de la muestra.
3. En el screening fitoquímico cualitativo se encontró que la especie vegetal poseía alcaloides, quinonas, esteroides, triterpenoides, flavonoides, taninos, cumarinas, lactonas, azúcares reductores y resinas.
4. Se encontró que el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* no genera efecto bactericida sobre *Escherichia coli* en las concentraciones de 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL y 125 mg/mL.
5. La media de los halos de inhibición generados por las concentraciones de 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL y 125 mg/mL para *Escherichia coli* son todas igual a 0 dado que no existe efecto inhibitorio.
6. Se encontró que el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* no genera efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* en las concentraciones de 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL y 125 mg/mL.
7. La media de los halos de inhibición generados por las concentraciones de 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL y 125 mg/mL son casi similares, por lo cual consideramos que el tamaño del halo no incrementa con la concentración a partir de 125 mg/mL.

SUGERENCIAS

- Se sugiere utilizar para la extracción el método de arrastre de vapor, porque se carece de investigaciones donde se hubiera podido emplear.
- Se podría utilizar otras especies bacterianas dentro de los Gram negativos para ver la posibilidad de que el extracto etanólico al 96% de tallos de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg colectado en la zona de Corao genere efecto bactericida.
- Se sugiere emplear otros disolventes para el proceso de maceración como, por ejemplo: Metanol, Benceno, Cloroformo o Etanol de 70°.
- Se sugiere experimentar con otras especies vegetales el efecto bactericida que podrían generar sobre las cepas ATCC 35218 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.
- Se recomienda realizar el análisis fitoquímico por métodos cuantitativos para la determinación de la composición fitoquímica para los tallos de *T. officinale* F. H. Wigg recolectados en la zona de Corao.
- Se sugiere realizar el análisis fitoquímico de *T. officinale* F. H. Wigg en otras zonas, poblados o distritos de la región Cusco.

BIBLIOGRAFÍA

- ABIS online. (2010). *Escherichia coli* - ABIS Encyclopedia. <https://www.tgw1916.net/Enterobacteria/Escherichia.html>
- ABIS online. (2020). *Staphylococcus aureus* sp. aureus - ABIS Encyclopedia. <https://www.tgw1916.net/Staphylococcus/aureus.html>
- American Type Culture Collection. (2020). *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers 35218TM. <https://www.atcc.org/products/35218>
- American Type Culture Collection. (2013). *Staphylococcus aureus* subsp. aureo Rosenbach 25923TM. <https://www.atcc.org/products/25923>
- Ayala Aguilar, J. L. (2019). Efectividad antimicrobiana del extracto etanólico del *Taraxacum officinale* (diente de león) al 50% y 100% sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Proyecto de investigación para obtener el Título de Odontóloga. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20095/1/T-UCE-0015-ODO-266.pdf>
- Azuero, A., Jaramillo Jaramillo, C., San Martin, D., y D'Armas Regnault, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador / Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. CIENCIA UNEMI, 9(20), 11-18. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp11-18p>
- Bermejo de Zaa, A. A., Pereira Cabrera, S., Cintra Jorge, M. L., y Morales Torres, G. (2014). Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana). <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v13n5/rhcm04514.pdf>
- Bernal Mercado, A. T. (2019). COMBINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PARA INHIBIR LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA EN SUPERFICIES DE SILICONA. COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/1159/1/Ariadna%20Thal%C3%ADa%20Bernal%20Mercado.pdf>
- Blount Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bullaín Galardis, M. M., Viera Tamayo, Y., & Avilés Tamayo, Y. (2014). Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco de las hojas de *Faramea occidentalis*. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v13n3/tamayo.html>
- Bush, L. M. y Vazquez Pertejo, M. T. (2020) Infecciones por *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. <https://www.msmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-y>

- Calvo, J., Martínez Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-antimicrobianos-S0213005X08000177>
- Cano Flores, A. (2013). Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000200002
- Carbajal Rojas, L., Hata Uribe, Y., Sierra Martínez, N., y Rueda Niño, D. (2009). Análisis Fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-07392009000100011
- Carranza Vega, D. E. & Huayanay Viera, J. A. (2009). Determinación de metabolitos secundarios del tallo de *Croton alnifolius* L. (Tunga). Universidad nacional de Trujillo. <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4852/Carranza%20Vega%20Dhail%20Elaine.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carrillo Hernández, D. M. y Galván Hernández, D. M. (2022). Actividad antimicrobiana de extractos de *Taraxacum officinale* y *Agave lechuguilla*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2022/05/Carrillo-y-Galvan-2022.pdf>
- CDC (2022) La *E. coli* y la seguridad de los alimentos. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html>
- Cervantes Garcia, E., Garcia Gónzales, R., & Salazar Schettino, P. M. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Chong, Y., Shimoda, S., & Shimono, N. (2018). Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 61, 185–188. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.005>
- Constantinides, B., Chau, K. K., Quan, T. P., Rodger, G., Andersson, M. I., Jeffery, K., Lipworth, S., Gweon, H. S., Peniket, A., Pike, G., Millo, J., Byukusenge, M., Holdaway, M., Gibbons, C., Mathers, A. J., Crook, D. W., Peto, T., Walker, A. S., & Stoesser, N. (2020). Genomic surveillance of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in hospital sink drains and patients. *Microbial genomics*, 6(7), mgen000391. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000391>
- Cortez Jambo, C. M., & Manayalle Saldaña M. (2022) Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Taraxacum officinale* (Diente de león) frente a *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar por el título profesional de Químico farmacéutico. <https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14140/814/TESIS%20CORTEZ%20-%20MANAYALLE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Espadero Bermeo, S. G. (2018) Comparación de la capacidad antioxidante de 4 metabolitos secundarios presentes en *Taraxacum officinale* (Diente de León) frente a N-acetil cisteína un antioxidante comercial. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Revisado el 26 de agosto de 2022. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16225/1/UPS-CT007881.pdf>
- ESSALUD. (2002). Formulario Nacional de Recursos Naturales y Afines. Guía de fármaco botánica. https://ww1.essalud.gob.pe/compendio/pdf/0000004872_pdf.pdf
- García Huamán, F., & Angeles Trauco, M. (2021). Efecto del extracto de plantas medicinales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniera*, 3(3), 31-35. doi: <http://dx.doi.org/10.25127/ucni.v3i3.633>
- González Castejón, M., Visioli, F. y Rodríguez Casado, A. (2021). Actividades biológicas diversas del diente de león, *Nutrition Reviews* , volumen 70, número 9, páginas 534–547. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00509.x>
- Harfouch, R. M., & Ghosh, S. (2021). Antibacterial Activities of Widely Spread *Taraxacum Officinale* Dandelion in Al-Qadmous, Syria as Potential Therapeutic Strategy for Antibiotic Resistant Bacteria. *March*. https://www.researchgate.net/publication/350140795_Antibacterial_Activities_of_Widely_Spread_Taraxacum_Officinale_Dandelion_in_Al-Qadmous_Syria_as_Potential_Therapeutic_Strategy_for_Antibiotic_Resistant_Bacteria
- Hernández Moreno, L. V., Pabón Baquero, L. C., y Hernández Rodríguez, P. (2021). Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 16(1), 43-56. <https://doi.org/10.18359/rfcb.4896>
- Holgado, M., Aranzabal, R., Acurio, J., Atausinche, H., Cuba, A., Vargas, J., Nauray, W., Mamani, M., Ruth, L., Garcia, K., Farfán, W., Kancha, C. (2015) DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS QUÍMICO DE *Taraxacum* “DIENTE DE LEÓN” EN URUBAMBA, CALCA, ANTA-CUSCO. <https://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/cantu/article/view/412/256>
- Huamaní Cárdenas, C. A. (2010). reaccion dragendorff, reaccion le rosen, reaccion mayer, reaccion yoduro yodato, reaccion FeCl3, reac nitrato de plata, reaccion de farmacos, analisis cualitativo de fármacos. Universidad Weiner. <https://www.slideshare.net/angelito290184/reaccion-dragendorff-reaccion-le-rosen-reaccion-mayer-reaccion-yoduro-yodato-reaccion-fecl3-reac-nitrato-de-plata-reaccion-de-farmacos-analisis-cualitativo-de-farmacos>
- Instituto de Salud Global Barcelona. (2020). 12 bacterias prioritarias en la investigación de antibióticos. <https://www.isglobal.org/-/bacterias-prioritarias-en-la-investigacion-de-nuevos-antibioticos>

- Jinchun, Z., & Jie, C. (2011). The effects of Taraxacum officinale extracts (TOE) supplementation on physical fatigue in mice. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 8(2), 128–133. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i2.63198>
- Koehler, H. A. (1887). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America/herausgegeben von G. Pabs.Köhler's Medizinal-Pflanzen. http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=13126&SID=85118kkgbp1u6n888odecjbvp&mobile=0&size=0&uhd=0
- Labbox. (2022). EVAPORADOR ROTATIVO: TODO LO QUE DEBE SABER. BLOG - LABORATORIO Y CIENCIA. <https://esp.labbox.com/evaporador-rotativo-todo-lo-que-debes-saber/>
- Leyva, E., Loredó Carrillo, S. E., López, L. I., Escobedo Avellaneda, E. G. & Navarro Tovar, G. (2016). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/download/320755/411246>
- Martínez Guerra, J. J. (2006). Estructura de los esteroides. Universidad autónoma de Aguascalientes. <https://libroelectronico.uaa.mx/capitulo-13-estructura/estructura-de-los-esteroide.html>
- Moncayo Rivera, Ch. M., Garzón Idrovo, G. B., Bernal Calle, J. A., Gonzáles Ortiz, J. P., Gómez Chacón, D. E. (2022). Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de diente de león (Taraxacum Officinale) frente a microorganismos patógenos. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v5i2.1.2155>
- NCBI (2020) Taxonomy browser (Staphylococcus aureus) - NCBI. Revisado: 16 de agosto del 2022. Recuperado: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&id=1280
- NCBI. (2018). Taxonomy browser (Escherichia coli) - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1269009&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI. (2018). Taxonomy browser (Taraxacum officinale) - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Taraxacum%20oficinale>
- Olivera Delgado, L. I. & Gutierrez Felix, E. G. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana “in vitro” sobre cuatro cepas atcc y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico al 96% de taraxacum officinale (diente de león) y del aceite esencial de *minthostachys spicata* (q’eshua muña).

http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/5580/253T20210011_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Organización Mundial de la Salud. (2021). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms#:~:text=%2D%20Staphylococcus%20aureus%20resistente%20a%20la,y%20en%20el%20hospitaly%20endocarditis>.

Piñero, J., Sifaoui, I., López, A. (2015). Desde el extracto crudo al compuesto puro. Universidad de la laguna. https://campusvirtual.ull.es/ocw/pluginfile.php/18761/mod_resource/content/2/OCW%20INES%20SIFAUI%20Final.pdf

Plantas y hongos. (1952). Diente de león, achicoria amarga, taraxacón, dente-de-leão (port.), taraxaco (port.), pissenlit (fran.), dent-de-lion (fran.), dandelion (engl.) *Taraxacum officinale* F. H. Wigg. (Asteraceae). Herbarium. https://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Taraxacum_officinale.htm

Reaño Ortega, C. K. (2014). Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos de *Aloysia triphylla* “cedrón”, *Rosmarinus officinalis* “romero”, *Mentha spicata* “hierbabuena”, *Portulaca oleracea* “verdolaga” y *Taraxacum officinale* “diente de león”. Tesis para obtener el título de Biólogo microbiólogo. Universidad de Trujillo. <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4801/Rea%c3%bl0%20Ortega%2c%20Cinthia%20Karina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rodriguez Pava, C. N., Zarate Sanabria, A. G. y Sánchez Leal, L. C. (2017) Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1963/2184>

Sacsquispe Contreras, R. E., y Velásquez Pomar, J. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30 - INS. https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_1_sensibilidad.pdf.

Salgado, P., Gilsanz, F., & Maseda, E. (2015). Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas [Therapeutic options for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 28 Supl 1, 12–15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26365727/>

- Sánchez y García Figueroa, F. L. (2022). Fitoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Publicaciones/libros/cbiologia/Fitoquimica.pdf>
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H. & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA. vol. 21. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
- Sohail, Zafar Iqbal, Muhammad Afzal, Aftab Afzal, Inayat Ur Rahman, Salma shad, Bilal Ahmed, Naveed Anjum, Kalsoom Qureshi, Afsana Bibi (2014). In vitro antibacterial study of Taraxacum officinale leaves extracts against different bacterial pathogenic strains. <https://www.researchgate.net/publication/272814797> In vitro antibacterial study of Taraxacum officinale leaves extracts against different bacterial pathogenic strains
- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (2010). Identificación de Quinonas. <https://sisbib.unmsm.edu.pe>
- Valdivia, C. (2020). Reactivo de Dragendorff. SCRIBD. <https://es.scribd.com/document/445711207/Reactivo-de-Dragendorff-docx#>
- Vazquez Pertejo, M. (2020). Pruebas de sensibilidad o antibiogramas. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas#:~:text=EI%20m%C3%A9todo%20de%20difusi%C3%B3n%20en,el%20microorganismo%20que%20est%C3%A1%20prob%C3%A1ndose>
- Wencewicz T. A. (2019). Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. Journal of molecular biology, 431(18), 3370–3399. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.033>
- Werth, B. (2022). Fosfomicina. Manual MSD. <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/fosfomicina>
- Xu, P., Xu, X. B., Khan, A., Fotina, T., & Wang, S. H. (2021). Antibiofilm activity against Staphylococcus aureus and content analysis of Taraxacum Officinale phenolic extract. Polish journal of veterinary sciences, 24(2), 243–251. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.137659>

ANEXOS

ANEXO 1. Certificado de identificación taxonómica de *Taraxacum officinale*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **RECTORADO**
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- **CIUDAD UNIVERSITARIA**
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- **CENTRAL TELEFÓNICA**: 232398 - 232210
243825 - 243836 - 243837 - 243838
- **LOCAL CENTRAL**
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 234015
- **MUSEO INKA**
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 10-2023-HVC-FCB-UNSAAC

La Directora del Herbario Vargas CUZ, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: el Sr. **Victor Andres Tapia Puma** y **Eddie Andre Farfan Zevallos**, estudiantes de la Escuela Profesional de Biología, han presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ, una muestra botánica para su determinación taxonómica (**expediente N° 515273**), para realizar el proyecto de investigación **ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE TALLOS DE *Taraxacum officinale* F. H. WIGG Y SU EFECTO BACTERICIDA IN VITRO EN CEPAS ATCC 35218 *Escherichia coli* Y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus***, la que al ser diagnosticada por el Mgt. Abel Monteagudo Mendoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del herbario, concuerdan con la siguiente especie; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN
1	Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg.	"diente de león"

Se le expide la presente certificación a petición formal de los interesados para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 07 de marzo de 2023

Blga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas CUZ



ANEXO 2. Cotización de las cepas bacterianas



COTIZACION GL - 23 / 057774

FECHA: Lunes, 9 de Enero de 2023

CLIENTE: **UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

ATENCION: Victor Andres Tapia Puma <170185@unsaac.edu.pe>

REFERENCIA: Cepas de referencia
Los Precios Incluyen I.G.V. (18%) de Ley

PRECIO: **NUEVOS SOLES**

ENTREGA: **A 60 DIAS**

VALIDEZ: 7 DIAS

PAGO: **PAGO ADELANTADO**

CODIGO	PRODUCTO	PRECIO UNITARIO S/.	CANT.	PRECIO TOTAL S/.
H05302-A	KWIK-STIK Escherichia coli derived from ATCC® 35218™ Marca: Microbiologics Cod. Proveedor: 0495P Presentación: Pack de 2 cepas liofilizadas no mayor al 3er. pasaje + Certificado de Análisis. Expira: No menor a los 06 meses.	488,96	1	488,96
H05378-A	KWIK-STIK Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach derived from ATCC® 25923™ Marca: Microbiologics Cod. Proveedor: 0351P Presentación: Pack de 2 cepas liofilizadas no mayor al 3er. pasaje + Certificado de Análisis. Expira: No menor a los 06 meses.	359,22	1	459,22
TOTAL				948,18

BLGA. YESENIA QUISPE
Asesor Comercial
yquispe@genlabperu.com

Producto sujeto a disponibilidad del proveedor y a la política de fechas de expira de Microbiologics.
Ver términos y condiciones.

Realice el pago con cheque a nombre de **GEN LAB DEL PERU S.A.C.**, en caso de Depósito Bancario, realice el abono en nuestra Cuenta Bancaria:
Banco Continental - Soles 0011-0139-0100024183-34 ó Banco BCP - Soles 193-1440607-0-84
CCI Continental - Soles 011-139-000100024183-34 ó CCI Banco BCP - Soles 002-193-001440607084-18

Jr. Capat' Yupanqui Nº 2434 - (Alt. Cdta. 8 Av. 2 de Mayo) - Linco - Lima 14 PERU
Telf.: 2037500 / 2037504 TeleFax: (51-1) 2037501
e-mail: ventas@genlabperu.com

ANEXO 3. Preparación de agar Sangre para siembra de cepa ATCC 35218 de *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*



Blood Agar Base

Medio no selectivo para el aislamiento y cultivo de diferentes microorganismos patógenos y no patógenos.

Intertec, Inc. y sus filiales
ESPAÑOL

DESCRIPCIÓN

Blood Agar Base es un agar para diversos usos que puede ser enriquecido con sangre o suero para favorecer el crecimiento de una gran variedad de organismos exigentes de importancia clínica. Cuando se añade sangre, este medio servirá para la determinación de reacciones típicas de hemólisis importantes para la diferenciación de estreptococos, estafilococos, y otros organismos. El Blood Agar Base también se puede utilizar sin necesidad de añadir sangre como un agar nutritivo o como un medio para el mantenimiento de cultivos a corto plazo.

FÓRMULA

Ingrediente	(g/l)
Triptosa	10.0
Extracto de Carne	10.0
Cloruro Sódico	5.0
Agar	15.0
pH 7.3 Final ± 0.2 a 25°C	

PRINCIPIO DEL METODO

La triptosa y el extracto de carne proporcionan aminoácidos, nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El Cloruro de Sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio. El Agar es el agente solidificante.

PREPARACIÓN

Medio deshidratado: Suspender 40 g del polvo deshidratado en 1 litro de agua destilada o fisiológica. Mezclar bien. Calentar hasta la ebullición removiendo frecuentemente hasta la completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio en botellas: Disolver el contenido de la botella en un baño con agua a 100°C (con el tapón ligeramente desenroscado) hasta su completa disolución. Comprobar la homogeneidad del medio disuelto, girar la botella si es necesario para ayudar a la homogenización. Enfriar a 45-50°C, mezclar bien evitando la formación de burbujas y distribuir en placas Petri de forma aseptica.

Para agar sangre, añadir 5-10% de sangre estéril desfibrosada de oveja (ref. 83394) o caballo (ref. 83294) a la Base enfriada a 45-50°C después de ser esterilizada. Mezclar rotando ligeramente y verter en las placas Petri o recipientes.

Agar sangre hervido (agar chocolate) se prepara calentando después de haber añadido la sangre. Calentar el medio de cultivo durante 10 minutos a 80°C, removiendo de vez en cuando hasta que el color pase a ser marrón. El uso del agar Chocolate con suplemento de sangre desfibrosada al 10% está recomendado para el aislamiento de especies de *Haemophilus* y *Neisseria*.

Para un aislamiento selectivo de *M. tuberculosis* se recomienda añadir sangre humana al 25% con un 1% de glicerol.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Procesar adecuadamente cada muestra o inocular en la superficie agarizada. Sembrar por estricción con un asa repetidamente para permitir el depósito de los estreptococos beta-hemolíticos sobre la superficie agarizada. El crecimiento bajo la superficie mostrará las reacciones hemolíticas evidenciando a la par estreptococos lábiles al oxígeno y estafilococos estables al oxígeno.

Incubar las placas en condiciones de aerobiosis, anaerobiosis ó en atmósfera enriquecida de CO₂, según los procedimientos establecidos de laboratorio.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Examinar el crecimiento en las placas y las reacciones hemolíticas después de 18-48 horas de incubación. Se pueden encontrar cuatro tipos diferentes de hemólisis en el agar sangre:

1. Alfa (α)-hemólisis: es la reducción de la hemoglobina a metahemoglobina en el medio que rodea a la colonia, ocasionando una descolorización verde del medio.
2. Beta (β)-hemólisis: es la lisis de los glóbulos rojos, produciendo una zona clara que rodea a la colonia.
3. Hemólisis Gamma (γ): indica que no se ha producido hemólisis. No destrucción de red blood cells ocurren debido a destrucción de los glóbulos rojos y el medio permanece insalterado.
4. Hemólisis Alfa-primo (α_1): hay una pequeña zona de hemólisis completa rodeada de una zona de lisis parcial.

Las reacciones hemolíticas de los organismos inoculados en este medio estarán inhibidas por el tipo de sangre animal empleada (caballo u oveja), y por las condiciones de incubación (aeróbicas o anaeróbicas). Cuando se emplea sangre de caballo las colonias de *Haemophilus haemolyticus* producirán beta-hemólisis imitando *Streptococcus pyogenes*.

ASPECTO

Medio deshidratado: suelto, homogéneo, beige claro.
 Medio preparado, antes de añadir la sangre, claro y marrón - Amarillo, después de la adición, rojo ceniza.

ANEXO 4. Preparación de caldo BHI (brain heart infusion) para la conservación de bacterias

© Lactobacter® - Brain Heart Infusion Broth - 8001 - 1000L/1000

Innovaciones de LIA
ESPAÑOL



Brain Heart Infusion Broth

Medio líquido para el cultivo de diferentes organismos exigentes y para la detección de estafilococos, de acuerdo a la ISO 6888.

DESCRIPCIÓN

Brain Heart Infusion Broth es un medio líquido utilizado para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes, incluyendo bacterias aeróbicas y anaeróbicas, desde muestras clínicas, ambientales y alimentos. Este medio se aconseja para el cultivo de estafilococos coagulasa-positivos staphylococci para el test de la coagulasa en plasma de acuerdo a la ISO 6888.

Brain Heart Infusion Broth está recomendado por la APHA para el análisis de aguas potables y aguas de descarga y por la CLSI para la preparación de los inoculos para los estudios de susceptibilidad antimicrobiana.

FÓRMULA

	(g/l)
Digerido Enzimático de Tejidos Animales	10.0
Infusión Deshidratada de Cerebro de Ternera	12.5
Infusión Deshidratada de Corazón de Ternera	5.0
Glucosa	2.0
Cloruro Sódico	5.0
Disodio Hidrógeno Fosfato, Anhidro	2.5

pH Final 7.4 ± 0.2 a 25°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El digerido enzimático y la infusión de corazón y cerebro suministran los aminoácidos, nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento de los microorganismos. La Glucosa es la fuente de carbohidratos. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico del medio. El Disodio hidrógeno fosfato es el tampón.

PREPARACIÓN

Medio deshidratado Suspender 37 g del polvo deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Calentar hasta la ebullición removiendo frecuentemente hasta la completa disolución. Distribuir en los recipientes finales. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Si se obtiene el cultivo directamente desde un tampón, introducir éste en el caldo después de ser inoculado en una placa Petri. Para muestras líquidas, transferir un asa de la muestra al caldo usando un asa estéril o pipeteando asepticamente la muestra a un medio en placa y al caldo. Examinar el crecimiento después de 24-72 horas de incubación.

Nota: Se recomienda que para la incubación anaeróbica el medio líquido debería reducirse antes de ser inoculado, sometiendo los tubos (con tapones parcialmente desentoraxados) a condiciones anaeróbicas durante 18-24 horas. Alternativamente, el medio se puede reducir llevándolo hasta 100°C en un baño. Desentoraxar los tapones parcialmente antes de calentar y cerrar cuando se enfrían a la temperatura ambiente.

Para realizar las pruebas de la coagulasa en plasma, según la ISO 6888, inocular los tubos de Brain Heart Infusion Broth con una colonia seleccionada desde placas de Baird Parker Agar (ref. 10020). Incubar a 37 ± 1°C durante 24 ± 2 horas. Añadir 0,1 ml de cada cultivo a 0,4 ml de plasma de conejo. Examinar después de 4-6 horas de incubación a 37°C para comprobar la coagulación del plasma.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La turbidez indica crecimiento microbico.

El test de la coagulasa se considera positivo si el volumen coagulado es superior a la mitad del volumen inicial del líquido.

ASPECTO

Medio deshidratado: suelto, homogéneo, beige claro.
Medio preparado: claro, ámbar

ANEXO 5. Preparación agar de Mueller Hinton para la replicación de bacterias

© Liofilchem® - Mueller Hinton II Agar (bio-2) (m-hii-2)



Mueller Hinton II Agar
Medium for antimicrobial susceptibility testing
by the disc diffusion technique, according to CLSI and EUCAST.

Instructions For Use
ENGLISH

DESCRIPTION
Mueller Hinton II Agar is a medium recommended for antimicrobial susceptibility testing of common, rapidly growing aerobic microorganisms by the disc diffusion technique (Kirby-Bauer method), as standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

TYPICAL FORMULA	(g/l)
Beef Extract	2.0
Acid Hydrolysate of Casein	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0
Final pH (7.3 ± 0.2 at 25°C)	

METHOD PRINCIPLE
Acid hydrolysate of casein and beef extract supply amino acids, nitrogen, minerals, vitamins, carbon and other nutrients which support the growth of microorganisms. Starch acts as a protective colloid against toxic molecules which can be present in the medium. Hydrolysis of starch during autoclaving supplies a little amount of glucose, which is a source of energy. Agar is the solidifying agent.
The Kirby-Bauer method is based on the diffusion, through the agar, of the antimicrobial substance which soaks the paper disc. Each disc has a single concentration of the antimicrobial agent that inhibits the microorganism growth showing an halo around the disc. The diameter of the inhibiting halo is correlated with the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).
Mueller Hinton II Agar is manufactured to contain low levels of thymine and thymidine and controlled levels of calcium and magnesium ions.

PREPARATION

Dehydrated medium Suspend 38 g of the powder in 1 litre of distilled or deionized water. Mix well. Heat until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 35 minutes. Cool to 45-50°C. Aseptically dispense in Petri dishes.

Medium in tube/bottle Melt the content of the tube/bottle in a water bath at 100°C (loosening the cap partially removed until completely dissolved). Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the tube/bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

TEST PROCEDURE

1. Prepare a standardized suspension of the test organism using either the direct colony suspension or growth method.
2. Dip a sterile cotton swab into the adjusted suspension.
3. Inoculate the surface of the plate by streaking the swab over the entire agar surface.
4. Apply the antimicrobial discs onto the surface of the inoculated agar plate.
5. Incubate aseptically at 35 ± 2°C for 16-18 hours.

INTERPRETING RESULTS
After incubation measure the diameter of the zone of complete inhibition including the diameter of the disc. Interpret zone sizes by referring to the current CLSI or EUCAST procedures and standards. Report the organism as susceptible, intermediate or resistant to the agents that have been tested.

APPEARANCE
Dehydrated medium: fine, dry, homogeneous, free of extraneous material, beige.
Prepared medium: slightly opalescent, amber.

STORAGE
The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store tubes, bottles and prepared plates at 10-25°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE
Dehydrated medium: 4 years.
Medium in tube/bottle: 2 years.
Ready-to-use plates: 6 months.

QUALITY CONTROL
The plates are controlled by performing antimicrobial susceptibility tests as defined by CLSI and EUCAST with the microbial strains indicated in the QC table.
Thymine and thymidine levels of raw materials are determined using the disc diffusion procedure with trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) discs and *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. Calcium and magnesium levels are controlled by testing raw materials and supplementing with sources of calcium and/or magnesium as required to produce correct zone diameters with aminoglycoside antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

ANEXO 6. Certificado de la cepa ATCC 35218 *Escherichia coli*



GenLab
del Perú

Thermo Fisher Scientific
Microbiology
12076 Santa Fe Trail Drive
12230 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215
800.255.6730
800.447.5761 fax
www.thermofisher.com

Certificate of Analysis

Product Name: E. coli ATCC 35218 PK/5
Lot Number: 643858

Product Number: R4601971
Expiration Date: 2024-09-25
(YYYY-MM-DD)

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

Purity:

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

Viability And Quantification:

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

Macroscopic And Microscopic Morphology:

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

Characterization:

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

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Negative Rod

Identification Profile: MicroSEQ® or Vitek® 2

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

ANEXO 7. Certificado de la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*



GenLab
del Perú

Thermo Fisher Scientific
Microbiology
12076 Santa Fe Trail Drive
12230 Santa Fe Trail Drive
Lenexa, KS 66215
800.255.6730
800.447.5761 fax
www.thermofisher.com

Certificate of Analysis

Product Name: S. aureus ATCC 25923 PK/5
Lot Number: 662143

Product Number: R4607010
Expiration Date: 2024-10-31
(YYYY-MM-DD)

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

Purity:

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

Viability And Quantification:

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

Macroscopic And Microscopic Morphology:

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

Characterization:

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

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Positive Cocci

Identification Profile: MicroSEQ® or Vitek® 2

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

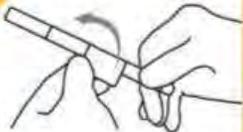
pH: N/A

ANEXO 8. Activación de cepas ATCC



INSTRUCCIONES CON ILUSTRACIONES

- 

Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
- 

Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquese a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
- Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agnate la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- 

Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- 

Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- 

De inmediato, sature el hisop abundantemente con el material hidratado y transfíralo al medio con agar correspondiente o utilícelo según el procedimiento operativo estándar del laboratorio.
- 

Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisop sobre un tercio de la placa.
- 

Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.
- 

Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.
Para ver el método de cultivo ingrese a la página del producto en www.microbiologics.com.

REGISTRO FOTOGRÁFICO



FIGURA 34. Fotografía de *Taraxacum officinale* F. H. Wigg (Diente de león) en la zona de Corao



FIGURA 35. Tallos colectados de *Taraxacum officinale*



FIGURA 36. Fotos de la muestra molida con etanol, antes y después de ser forrados.



FIGURA 37. Frasco con la muestra vegetal luego de la maceración



FIGURA 38. Doble filtración luego del macerado de *Taraxacum officinale* con etanol



FIGURA 39. Filtración del extracto



FIGURA 40. Fotografías del extracto etanólico luego de ser filtrado y comenzando su proceso de separación del etanol con la ayuda del rotavapor

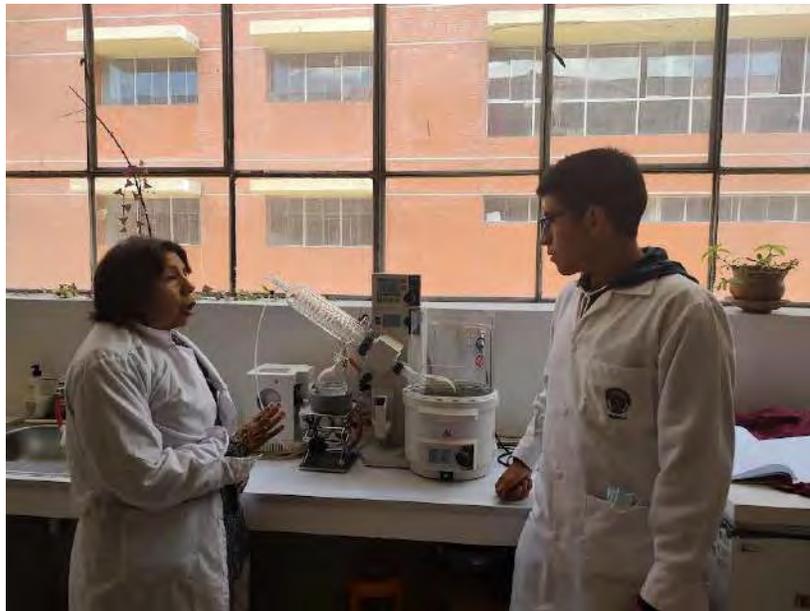


FIGURA 41. Recibiendo capacitación para el uso del rotavapor



FIGURA 42. Calibrando el rotavapor



FIGURA 43. Purificación y obtención del extracto etanólico

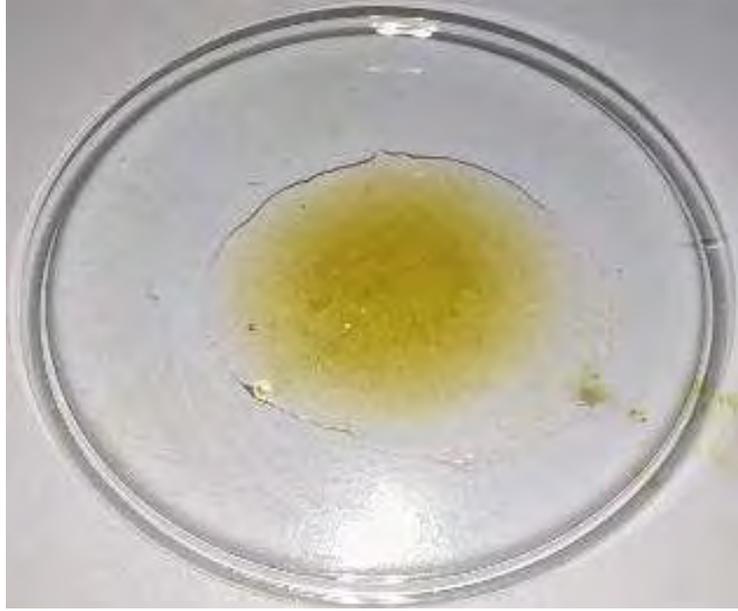


FIGURA 44. Ensayo de Dragendorff negativo



FIGURA 45. Ensayo de Mayer positivo



FIGURA 46. Ensayo de Wagner positivo



FIGURA 47. Análisis fitoquímico de Quinonas positivo



FIGURA 48. Análisis fitoquímico de Esteroides y triterpenoides libres positivo



FIGURA 49. Análisis fitoquímico de Flavonoides positivo



FIGURA 50. Análisis fitoquímico de Fenoles y Taninos con presencia de taninos pirocatecolicos



FIGURA 51. Análisis fitoquímico de Saponinas negativo



FIGURA 52. Análisis fitoquímico de Lactonas y cumarinas positivo



FIGURA 53. Análisis fitoquímico de Aminoácidos libres negativo

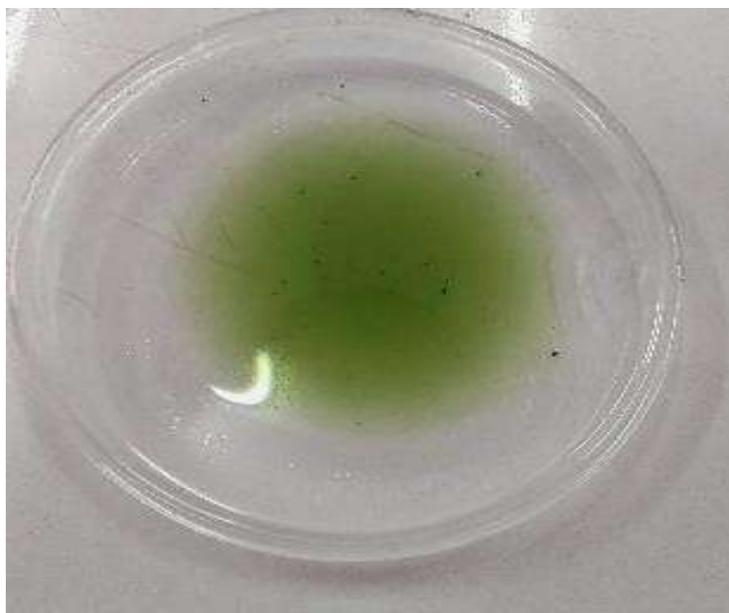


FIGURA 54. Análisis fitoquímico de Resinas positivo



FIGURA 55. Análisis fitoquímico de Azúcares Reductores positivo



FIGURA 56. Laboratorio de aguas y alimentos



FIGURA 57. Dimetil sulfoxido



FIGURA 58. Diluciones a concentraciones de 100,500,250 y 125 mg/mL



FIGURA 59. Discos preparados con papel filtro

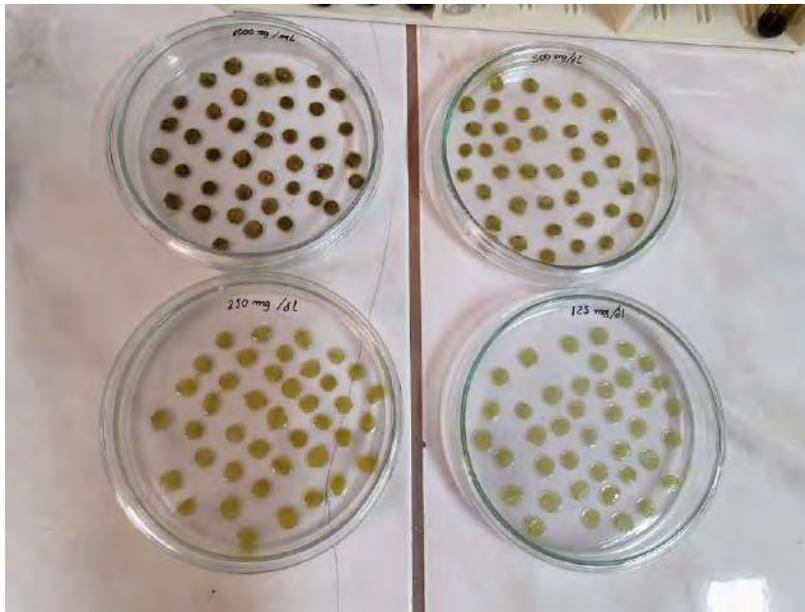


FIGURA 60. Discos impregnados con las diluciones a distintas concentraciones



FIGURA 61. Preparación del inóculo A (*E. coli*) y B (*S. aureus*)



FIGURA 62. Fase experimental de antibiograma



FIGURA 63. Colocando las muestras en la incubadora

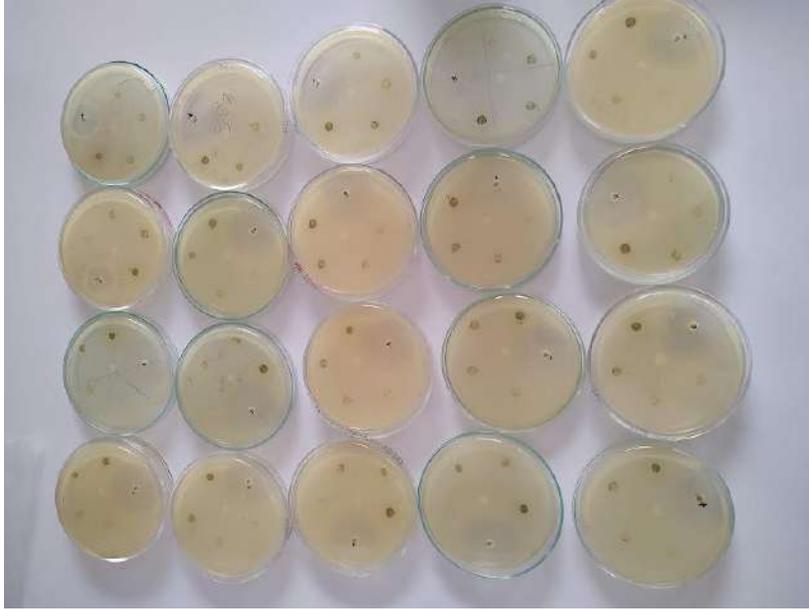


FIGURA 64. Resultado del antibiograma realizado para *Escherichia coli*



FIGURA 65. Antibiograma a detalle de *Escherichia coli*



FIGURA 66. Resultado del antibiograma realizado para *Staphylococcus aureus*



FIGURA 67. Antibiograma a detalle de *Staphylococcus aureus*



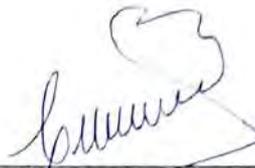
FIGURA 68. Alistando el material para ser llevado al autoclave



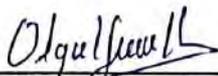
FIGURA 69. Auto clavando el material para ser usado en la evaluación bactericida



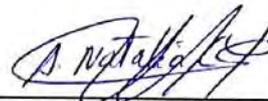
Dra. Julia Griselda Muñiz Duran
Primer Replicante



Dra. Carla Del Carpio Jimenez
Segundo Replicante



Blga. Olga Lilia Cjuno Huanca
Primer Dictaminante



Mgt. Aura Natalia Cantero Loaiza
Segundo Dictaminante