

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA
PERUANA**



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS
VEGETALES DE *Senna reticulata* (Willd) “retama” SOBRE
MICROORGANISMOS PATÓGENOS. IQUITOS-2012.**

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

PRESENTADO POR:

**BACH. BARRÍA ACOSTA GISELA
BACH. SÁNCHEZ TELLO ALBERT FRANCK**

ASESORA:

ING°. GLADYS CÁRDENAS DE REÁTEGUI

IQUITOS-PERÚ

2013

ii.

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE
Senna reticulata (Willd) “retama” SOBRE MICROORGANISMOS
PATÓGENOS. IQUITOS-2012.**

Gissela Barría A. ¹, Franck Sánchez T. ¹

¹Bachilleres en Farmacia y Bioquímica, UNAP.

RESUMEN

Se investigó la actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de la hoja y el extracto hidroalcohólico de vaina de *Senna reticulata* (Willd) “retama”. La especie fue recolectada en la localidad de Francisco de Orellana, de forma aleatoria; en la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto, Perú. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar (Método de Kirby- Bauer). Los microorganismos utilizados fueron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En el extracto etanólico de la hoja, 6 (37,5%) presentaron moderada actividad antimicrobiana significativa frente a *Escherichia coli*; con el extracto hidroalcohólico de la vaina, 11(68,8%) presentaron moderada actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus*. Los extractos con la mejor actividad antimicrobiana fueron el extracto etanólico de la hoja frente a *Escherichia coli* y el extracto hidroalcohólico de la vaina frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras Claves: *Senna reticulata*, actividad antimicrobiana, extracto etanólico, extracto hidroalcohólico.

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF VEGETABLE ABSTRACTS OF *Senna reticulata* (Willd) “retama” ON PATHOGENIC MICROORGANISMS
IQUITOS 2012.**

Gissela Barría A, ¹, Franck Sánchez T. ¹

¹ Bachelors at Pharmacy and Biochemistry, UNAP.

ABSTRACT

We investigated the antimicrobial activity in vitro of the ethanolic extract of the leaf and the hydroalcoholic extract of pod of *Senna reticulata* (Willd) "retama". The sort was gathered at Francisco's locality of Orellana, of aleatory form; At Iquitos's city, Loreto's department, Peru. The antimicrobial activity was evaluated by means of the method of diffusion in agar (Kirby Bauer's Method). The used microorganisms were bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. In the abstract etanólico of the sheet, 6 (37.5 %) presented moderate antimicrobial significant activity in front of *Escherichia coli*, with the pod's hydroalcoholic abstract, 11(68,8%) presented moderate antimicrobial significant activity in front of *Staphylococcus aureus*. The abstracts with the best antimicrobial activity were the abstract etanólico of the sheet in front of *Bacillus Coli* and the hydroalcoholic abstract of the pod in front of *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Senna reticulata*, antimicrobial activity, abstract etanólico, hydroalcoholic abstract.

iv.

*A mi **DIOS**, mi redentor, por su infinito amor, al otorgarme la paciencia y la fortaleza para no desmayar y así lograr mis metas.*

*A mis queridos padres, Luis y Rosa,
por sus buenos y sabios consejos, por su
confianza y apoyo incondicional en las decisiones
que tomo y sobre todo por enseñarme
que el éxito requiere de sacrificios.*

*A mi abuelita Teresita, por enseñarme
que primero esta **DIOS**
y porque a pesar de la distancia,
siento que esta junto a mí, apoyándome.*

*A mis hermanos Helmith, Luis Gabriel
y Grace Karolyn por ser las personas
por el cual debo de esforzarme
en ser mejor cada día.*

*A ustedes, mi amada familia, les debo
este triunfo, porque son el motivo para dar
al más máximo en cada etapa de mi vida.*

Gissela

v.

A mi DIOS, mi redentor, por su infinito amor, al otorgarme la paciencia y la fortaleza para no desmayar y así lograr mis metas.

*A mis queridos padres, Jorge y Gladis,
por sus buenos y sabios consejos, por su
confianza y apoyo incondicional en las decisiones
que tomo y sobre todo por enseñarme
que el éxito requiere de sacrificios.*

*A mi enamorada Milagros y a sus
Papás Eroita y Emilio por su valioso y
Desinteresado apoyo para lograr
este gran sueño.*

*A mis hermanas Anita, Cinthia, Silvia
y Karol por ser las personas
por el cual debo de esforzarme
en ser mejor cada día.*

*A ustedes, mi amada familia, les debo
este triunfo, porque son el motivo para dar
al más máximo en cada etapa de mi vida.*

Franck

AGRADECIMIENTO

A nuestros asesores, Q. F. Luis D. Nonato Ramírez; Blga. Maria E. Bendayán Acosta; Q. F. Luis Vílchez Alcalá; por habernos dedicado parte de su valioso tiempo y sus valiosas experiencias profesionales, sirviendo de guía en la orientación, corrección y contribución para la culminación de este trabajo de tesis.

A nuestra asesora Ing^o Gladys Cárdenas de Reátegui, por su abierta disponibilidad, enseñanza y constante presencia en todo momento.

Al Prof. Eliseo Zapata, por su amistad, paciencia y por ayudarnos en el análisis estadístico de los datos y haber convertido los problemas, en prácticas soluciones, así como también por su receptividad.

A todos los profesores de la facultad de Farmacia y Bioquímica que de alguna forma contribuyeron en nuestra formación como profesionales y personas de bien.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FF.BQ), por permitirnos el uso de sus instalaciones para la ejecución de nuestro proyecto de tesis.

vii.

A los Q F. Maria C. Granda Zamudio; con gratitud, por su amistad y apoyo en el trabajo (farmacia de hospitalización); lo que nos ha permitido dedicarnos a este proyecto con tranquilidad.

A todos los trabajadores de la facultad de Farmacia y Bioquímica, por su amabilidad y apoyo desinteresado en cada etapa de este proyecto.

A la Lic. Rosa Acosta Ampuero, por su valiosa colaboración en la redacción y procesamiento de la información.

A todos los amigos que de una u otra manera incentivaron a la culminación del presente estudio.

INDICE DE CONTENIDO	Pag.
Carátula	i
Resumen	ii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	viii
Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras	xii
Índice de Cuadros	xiii
Índice de Fotos	xiii
Índice de Anexos	xiv
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. OBJETIVOS	4
CAPÍTULO II	
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Clasificación taxonómica	8
2.3 Descripción botánica	8
2.4 Distribución geográfica	10

2.5 Principales compuestos presentes	11
2.6 Bacterias	12
2.6.1 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	12
2.6.2 Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.7 Métodos para el estudio de la actividad antimicrobiana en extractos de plantas medicinales.	14
2.7.1 Método de difusión en agar	14
2.8 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	15
2.8.1 Principales metabolitos secundarios presentes en <i>Senna reticulata</i>	15
2.8.2 Ensayos utilizados en el tamizaje fitoquímico	16
2.9 DEFINICIONES OPERACIONALES	18
2.9.1 Variable independiente (X)	19
2.9.2 Variable dependiente (Y)	20
2.10. Hipótesis	21
CAPÍTULO III	
3.1 MÉTODO DE INVESTIGACIÓN	22
3.1.1 Tipo de estudio	22
3.1.2 Diseño de investigación	22
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	23
3.2.1 Población bacteriana	23
3.2.2 Muestra bacteriana	23
3.2.3. Población vegetal	23
3.2.4 Muestra vegetal	23

3.3 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	24
3.3.1 Material vegetal	24
3.3.2 Material biológico	24
3.3.3 Medios de cultivo y reactivos	24
3.3.4 Materiales generales de laboratorio.	25
3.3.5 Equipos.	25
3.4 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.	26
3.4.1 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.	26
3.4.2. Procedimiento para la recolección.	26
3.4.2.1. Colección de la planta.	26
3.4.3 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.	27
3.4.3.1. Preparación del pulverizado vegetal.	27
3.4.3.2. Preparación del extracto etanólico.	27
3.4.3.3. Preparación del extracto hidroalcohólico.	27
3.4.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.	28
3.4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	31
3.4.5.1 Preparación de los discos de sensibilidad.	31
3.4.5.2 Prueba de sensibilidad según el Instituto Nacional de Salud.	31
3.5 ANÁLISIS DE DATOS	34
3.6 ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD	34
3.7 ASPECTOS ÉTICOS Y BIOÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	34

CAPÍTULO IV

I. RESULTADOS	35
II. DISCUSIÓN	62
III. CONCLUSIÓN	67
IV. RECOMENDACIONES	69

CAPÍTULO V

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
II. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	76
III. ANEXOS	78

ÍNDICE DE TABLAS

01. Variables a controlar en la ejecución del antibiograma por difusión.	14
02. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la hoja.	36
03. Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la vaina.	36
04. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de la hoja de <i>Senna reticulata (Willd)</i> “retama” según concentración.	37
05. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de vaina de <i>Senna reticulata (Willd)</i> “retama” según concentración.	37
06. Promedios y desviaciones típicas de diámetros del halo de inhibición por extracto etanólico de la hoja en microorganismos patógenos.	38
07. Promedios y desviaciones típicas de diámetros del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico de la vaina en microorganismos patógenos.	41
08. Análisis de la varianza de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de hoja en microorganismos patógenos.	44
09. Comparaciones múltiples de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de hoja en microorganismos patógenos.	46

xii.

10. Análisis de la varianza de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de vaina en microorganismos patógenos.	50
11. Comparaciones múltiples de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de vaina en microorganismos patógenos.	52
12. Porcentaje del diámetro de inhibición en la hoja.	56
13. Porcentaje del diámetro de inhibición en la vaina.	57
14. Actividad antimicrobiana en la hoja.	58
15. Actividad antimicrobiana en la vaina.	58
16. Estadísticos descriptivos del porcentaje de inhibición en la hoja.	59
17. Estadísticos descriptivos del porcentaje de inhibición en la vaina.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

01. Promedios de diámetros del halo de inhibición por extracto etanólico de la hoja en microorganismos patógenos.	39
02. Promedios y desviaciones típicas de diámetros del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico de vaina en microorganismos patógenos.	42
03. Comparaciones en intervalos de confianza de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de hoja en microorganismos patógenos.	48
04. Comparaciones en intervalos de confianza de los efectos entre los halos de inhibición de vaina por extracto hidroalcohólico en microorganismos patógenos.	54

ÍNDICE DE CUADROS

01. Fórmula para la Determinación del Porcentaje de Inhibición	33
02. Clasificación de la Actividad Antimicrobiana según el Porcentaje de Inhibición.	33
03. Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico de <i>Senna reticulata</i> (Willd) “retama”.	60
04. Tamizaje Fitoquímico del Extracto Hidroalcoholico de <i>Senna reticulata</i> (Willd)“retama”.	61

ÍNDICE DE FOTOS

01. Forma de las hojas de <i>Senna reticulata</i>	9
02. Flor de <i>Senna reticulata</i>	9
03. Forma del fruto de <i>Senna reticulata</i>	10
04. Estructura química de <i>Senna reticulata</i> spp.	11
05. Estructura química de Hidroxi- metoximetilantraquinonas.	11
06. Maceración del extracto etanólico de <i>Senna reticulata</i> “retama”.	27
07. Maceración del extracto hidroalcohólico de <i>Senna reticulata</i> “retama”.	27
08. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del Agar.	32
09. Forma de la hoja de <i>Senna reticulata</i> “retama”	83
10. Forma de la vaina de <i>Senna reticulata</i> “retama”	83

xiv.

11. Halos de inhibición por Efecto del Extracto Hidroalcohólico de <i>Senna reticulata</i> “retama” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según concentración.	84
12. Halos de Inhibición por Efecto del Extracto Etanólico de <i>Senna reticulata</i> “retama” frente a <i>Escherichia coli</i> según concentración.	86
13. Preparación de las placas, inoculación de los discos, siembra de microorganismos.	88

ÍNDICE DE ANEXOS

01. Certificado de identificación taxonómica de <i>Senna reticulata</i> (Will)	79
02. Flujograma de estudio para la obtención del extracto hidroalcohólico, y etanólico de hojas y vainas de <i>Senna reticulata</i> “retama”.	80
03. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el Método de Kirby- Bauer.	81
04. Medidas de Bioseguridad en el Laboratorio.	82
05. Pruebas de Normalidad de los Diámetros de los Halos de Inhibición por Extracto Etanólico e Hidroalcohólico en Microorganismos Patógenos.	89
06. Pruebas de Levene sobre la Igualdad de las Varianzas Error del Halo de Inhibición por Extracto Etanólico (hoja) e Hidroalcohólico (vaina) de <i>Senna reticulata</i> “retama” (Will) en Microorganismos Patógenos.	90

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La existencia de amplias áreas protegidas reconocidas por su alta diversidad en especies medicinales, representan el punto de partida para el estudio de la relación entre la naturaleza y la salud, que contribuirán a la mejora de la salud ambiental y del hombre, contrarrestando las enfermedades por diversos agentes patógenos e inadecuados estilos de vida del hombre moderno, creando la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamientos, con una tendencia de volver a las costumbres ancestrales: el uso de plantas, para la cura de sus enfermedades. (ZULUAGA G.1994).

El estudio de las plantas medicinales, ha sido apoyado frecuentemente por diferentes organizaciones internacionales. La Asamblea Mundial de la Salud (WHO, 1991) y la Organización Mundial de la Salud, quienes con el proyecto “Salud y Medicina Tradicional” han dado mucho valor a los fitomedicamentos, teniendo en cuenta que la población mundial usa plantas como su fuente primaria de agentes medicinales, representando el 25% (WHO, 1996), y en los países en desarrollo la participación de las plantas medicinales alcanza el 80%. (SANGAMA D, *et al.* 2009).

El Perú es uno de los 12 países privilegiados con mayor biodiversidad del planeta. Se calcula que existen alrededor de 250,000 plantas medicinales en los bosques tropicales, 2,000 de las cuales se encuentran en nuestra región amazónica (60% del territorio). (GIULIANO G, *et al.* 2003).

Las propiedades medicinales de *Senna reticulata*, esta relacionada con los diversos metabolitos secundarios presentes en ella, cuyo efecto puede variar dependiendo de las partes de la planta a utilizar (corteza, raíz, hoja, vaina, flores y semillas), (CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS M. 2008) cuyas hojas son utilizadas en el tratamiento antidiarreico, abscesos en la piel y sus flores para el tratamiento

antidiurético e infecciones urinarias, de allí que exista un creciente interés por conocer sus principios activos, y su actividad antimicrobiana. (WHO, 1991).

El consumo de plantas medicinales, dentro de ellas *Senna reticulata* tiende a desarrollar programas que fomenten el uso adecuado de estos recursos terapéuticos ancestrales, siendo fundamental intensificar las investigaciones con el fin de determinar su eficacia y evaluar su potencial como fuente de nuevas drogas, ya que es de suma importancia descubrir nuevos compuestos que sean más eficaces, y de menor toxicidad para tratar diferentes infecciones bacterianas ocasionadas por agentes patógenos. (WHO, 1996).

Las enfermedades entéricas producidas por microorganismos como *Escherichia coli* ocasionan una gran parte de la carga de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo, provocando el mayor número de muertes en niños de 5 años de edad en todo el mundo, (RENGIFO, *et al* 1997). Otros microorganismos como *Staphylococcus aureus* es responsable del 50% de dichas infecciones (ANGULO., 1999).

Con la finalidad de contribuir a la solución de este problema de salud pública, se desarrolló este trabajo de investigación que tiene por propósito contribuir a la obtención de fármacos naturales, seguros y eficientes que pudieran servir como modelo para el desarrollo de moléculas sintéticas apropiadas para la producción de antimicrobianos efectivos y más específicos, mediante pruebas *In vitro*. (ANGULO., 1999).

En el presente trabajo de investigación presentamos los resultados obtenidos de la investigación de los extractos vegetales de *Senna reticulata* “retama” que permiten su uso como agente antimicrobiano sobre microorganismos patógenos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, de mayor importancia en Salud Pública, planteándose la siguiente interrogante:

1.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentará actividad antimicrobiana los extractos vegetales de *Senna reticulata* (Willd) “retama” sobre microorganismos patógenos. IQUITOS-2012?

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General.

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Senna reticulata* “retama” sobre microorganismos patógenos.

1.2.2 Objetivos Específicos.

- ✚ Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico (hoja) e hidroalcohólico (vaina) de *Senna reticulata* “retama” sobre microorganismos patógenos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por el Método de Difusión en agar (Método de Kirby - Bauer).

- ✚ Desarrollar el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico (hoja) e hidroalcohólico (vaina) de *Senna reticulata* “retama.

- ✚ Analizar y procesar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 ANTECEDENTES

Costa, 1977. En la evaluación e identificación de los constituyentes vegetales, se demostró la acción desinfectante de los metabolitos secundarios, en mayor proporción estuvo taninos, concedida por su carácter fenólico.

Baron, et al. 1990. En la validación microbiológica; de las bacterias, se demostró la actividad antimicrobiana frente a los extractos vegetales, entre ellos, el extracto hidroalcoholico, mediante la estructura de la membrana que posee dicha bacteria.

Román, 1999. En la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos- Lima, realizaron el tamizaje fitoquímico, de *Spartium junceum* “retama”, determinándose metabolitos secundarios como: glicósidos cianogénicos, alcaloides y taninos.

Pareja et al., 2002. En la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, encontraron que *Senna reticulata* “retama” presenta proteínas, flavonoides, taninos y terpenos, determinando que el zumo de las hojas tiene efecto antiinflamatorio y cicatrizante.

Delgado, et al. 2003. En el presente estudio se realizó la determinación fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales, demostrándose el mecanismo de acción, siendo dos aminoácidos esenciales para realizar la actividad antimicrobiana.

Gorriti, et al. 2003. En la investigación realizada, se presentó los resultados del análisis antimicrobiano; demostrándose la formación de halos de inhibición de crecimiento microbiano frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, cuando se evaluó con el extracto hidroalcohólico de *Senna reticulata* (Willd), por el método de placas petri excavadas cuyos resultados validan sus actividades antimicrobianas.

Callapiña, et al., 2005. En el extracto acuoso de las flores de *Spartium junceum* L. “retama”, no encontraron actividad mutagénica evidente con ninguna de las cepas, con o sin actividad metabólica, en la investigación realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Robbins, et al., 2005. En las hojas de *Senna reticulata* (Willd.)H. Irwin & Barneby, realizaron el aislamiento del ácido cássico por la acidificación meticulosa de una solución alcalina diluida y determinaron que presenta actividad antibiótica *in vitro* en *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, y *Neisseria gonorrhoeae*.

Goncalves, et al. 2005. En el presente estudio se realizó diversos estudios, que comprenden análisis farmacognósticos y actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de *Senna reticulata* (Willd), mostro la presencia de carbohidratos, compuestos terpenoides y fenólicos (taninos y flavonoides).

Pérez, 2006. En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y el Herbario de la Facultad de Forestales de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se determinó el efecto sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. (Curculionidae), plaga del Pijuayo *Bactris gasipaes kunth*, de diez plantas con potencial biocida: entre ellas “retama común” (*Cassia fistula* L).

Isaza G, 2006. En la validación de los efectos farmacológicos atribuidos a las hojas de *Senna reticulata* (Willd), se determinó que el efecto cicatrizante del extracto etanólico de las hojas es significativo, encontrándose que a mayor concentración mayor actividad terapéutica.

Sangetha et al, 2008. En el estudio realizado a los extractos etanólico e hidroalcohólico de la planta entera de *Senna reticulata* (retama), mostraron actividad significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Nunes Dos Santos R. 2008. En la evaluación Fitoquímica de dos extractos etanólicos de *Senna reticulata* Willd., se encontró seis antraquinonas, un flavonoide y una biantrona, identificando mistura de dos triterpenos y dos fitoesteróides glicosilados en forma libre. Otra etapa del trabajo fue dedicada al estudio farmacológico que a través de ensayos se analizó el potencial antioxidante, actividad antiparasitaria, antimicrobiana y anticonvulsivante de los extractos etanólicos.

Ruiz Q. J. et al. 2009. R A. (2009). En su trabajo citan que varios constituyentes de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, fueron aislados e identificados, entre los cuales incluyen a los carotenoides, terpenoides, flavonoides, taninos y trazas de alcaloides, resultados semejantes a los obtenidos en esta investigación.

Cristancho et al., 2009. En los extractos acuosos de las hojas de *Senna reticulata*, “dorancé”, se evaluó el efecto sobre la glicemia de los extractos acuosos administrados a ratas con diabetes inducida por aloxano, demostrándose estadísticamente que esta planta posee acciones hipoglicemiantes.

2.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

De acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist *et al.*, 1981, se ubica en las siguientes categorías taxonómicas: (DE WIT H. 2005).

Reino	: <i>Plantae</i>
División	: <i>Magnoliophyta</i>
Clase	: <i>Magnoliopsida</i>
Subclase	: <i>Rosidae</i>
Orden	: <i>Rosales</i>
Familia	: <i>Fabaceae</i>
Género	: <i>Senna</i>
Especie	: <i>Senna reticulata Willd</i>
Nombre común	: retama
Sinonimia	: <i>Cassia reticulata Willd. V</i>

2.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol que alcanza una altura de 10 metros. Sus hojas son pinnadas, de hasta 70 centímetros de longitud, con 6 a 14 pares de folíolos, oblongos de 4 a 15 centímetros de longitud. Sus racimos terminales tienen numerosas flores de color amarillo dorado, con los sépalos ligeramente distintos entre sí. Su fruto es lineal y oblongo, de 15 centímetros de longitud y 2 centímetros de ancho, delgado, plano y glabro. Sus semillas son alargadas, pequeñas y de color negro al madurar. (FONT QUER P. 1985). La familia Fabaceae, es extraordinariamente rica en especies. Se halla difundida por toda la tierra constituida por numerosas plantas con más 12000 variedades de hierbas, matas y árboles. Las formas leñosas se ubican principalmente en las regiones tropicales, las herbáceas mayormente en las extratropicales.

Hojas: Compuestas imparipinnadas, alternas, con estípulas; con 7-13 pares de foliolos, ampliamente oblongos a ligeramente obovados y asimétricos, 7-19 cm de largo y 3-7 cm de ancho, ápice redondeado, base inequilátera y obtusa, haz opaca, envés pubérulo. La planta por la noche cierra sus hojas. (RENGIFO, *et al*, 1997).



FOTO N° 01: Forma de las hojas de *Senna reticulata*

Raíz: La retama, *Senna reticulata* (Willd.). Presenta una raíz típica, axonomorfa, profunda y se orientan en busca del agua del subsuelo. Sus hojas simples, oblongas, enteras, algo pilosas en el dorso, de 14 cm de longitud por 5 cm ancho en promedio, enteras, con ápice y bases agudos. El nervio principal está impreso en el haz y el relieve en el envés; la nervación secundaria es inconspicua, laminas glabras. (RENGIFO, *et al*, 1997).

Flores: Las flores son papilionadas de simetría irregular, la prefloración de la corola es imbricada descendente, y presenta los estambres soldados unidos por sus filamentos, es monodelfo, formando un solo haz alrededor del pistilo, el gineceo de unos 2 cm de longitud con ovario súpero alargado pubescente, estilo incurvado y el estigma capitado, el cáliz cupuliforme y oblicuo irregularmente dentado. (RENGIFO, *et al*, 1997).

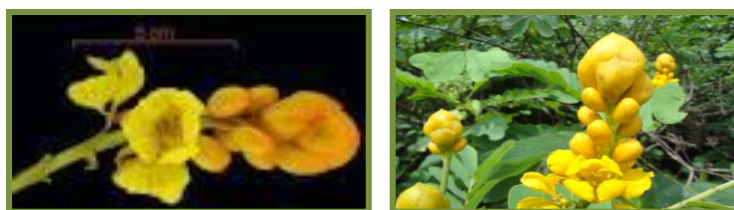


FOTO N° 02: Flor de *Senna reticulata*

Frutos: Frutos legumbres de 4 a 6 cm de longitud de color verduzco a marrón claro, pubescentes con 15 a 20 semillas por vaina. (RENGIFO, *et al*, 1997).



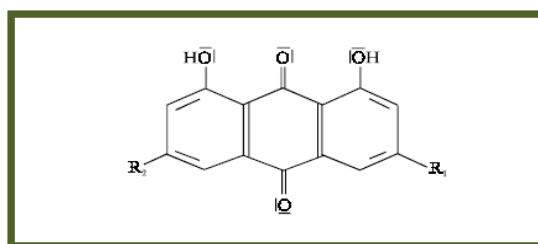
FOTO N° 03: Forma del fruto de *Senna reticulata*

2.1.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA.

Ampliamente distribuida en los bosques tropicales primarios y secundarios de América Central y América del Sur. En el Perú se localiza en los departamentos de Amazonas, Junín, Loreto, Pasco y San Martín. La retama, *Senna reticulata* (*Willd*), es una especie que crece en forma silvestre. Requiere de un clima tropical y seco, es muy resistente a las sequías vegetando en suelos estériles, pedregosos y áridos. Existe la retama de tintoreros “*Genista tinctora L*”, la cual posee propiedades diuréticas al tomar infusiones de flores en menos concentración, pero a mayor concentración se utiliza como laxante o purgante. La retama Gayomba “*Spartium junceum L*” llamada retama de olor, presenta el alcaloide citisina. (CÁCERES, A.1996).

2.1.5 PRINCIPALES COMPUESTOS PRESENTES

Contiene alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, quinonas, glicósidos antraquinónicos, asimismo es una fuente potencial de 1,8 dihidroxiantraquinonas, hidroxi- metoxiantraquinonas, 1,8-dihidroxi-9-oxo-antronas, diantronas y 2,2- bi-antraquinonas denominadas casianinas. Las antraquinonas elaboradas por el género *Cassia* pueden ser agrupadas en antraquinonas simples y complejas. Las antraquinonas simples tienen como base el esqueleto carbonato 1,8-dihidroxiantraquinónico, sustituido en la posición C- 3 por grupos metilo, hidroximetileno, metoxilo o carboxilo. (SISBIB, UNMSM 2004).



(I) $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R_2 = \text{H}$ Álloe-emodina
 (II) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ Crisofanol
 (III) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{OH}$ Emodina

(IV) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{OCH}_3$ Fisciona
 (V) $R_1 = \text{COOH}$ $R_2 = \text{H}$ Reina

1,8-Dihidroxiantraquinonas en *Cassia* spp

FOTO N° 04: Estructura química de *Senna reticulata* spp.

En las hidroxi-metoxi-metilantraquinonas se observa el incremento de metoxilación en el anillo B, como es el caso de la aurantio-obtusina que presenta la metoxilación más alta de las antraquinonas naturales. (SISBIB - UNMSM 2004).

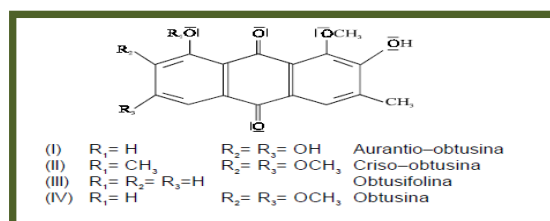


FOTO N° 05: Estructura química de *Senna* spp.
 Hidroxi-metoximetilantraquinonas

2.1.6 BACTERIA GRAM NEGATIVA

Escherichia coli

Clasificación Científica

Reino : Bacteria
Filo : Proteobacteria
Clase : Gamma Proteobacteria
Orden : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Género : *Escherichia*
Especie : *Escherichia coli*

Nombre binomial

Escherichia coli

2.1.6.1 Generalidades:

Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*, es una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos de los animales. Incluido el humano y, por ende, en las aguas negras. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. (GIRON J, *et al.* 1995).

Actualmente se ha demostrado mediante estudios clínicos la existencia en el ser humano de *Escherichia coli*. En el proceso evolutivo ha sufrido cambios genéticos, que han conducido a que estas clonas desarrollen la capacidad de causar diferentes enfermedades incluso en individuos sin trastornos inmunitarios graves. (GIRON.J, *et al.* (1995).

2.1.7 BACTERIA GRAM POSITIVA

Staphylococcus aureus

Clasificación Científica	
Reino	: Bacteria
Filo	: Firmicutus
Clase	: Cocci
Orden	: Micrococcales
Familia	: Micrococcaceae
Género	: <i>Staphylococcus</i>
Especie	: <i>Staphylococcus aureus</i>
Nombre binomial	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

2.1.7.1 Generalidades:

Se compone de *staphylé*, que significa racimo y *coccus*, que significa grano, baya o uva; y del latín *aureus* que significa dorado. Este nombre significa racimo de uvas dorado y lo lleva en función de su morfología microscópica y su color dorado en el cultivo de agar-sal-manitol. (INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES. 2007).

Epidemiología:

Los seres humanos son un reservorio natural de *Staphylococcus aureus*. Entre el 30 y el 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y el 20% se mantienen colonizados persistentemente. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal del ser humano y tiene colonización selectiva de narinas (20-40%), en adultos. (INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES. 2007).

2.1.8 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES.

2.1.8.1 Método de difusión en Agar:

Es el método más utilizado por su sencillez y rapidez en la lectura de resultados de difusión por discos, basados en la metodología utilizada por Bauer *et al* (BAUER *et al*, 1966). El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de un microorganismo u otra sustancia en un sustrato, (usualmente discos de papel) en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio; se formará así, por difusión un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del producto en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria o microorganismos en estudio. GARCIA R. *et al*. (2000).

Tabla N° 01: Variables a controlar en la ejecución del antibiograma por difusión.

Inoculo	
Medio de cultivo	Formulación
	Contenido de Ca y Mg
	Contenido de timidina
	Ph
	Profundidad del agar
Sensidiscos	Concentración (carga)
	Mantencion
	Número apropiado
Incubación	Atmósfera
	Temperatura
	Tiempo de incubación
Lectura e interpretación de halos de inhibición	

Fuente: (VARGAS C. 2007).

2.1.9 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. (Ugaz O. 1994).

2.1.9.1 Principales Metabolitos Secundarios.

✚ **Cumarinas:** Son compuestos derivados de la benzo- α - pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Están presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitirobóticas y vasodilatadoras. Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral. (Machado L. 2003.)

✚ **Alcaloides:** Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo. (Machado L. 2003.)

✚ **Flavonas:** Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. (Machado L. 2003.)

✚ **Quinonas:** Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. (Machado L. 2003.)

✚ **Taninos:** Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona se usan principalmente como curtientes, son absorbidos por las pieles forman combinaciones insolubles, transformándolas en cueros. (Machado L. 2003.)

✚ **Saponinas:** Son los componentes principales de varios extractos de plantas, tienen actividad antiprotozoaria. Las saponinas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular. (Machado L. 2003.)

2.1.9.2 Ensayos Utilizados en el Tamizaje Fitoquímico. (Ugaz O. 1994); (Machado L. 2003.)

✚ **Ensayo de Mayer y el de Wagner.** Permiten identificar alcaloides, se procede de la forma descrita para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución ácida. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito.

✚ **Ensayo de Borntrager.** Se emplea para la identificación de quinonas. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo. La presencia de triterpenos y/o esteroides.

- ✚ **Ensayo de Ninhidrina.** La presencia de aminoácidos libres o de aminas en general se realiza a través de este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.
- ✚ **Ensayo de Shinoda.** Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES

2.2.1 Variable Independiente (X)

- Extracto hidroalcohólico de vaina y etanólico de hoja de *Senna reticulata* “retama”.

Indicador:

- Dosis de los extractos de hoja y vaina de *Senna reticulata* “retama”: 7.5; 15; 22.5; 30 mg/ml.

2.2.2 Variable Dependiente (Y)

- Actividad antimicrobiana *In Vitro*

Indicador:

- Medición Ø de halos:
 - Resistente: 0.0 mm y 10 mm.
 - Intermedio: 11 mm y 15 mm
 - Sensibles: 16 mm a más
- Diámetro del halo de inhibición:

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inactivo	< 55%
Poco activo	55 – 65 %
Moderadamente activo	66 -80 %
Buena actividad	> 80 %

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: VARIABLE INDEPENDIENTE (X)

VARIABLE INDEPENDIENTE (X)	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
<i>Extracto etanólico (hoja) e hidroalcohólico (vaina) de Senna reticulata “retama”.</i>	<p>Mezcla de metabolitos secundarios obtenidos por maceración a partir de diferentes órganos de una especie vegetal.</p> <p>(hoja y vaina) de <i>Senna reticulata</i> “retama”.</p>	<p>Extracto hidroalcohólico:</p> <p>Producto de la extracción de la hojas y vainas de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) “retama”, obtenida por maceración con etanol 96° C en una proporción 70:30, (etanol- agua), para su posterior filtrado y conservación.</p> <p>Extracto etanólico :</p> <p>Producto de la extracción de las hojas y vainas de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) “retama”, obtenidos por maceración en etanol 96° C, posteriormente se filtra, luego se procede a ser conservados en frascos de vidrio de color ambar.</p>	<p>Dosis:</p> <p>7.5; 15 22.5;30 (mg/ml)</p>	<p>Intervalo</p> <p>Tipo:</p> <p>Cuantitativo</p>

Fuente: Elaborado por los autores.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: VARIABLE DEPENDIENTE (Y)

VARIABLE DEPENDIENTE (Y)	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA								
<i>Actividad antimicrobiana</i>	Capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento del microorganismo o de producir su muerte.	Capacidad Antimicrobiana: Determinación del halo de inhibición tras la aplicación en el medio de cultivo, de los discos de sensibilidad impregnados con los extractos en estudio.	<ul style="list-style-type: none"> Medición Ø de halos: Resistente: 0.0 mm y 10 mm. Intermedio: 11 mm y 15 mm Sensibles: 16 mm a más Diámetro del Halo de inhibición (mm): <table border="0"> <tr> <td>Inactivo</td> <td>< 55%</td> </tr> <tr> <td>Poco activo</td> <td>55 – 65 %</td> </tr> <tr> <td>Moderadamente activo</td> <td>66 -80 %</td> </tr> <tr> <td>Buena actividad</td> <td>> 80 %</td> </tr> </table> 	Inactivo	< 55%	Poco activo	55 – 65 %	Moderadamente activo	66 -80 %	Buena actividad	> 80 %	Intervalo Tipo: Cuantitativo
Inactivo	< 55%											
Poco activo	55 – 65 %											
Moderadamente activo	66 -80 %											
Buena actividad	> 80 %											

Fuente: Elaborado por los autores.

2.3 HIPÓTESIS

Los extractos etanólico e hidroalcohólico obtenidos de la hoja y vaina de *Senna reticulata* “retama” (Willd), utilizadas en el tratamiento de infecciones bacterianas presentan actividad antimicrobiana *in vitro*.

CAPÍTULO III

3.1 MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1 Tipo de estudio:

- ♣ **Experimental:** El estudio permitió establecer relación de causa y efecto, a través de procedimientos controlados donde se manipuló y controló las variables.
- ♣ **Prospectivo:** Se determinó la relación entre las variables sobre los resultados que se obtuvo. Se registró los hechos ocurridos a partir de la fecha de ejecución.

3.1.2 Diseño de investigación:

Los extractos se obtuvieron por maceración, posteriormente se realizó la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* y la identificación de metabolitos secundarios (Tamizaje fitoquímico).

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de Kirby-Bauer cultivo *in vitro* con cepas de control de: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se analizó el extracto etanólico de la hoja e hidroalcohólico de vaina a concentraciones de 7.5; 15; 22.5; 30 mg; se determinó el porcentaje de inhibición a través de la medición del halo de inhibición formado alrededor de los discos que contendrán los extractos hidroalcohólico etanólico de las hojas y vainas de *Senna reticulata*, se determinó activos a aquellos extractos con actividad moderadamente activa 66-80%, buena actividad antimicrobiana >80 %

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1 Población Bacteriana:

El estudio se realizó en cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, provenientes del Instituto Nacional de Salud, con sede en la ciudad de Lima.

3.2.2 Muestra bacteriana:

Estuvo conformado por el número de colonias que se empleó para la preparación del inóculo bacteriano, esta oscilo entre 3 a 5 colonias de tamaño y morfología similar.

3.2.3. Población vegetal:

Constituida por la especie vegetal de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, que se encuentran en la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto, Perú.

3.2.4 Muestra Vegetal:

Se emplearon 500 gramos de hojas y vainas de *Senna reticulata* (Willd.) “retama”, que fueron recolectadas en la localidad de Francisco de Orellana, de forma aleatoria; cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Material vegetal en buen estado de conservación.
- Material vegetal recolectado en el transcurso de las 2 y 3 de la tarde.

Criterios de exclusión:

- Material vegetal que se encuentre en mal estado de conservación y que presente signos visibles de descomposición microbiana.
- Material vegetal no recolectado en el transcurso de las 2 y 3 de la tarde.

3.3 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.3.1 Material vegetal

- Extracto etanólico de *Senna reticulata* “retama” (hoja).
- Extracto Hidroalcoholico de *Senna reticulata* “retama” (vaina).

3.3.2 Material biológico

- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

3.3.3 Medios de cultivo y Reactivos

- Agar Mueller Hinton
- Caldo Mueller Hinton
- Caldo Nutritivo
- Discos de sensibilidad antibiótica (Gentamicina)
- Cloruro de Bario (BaCl₂)
- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄)
- Agua destilada
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Wagner.
- Reactivo de Mayer.
- Disolución de cloruro férrico al 5%.
- Disolución de Ninhidrina al 5%.
- Disolución de hidróxido de potasio al 5,7%.
- Disolución de ácido clorhídrico al 1% y 10%.
- Etanol 96° C

3.3.4 Materiales generales de laboratorio

- Asa de inoculación
- Embudo
- Gradillas para tubos de ensayo
- Hisopos estériles
- Guantes descartables
- Matraz de Erlenmeyer de 250 ml y 500ml
- Mascarillas descartables
- Micropipetas automáticas de 50, 100 y 1000 μg
- Papel Kraft
- Papel filtro
- Pinzas puntas planas esteriles
- Micropipetas de 100-1000 μl , 20-100 μl , 2-20 μl , 0.5-10 μl
- Tips descartables
- Pipetas serológicas 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml estériles
- Probetas de 100ml a 1000 ml
- Placas petri
- Plumón marcador
- Tubos con tapa rosca
- Tubos de centrifuga de 15ml, 50ml, 5 ml
- Vaso precipitado

3.3.5 Equipos

- Rotavapor (BuchiHeating Bath B-490)
- Bomba de vacío (LITTLE GIANT 13156)
- Balanza analítica (SARTORIUS CP 2245)
- Centrifuga Universal (HETTICH 13R)
- Centrifuga de microtubos (Eppendorf Centrifuge 5415 C)
- Incubadora para cultivo (37°C) (SANYO MCO-20AIC)
- Propipeta automática. (ACCU-JET)

3.4 Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La colección de las muestras vegetales se realizó en el campo, con tijera podadora, se colectó en sacos aproximadamente de 10 Kg. de la especie: *Senna reticulata* “retama”, que fueron llevados al Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNAP, para su posterior secado.

3.4.2 Procedimiento para la recolección

3.4.2.1. Colección de la planta

La colecta de la muestra vegetal se realizó en la localidad de Francisco de Orellana-Rio Napo, Distrito Las Amazonas, Provincia de Maynas. Las muestras (hojas y vainas), se recogió de un árbol adulto entre las 2 y 3pm., y se le dió el tratamiento previo a las muestras antes de embalarlos (parada enzimática) para su traslado a la ciudad de Iquitos, distante 8 horas.

De igual manera se recogió una muestra para la identificación, la misma que fue realizada por Ing°. JUAN RUÍZ MACEDO, la excicata se encuentra depositado en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y certificado por la Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA, MSC; Coordinadora de AMAZ- CIRNA- UNAP.

3.4.3 Procedimiento para la preparación de los extractos vegetales

3.4.3.1 Preparación del pulverizado vegetal.

Las muestras fueron secadas bajo sombra x 7 días, luego se procedió a la molienda utilizando un molino manual de acero inoxidable, para pulverizar la muestra, posteriormente se guardó en frascos oscuros.

3.4.3.2. Preparación del Extracto Etanólico.

Las muestras vegetales (hoja y vaina) se pesaron y fueron colocados en frascos de vidrio de boca ancha color ámbar donde se agregó etanol 96° C; seguidamente se maceró por 7 días, luego se filtró.



FOTO N° 06: Maceración del extracto etanólico de *Senna reticulata* “retama”.

3.4.3.3. Preparación del Extracto Hidroalcohólico

Se procedió a macerar las muestras de los extractos vegetales en etanol - agua en una proporción de 70/30 respectivamente, se maceró por 7 días, luego se procedió a realizar filtraciones de la muestra, utilizando tela gasa estéril y donde se guardó por 48 horas a temperatura ambiente, luego se tuvo que llevar al rotavapor para eliminar el agua y el etanol hasta obtener el extracto hidroalcohólico. Se guardaron en frascos de color ámbar.



FOTO N° 07: Maceración del extracto Hidroalcohólico de *Senna reticulata* “retama”.

3.4.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico se realizó con el objetivo de determinar la presencia de determinados metabolitos secundarios, en dependencia de sus características estructurales y solubilidad de cada uno de ellos, que permitan su identificación en uno u otro solvente (agua, alcohol).

10 g de muestra vegetal (hoja y vaina) seco y molido, se colocó en un matraz de fondo plano de 250 a 500 ml, se le agregó etanol procurando que cubra máximo 2/3 partes de su volumen (no olvidar agregar perlas de ebullición). El extracto etanólico obtenido después de filtrar, se concentró en Baño María; posteriormente se realizó el tamizaje fitoquímico a las especies que presentaron actividad antimicrobiana *in vitro* por el siguiente procedimiento:

❖ Identificación de Alcaloides

Ensayo de Dragendorff – Ensayo de Mayer

En un vaso de precipitado de 50 ml se colocó aproximadamente una pequeña cantidad de extracto seco, adicionando 15 ml de ácido clorhídrico al 10 %, se calentó hasta disolver y luego se procedió a filtrarlo. De esta forma se obtuvo un residuo y una disolución ácida (lavados ácidos). Se midió 1 ml de los lavados ácidos en tres (3) tubos de ensayo, un tubo es para muestra patrón, a los otros tubos se les adicionó unas gotas de los reactivos de reconocimiento de Dragendorff (la presencia de turbidez, floculación o precipitado rojo-naranja), y de Wagner (precipitado marrón) respectivamente.

❖ Identificación de Quinonas

Ensayo de Borntrager

En un vaso de precipitado de 50 ml se colocó una fracción del extracto y se disolvió en CHCl_3 , luego se procedió a filtrar; donde se obtuvo un residuo y una disolución clorofórmica, después se midió 1 ml de la disolución en 2 tubos de ensayo, uno se utilizó como patrón y al otro se le adiciono 1 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 5%, se agito y se dejó en reposo, posteriormente se observó dos fases: la clorofórmica y alcalina. Una coloración rojo- rosa en la fase alcalina nos indica la presencia de quinonas.

❖ Identificación de Flavonoides

Ensayo de Shinoda

En un vaso de precipitado de 50 ml se colocó una fracción del extracto y se procedió a disolver en etanol 96°C , luego se procedió a filtrar, donde se obtuvo un residuo y una disolución etanólica, después se midió 1 ml de la disolución etanólica en 2 tubos de ensayo; uno se utilizó como patrón y al otro se le adicionó un trocito de cinta de $\text{Mg}+2$ y 5a 6 gotas de HCl concentrado al 37,5%. Se observó un cambio de color en la parte superior del líquido de la muestra indicando la presencia de flavonoides.

Resultados positivos:

- ✿ *Amarillo-rojo*= flavonas, chalconas, auronas
- ✿ *Rojo- magenta*= flavonoles
- ✿ *Rojo, magenta, violeta, azul*= Antocianócidos
- ✿ *Amarillo claros, incoloros*= Flavonoles, flavonas y isoflavonas.

❖ **Identificación de Fenoles y Taninos**

Ensayo de Fenoles y Taninos

En un vaso de precipitado de 50 ml se colocó una fracción del extracto, donde se disolvió en etanol 96° C, luego se procedió a filtrar, se obtuvo un residuo y una disolución etanólica, después se midió 1 ml de la disolución etanólica en 2 tubos de ensayo, uno se utilizó como patrón y al otro se le adicionó de 3 a 5 gotas de FeCl₃ al 5%, lentamente.

❖ **Identificación de Saponinas**

Ensayo de la espuma

En un vaso de precipitado de 50 ml se colocó una fracción del extracto y se disolvió en etanol 96° C, luego se procedió a filtrar obteniéndose un residuo y una disolución etanólica, después se midió 1 ml de la disolución etanólica en 2 tubos de ensayo, uno se utilizó como patrón y al otro se le adicionó 4 ml de agua, donde se agitó la mezcla fuertemente durante 2 minutos, posteriormente se dejó reposar durante 15 minutos. La formación de espuma jabonosa de más de 2 mm de altura en la superficie del líquido y su persistencia nos indicó la presencia de saponinas.

❖ **Identificación de Aminas y Aminoácidos**

Ensayo de Ninhidrina

En un vaso de precipitado de 50 ml se colocó una fracción del extracto y se disolvió en etanol 96°, luego se procedió a filtrar, donde se obtuvo un residuo y una disolución etanólica, después se midió 1 ml de la disolución etanólica en 2 tubos de ensayo, uno se utilizó como patrón y al otro se le adicionó 1 ml de Ninhidrina al 5%, posteriormente se calentó en baño maría de 5-10 minutos. La aparición de una coloración azul violácea nos indicó la presencia de aminas.

3.4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se empleó la observación directa, medición y registro de los halos de inhibición observados en cada microorganismo integrante de la muestra. Los datos obtenidos fueron registrados teniendo en cuenta microorganismo y sustancia. (Instituto Nacional de Salud. INS, 1997).

3.4.5.1 Preparación de los discos de sensibilidad

Los discos de sensibilidad se prepararon utilizando papel Wattman N° 3, empleando un perforador convencional. Estos discos fueron esterilizados en autoclave a 121° C x 15 libras de presión x 15 minutos. Luego se procedió a agregar a cada uno de los discos 7.5, 15, 22.5, 30 µl de las concentraciones de los extractos vegetales, las que se dejó secar por espacio de 24 horas. (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, INS 2002)

3.4.5.2 Prueba de Sensibilidad según el Instituto Nacional de Salud. (2002)

Preparación del inóculo

- Se seleccionó cuatro a cinco colonias aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa.
- Se manipuló la superficie de cada colonia con un asa de siembra y para ser transferido a un tubo que contiene de 4 a 5 ml de Caldo Nutritivo.
- Se Incubó el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta que haya alcanzado o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- Se ajustó la turbidez del inóculo con NaCl, hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente se tuvo que usar una luz apropiada para mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.
- La suspensión preparada contenía aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml para las bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

Inoculación de las Placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, donde se tuvo que rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Se inóculo la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones

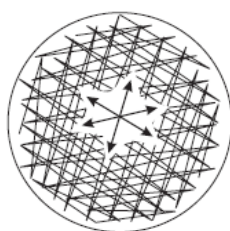


FOTO N° 08: Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del Agar.

Para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

Aplicación de los discos

Se colocó los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

Incubación

Se incubo las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos. Después del tiempo recomendado de incubación, se examinó cada placa, donde se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

CUADRO N° 01: Fórmula para la Determinación del Porcentaje de Inhibición.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de la muestra}}{\text{Diámetro del control}} \times 100$$

Todos los ensayos fueron llevados por cuadruplicado y se realizó cultivos de control de todas las cepas para comprobar su viabilidad. El criterio utilizado para la clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados en el Cuadro 4.

CUADRO N° 02: CLASIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SEGÚN EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inactivo	< 55 %
Poco activo	55 – 65 %
Moderadamente activo	66 – 80 %
Buena actividad	>80 %

Fuente: Carvalho Xavier, 2002.

3.5 ANALISIS DE DATOS

Se calculó la media y desviación estándar de los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, obtenidas del extracto hidroalcohólico de vaina y etanólico de la hoja de *Senna reticulata* (“retama”), que son presentados en tablas y gráficos. Los resultados se evaluaron mediante el método de Análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SPSS v.20 y las diferencias entre medidas de grupos fueron analizadas mediante el test de comparaciones múltiples. Valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos hidroalcohólicos y etanólicos de la vaina y hoja de *Senna reticulata* (“retama”), en la prueba de actividad antimicrobiana por el método de Disco Difusión, estos valores son presentados en tablas y gráficos, clasificados de acuerdo a las especificaciones.

3.6 ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

Se aplicó las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad (Serie Normas Técnicas N° 18-INS), aplicable al personal, uso y desecho de sustancias y materiales, acceso a los locales, y el medio ambiente. Los microorganismos patógenos mencionados en el presente estudio corresponden trabajarlas a un nivel de bioseguridad, que son mencionan en el Anexo N° 4. (Instituto Nacional de Salud. 1997).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS Y BIOÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Según informe BELMONT, la expresión “principios éticos y bioéticos básicos”, se refiere a aquellos criterios generales que sirven como base para justificar muchos de los preceptos éticos y valoraciones particulares de las acciones humanas, en el presente trabajo de investigación se aplicó una de las tres reglas éticas que regulan la experimentación animal: Esta fue “Reemplazo”, porque se reemplazó los ensayos sobre animales por métodos alternativos *in vitro*. (INFORME BELMONT. 2003).

CAPÍTULO IV

I. RESULTADOS

Los resultados se organizaron para su presentación de acuerdo a los objetivos planteados según el siguiente orden:

- A. Análisis descriptivo de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de la hoja e hidroalcohólico de la vaina de *Senna reticulata* “retama” sobre microorganismos patógenos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por el Método de Difusión en agar (Método de Kirby - Bauer).
- B. Descripción cualitativa del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la hoja e hidroalcohólico de la vaina de *Senna reticulata* “retama”
- C. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

A. Análisis descriptivo de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico (hoja) e hidroalcohólico (vaina) de *Senna reticulata* “retama” sobre microorganismos patógenos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en agar (MÉTODO DE KIRBY - BAUER).

Tabla N° 02: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO^(b) DE LA HOJA.^(a)

20 horas	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)															
	Concentracion del extracto ^(b,a)															
	7.5				15				22.5				30			
CEPA ^(c)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	9	8.7	8.9	9.1	10.7	11.3	11.4	11.3	13.1	13	12.8	13.1	14.5	14.6	14.3	14.7
<i>S. aureus</i>	8.6	8.4	8.7	8.6	9.7	9.4	9.8	9.3	10	10.2	10	10.3	11.3	11.5	11.4	11.7

(a) Partes de la planta ensayada: hoja (H).

(b) Tipo de extracto: etanólico (E).

(c) Especie de bacterias: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. a*).

Tabla N° 03: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO^(b) DE LA VAINA.^(a)

20 horas	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)															
	Concentracion del extracto ^(b,a)															
	7.5				15				22.5				30			
CEPA ^(c)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	8.7	8.9	8.7	8.4	8.8	9	8.6	8.9	9.5	9.7	9.6	9.9	11.7	12	11.9	12.1
<i>S. aureus</i>	12.4	12.2	12.5	12.8	13.3	13.5	13.4	13.6	14.6	14.8	14.5	14.7	14.9	15.5	15.8	16.2

(a) Partes de la planta ensayada: Vaina (V).

(b) Tipo de extracto: hidroalcoholico (H).

(c) Especie de bacterias: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. a*).

TABLA N° 04: PORCENTAJE DE INHIBICION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA HOJA DE *Senna reticulata* (Willd) “retama” SEGÚN CONCENTRACION. (Expresados en %)*

20 horas	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)															
	Concentracion del extracto															
	7.5				15				22.5				30			
CEPA	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	45	43.5	44.5	45.5	53.5	56.5	57	56.5	65.5	65	64	65.5	72.5	73	71.5	73.5
<i>S. aureus</i>	43	42	43.5	43	48.5	47	49	46.5	50	51	50	51.5	56.5	57.5	57	58.5

FUENTE: Elaborado por los autores
 (*)Valor promedio de cuatro réplicas.

TABLA N° 05: PORCENTAJE DE INHIBICION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE VAINA DE *Senna reticulata* (Willd) “retama” SEGÚN CONCENTRACION. (Expresados en %)*

20 horas	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)															
	Concentracion del extracto															
	7.5				15				22.5				30			
CEPA	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	43.5	44.5	43.5	42	44	45	43	44.5	47.5	48.5	48	49.5	58.5	60	59.5	60.5
<i>S. aureus</i>	62	61	62.5	64	66.5	67.5	67	68	73	74	72.5	73.5	74.5	77.5	79	81

FUENTE: Elaborado por los autores
 (*)Valor promedio de cuatro réplicas.

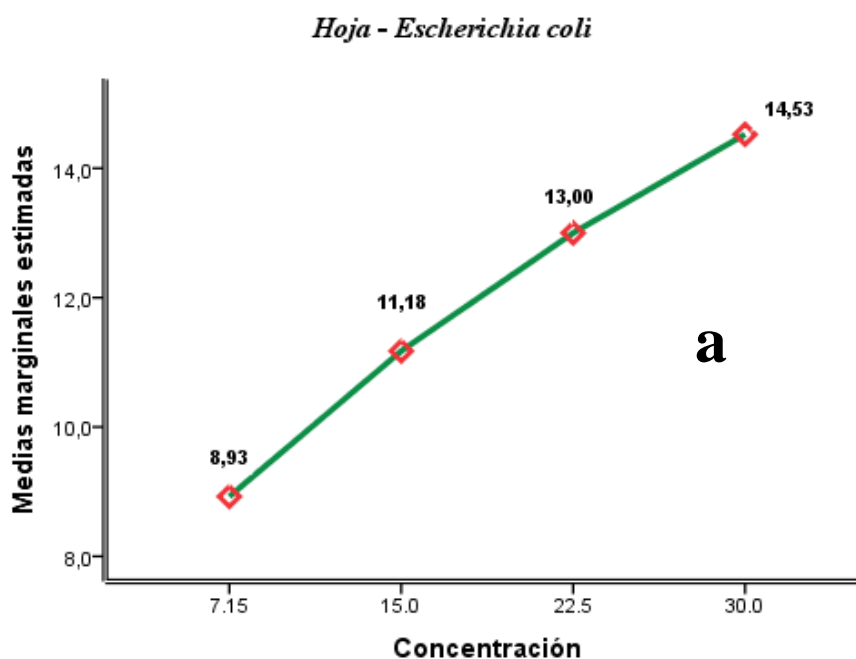
TABLA 06

PROMEDIOS Y DESVIACIONES TÍPICAS DE DIAMETROS DEL HALO DE INHIBICION POR EXTRACTO ETANOLICO DE LA HOJA EN MICROORGANISMOS PATOGENOS.

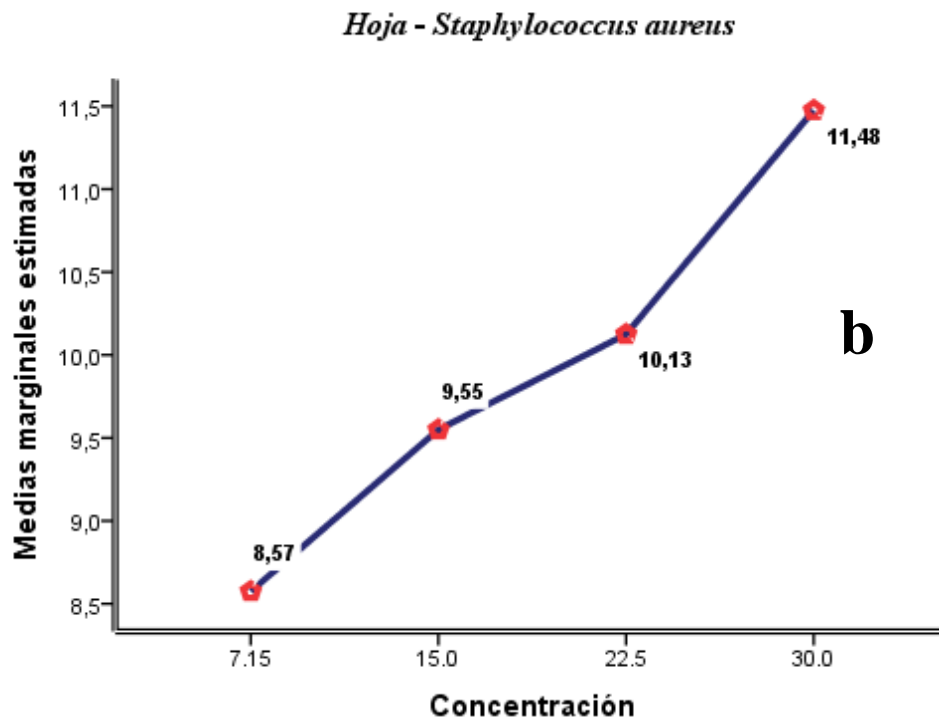
Microorganismos Patógenos	Concentración n	Promedios y desviaciones típicas del halo de inhibición (mm)
<i>Escherichia coli</i>	7,15 mg/ml	8,925 ± 0,1708
	15,0 mg/ml	11,175 ± 0,3202
	22,5 mg/ml	13,000 ± 0,1414
	30,0 mg/ml	14,525 ± 0,1708
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,15 mg/ml	8,575 ± 0,1258
	15,0 mg/ml	9,550 ± 0,2380
	22,5 mg/ml	10,125 ± 0,1500
	30,0 mg/ml	11,475 ± 0,1708

FIGURA 01

PROMEDIOS DE DIAMETROS DEL HALO DE INHIBICION POR
EXTRACTO ETANOLICO DE LA HOJA EN
MICROORGANISMOS PATÓGENOS



En la tabla 06 y el figura 1a, se aprecia que el promedio de diámetro del halo de inhibición por extracto etanólico máximo frente a *Escherichia coli*, fue de 14,525 mm con una desviación típica de $\pm 0,1708$ mm, presentado con una concentración de 30,0 mg/ml en las hojas. En las demás concentraciones los halos de inhibición fueron menores, así tenemos en las concentraciones de, 22,5 mg/ml con promedio de 13,00 mm y desviación típica de $\pm 0,141$ mm, en la de 15,0 mg/ml con promedio de 11,18 mm y desviación típica de $\pm 0,320$ mm y en la concentración de 7,15 mg/ml el promedio fue de 8,925 mm con desviación típica de $\pm 0,1708$ mm.



En la tabla 06 y el grafico 1b, se observa que el promedio de diámetro del halo de inhibición por extracto etanólico máximo frente *Staphylococcus aureus*, fue de 11.48 mm con desviación típica de 0,1708mm presentado con 30,0 mg/ml de concentración, en las demás concentraciones se encontraron promedios menores. Así tenemos en las concentraciones de, 22,5 mg/ml con promedio de 10,125 mm y desviación típica de $\pm 0,15$ mm, en la de 15,0 mg/ml con promedio de 9,550 mm y desviación típica de $\pm 0,2380$ mm y en la concentración de 7,15 mg/ml el promedio fue de 8,575mm con desviación típica de $\pm 0,1258$ mm.

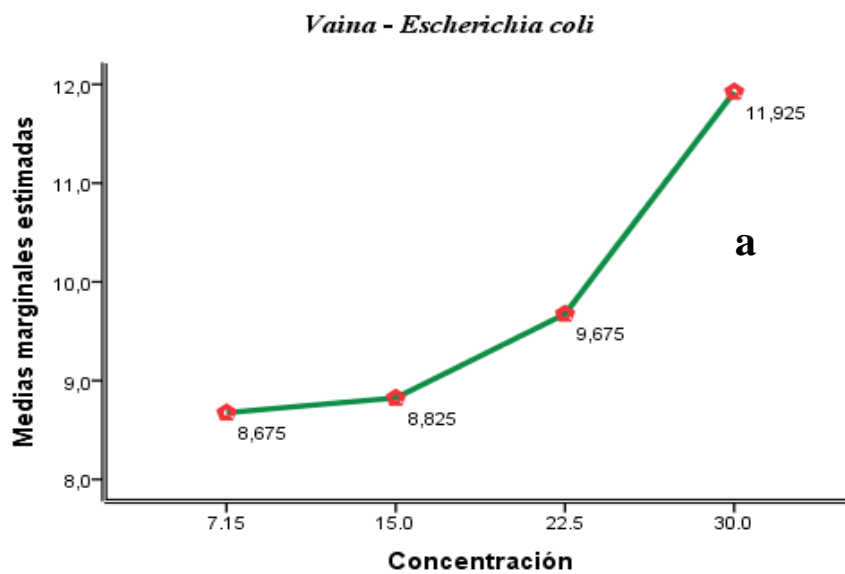
TABLA 07

PROMEDIOS Y DESVIACIONES TÍPICAS DE DIÁMETROS DEL HALO DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA VAINA EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

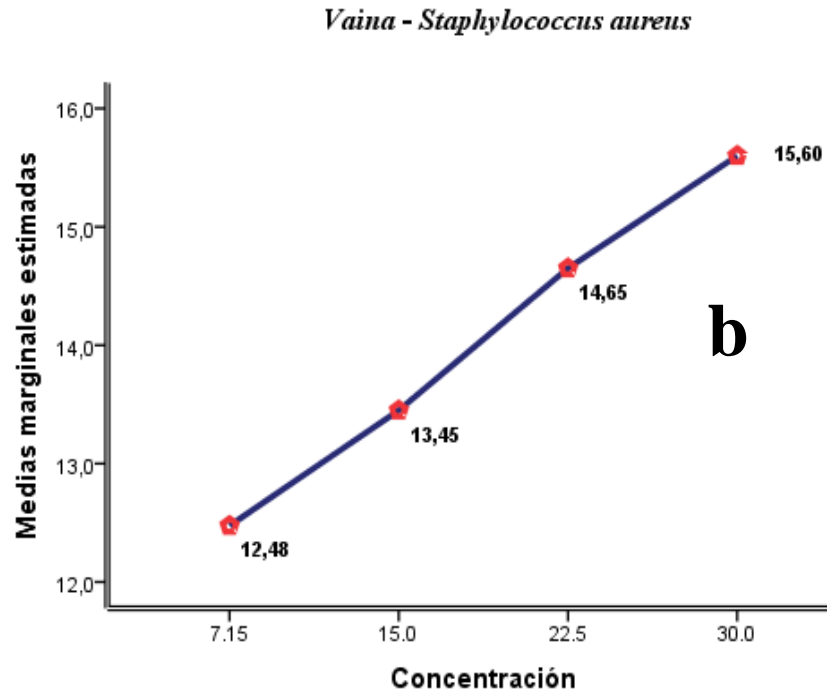
MICROORGANISMO PATÓGENO	Concentración	Promedios y desviaciones típicas del halo de inhibición (mm)
<i>Escherichia coli</i>	7,15 mg/ml	8,675 ± 0,2062
	15,0 mg/ml	8,825 ± 0,1708
	22,5 mg/ml	9,675 ± 0,1708
	30,0 mg/ml	11,925 ± 0,1708
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,15 mg/ml	12,475 ± 0,2500
	15,0 mg/ml	13,450 ± 0,1291
	22,5 mg/ml	14,650 ± 0,1291
	30,0 mg/ml	15,600 ± 0,5477

FIGURA 02

PROMEDIOS Y DESVIACIONES TÍPICAS DE DIÁMETROS DEL HALO DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE VAINA EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS.



La tabla 07 y el figura 2a, muestra que el promedio de diámetro del halo de inhibición máximo frente al microorganismo *Escherichia coli*, en la concentración de 30,0mg/ml con promedio de 11,925mm y desviación típica de $\pm 0,1708$, en las demás concentraciones menores los diámetros promedios del halo de inhibición fueron menores.



En la tabla 07 y el figura 2b, se aprecia que el promedio de diámetro del halo de inhibición máximo se presentó frente al microorganismo *Staphylococcus aureus* fue de 15,600mm y una desviación típica de $\pm 0,5477$, presentado con una concentración de 30,0mg/ml en las vainas, en las concentraciones de 22,5 mg/ml se presentó un promedio de 14,65mm y desviación típica de $\pm 0,1291$ mm, en la concentración de 15,0 mg/ml el promedio fue de 13,450mm y desviación típica de $\pm 0,1291$ y en la concentración de 7,15 mg/ml el promedio fue de 12,475 con desviación típica de $\pm 0,2500$ mm.

TABLA 08

**ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE LOS EFECTOS ENTRE LOS HALOS
DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJA EN
MICROORGANISMOS PATÓGENOS.**

Variable dependiente: Diámetro						
Bacteria	Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadráti.	F	Sig.
<i>Escherichia coli</i>	Modelo corregido	69,907 ^a	3	23,30	515,44	0,000
	Intersección	2268,141	1	2268,14	50170,85	0,000
	Concentración	69,907	3	23,30	515,44	0,000
	Error	0,543	12	0,04		
	Total	2338,590	16			
	Total corregida	70,449	15			
a. R cuadrado = 0,992 (R cuadrado corregida = 0,990)						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Modelo corregido	17,622 ^b	3	5,874	189,23	0,000
	Intersección	1578,076	1	1578,08	50837,34	0,000
	Concentración	17,622	3	5,874	189,228	0,000
	Error	0,372	12	0,031		
	Total	1596,070	16			
	Total corregida	17,994	15			
b. R cuadrado = 0,979 (R cuadrado corregida =0,974)						

Se realizó el Análisis de Varianza de los efectos en los microorganismos patógenos con sus respectivas comparaciones múltiples según tablas 8:

Para *Escherichia coli* se encontraron significancias estadísticas, en el modelo corregido ($p=0,000$) con un coeficiente de determinación (R^2 corregida) del 0,990 (99,0%) lo que indica que el modelo predice en el 99% el halo de inhibición del diámetro en de extracto etanólico de la hoja de retama, así mismo para la intersección entre extracto etanólico de la hoja, la bacteria y la concentración hubo significancia estadística ($p=0,000$) lo mismo para las diferentes concentraciones ($p =0,000$).

Para *Staphylococcus aureus* se encontraron significancias estadísticas, para el modelo ($p=0,000$) con predicción corregida del 0,979 (97,9%) indicando que el modelo predice en el 97,9% el halo de inhibición del diámetro en de extracto etanólico de la hoja de retama en el mencionado microorganismo, lo mismo ocurrió para la intersección entre extracto etanólico de la hoja, *Staphylococcus aureus* y la concentración ($p=0,000$) y para los diferentes niveles de concentraciones ($p =0,000$).

TABLA 09

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE LOS EFECTOS ENTRE LOS HALOS DE
INHIBICIÓN POR EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJA EN
MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Variable dependiente: Diámetro. Contraste DHS de Tukey

Bacteria	Concen. mg/ml	Concen. mg/ml	Dif. de medias (i-j)	Error típ.	Sig. (p)	Intervalo de confianza 95%	
						L.I.	L.S.
<i>Escherichia coli</i>		15,0	-2,250*	0.1503	0.000	-2.696	-1.804
	7,15	22,5	-4,075*	0.1503	0.000	-4.521	-3.629
		30,0	-5,600*	0.1503	0.000	-6.046	-5.154
		7,15	2,250*	0.1503	0.000	1.804	2.696
	15,0	22,5	-1,825*	0.1503	0.000	-2.271	-1.379
		30,0	-3,350*	0.1503	0.000	-3.796	-2.904
		15,0	4,075*	0.1503	0.000	3.629	4.521
	22,5	7,15	1,825*	0.1503	0.000	1.379	2.271
		30,0	-1,525*	0.1503	0.000	-1.971	-1.079
		7,15	5,600*	0.1503	0.000	5.154	6.046
	30,0	15,0	3,350*	0.1503	0.000	2.904	3.796
		22,5	1,525*	0.1503	0.000	1.079	1.971
<i>Staphylococcus aureus</i>		15,0	-0,975*	0.1246	0.000	-1.345	-0.605
	7,15	22,5	-1,550*	0.1246	0.000	-1.920	-1.180
		30,0	-2,900*	0.1246	0.000	-3.270	-2.530
		7,15	0,975*	0.1246	0.000	0.605	1.345
	15,0	22,5	-0,575*	0.1246	0.000	-0.945	-0.205
		30,0	-1,925*	0.1246	0.000	-2.295	-1.555
		15,0	1,550*	0.1246	0.000	1.180	1.920
	22,5	7,15	0,575*	0.1246	0.000	0.205	0.945
		30,0	-1,350*	0.1246	0.000	-1.720	-0.980
		7,15	2,900*	0.1246	0.000	2.530	3.270
	30,0	15,0	1,925*	0.1246	0.000	1.555	2.295
		22,5	1,350*	0.1246	0.000	0.980	1.720

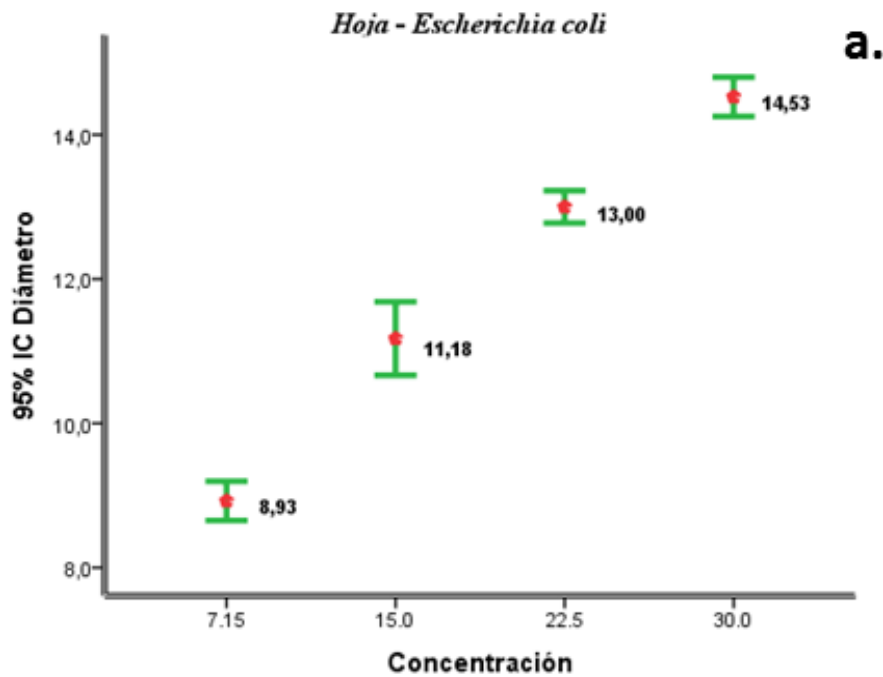
La tabla 09 muestra las comparaciones múltiples de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de hoja según microorganismos patógenos del que se aprecia lo siguiente:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición según niveles de concentración del extracto etanólico para *Escherichia coli* con significancias ($p=0,000$) $p<0,05$; siendo la de mayor diferencia la del nivel de concentración de 30,0 en comparación con los demás niveles.

Para *Staphylococcus aureus* ocurre las mismas diferencias estadísticamente significativas según niveles de concentración del extracto etanólico de hoja con significancias menores de 0,05 ($p=0,000$); siendo la diferencia de mayor valor con la del nivel de concentración 30,0.

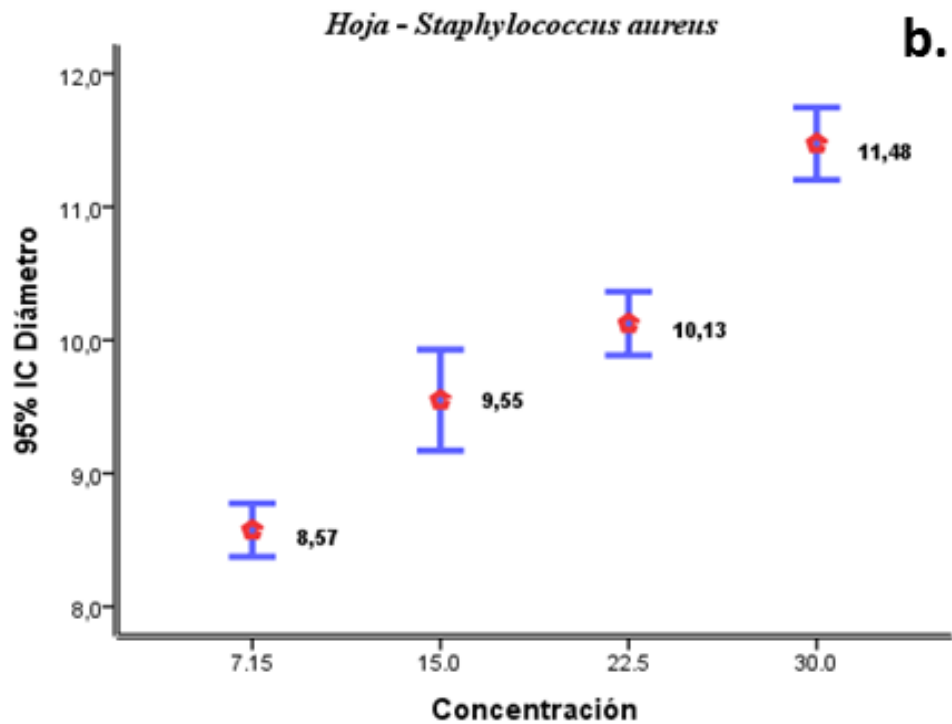
FIGURA 03

COMPARACIONES EN INTERVALOS DE CONFIANZA DE LOS EFECTOS
ENTRE LOS HALOS DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO ETANÓLICO
DE HOJA EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS.



Las comparaciones de los intervalos de confianza al 95% según promedios de los diámetros del halo de inhibición de los extractos etanólicos a cada microorganismo patógenos del estudio se presentan en gráficos de acuerdo a lo siguiente:

En la figura 3a se aprecia que el intervalo de confianza de diámetro del halo de inhibición por extracto etanólico máximo frente a *Escherichia coli*, se encuentra en el nivel de concentración de 30,0mg/ml, con promedio de halo de inhibición de 14,53mm.



La figura 3b muestra el intervalo de confianza de diámetro del halo de inhibición por extracto etanólico máximo frente a *Staphylococcus aureus*, que está representado por el nivel de concentración de 30,0mg/ml con promedio del halo de inhibición de 11,48mm.

TABLA 10

**ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE LOS EFECTOS ENTRE LOS HALOS
DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE VAINA
EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS.**

Variable dependiente: Diámetro						
Bacteria	Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrati.	F	Sig.
<i>Escherichia coli</i>	Modelo corregido	26,980 ^c	3	8,993	276,72	0,000
	Intersección	1528,810	1	1528,81	47040,31	0,000
	Concentración	26,980	3	8,99	276,72	0,000
	Error	0,390	12	0,03		
	Total	1556,180	16			
	Total corregida	23,599	15			
c. R cuadrado = 0,986 (R cuadrado corregida = 0,982)						
<i>Staphylococcus aureus</i>	Modelo corregido	22,412 ^d	3	7,47	75,49	0,000
	Intersección	3155,631	1	3155,63	31888,48	0,000
	Concentración	22,412	3	7,47	75,49	0,000
	Error	1,187	12	0,10		
	Total	3179,230	16			
	Total corregida	23,599	15			
d. R cuadrado = 0,950 (R cuadrado corregida = 0,937)						

Las tablas 10, 11 y figuras 4a y 4b muestran el Análisis de Varianza de los efectos en los microorganismos patógenos con sus pruebas de comparaciones múltiples e intervalos de confianza al 95% según lo siguiente:

En la tabla 10 se observa que:

- Para la bacteria *Escherichia coli* se encontraron significancias estadísticas, en el modelo corregido ($p=0,000$) con coeficiente de determinación (R^2 corregida) del 0,982 (98,2%) indicando que el modelo predice en 98,2% el halo de inhibición del diámetro es de extracto hidroalcohólico de la vaina de retama, de igual forma para la intersección entre extracto hidroalcohólico, la bacteria y la concentración se determinó significancia estadística ($p=0,000$) lo mismo para los diferentes niveles de concentraciones ($p =0,000$).
- De igual forma para la bacteria *Staphylococcus aureus* se encontraron significancias estadísticas, para el modelo corregido ($p=0,000$) con predicción del 0,937 (93,7%) es decir que el modelo predice en 93,7% el halo de inhibición del diámetro en de extracto hidroalcohólico de la vaina de retama, lo mismo fue para la intersección entre extracto hidroalcohólico, *Staphylococcus aureus* y la concentración ($p=0,000$) así también para los diferentes niveles de concentraciones ($p =0,000$).

TABLA 11

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE LOS EFECTOS ENTRE LOS HALOS DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE VAINA EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

Variable dependiente: Diámetro. Contraste DHS de Tukey

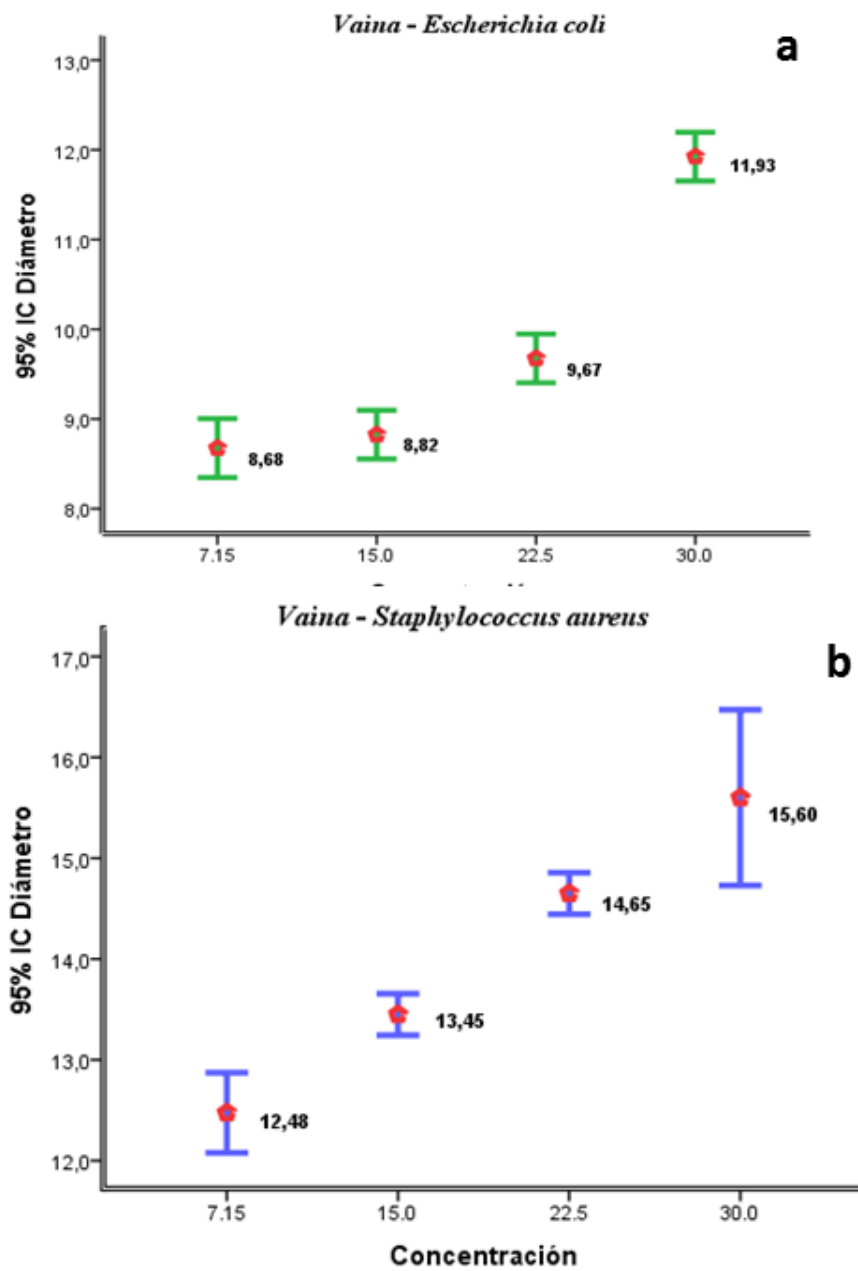
Bacteria	Concen. (i) mg/ml	Concen. (j) mg/ml	Dif. de medias (i-j)	Error típico	Sig. (p)	Intervalo de confianza 95% L.I. L.S.	
<i>Escherichia coli</i>		15,0	-0,150	0,1275	0,652	-0,528	0,228
	7,15	22,5	-1,000*	0,1275	0,000	-1,378	-0,622
		30,0	-3,250*	0,1275	0,000	-3,628	-2,872
	15,0	7,15	0,150	0,1275	0,652	-0,228	0,528
		22,5	-0,850*	0,1275	0,000	-1,228	-0,472
		30,0	-3,100*	0,1275	0,000	-3,478	-2,722
	22,5	15,0	1,000*	0,1275	0,000	0,622	1,378
		7,15	0,850*	0,1275	0,000	0,472	1,228
		30,0	-2,250*	0,1275	0,000	-2,628	-1,872
		7,15	3,250*	0,1275	0,000	2,872	3,628
	30,0	15,0	3,100*	0,1275	0,000	2,722	3,478
		22,5	2,250*	0,1275	0,000	1,872	2,628
15,0		-0,975*	0,2224	0,004	-1,635	-0,315	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,15	22,5	-2,175*	0,2224	0,000	-2,835	-1,515
		30,0	-3,125*	0,2224	0,000	-3,785	-2,465
		7,15	0,975*	0,2224	0,004	0,315	1,635
	15,0	22,5	-1,200*	0,2224	0,001	-1,860	-0,540
		30,0	-2,150*	0,2224	0,000	-2,810	-1,490
	22,5	15,0	2,175*	0,2224	0,000	1,515	2,835
		7,15	1,200*	0,2224	0,001	0,540	1,860
		30,0	-0,950*	0,2224	0,005	-1,610	-0,290
	30,0	7,15	3,125*	0,2224	0,000	2,465	3,785
15,0		2,150*	0,2224	0,000	1,490	2,810	
22,5		0,950*	0,2224	0,005	0,290	1,610	

La tabla 11 muestra las comparaciones múltiples de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de vaina según microorganismos patógenos en el que se observa:

- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición según niveles de concentración del extracto hidroalcohólico para la bacteria *Escherichia coli* con significancias ($p=0,000$) $p<0,05$; siendo la mayor diferencia encontrada la del nivel de concentración de 30,0mg/ml en comparación con los demás niveles de concentración.
- Para la bacteria *Staphylococcus aureus* ocurre las mismas diferencias estadísticamente significativas según niveles de concentración del extracto hidroalcohólico con significancias menores de 0,05 ($p=0,000$); siendo la diferencia de mayor valor con la del nivel de concentración 30,0 mg/ml

FIGURA 04

COMPARACIONES EN INTERVALOS DE CONFIANZA DE LOS EFECTOS
ENTRE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE VAINA POR EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS



Las comparaciones de los intervalos de confianza al 95% según promedios de los diámetros del halo de inhibición de los extractos hidroalcohólicos a cada microorganismo patógenos del estudio se presentan en gráficos según lo siguiente:

- En la figura 4a se aprecia que el intervalo de confianza de diámetro del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico máximo frente a *Escherichia coli*, se encuentra en el nivel de concentración de 30,0mg/ml, con promedio de halo de inhibición de 11,93mm:

- La figura 4b muestra los intervalos de confianza de diámetro del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico máximos frente a *Staphylococcus aureus*, que están representados por los niveles de concentración de 30,0 con promedio de halo de inhibición de 15,60mm y el nivel de concentración de 22,5 con promedio de halo de inhibición de 14,65mm.

TABLA N° 12
PORCENTAJE DEL DIÁMETRO DE INHIBICIÓN
EN LA HOJA

Bacteria	%	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	43,50	1	6,3
	44,50	1	6,3
	45,00	1	6,3
	45,50	1	6,3
	53,50	1	6,3
	56,50	2	12,5
	57,00	1	6,3
	64,00	1	6,3
	65,00	1	6,3
	65,50	2	12,5
	71,50	1	6,3
	72,50	1	6,3
	73,00	1	6,3
	73,50	1	6,3
	Total	16	100,0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	42,00	1
43,00		2	12,5
43,50		1	6,3
46,50		1	6,3
47,00		1	6,3
48,50		1	6,3
49,00		1	6,3
50,00		2	12,5
51,00		1	6,3
51,50		1	6,3
56,50		1	6,3
57,00		1	6,3
57,50		1	6,3
58,50		1	6,3
Total		16	100,0

Fuente: Elaborado por los autores.

TABLA N° 13

**PORCENTAJE DEL DIÁMETRO DE INHIBICIÓN
EN LA VAINA**

Bacteria	%	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	42,00	1	6,3
	43,00	1	6,3
	43,50	2	12,5
	44,00	1	6,3
	44,50	2	12,5
	45,00	1	6,3
	47,50	1	6,3
	48,00	1	6,3
	48,50	1	6,3
	49,50	1	6,3
	58,50	1	6,3
	59,50	1	6,3
	60,00	1	6,3
	60,50	1	6,3
	Total	16	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	61,00	1	6,3
	62,00	1	6,3
	62,50	1	6,3
	64,00	1	6,3
	66,50	1	6,3
	67,00	1	6,3
	67,50	1	6,3
	68,00	1	6,3
	72,50	1	6,3
	73,00	1	6,3
	73,50	1	6,3
	74,00	1	6,3
	74,50	1	6,3
	77,50	1	6,3
	79,00	1	6,3
81,00	1	6,3	
Total	16	100,0	

Fuente: Elaborado por los autores.

TABLA N° 14

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LA HOJA

Bacteria	Actividad Antimicrobiana	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	Inactivo (< 55%)	5	31,3
	Poco activo (55% a 65%)	5	31,3
	Moderadamente activo (66% a 80%)	6	37,5
	Total	16	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inactivo (< 55%)	12	75,0
	Poco activo (55% a 65%)	4	25,0
	Total	16	100,0

Se demuestra la actividad antimicrobiana de la hoja en el extracto etanólico, moderadamente activo con un 37,5% frente a *Escherichia coli*, y poco activo con 25% frente a *Staphylococcus aureus*.

TABLA N° 15

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LA VAINA

Bacteria	Actividad Antimicrobiana	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	Inactivo (< 55%)	12	75,0
	Poco activo (55% a 65%)	4	25,0
	Total	16	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Poco activo (55% a 65%)	4	25,0
	Moderadamente activo (66% a 80%)	11	68,8
	Buena actividad (> 80%)	1	6,3
	Total	16	100,0

Se demuestra la actividad antimicrobiana de la vaina en el extracto hidroalcohólico, poco activo con un 25%, frente a *Escherichia coli*, y 68,8% moderadamente activo frente a *Staphylococcus aureus*.

TABLA N° 16

**ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL PORCENTAJE
DE INHIBICIÓN EN LA HOJA**

Bacteria	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
<i>Escherichia coli</i> ,% del diámetro de inhibición	16	43,50	73,50	59,5313	10,83585
<i>Staphylococcus aureus</i> ,% del diámetro de inhibición	16	42,00	58,50	49,6563	5,47637

Fuente: Elaborado por los tesistas.

TABLA N° 17

**ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL PORCENTAJE
DE INHIBICIÓN EN LA VAINA**

Bacteria	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
<i>Escherichia coli</i> ,% del diámetro de inhibición	16	42,00	60,50	48,8750	6,75401
<i>Staphylococcus aureus</i> , % del diámetro de inhibición	16	61,00	81,00	70,2188	6,27155

Fuente: Elaborado por los tesistas.

B. DESCRIPCION CUALITATIVA DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO E HIDROALCOHÓLICO DE LA HOJA Y VAINA DE *Senna reticulata* (Willd) “retama”.

☀ Descripción Cualitativa del Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico de la Hoja de *Senna reticulata* (Willd) “retama”.

CUADRO N° 03: TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

Reactivos	Metabolitos Secundarios	Extracto Etanólico
		HOJA
Cl₃Fe	Taninos	+++
Ninhidrina	Aminoácidos	-
Shinoda	Flavonoides	++
Bomtrager	Quinonas	+
Por Agitación vigorosa en agua caliente	Saponinas	+
Dragendorff	Alcaloides	++
Mayer	Alcaloides	+

Fuente: Elaborado por los tesisistas.

Negativo (-), Reacción positiva moderada (+), Reacción positiva intensa (++), Reacción positiva muy intensa (+++)

Como se observa en el cuadro N° 03, el extracto etanólico de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, presento un abundante contenido en su composición de taninos, mientras la hoja presento reacción positiva

moderada de alcaloides y flavonoides, mostrando también un bajo contenido de quinonas, saponinas. Mostrando ausencia de aminoácidos.

✿ **Descripción Cualitativa del Tamizaje Fitoquímico del Extracto Hidroalcohólico de Vaina de *Senna reticulata* (Willd) “retama”.**

CUADRO N° 04: TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

Reactivos	Metabolitos Secundarios	Extracto Hidroalcoholico
		VAINA
Cl₃Fe	Taninos	+++
Ninhidrina	Aminoácidos	-
Shinoda	Flavonoides	++
Bomtrager	Quinonas	++
Por Agitación vigorosa en agua caliente	Saponinas	++
Dragendorff	Alcaloides	++
Mayer	Alcaloides	++

Fuente: *Elaborado por los testistas.*

Negativo (-), Reacción positiva moderada (+), Reacción positiva intensa (++) , Reacción positiva muy intensa (+++)

Como se observa en el cuadro N° 04, En el ensayo fitoquímico del extracto hidroalcolico de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, presentaron mayor actividad antimicrobiana en los ensayos in vitro, fueron en la vaina, donde se encontró en sus composiciones: taninos, alcaloides, quinonas, saponinas, y alcaloides. A su vez el contenido de aminoácidos fue bajo.

4.2 DISCUSIÓN

Las plantas investigadas son usadas en la medicina popular, muchas de ellas en problemas dérmicos e infecciosos. Las propiedades antimicrobianas a partir de productos vegetales han sido comprobadas a través de intensas investigaciones en todo el mundo. Generalmente, son evaluadas y confirmadas a través de ensayos biológicos *in vitro*, por medio de pruebas de sensibilidad con métodos de difusión en Agar como en la presente investigación.

Al analizar globalmente los resultados obtenidos por el método de disco difusión, podemos indicar que esta metodología es adecuada para evaluar de manera cuantitativa la actividad antimicrobiana de extractos naturales, tal como señala INS (2002). Los parámetros que deben tener en cuenta para los resultados aportados sean comparables con los indicados por otros autores, deben ser: concentración de inóculo inicial del microorganismo, medio de cultivo, condiciones de incubación y concentración del producto ensayado.

En lo referente a los resultados obtenidos en el extracto etanólico de la hoja, podemos señalar que de los dos microorganismos utilizados en la determinación de la actividad antimicrobiana; solo *Escherichia coli*, demostró que seis (37,5%) presentaron moderada actividad antimicrobiana significativa, mientras que en el extracto hidroalcohólico de la vaina, once (68,8%) presentaron moderada actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus*. Demostrándose así que los extractos con la mejor actividad antimicrobiana fueron el extracto etanólico de la hoja frente a *Escherichia coli* y el extracto hidroalcohólico de la vaina frente a *Staphylococcus aureus*. SANGETHA (2008).

Además, podemos indicar que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los diámetros de los halos de inhibición con los extractos vegetales, etanólico e hidroalcohólico evaluados frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, destacándose el extracto etanólico en la hoja frente a *Escherichia coli* e hidroalcohólico en vaina frente a *Staphylococcus aureus* como moderadamente activos.

La razón de estas diferencias en la actividad del extracto etanólico puede deberse a que sustancias como: flavonoides, fenoles, taninos y glicósidos se encuentran en mayor proporción, ya que según (NUNES DOS SANTOS R.2008), éstos y otros compuestos como las quinonas, terpenos, y alcaloides son responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas, interfiriendo en la síntesis de la pared celular, como se detalla más adelante.

Sin embargo una planta puede contener centenares de metabolismo secundarios, de las cuales la fotoquímica clásica, aísla y estudia los componentes presentes en mayor concentración. El análisis de sustancias activas es mucho más compleja y larga, ya que generalmente los compuestos presentes en menor proporción en la planta son los que presentan mejores efectos biológicos (ISAZA, G,). Siendo la gentamicina la que posee mayor capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos ensayados, al inhibir la síntesis del DNA y como consecuencia se produce la interpretación de la síntesis del ácido cássico.

Se cree que la actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram positivas se debe a que los metabolitos secundarios contenidos en el extracto se difunden con más facilidad a través de la pared celular de estas bacterias, debido a la simplicidad de su envoltura (BARON e FINEGOLD, 1990). Una vez allí, inhiben el crecimiento bacteriano por interferencia del proceso de biosíntesis de la pared celular bacteriana, formada por un complejo entrecruzado tridimensional de unidad peptídicas y glucosídicas denominada peptidoglucano.

El posible mecanismo de acción de estos metabolitos, puede estar relacionado con la habilidad de inhibir enzima como la transpeptidasa, que es la responsable de catalizar el enlace entre un resto de glicina (Gly) y uno de D- alanina (D-Ala), con lo que queda interrumpido la síntesis del peptiglicano, produciéndose así la muerte del microorganismo (DELGADO *et al.*, 2003).

En general, se aprecia que el mayor promedio de diámetro del halo de inhibición máximo en el extracto etanólico fue observado en *Escherichia coli* con 14,525 mm, obteniendo una desviación típica de $\pm 0,1708$ mm (Tabla 06); mientras que los diámetros del halo de inhibición más bajo se obtuvieron con *Staphylococcus aureus*, con un valor de 11.48 mm, alcanzando una desviación típica de 0,1708 mm. Estos resultados se asemejan con los aportados por (RUIZ, Q. J 2009), quien utilizó extractos etanólicos e hidroalcohólicos al 96% a una concentración de 25;30 mg/ml, y obtuvo halos de inhibición entre 14 – 15 mm para *Escherichia coli* y leve actividad contra *Staphylococcus aureus*, estas variaciones entre los resultados de ambos trabajos pueden ser explicadas por varios factores como la concentración del extracto, época y periodo de recolección de la planta. Se obtuvieron resultados similares en estudios realizados por GORRITI *et al.* (2003) y GONCALVES *et al.* (2005) quienes además mostraron la presencia de compuestos terpenoides y fenólicos (taninos y flavonoides) en los extractos hidroalcohólicos.

En cuanto al extracto hidroalcohólico de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, quien presento moderada actividad frente a *Staphylococcus aureus* (Tabla 15), fue vaina; siendo ésta la que produjo mayor inhibición del crecimiento bacteriano debido a que poseen una mayor concentración de metabolitos secundarios como saponinas, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, fenoles y taninos. (PAREJA, 2002). En cuanto a la hoja, no presento moderada actividad frente a *Escherichia coli*.

Así mismo en el extracto hidroalcohólico de vaina, el promedio de diámetro del halo de inhibición máximo se obtuvieron con *Staphylococcus aureus*, con un valor de 15,600mm y una desviación típica de $\pm 0,5477$, mientras los diámetros del halo de inhibición más bajo se obtuvo con *Escherichia coli* un promedio de 11,925mm y desviación típica de $\pm 0,1708$. (Tabla 06).

Al analizar estos resultados, podemos observar que existe actividad biológica no significativa frente a *Escherichia coli*, en el extracto hidroalcohólico de la vaina. Este resultado puede ser explicado desde el punto de vista morfológico de la pared celular de las bacterias Gram negativas, concretamente la membrana externa. La permeabilidad de la membrana externa de los gram negativos, es debida, a unas proteínas a las que se les ha dado el nombre genérico de porinas. Estas proteínas constituyen canales o poros relativamente inespecíficas que permiten la difusión pasiva de iones y moléculas hidrofílicas de una medida inferior a 600Da aproximadamente.

Podemos decir, que los extractos hidroalcohólicos de la vaina presentaron mayor moderada actividad con un 68.8% en comparación con el extracto etanólico de la vaina, que encontrándose inactivo, con el 75%, por contener otros grupos de sustancias como trazas de alcaloides, glicósidos cardiotónicos y un abundante contenido de saponinas, además de los flavonoides, fenoles y taninos, que también están presentes en el extracto etanólico. Esto se debe a que la mayor parte de los componentes de las plantas con actividad contra microorganismos; son compuestos orgánicos aromáticos o saturados, quienes muchas veces son obtenidos a través de una extracción inicial con etanol (COWAN, 1999).

La acción desinfectante de los taninos, conferida por su carácter fenólico, explica el hecho de que estos impidieran el crecimiento de los microorganismos, (COSTA, 1977) probablemente responsable de la acción antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos.

(ROMAN, 1999), refiere que la actividad antimicrobiana de los flavonoides, es debida posiblemente a la habilidad de este grupo de formar complejos con la pared de las células bacterianas. Muchos flavonoides lipofílicos pueden romper las membranas microbianas. Algunas de isoflavonoides poseen propiedades antifúngicas, sin embargo, ninguno de los extractos ensayados presentó esta actividad (PEREZ, 2006), probablemente por encontrarse en bajas concentraciones o por pertenecer a otros grupos de flavonoides.

En cuanto a las saponinas contenidas en los extractos hidroalcohólicos, se puede decir que su actividad está en relación a su estructura. Por ser sustancias tensioactivas y poseer propiedades parecidas a la del jabón. Las saponinas, actúan a través de sus grupos lipófilos e hidrófilos fragmentando la membrana citoplasmática y destruyendo la célula bacteriana.

Finalmente de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos indicar que el extracto hidroalcohólico de vaina frente a *Staphylococcus aureus* y extracto etanólico frente a *Escherichia coli*, resultaron moderadamente activas; lo que nos permite confirmar los resultados obtenidos por ROBBINS, *et al.*, (2005), quien en su ensayo demostró la actividad de *Senna reticulata* (Willd.)H. Irwin & Barneby, frente a estos microorganismos. Esto nos permite conjeturar que *Senna reticulata* (Willd) “retama”, es activo frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, en ensayos in vitro, otro posible factor sería el proceso de extracción, Sin embargo, es necesario que se realicen otros trabajos, con el fin de determinar si estos resultados son reproducibles.

4.3 CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente investigación se abordan de acuerdo a los objetivos que nos permiten concluir lo siguiente:

1. El extracto etanólico de la hoja de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, a una concentración de 30mg/mL, presento moderada actividad antimicrobiana con un 37,5% frente a *Escherichia coli*; sin embargo frente a *Staphylococcus aureus*, se encontró inactivo con un 75% (Tabla 14).
2. El extracto hidroalcoholico de la vaina de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, a una concentración de 30mg/mL, presento moderada actividad antimicrobiana con un 68,8% frente a *Staphylococcus aureus*; sin embargo frente a *Escherichia coli*, se encontró inactivo con un 75% (Tabla 15).
3. Los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, presenta un abundante contenido en su composición de taninos, mientras la hoja presento reacción positiva moderada de alcaloides y flavonoides, así mismo un bajo contenido de quinonas, saponinas, mostrando ausencia de aminoacidos.(Cuadro 03)
4. Los extractos hidroalcoholicos obtenidos de la vaina de *Senna reticulata* (Willd) “retama”, presenta en su composición: taninos, alcaloides, quinonas, saponinas, y alcaloides y un bajo contenido de aminoacidos. (Cuadro 04)
5. En la evaluación de la actividad antimicrobiana se encontraron diferencias altamente significativas; en el extracto etanólico de hoja, se aprecia que los halos de inhibición según niveles de concentración del extracto etanólico para *Escherichia coli* con significancias ($p=0,000$) $p<0,05$; siendo la de mayor diferencia la del nivel de concentración de 30,0 en comparación con los demás niveles. Mientras para *Staphylococcus aureus* ocurre las mismas diferencias estadísticamente significativas según niveles de concentración del extracto etanólico de hoja con significancias menores de 0,05 ($p=0,000$); siendo la diferencia de mayor valor con la del nivel de concentración 30,0.

6. En el análisis estadístico sobre los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de vaina se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición según niveles de concentración del extracto hidroalcohólico para la bacteria *Escherichia coli* con significancias ($p=0,000$) $p<0,05$; siendo la mayor diferencia encontrada la del nivel de concentración de 30,0mg/ml Para la bacteria *Staphylococcus aureus* ocurre las mismas diferencias estadísticamente significativas según niveles de concentración del extracto hidroalcohólico con significancias menores de 0,05 ($p=0,000$); siendo la diferencia de mayor valor con la del nivel de concentración 30,0mg/ml.

7. En el Análisis de Varianza de los efectos en los microorganismos patógenos con sus respectivas comparaciones múltiples, para *Escherichia coli* se encontraron significancias estadísticas, en el modelo corregido ($p=0,000$) con un coeficiente de determinación (R^2 corregida) del 0,990 (99,0%) lo que indica que el modelo predice en el 99% el halo de inhibición del diámetro en el extracto etanólico de la hoja.

8. Para *Staphylococcus aureus* también se encontraron significancias estadísticas, para el modelo ($p=0,000$) con predicción corregida del 0,979 (97,9%) indicando que el modelo predice en el 97,9% el halo de inhibición del diámetro en de extracto etanólico de la hoja.

4.4 RECOMENDACIONES

- Continuar el trabajo de investigación, en especial en la parte fitoquímica con las muestras que posean actividad antimicrobiana, en especial a los extractos hidroalcohólicos, por poseer mayor actividad.
- Continuar la investigación con las muestras que no posean actividad, utilizando otros métodos de extracción.
- Realizar trabajos de investigación similares, principalmente en el campo etnobotánica con otras plantas de nuestra región, en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos en general.
- El tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Senna reticulata* (Willd) “retama” presenta: alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, dentro de los grupos más importantes.
- Seguir con el estudio de esta planta pues por los compuestos que esta presenta se puede determinar que posea otras propiedades biológicas para lo cual se deberá realizar un monitoreo para detectar la mayor cantidad de compuestos con posibilidad de actividad farmacológica.
- La baja densidad que existe sobre esta planta silvestre es un indicativo para que esta tiende a su desaparición de la zona, para lo cual se recomienda que se investigue sobre el cultivo de la misma para tratar de alguna forma de rescatarla.
- Valorar el conocimiento ancestral de las plantas medicinales, ya que facilita mucho su estudio y su posterior utilización como fitomedicamento.

CAPÍTULO V

5.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANGULO, JORGE. 1999. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de Tres especies vegetales sobre microorganismos que producen Infecciones vaginales. Tesis para optar el título de Biólogo. Facultad de Ciencia Biológicas. UNAP. Iquitos-Perú, pp 35.

BARON, FINEGOLD.MOLD.1990. Bailey & Scott's – Diagnostic microbiology. The C.V. Mosby Co: St. Louis. 8 ed.

CÁCERES, ALBERTO. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria UNSAC, pp. 48-57.

CALLAPIÑA, MARIA. et al. 2005. Actividad Mutagenica de los extractos de *Sparteum Junceum L.* (retama). Investigación realizada en el instituto de Recursos Naturales y Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS MEDICINALES. 2008. Cadena productiva de Plantas Medicinales. Prom Amazonia. (Actualizada el 3 de Enero del 2008; acceso el 10 de Noviembre del 2011). Disponible en: [<http://www.iiap.org.pe/promamazonia/sbiocomercio/Upload%5CLineas%5CDocumentos/195.pdf>].

COMITÉ DEL ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE. 1996. CA- SFM. Zone sizes and MIC breakpoints for non-fastidious organisms. Clin Microbial Infect. 2(Suppl. 1):S24-S49.

- DELGADO A, MINGUILLON C. JOGLAR J. 2003. Introduccion a la Quimica terapéutica. Ediciones Diaz de Santos. España. 2 Ed, p 428-430.
- DE WIT H. C. D. 2005. Plantas Superiores I tomo. Editorial Seix Barral S.A. Barcelona.
- FONT QUER P. 1985. Plantas Medicinales. El dioscórides Renovado. Editorial Labos S. A. Barcelona- España, pp. 50-65.
- GARCIA ROQUE. 2000. Procedimientos en Microbiologia Clinica. Metodos Basicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Madrid- España; 17: 03-06.
- GIULIANO G, ROSATI C, BRAMLEY. 2003. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *TRENDS in Biotechnology*; 21(12):513.
- GIRON JULIO, SANCHEZ R. 1995. An inducible bundleforming pilus of enteropathogenic. *Escherichia coli*. *Science*; 254: 710-713.
- GONCALVES A. L ALVES F. A. 2005. Estudio comparativo da actividade Antimicrobiana de Extractos de algumas arvores nativas. *Arq. Ins. Biol., Sao Paulo*, jul/ set, v. 72, n 3, p. 353-358.
- INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES. 2007. COL000095174 - *Senna reticulata* (Willd.) H.S. Irwin & Barneby – *Caesalpinaceae*- *Staphylococcus aureus* (Actualizada el 14 de xxFebrero del 2007; acceso el 20 de Octubre del 2011). Disponible en:
[<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do;jsessionid=6E7B99AA7782C0B46AB9A6E33053E7C3?idBuscar=404&method=displayAAT>]

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 1997 MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD. Serie de Normas Técnicas, N° 18.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD 2002. Ministerio de Salud del Perú. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de normas técnicas n° 30, pp 1:67. Lima – Perú.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2007. Reporte de las principales enfermedades infecciosas en el Peru. Lima. INS, p15

INFORME BELMONT. 2003. Principios Éticos y Directrices para la Protección de Sujetos Humanos de Investigación; pp. 1-13.

ISAZA MARIA. 2006 PLANTAS MEDICINALES AMAZÓNICAS: Realidad 2. y Perspectivas Tratado de Cooperación Amazónica: Secretaría Pro Tempore. Lima.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN JR, W. C. 2001. Diagnostico microbiologico. 5 ed. Medsi: Rio de Janeiro, p. 796-809.

LABORATORIO INTERNACIONAL DE REFERENCIA. 2000. National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS). Manual de pruebas de referencia de dilución: “Prueba de la CIM” aprobado por el estándar M7-A5. NCCLS, Wayne, P.

MACHADO L. 2003. Materias primas vegetales para la industria de fitofármacos. Lima.

MANRIQUE EDNA, MOSQUERA OLGA. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeletia marilloti* cuatr. Y *Espeletopsis guacharaca*. Carrera Bacteriología. Facultad de Ciencias.

- NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk Susceptibility Test: Approved Standard. Seventh, Edition M2-A7. Vol. 20 N°1 2000.
- NCCLS. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational. Supplement M100-S11. Vol. 21 N°1 January 2001.
- NUNES DOS SANTOS R. 2008. Estudio químico e farmacológico de *Senna reticulata*. Universia Biblioteca.
- OLIVEIRA .F. 1996. ANALISE DE DROGAS. SEMENTES. In: Farmacognosia. Rio de Janeiro: Atheneu, cap. 7, p. 234-236.
- PAREJA, B.; et al. 2002. Plantago Mayor L. Zumo de hojas tiene efecto antiinflamatorio y cicatrizante. Folia Dermatológica Peruana. Volumen 11, N° 1.
- PÉREZ DIANA. 2006. Efectividad de Extractos Botánicos de Diez plantas Sobre la Mortalidad y Repelencia de Larvas de *Rhynchophoruspalmarum* L., Insecto Plaga del Pijuayo *Bactrisgasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Revista de Agricultura Técnica v.66 n.1 Chillán mar. 2006.
- RENGIFO, E. & CERRUTI, T. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana. Estudio de su uso y cultivo. Ediciones IIAP. pp. 40-46. Iquitos, Perú.
- ROBBINS, KOLBENS. 2005. Patología Estructural y funcional. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana Madrid pp. 72-119.
- ROMÁN, MARCO 1999. Evaluación de la aptitud forrajera de *Sparteum Junceum* L. (retama) y *Verbiena tormentosa*. D.C. (Putka). Investigación realizada Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú, pp. 46.

- RUIZ JAVIER. 2009. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor oriente peruano Rev. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- SANGAMA D; ESPINOZA G. 2009. “Evaluación de la actividad biológica in vitro de extractos y fracciones de nueve especies vegetales de la Amazonía Peruana sobre formas parasitarias de Plasmodium, Leishmania y Tripanosoma”. Tesis de Pre-grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- SISBIB. UNMSM 2004. Antraquinonas. (Actualizada el 12 de Junio del 2003; acceso el 14 de Junio del 2011). Disponible en:
[<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/libros/quimica/pigmentos/archivos%20pdf/antraquinonas.pdf>]
- SANGETHA S, *et al.* 2008. Fungicidal 12. Effect and oral acute toxicity of cassia spectabilis leaf extract. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi; 49(4): 299-304.
- TILLAN JIERS. 2004. Efecto cicatrizante de la crema de extracto etanólico de cera de caña. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana.
- VARGAS CARLOS. (2007. Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto alcohólico de las hojas de Senna reticulata (Willd.) H. Irwin & Barneby (“Retama”). Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Facultad De Farmacia y Bioquímica. Escuela De Post- Grado. Lima- Perú, pp. 6-8.
- UGAZ OSCAR (1994). Investigación Fitoquímica. 2da Edición. Fondo Editorial PUCP. Lima. Perú, pp. 7-10.

WHO 1991. WHO Policy System Eighty-Seventh Session EB87.R24 Traditional Medicine and Modern Health Care. Geneva, January, pp 14-25.

WHO 1996, "Traditional Medicine" Fact Sheet N° 134.

ZULUAGA.G.1994.Programa de recuperación de plantas medicinales en las comunidades. Proyecto base para el desarrollo de programas comunitarios, pp1-16.

II. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- ✱ **Agente patógeno:** Es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un huésped (humano, animal, vegetal, etc.)
- ✱ **Fitomedicamento:** Es un medicamento cuyos componentes son parte estandarizadas de plantas, que tiene una presentación farmacéutica y al cuales le atribuye una acción terapéutica preventiva, curativa o atenuante de un estado patológico en forma eficaz y segura.
- ✱ **Antimicrobiano:** Sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento.
- ✱ **Toxicidad:** Grado de efectividad que poseen las sustancias que, por su composición, se consideran tóxicas.
- ✱ **Extracto:** Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.
- ✱ **Extracto Etanólico:** Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico.
- ✱ **Extracto Hidroalcohólico:** Extracto obtenido con etanol 96°C, agua y parte de la planta, la función del alcohol es extraer las sustancias, o las propiedades, de ésta.
- ✱ **Efecto:** Cualquier cambio producido por una sustancia química sobre un sistema biológico concreto.
- ✱ **Control:** Caso, grupo o individuo seleccionado para usarlo como referencia en un estudio por sus características específicas, como edad, sexo, raza estatus económico, etc. Término relacionado: patrón, estándar.
- ✱ **Tamizaje Fitoquímico:** Consiste en efectuar una extracción (del material previamente colectado, secado y molido) que permita obtener la mayor parte de los constituyentes químicos.
- ✱ **Metabolitos Secundarios:** Son vinculados en relación con el medio ambiente y sus exigencias ecológicas.
- ✱ **Cepa Bacteriana:** Conjunto de bacterias con igualdad en cuanto a sus caracteres biológicos, es decir, bacterias de la misma especie.

- ✿ **ATCC:** American Type Culture Collection. Es una colección de cepas bacterianas de microorganismos.
- ✿ **Actividad Antimicrobiana:** Capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarlas y que se puede expresar cuantitativamente con pruebas *In vitro*.
- ✿ **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un disco de un antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de Agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.
- ✿ **Bioseguridad:** Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del
- ✿ ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.
- ✿ **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.
- ✿ **Disco de sensibilidad:** Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.
- ✿ **Escala de Mc. Farland:** Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.
- ✿ **Esterilización:** Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.
- ✿ **Incubación:** Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación, y/o que el antibiótico se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado.
- ✿ **medio de cultivo:** Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.

ANEXOS

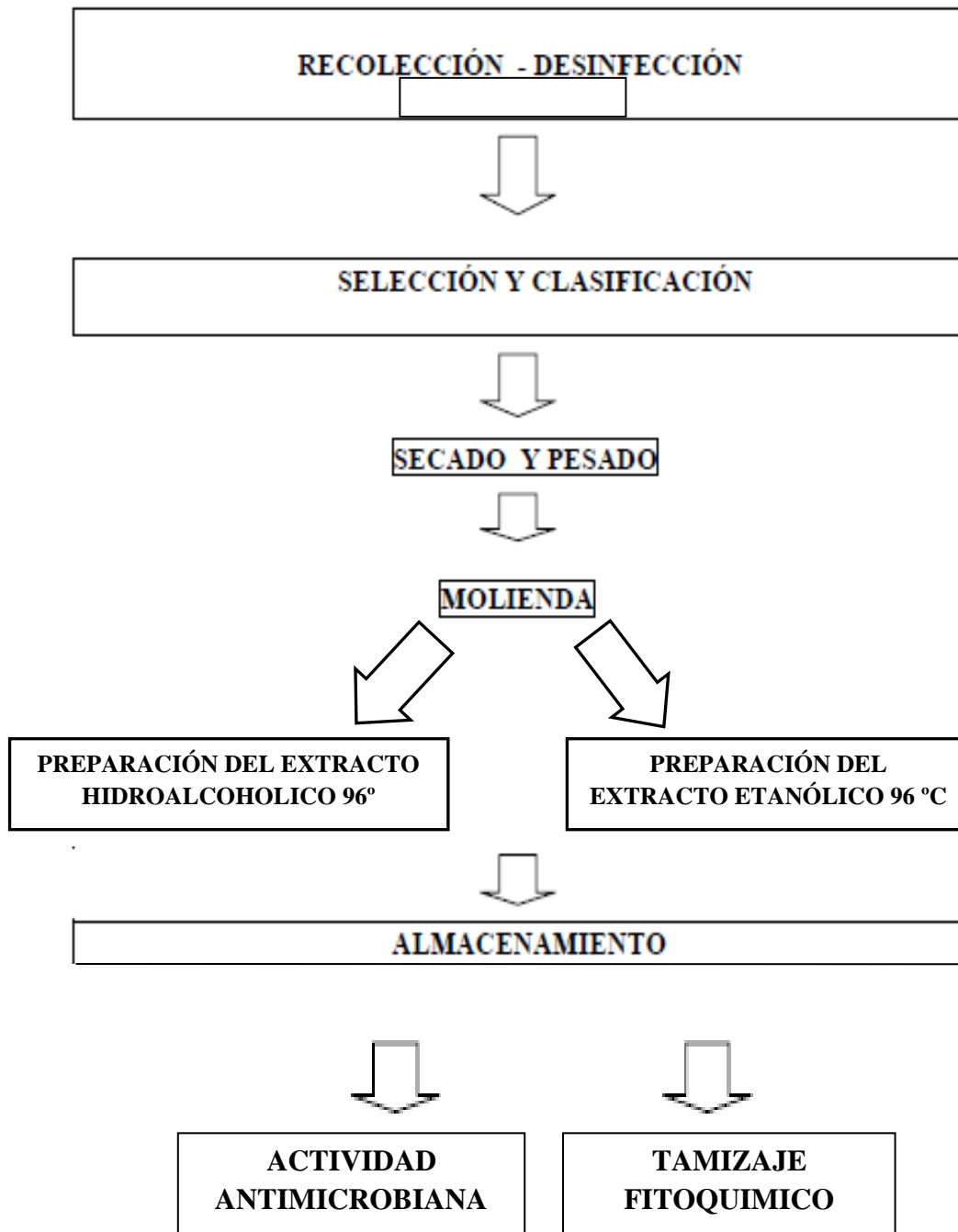
ANEXO N° 1

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Senna reticulata* (Will)

	UNAP	<i>Herbarium Amazonense - AMAZ</i> Centro de Investigación de Recursos Naturales																		
CONSTANCIA N°39																				
LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA																				
CERTIFICA:																				
Que, las muestras botánicas presentadas por los bachilleres Gissela Barria Acosta y Albert Frank Sánchez Tello son parte de la tesis titulada Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de <i>Senna reticulata</i> (Will) "retama" sobre microorganismo patógenos. Iquitos-2012; los cuales fueron verificados e identificados en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>FAMILIA</th> <th>NOMBRE CIENTIFICO</th> <th>NOMBRE VULGAR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FABACEAE</td> <td><i>Senna reticulata</i></td> <td>"retama"</td> </tr> </tbody> </table>	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR	FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	"retama"	<table border="1"> <thead> <tr> <th>FAMILIA</th> <th>NOMBRE CIENTIFICO</th> <th>NOMBRE VULGAR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FABACEAE</td> <td><i>Senna reticulata</i></td> <td>"retama"</td> </tr> </tbody> </table>	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR	FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	"retama"	<table border="1"> <thead> <tr> <th>FAMILIA</th> <th>NOMBRE CIENTIFICO</th> <th>NOMBRE VULGAR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FABACEAE</td> <td><i>Senna reticulata</i></td> <td>"retama"</td> </tr> </tbody> </table>	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR	FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	"retama"
FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR																		
FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	"retama"																		
FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR																		
FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	"retama"																		
FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR																		
FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	"retama"																		
Se expide el presente certificado al interesado para los fines que se estime conveniente.																				
Iquitos, 07 de Mayo del 2012																				
Atentamente,																				
 Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP																				
Dirección: Pucallpa - Iquitos, Perú	Centro de Investigación de Recursos Naturales																			

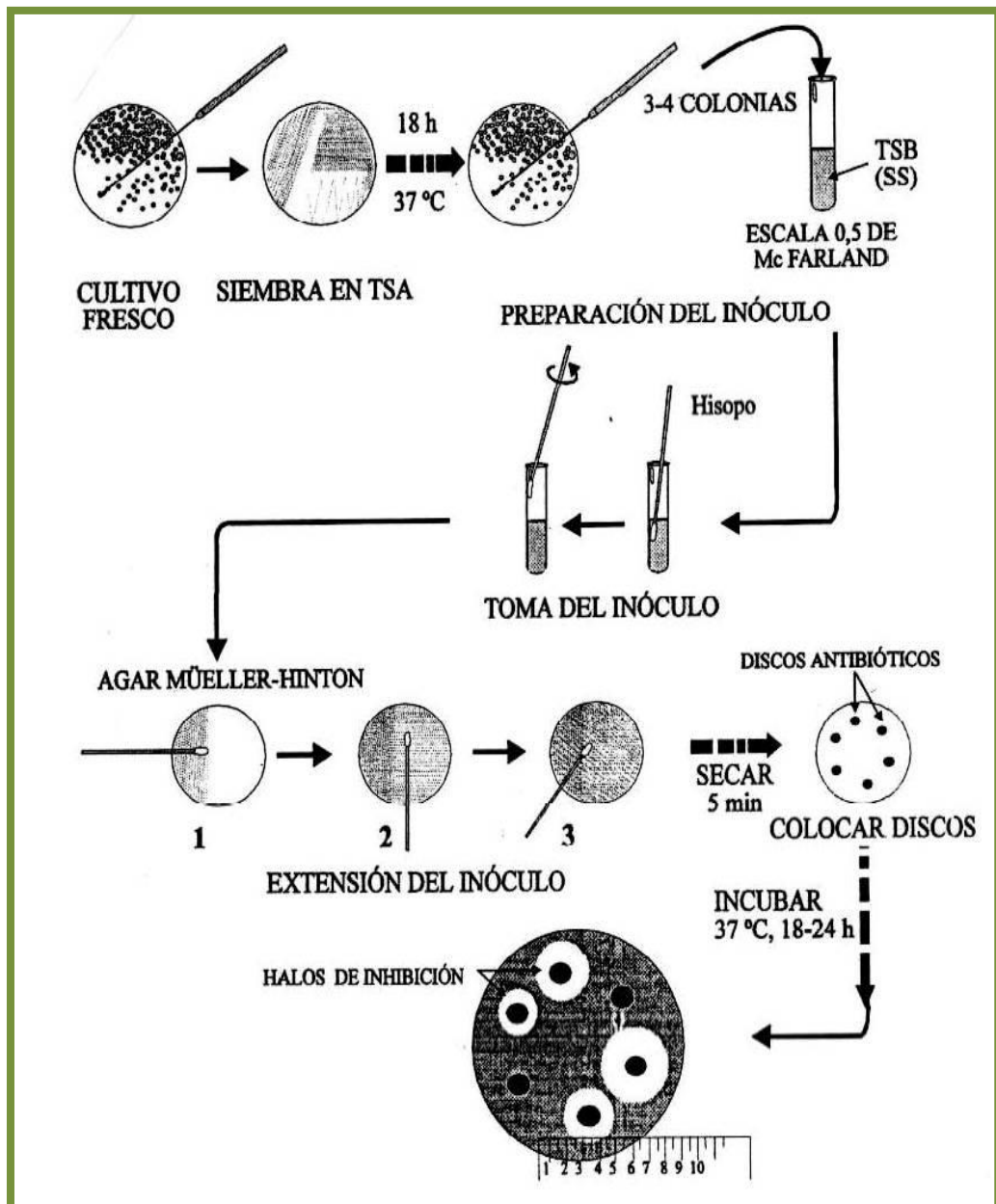
ANEXO N° 2

FLUJOGRAMA DE ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO
HIDROALCOHOLICO Y ETANÓLICO DE HOJAS Y VAINAS DE *Senna
reticulata* “retama”.



ANEXO N° 3

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL
METODO DE KIRBY- BAUER



Fuente: Microbiología general- Antibiograma.

ANEXO N° 4

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- ◆ Ingreso restringido al laboratorio.
- ◆ Utilizar siempre guardapolvo o mandilones de laboratorio en la zona de trabajo.
- ◆ El guardapolvo no debe salir de la zona del laboratorio, salvo para enviarlo a lavar.
- ◆ No pipetear con la boca.
- ◆ Está prohibido comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos en el laboratorio.
- ◆ En caso de tener cabello largo, recogerlo y cubrirlo.
- ◆ Lavarse las manos luego de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- ◆ Utilizar protección para los ojos cuando el procedimiento genere gotas o aerosoles.
- ◆ Toda manipulación de los microorganismos, comprendase el cultivo e inoculación de las cepas microbianas deberá realizarse exclusivamente en la campana de bioseguridad.
- ◆ Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
- ◆ Las cortaduras o rasguños en las manos y brazos deben protegerse bien.
- ◆ Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (no usar sandalias o zapatos abiertos).
- ◆ El procesamiento de las muestras debe realizarse sobre una superficie de trabajo cubierta con papel absorbente plastificado o papel de filtro.
- ◆ Los reactivos deben estar etiquetados y almacenados en viales adecuados con tapa rosca.
- ◆ Todos los laboratorios deben tener a disposición un equipo de primeros auxilios.
- ◆ El material infeccioso debe ser fácilmente identificado como tal y ser esterilizado lo antes posible.
- ◆ Limpiar a diario los pisos con un trapeador limpio y solución desinfectante.

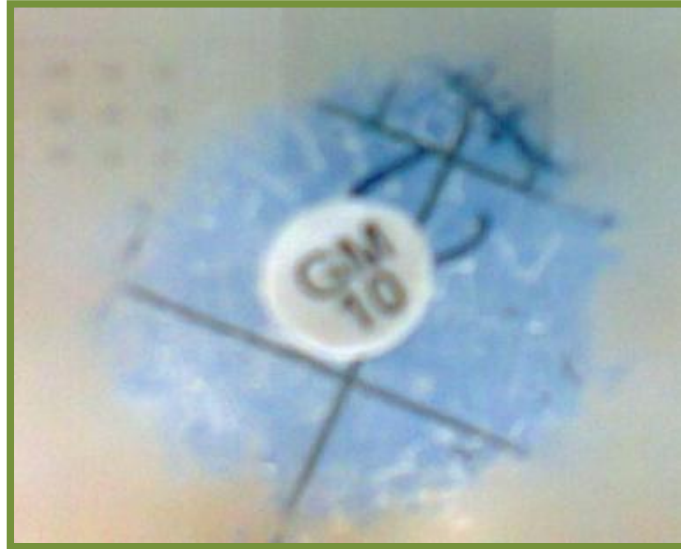
FOTO N° 09: FORMA DE LA HOJA DE *Senna reticulata* “retama”



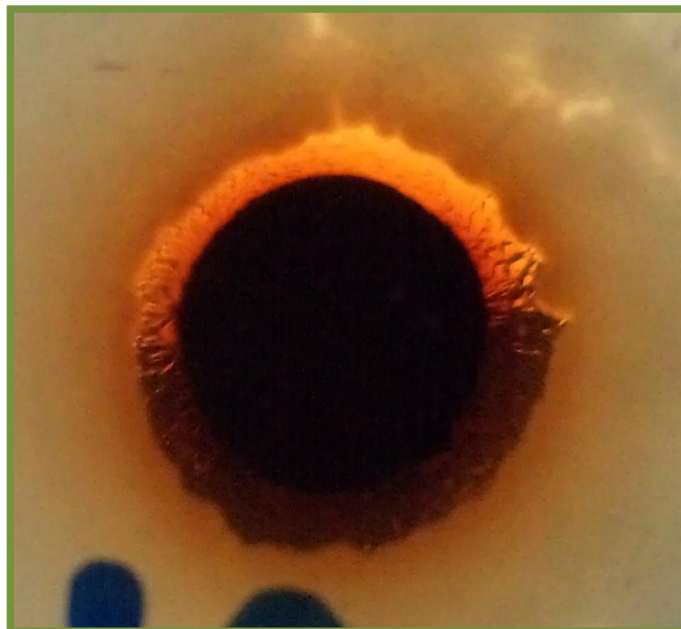
FOTO N° 10: FORMA DE LA VAINA DE *Senna reticulata* “retama”



FOTO N° 11: HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Senna reticulata* “retama” FRENTE A *Staphylococcus aureus* SEGÚN CONCENTRACION.



CONTROL POSITIVO



Halo de inhibición con la concentración de 7.5 mg

**Halo de inhibición con la
Concentración de 15 mg**



**Halo de inhibición con la
concentración de 22.5**



**Halo de inhibición con la
concentración de 30 mg**



FOTO N° 12: HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Senna reticulata* “retama” FRENTE A *Escherichia coli* SEGÚN CONCENTRACION.



CONTROL NEGATIVO

Halo de inhibición con la concentración de 7.5 mg



**Halo de inhibición con la
concentración de 15 mg**



**Halo de inhibición
concentración de 22.5**



**Halo de inhibición con la concentración de
30 mg**

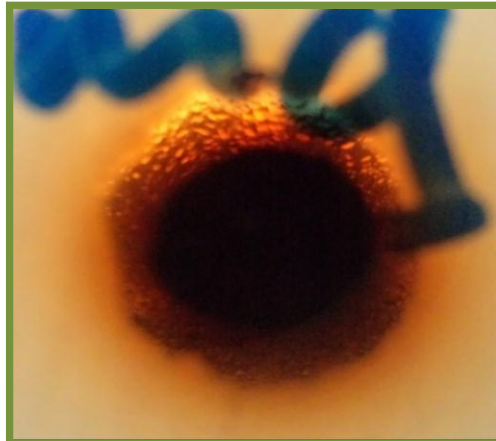
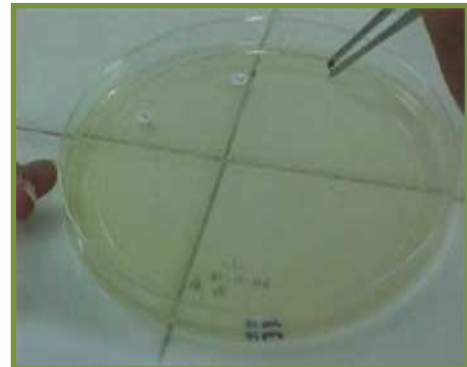


FOTO N° 13: PREPARACIÓN DE LAS PLACAS, INOCULACIÓN DE LOS DISCOS, SIEMBRA DE MICROORGANISMOS.

PREPARACION DE LAS PLACAS CON AGAR MUELLER HINTON

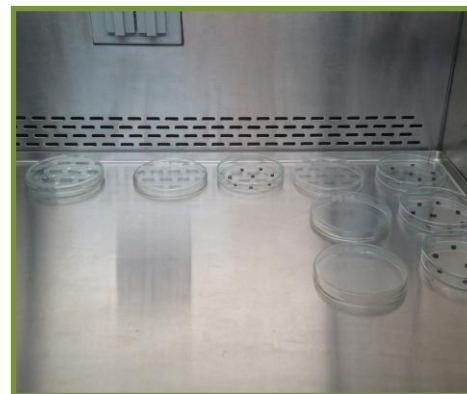


INOCULACION DE LOS DISCOS



SIEMBRA DE LOS MICROORGANISMOS PATOGENOS

Escherichia coli, Staphylococcus aureus.



ANEXO N° 05

**PRUEBAS DE NORMALIDAD DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS
DE INHIBICION POR EXTRACTO ETANÓLICO E
HIDROALCOHOLICO EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

<i>Senna reticulata</i> “retama” (Willd)	Microorganismo Patógeno	Concentración	Z de K-S	Significancia P
HOJA	<i>Escherichia coli</i>	7,15 mg/ml	0,384	0,999
		15,0 mg/ml	0,804	0,538
		22,5 mg/ml	0,520	0,949
		30,0 mg/ml	0,384	0,999
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,15 mg/ml	0,657	0,780
		15,0 mg/ml	0,471	0,979
		22,5 mg/ml	0,595	0,870
		30,0 mg/ml	0,384	0,999
VAINA	<i>Escherichia coli</i>	7,15 mg/ml	0,597	0,869
		15,0 mg/ml	0,384	0,999
		22,5 mg/ml	0,384	0,999
		30,0 mg/ml	0,384	0,999
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,15 mg/ml	0,420	0,994
		15,0 mg/ml	0,301	1,000
		22,5 mg/ml	0,301	1,000
		30,0 mg/ml	0,355	1,000

Se sometió a la variable cuantitativa del diámetro del halo de inhibición por extracto Etanólico en las hojas e Hidroalcohólico en vainas de la *Senna reticulata* “retama” (Willd) según microorganismo patógenos del estudio; en primer lugar a las pruebas de normalidad de Kolmogorov – Smirnov encontrando que todas cumplen los criterios de normalidad ($p > 0,05$).

ANEXO N° 06

PRUEBAS DE LEVENE SOBRE LA IGUALDAD DE LAS VARIANZAS ERROR^a DEL HALO DE INHIBICION POR EXTRACTO ETANÓLICO (HOJA) E HIDROALCOHÓLICO (VAINA) DE *Senna reticulata* “retama” (*Willd*) EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

Variable dependiente: Diámetro

Parte	Microorganismo Patógeno	F	gl1	gl2	Sig.
Hoja	<i>Escherichia coli</i>	1,198	3	12	0,352
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,879	3	12	0,187
Vaina	<i>Escherichia coli</i>	0,015	3	12	0,997
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,804	3	12	0,085

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza del error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos; a. Diseño: Intersección + Concentración

Se demuestra igualdad de varianzas a lo largo de todos los grupos ($p > 0,05$); así como en el Diseño de efectos de: Intersección + Concentración. Condiciones necesarias en todas pruebas paramétricas como el ANOVA y comparaciones múltiples.