

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* L (huacatay) en cepas de *Pseudomona aeruginosa*, *in vitro*

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

**Bach. Cordero Hidalgo, Mayra
Bach. Pinedo Caldas, Gisella**

ASESOR:

Mg. Q.F. Montellanos Cabrera, Henry

**LIMA – PERÚ
2018**

DEDICATORIA

A Dios por protegerme y darme las fuerzas suficientes para avanzar en mi desarrollo profesional.

A mis padres por su inmenso cariño y respaldo en todas las actividades que desempeño.

MAYRA

A Dios por bendecirme y darme la fuerza necesaria para continuar este trayecto.

A mis padres por su apoyo incondicional a mis hermanos que me brindaron su respaldo

GISELLA

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Inca Garcilaso de la Vega y a los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica por habernos dado la oportunidad de formarnos profesionalmente y a mi principal motivo mi hija Valeria y a mi esposo que me han impulsado a seguir luchando por mis sueños.

MAYRA

Agradezco a mis docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica por brindarnos todo sus conocimientos y enseñanzas.

GISELLA

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria
Agradecimientos
Índice de Tablas
Índice de Figuras
Índice de Anexos
Resumen
Abstract

Introducción	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Identificación y formulación del problema	4
1.2.1. Problema general.....	4
1.2.2. Problemas específicos	4
1.3. Objetivos de la investigación	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación de la investigación	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.1.1. Antecedentes nacionales	7
2.1.2. Antecedentes internacionales	9
2.2. Bases teóricas	11
2.2.1. Tagetes minuta (Huacatay).....	11
2.2.1.1. Descripción botánica	11
2.2.1.2. Taxonomía	13
2.2.1.3. Antecedentes etnofarmacológicos.....	13
2.2.1.4. Estudio fitoquímico	13
2.2.1.5. Composición química	13
2.2.1.6. Propiedades medicinales y uso tradicional	14
2.2.2. Pseudomonas aeruginosa.....	14
2.2.2.1. Morfología	14
2.2.2.2. Patogenia	15

2.2.2.3. Características de cultivo de P. Aeruginosa.....	15
2.3. Formulación de Hipótesis	15
2.3.1. Hipótesis general	15
2.3.2. Hipótesis específicas	16
2.4. Operacionalización de Variables e Indicadores	16
2.5. Definición de términos básico	16
CAPITULO III. METODOLOGÍA	18
3.1. Tipo de investigación	18
3.2. Diseño de investigación	19
3.3. Población y muestra de la investigación	19
3.3.1. Población	19
3.3.2. Muestra.....	19
3.4. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos	20
3.4.1. Técnica	20
3.5. Equipos, materiales y reactivos	21
3.5.1. Equipos.....	21
3.5.2. Materiales	21
3.5.3. Reactivos	22
3.5.4. Material biológico	23
3.6. Procedimiento experimental	23
3.7. Técnicas estadísticas de análisis de datos	30
CAPITULO IV. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
4.1. Resultados de la investigación.....	31
4.2. Prueba de hipótesis	36
4.3. Discusión de resultados.....	38
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1. Conclusiones	39
5.2. Recomendaciones	40
Referencias bibliográficas	41
Anexos.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Distribución de placas	30
Tabla 2	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> L.	31
Tabla 3	Resultados de la prueba de solubilidad "Huacatay"	32
Tabla 4	Promedio de desviación estándar extracto etanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 20%	33
Tabla 5	Promedio de desviación estándar extracto etanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 50%	34
Tabla 6	Promedio de desviación estándar extracto etanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 80%	35
Tabla 7	Contrastación de hipótesis	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Tagetes minuta L.	12
Figura 2	Comparativo de los halos de inhibición extracto etanólico de la Tagetes minuta "Huacatay" 20%	33
Figura 3	Comparativo de los halos de inhibición extracto etanólico de la Tagetes minuta "Huacatay" 50%	34
Figura 4	Comparativo de los halos de inhibición extracto etanólico de la Tagetes minuta "Huacatay" 80%	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Matriz de consistencia	47
Anexo 2	Testimonios fotográficos.....	48
Anexo 3	Reporte de contenido por espectrofotometría UV- VIS.....	62
Anexo 4	Certificados del laboratorio.....	63
Anexo 5	Certificado del huacatay	64
Anexo 6	Ficha de observación Ad-Hoc de la marcha fotoquímica	65
Anexo 7	Ficha de observación Ad Hoc de prueba de solubilidad	67
Anexo 8	Ficha de observación Ad- Hoc de recolección de datos	69

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes Minuta* (huacatay) en cepas de *Pseudomona aeruginosa*. Este estudio es de tipo transversal de nivel descriptivo, y de diseño experimental.

En las pruebas de screening fitoquímico, se determinó que el extracto sí presenta metabolitos secundarios como alcaloides y flavonoides.

Los resultados evidencian que el extracto etanólico a la concentración de 20mg/ml sí presenta efecto antimicrobiano, frente a cepas de *Pseudomona aeruginosa* (sensibilidad baja); a la concentración de 50mg/ml presenta efecto antimicrobiano de sensibilidad media; y a la concentración de 80mg/ml presenta una sensibilidad alta. Por otro lado, al realizar una comparación con el fármaco gentamicina 40mg/ml presentó menor actividad antimicrobiana ante las cepas de *Pseudomona aeruginosa*. Por lo tanto, el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta L* (huacatay) presentó efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Pseudomona aeruginosa* con mayor efectividad.

Palabras clave: Efecto antimicrobiano; extracto etanólico; huacatay; hojas de tagetes minuta

ABSTRACT

The main objective of this research was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Tagetes Minuta* (huacatay) in strains of *Pseudomana aeruginosa*.

This study is of an application type, transversal of descriptive level, and of experimental design.

In the phytochemical screening tests, it was determined that it does present secondary metabolites such as alkaloids and flavonoids.

The results show that the huacatay does have an antimicrobial effect against *Pseudomonas aeruginosa* strains and at a concentration of 20mg / ml (low sensitivity), at the concentration of 50mg / ml it has an antimicrobial effect (medium sensitivity); and at a concentration of 80mg / ml, it has a high sensitivity. When compared to the drug gentamicin 40mg / ml, it had less antimicrobial activity against the *Pseudomonas aeruginosa* strains. Therefore, the ethanolic extract of the leaves of *Tagetes minuta* L (huacatay)) showed an antibacterial effect in vitro in strains of *Pseudomonas aeruginosa* with greater effectiveness.

Keywords: Antimicrobial effect; Ethanolic extract; huacatay; sheets of tagetes minuta

INTRODUCCIÓN

El *Tagetes minuta* L. o popularmente conocido como Huacatay es una planta proveniente de la familia Asteráceas, la cual se utiliza en la gastronomía, es el componente por excelencia. Asimismo, el huacatay contiene cualidades que cumplen la función de: fungicida, pesticida y otros⁽¹⁾.

Durante la elaboración de esta investigación, se preparó una parte de los extractos etanólicos a través de maceración del vegetal y los subextractos etéreos y clorofórmicos para identificar las agrupaciones fitoquímicos, y con la intervención de los extractos por medio del método de Mitscher, frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*, para comprobar el efecto antimicrobiano⁽²⁾

El uso de las plantas como herramientas medicinales se da desde tiempos ancestrales para curar el conocido mal de ojo, empacho y enfermedades. Desde épocas legendarias, la clasificación de plantas medicinales estuvo relacionada con elementos morfológicos característicos de las hojas, raíces y planta con la formación de los órganos humanos⁽³⁾.

De acuerdo a lo señalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del 80 por ciento de la población recurren al uso de las plantas medicinales como una segunda opción para contrarrestar dolencias y enfermedades; por ello, hay quienes tienen una gran relevancia en el sector salud; en consecuencia, aumenta los medicamentos herbolarios y otros preparados a base de extractos y vegetales⁽⁵⁾.

Bajo estas premisas, se desprende el siguiente problema: ¿El extracto etanólico de *Tagetes minuta* (Huacatay) presenta efecto antimicrobiano, in vitro, en cepas de *Pseudomonas Aeruginosa*? En esta orientación, el estudio en su desarrollo tiene la siguiente estructura secuencial:

En el capítulo I, se desarrolló el planteamiento y formulación del problema de estudio; en el capítulo II, se presentan los antecedentes nacionales e

internacionales y las bases teóricas que corresponden a las variables de estudio respectivamente; así mismo, se realiza la definición de términos relacionados.

En el capítulo III, se plantea la Metodología de la investigación; aquí se explican las técnicas e instrumentos de recolección de datos y fundamento de los equipos utilizados en la investigación. Así mismo, el procesamiento y análisis de los datos estadísticos.

En el capítulo IV, se detalla la discusión de los resultados y se realiza la comprobación de la hipótesis. Finalmente, en el Capítulo V, se señalan las conclusiones y recomendaciones y se indican, además, los anexos correspondientes.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

En la época contemporánea, el índice de natalidad aumenta desmesuradamente, lo que produce un incremento considerable de enfermedades, las cuales, con el pasar del tiempo, toman fuerza y son producidas por hongos, virus, bacterias, entre otros.

La utilización excesiva y frecuente de fármacos origina que los virus y bacterias se fortalezcan; por lo tanto, produce una resistencia microbiana, es decir, con el tiempo, los antimicrobianos no tendrán efecto en las personas.

La infección está vinculada con la contaminación a través de laboratorios, detergentes, grifos de agua y otros. Es destacable la resistencia de las pseudomonas, ya que pueden permanecer por un largo tiempo. No es inusual encontrarla, por ejemplo en la microflora usual de personas que no padecen enfermedades.⁽⁴⁾

La Organización Mundial de la Salud destaca la importancia que tienen las plantas medicinales y la medicina ancestral, ya que, especialmente en los sectores poblacionales que no cuentan con los recursos suficientes para adquirir fármacos o medicina costosa, por ello recurren a la medicina natural, pues resulta más económica y tiene efectos positivos⁽⁵⁾.

La *Pseudomona aeruginosa* forma parte del modelo de la multirresistencia producida por la resistencia natural a los betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y otros. De igual forma, ocurre la implementación de resistencias logradas con gran fluidez. Pertenece a uno de los patógenos más relevantes, pues existe una gran cantidad de aislamiento producto de brotes de infecciones intrahospitalarias. Los

episodios de neumonía; bacteriemias son muy usuales en la sección de cuidados intensivos ⁽⁷⁾.

Ante la deficiente investigación científica sobre el huacatay y su gran importancia, se desarrolla este estudio con el propósito evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) en cepas de *Pseudomona aeruginosa* y cuantificar la presencia de flavonoides los cuales nos brindaran sus beneficios en la salud.

1.2 Identificación y formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (huacatay) tendrá actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomona aeruginosa in vitro*?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (huacatay) tendrá metabolitos secundarios que genere actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomona aeruginosa in vitro*?
2. ¿Existirá una concentración óptima del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) que genere un efecto antimicrobiano *in vitro* por el método de difusión en Agar?
3. ¿Cuál será el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay), *in vitro*, con el método de difusión en Agar en comparación con el fármaco de Gentamicina?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) en cepas de *Pseudomona aeruginosa*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar si el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) presenta metabolitos secundarios que genere efecto antimicrobiano.
2. Precisar la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) con efecto antimicrobiano *in vitro* por el método de difusión en Agar.
3. Comparar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay), *in vitro*, por el método de difusión en Agar con el del fármaco de Gentamicina.

1.4 Justificación del tema

El trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar si el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) presenta efecto antimicrobiano, *in vitro* en cepas de *Pseudomona aeruginosa*. Estos resultados nos permitirán contribuir a la ciencia médica, ya que no existen estudios al respecto.

La bacteria *Pseudomona* es causante de grandes problemas médicos como las s infecciones a los pulmones, vías respiratorias, vías urinarias, tejidos blandos y producir sepsis que puede llegar a la muerte.

En estos últimos tiempos, esta bacteria Gram negativa está siendo gran resistencia a los tratamientos farmacológicos es por ello, también, que nos vemos en la necesidad de buscar, en las plantas, un tratamiento que pueda combatirla.

La Organización Mundial de la Salud indica que la *Pseudomona Aeruginosa* es una bacteria que se encuentra en la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos estas bacterias multiresistentes son muy dañinas y por lo general, rondan por los hospitales, lugares de reposo para adultos mayores y otras personas que requieran de una atención con tecnología como los ventiladores y catéteres intravenosos⁽²⁾.

Por ello, en la búsqueda de una solución, buscamos trabajarlo con el extracto etanólico de las hojas de la *Tagetes Minuta* (Huacatay) como un posible tratamiento para este tipo de bacterias.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes nacionales

Segovia y Suárez (2010)⁽⁹⁾ realizaron un estudio titulado “Composición química de *Tagetes elliptica* Sm y determinación de su actividad antibacteriana, antifúngica”. En el estudio, se empleó el método de destilación por arrastre de vapor de agua y acto siguiente fue inducido a un análisis fisicoquímico. Se usó el método de difusión y dilución en agar con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), respectivamente, frente a los siguientes microorganismos: *S. aureus*, *S. epidermidis* (cepa clínica), *B. subtilis* (cepa ambiental), *E. coli* (cepa clínica), *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp. (Cepa clínica) y *C. albicans*. Del total de las muestras procesadas, el aceite esencial mostró actividad antibacteriana frente a 5 cepas bacterianas, mostrándose *Klebsiella* resistente, como resultado de la demostración menor de 18 mm de halo de inhibición en función a la *Candida albicans*, donde el aceite pudo establecer una significativa actividad antifúngica.

Vargas (2013)⁽¹⁰⁾ realizó un estudio titulado “El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes minuta* —Huacatayll o —Chinchull frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella typhi*. Las plantas de *T. minuta* fueron recolectadas de la provincia de Yungay, Región Ancash. El aceite esencial fue obtenido a partir de las hojas mediante la destilación por arrastre de vapor. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar, en el cual se observa que *S. aureus* a la concentración de aceite esencial de 5% forma un halo de inhibición de 17.72 mm y al 10% de 22.97 mm; y para *B. cereus* el promedio del diámetro del halo de inhibición del crecimiento al 5% y 10% de

aceite esencial de *T. minuta* son 28.55 mm y 39.62 mm respectivamente. Así mismo para *S. typhi* el halo de inhibición del crecimiento producido por el aceite esencial de *T. minuta* al 5% es de 17.78mm y 24.28 mm al 10%. Para los tres microorganismos ensayados a medida que se incrementa el porcentaje de aceite esencial aumentan los halos de inhibición. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Tagetes minuta* se determinó por el método de dilución en agar, siendo para *S. aureus* de 1.25 $\mu\text{L/mL}$, mientras que para *B. cereus* y *S. typhi* es de 2.5 $\mu\text{L/mL}$. Por lo tanto; el presente estudio permite afirmar que el aceite esencial de *Tagetes minuta*, obtenido mediante el método de destilación por arrastre de vapor; posee efecto antibacteriano sobre *S. aureus*, *B. cereus* y *S. typhi*.

Bazán (2014)⁽¹¹⁾ realizó un estudio titulado “Esta investigación tiene como objetivo determinar las características farmacognósticas de sus hojas”, así como también la cuantificación de los flavonoides totales presentes en el extracto fluido de dichas hojas. Para ello se recolectaron muestras de la planta del caserío Pedregal, de la provincia Trujillo, región La Libertad, determinándose inicialmente las características macromorfologías y sus parámetros físico-químicos: porcentaje de humedad residual, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido, cenizas solubles en agua y materia extraña. Además, se realizó la huella dactilar del extracto hidroalcohólico y el tamizaje fitoquímico según la prueba de la Gota. Finalmente, se cuantificó flavonoides mediante espectrofotometría UV/Visible a 256 nm. Los resultados obtenidos fueron: materias extrañas 0.128 %, humedad 8.70%, cenizas totales 16.78%, cenizas insolubles en ácido 2.09%, cenizas solubles en agua 14.7%, sustancias solubles en agua 35.16%, en alcohol a 30° GL 31.62%, en alcohol a 50° GL 31.50%, alcohol a 70° GL 21.27%, sólidos totales en macerado 1.15 g/100mL, sólidos totales en extracto fluido 4.0 g/100 mL. En el tamizaje fitoquímico, arrojó positivo: esteroides, triterpenos, alcaloides, taninos y flavonoides.

Pimentel et al. (2015)⁽¹²⁾ realizaron un estudio titulado “Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (orégano), *Tagetes elliptica* (chincho) y del *Tagetes minuta* (huacatay) comparado con

Clorhexidina al 0.12% y Colgate Plax frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277". Material y métodos: Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Difusión en Agar, Mínima Concentración Inhibitoria y Técnica Pour Plate (Técnica de Vertido en Placa). Conclusiones: Existe actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (orégano), *Tagetes elliptica* (chincho) comparado con Clorhexidina al 0,12% y Colgate Plax frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; asimismo el *Tagetes minuta* (huacatay) tiene efectividad con esta última cepa bacteriana.

2.1.2 Antecedentes internacionales

Felice et al (2004). "Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) contra las bacterias evaluadas con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6,25 – 25 µg/mL para bacterias Gram positivas y de 25- 50 µg/mL para bacterias Gram negativas". Además, la identificación de los niveles de presencia de dihidrotagetonas, tagetonas, y ocimenonas, contenidas en esta planta, tendrían relación con la propiedad antibacteriana identificadas. Otras pruebas determinaron que el extracto de hojas de *Tagetes lucida* posee actividad contra bacterias Gram positivas. Otras Investigaciones relacionados con la etnofarmacología y composición química de los aceites esenciales están reforzando los conocimientos de sus propiedades de acción antibacteriana y antioxidante de sus propiedades de acción antibacteriana y antioxidante.

Tereschuk (2005)⁽¹⁴⁾ realizaron un estudio titulado "los flavonoides mayoritarios del género *Tagetes* extraídos de hojas y flores de *T. minuta*, *T. pusilla* y *T. terniflora* fueron agliconas como patuletina, quercetina, quercetagetina, isoramnetina". Se trató de determinar el mecanismo de acción, como antimicrobiano, del flavonolquercetagetina, una de las agliconas más ampliamente distribuida en el género *Tagetes*, atribuyéndosele una potente actividad inhibitoria frente a todas las enzimas ADN polimerasas α , β y ADN polimerasa I de *E. coli*, así como, frente a la enzima ARN

polimerasa. Las propiedades biológicas de los flavonoides fueron descritas por primera vez por Szent-Gyorgyi (Premio Nóbel 1938) reportando que los flavonoides de la cáscara de Citrus resultaban efectivos en la prevención de la fragilidad capilar y el sangrado asociados con el escorbuto y los llamó “vitamina P”.

Uvidia (2012)⁽¹⁵⁾ realizó un estudio titulado “Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos”. Se obtuvieron los extractos etanólicos por maceración de toda la planta y fueron concentrados en rotavapor. Los subextractos se extrajeron en embudo de separación con una alícuota del extracto etanólico y éter etílico inmiscible, la fase superior es el éter. Se procedió igual con el cloroformo, la fase inferior es el cloroformo; se eliminó los solventes y se tuvo los subextractos. Por reacciones de coloración o precipitación se comprobó la presencia de aceites esenciales, flavonoides y terpenoides en los extractos etanólicos. Utilizando el método de Mitscher se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se comprobó que los extractos etanólicos y subextractos etéreos y clorofórmicos de las especies estudiadas si presentan actividad antimicrobiana; por ello, que se recomienda continuar con los estudios para determinar otras actividades biológicas.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Tagetes minuta (Huacatay)

Tagetes minuta, conocida en el Perú comúnmente como “huacatay”, es una hierba de carácter anual, perteneciente a la familia de las Asteráceas, en su tamaño vertical puede medir hasta cincuenta centímetros de altura; sus hojas poseen una forma lanceolada, dentadas y producen un olor intenso. Su

producción se extiende a todas las regiones del Perú. También crece en las zonas yungas y valles altos pertenecientes a Bolivia. El popular nombre de “huacatay” tiene como origen a la palabra quechua del mismo nombre, el mismo que se usa en diferentes partes de la serranía peruana.

Las especies del género *Tagetes* proceden de la tribu *Tageteae* que posee dieciséis géneros, y tienen como origen a la familia de las *Asteraceae*. La denominación de *Tagetes*, en un principio, fue dado por el filósofo Apuleus, durante el S. II, como muestra de admiración al Dios Etrusco Tages por sus bellas flores. Tiempo después el nombre fue tomado por Leonhartus Fuchius señalado en su tratado titulado “*Historia Stirpium*”, durante el S. XVI. Este género *Tagetes* posee aproximadamente sesenta especies, entre las que destaca la especie: “*Tagetes elliptica* Sm, asimismo de *T. erecta*, *T. minuta*, *T. pusilla*, *T. lucida*, *T. patula*, y *T. terniflora*, siendo las más notables por su utilización en la elaboración de alimentos, como condimento, extracción de pigmentos, medicinas tradicionales y enemigo de nematodos fitoparásitos”⁽¹⁶⁾.

Tagetes elliptica Sm también es denominada como “chincho”, “chinchu” o “chikchimpa”, la cual es utilizada como condimentos ⁽¹⁷⁾.

2.2.1.1 Descripción botánica

El *Tagetes minuta* L., proviene de la familia de las *Asteráceas*, Especie herbácea ascendente y no muy ramificada que puede llegar a medir hasta 50 cm. Sus hojas son lanceoladas, dentadas y un olor fuerte; mide de 1,2 a 2,5 y hasta 5 cm de largo por 0,2 hasta 0,7 mm de ancho. Presenta cabezuelas (inflorescencia de flores densas, sésiles, sobre una estructura parecida a un cojín), en corimbos (flores a una misma altura, pero con pedicelos de diferentes longitudes), pedúnculos (sostén de la inflorescencia) de 0,1 a 0,5 cm de largo, involucre (grupo de hifas que rodean a la inflorescencia) de 0,7 a 1 cm de largo por 0,15 a 0,3 cm de ancho.

Es una Hierba anual, erecta, glabra, de olor penetrante, persistente pero agradable crecer hasta 1,8m de altura. Tiene pinnatisectas con 4-8 pares de segmentos lanceolados, aserrados y segmento terminal algo mayor. Las flores son de color amarillo, se disponen en cimbras

corimbiformes compactas conteniendo bolsas oleíferas. Se propaga muy bien por semilla. Es muy fácil de observar creciendo en muchas macetas en el jardín⁽¹⁸⁾.

El fruto es una cápsula (fruto simple, seco que abre al madurar) desde 0,45 hasta 0,7 cm de largo. La planta se propaga por semillas. Estas requieren luz para germinar, su temperatura óptima es de 25°C⁽¹⁸⁾.

Son plantas habitualmente herbáceas arbustivas, en otros casos pueden ser lianas o árboles. Esta planta se expande en todos los lugares del mundo.

Tiene una inflorescencia a manera de capullos, de flores abundantes que circulan las brácteas cuya agrupación se denomina involucre.

Dentro de un mismo capullo puede haber flores de distinto sexo y forma. La flor puede ser unisexual o hermafrodita; mientras que el cáliz está conformado por pelos llamados papus o vilano. Además, puede estar conformado por escamas; la corola es tubular y su parte superior concluye en 1, 2 o 5 labios. Su fruto corresponde a un aquenio coronado por el papus utilizado para la dispersión. Las Asteráceas ostentan familias cuantiosas de vegetaciones con flores⁽¹⁹⁾.



Figura 1: Tagetes minuta L.

Fuente: Francisco Rodriguez

2.2.1.2 Taxonomía

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Género: Tagetes
Especie: Tagetes minuta L

2.2.1.3 Antecedentes etnofarmacológicos

La práctica de la medicina popular o habitual constituye una alternativa fundamental frente a los productos medicinales denominados sintéticos, de este modo a partir de una variedad de plantas medicinales se han obtenido y se consiguen diversas propiedades activas, ubicados en el fruto, raíces, tallos y hojas, en plantas, donde se encuentra incluido el huacatay, a través de procedimientos técnicos de extracción: acuosa, alcohólica, hidroalcohólica, así como de técnicas de destilación o cocción⁽¹⁹⁾.

2.2.1.4 Estudio fitoquímico

Investigaciones elaboradas sobre *T. multiflora* determinaron la existencia significativa de los siguientes elementos: En mayor porcentaje con un 47% está tagetona (47%), (E)- ocimenona (17%), (Z)- β -ocimenona (15%) y en menor cantidad, con un 8% de presencia se encuentra la dihidrotagetona (8%). De esta forma, *T. erecta* L. adquiere la estructura química y la actividad de su aceite esencial⁽¹⁶⁾. Se determinó que los elementos químicos poseen actividad antibacteriana y antioxidante.

2.2.1.5 Composición química

La estructura química de las diferentes especies vegetales no son semejantes, pues obedecen a componentes intrínsecos como la edad de la planta, la identidad de las variedades, el estado de las hojas y componentes extrínsecos a las zonas geográficas, su manera de cultivo y el medio ambiente.⁽¹⁷⁾

Contiene flavonoides, ácido valeriánico, ácido siríngico. Etimol, sustancia responsable de su aroma. - 9 - Planta rica en esencia (0,5%) que se resinifica con facilidad, contiene diversos terpenos. El aceite esencial contiene bitienil, canfeno, cinerina I y II, citral, ácido fórmico y acético, monometilfumarato, jasmolina I y II, limoneno, linalool, cis-ocimenona, transocimenona, patulitrina, feniletanol, α y β pineno, piretrina I y II, quercetagertrina, salicaldehído, ácido siríngico, tagetona, cis-tagetona, dihidrotagetona, tiofeno y ácido valeriánico.⁽¹⁸⁾

2.2.1.6 Propiedades medicinales y uso tradicional

Es un excelente digestivo y antiparasitario, posee actividad antimicrobiana, antifúngica, insecticida, acaricida y antioxidante comprobadas. Estudios revelan su eficacia para eliminar las larvas de *Aedes aegypti*, el mosquito vector del dengue y la fiebre amarilla, y la mosca de la fruta⁽²⁰⁾.

2.2.2 Pseudomonas aeruginosa

Es considerada como la especie vital y con un significativo nivel de producción de infecciones en el humano. Más del 50% de las sustancias en estado de aislamiento clínico ocasiona piocianina, un pigmento que otorga un color azul-verdoso al medio de cultivo. Obtienen un olor dulzón producto de 2-aminocetofenona y, algunas veces, las colonias exhiben un brillo metálico. Denota una exclusiva inclinación por las zonas húmedas (equipos respiratorios, desinfectantes, las piscinas de fisioterapia.). El mayor número de infecciones conlleva ser hospitalizada, y en pacientes inmunodeprimidos o con alteraciones de las barreras normales -piel y mucosas- (quemaduras / cirugía / cateterismo / intubación)⁽²³⁾.

2.2.2.1 Morfología

Células aisladas, rectas o curvadas, bacilares, pero no helicoidales. Dimensiones de 0,5 a 1µm por 1,5 a 4 µm. móviles por flagelos polares, monótricos o multítricos. No producen vainas ni prostecas. No se conocen etapas de reposo. Gram negativos, quimioorganotrofos y aerobios estrictos⁽²⁴⁾.

2.2.2.2 Patogenia

Tiene la particularidad de producir enfermedades producto de sus características toxigénicas e invasivas, puesto que pueden generar exotoxina termolábil. Poseen una fuerte resistencia ante los antibióticos⁽²²⁾.

Ostentan un nivel alto de susceptibilidad ante las infecciones ocasionadas por estos microorganismos provenientes de los lactantes y prematuros, pacientes quemados, y los que han experimentado intervenciones quirúrgicas o diagnósticas. La *P. aeruginosa* produce infecciones de heridas, meningitis, septicemia, infecciones urinarias, neumonía, otitis, conjuntivitis y otros⁽²⁵⁾.

2.2.2.3 Características de cultivo de *P. Aeruginosa*

El caldo sencillo se procesa en abundancia, forma una enérgica turbiedad, anillo y película, conforma un denso agrado similar al polvo de tiza que se desintegra sin problema, el particular olor fuerte es producto de la trimetil- amina, el medio se torna de coloración verdeazulado. En agar simple, las colonias son inmensas, circulares, brillantes, de borde perenne u ondulado, grisáceas con el centro opaco y periferia traslucida, pH 6.8 a 7.2, la colonia no adquiere un color por el pigmento elaborado, este se propaga al medio suministrándole una coloración verdosa fluorescente durante primeros días, y consecutivamente parda⁽²⁶⁾.

2.4 Formulación de hipótesis

2.4.1 Hipótesis general

El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) sí tiene actividad antimicrobiana en cepas de pseudomona aeruginosa in vitro.

2.4.2 Hipótesis específicas

1. Existen metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) que generan efecto antimicrobiano
2. Sí existe una concentración del extracto etanólico de las hojas **de** *Tagetes minuta* (Huacatay) con efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar que genera en cepas de Pseudomona aeruginosa.
3. Existe en el extracto etanólico de las hojas **de** *Tagetes minuta* (Huacatay) efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco de Gentamicina).

2.5 Operacionalización de variables e indicadores

V. Independiente	V. Dependiente
Extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay)	Efecto antimicrobiano en cepas de Pseudomona aeruginosa.
Indicadores	Indicadores
Grado de Concentración	Halo de Inhibición

2.6 Definición de términos básicos

Planta Medicinal:

Es un recurso biológico, a veces se usa por completo, en otros únicamente se utiliza alguna parte, flores, fruto, tubérculo, etc. del elemento optado, se adquieren extractos que utilizan para el tratamiento de alguna afección como, por ejemplo: la aflicción de estómago, dolor de cabeza, hinchazón y otros. Algunos la denominan

como medicina tradicional; la acción terapéutica (alivio o mejora), se produce por la adquisición de principios activos⁽³¹⁾.

Actividad Antibacteriana: Se entiende por la acción que ejerce un factor externo sobre el crecimiento microbiano⁽⁴⁾.

Cepa Pseudomona aeruginosa: es un bacilo Gram negativo móvil gracias a su flagelo polar, Es un patógeno oportunista que rara vez causa enfermedad en individuos sanos; en caso de producirse esta , suele manifestarse en infecciones de la piel, otitis, neumonía y enfermedades nosocomiales⁽⁴⁾.

Efecto Antimicrobiano: es una sustancia que elimina microorganismos o inhibe su crecimiento, tales como bacterias, hongos⁽⁴⁾.

Fitoterapia: requiere de productos de origen vegetal con el objetivo de prevenir, curar y aliviar la serie de síntomas y enfermedades. Contribuye con las llamadas conocidas popularmente como terapias naturales. Una buena parte de la diversidad de usos se hace en forma de autoconsumo⁽⁴⁾.

Solubilidad:

Capacidad de disolución de un compuesto químico; depende de la forma en que se encuentran: Aglicones libres (son insolubles en agua) o heterósidos (son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos)⁽⁴⁾.

Maceración

La maceración es el proceso de contacto continuo en un tiempo determinado de la droga con el menstruo formando un grupo uniforme mezclado en el cual el menstruo reacciona conjuntamente en la totalidad las fracciones de la droga, transitando por medio de todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta causar una concentración en equilibrio con la del contenido celular⁽⁴⁾.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Investigación

La investigación de acuerdo a sus características responde al tipo de estudio experimental. Para Hernández, Collado y Baptista los diseños experimentales son los que permiten la manipulación intencionada de una o más variables independientes para analizar las consecuencias que se generan en la variable dependiente. Según esta propuesta, en este estudio, se manipuló de manera intencionada la variable independiente: Extracto etanólico de las hojas de Tagetes minuta (huacatay) para luego analizar las consecuencias de manipulación que se generarán en la variable dependiente: Efecto antimicrobiano, in vitro. Además, la investigación fue de enfoque cuantitativo, ya que se presentarán los resultados a través de mediciones numéricas para probar las hipótesis planteadas en este estudio⁽²⁶⁾.

En este sentido, de acuerdo a las condiciones y al alcance del estudio es una investigación de tipo:

Transversal: Porque el estudio se ejecutó en un momento determinado, ya que las variables se observaron en una sola circunstancia luego de un reducido lapso de tiempo con una aproximación de 24 horas posterior del cultivo.

In vitro: Porque la investigación se realizó con parámetros controlados, en medios de cultivo, acondicionadas para el desarrollo de las bacterias y las condiciones investigadoras intencionalmente manipuladas ⁽²⁾.

3.2 Diseño de Investigación

La investigación responde al diseño cuasi experimental, donde el estudio se desarrolla con grupos ya formados, no aleatorizados. Estos diseños se aplican a situaciones reales en los que no se pueden formar grupos aleatoriamente, pero pueden manipularse la variable experimental (Hernandez et. Al 2006:203) y responde al siguiente diseño:

E	O1	X	02
C	O1	-	02

Donde:

- E** : Grupo experimental
- C** : Grupo control
- O1** : Preprueba
- X** : V. independiente
- O2** : postprueba

La investigación en su diseño, además, obedece al criterio transversal, debido a el procedimiento experimental se desarrolló en un periodo de tiempo preestablecido, abril –mayo2018; las mismas que se ejecutaron en los ambientes del laboratorio de la UPCH

3.3 Población y muestra

3.3.1 Población

Corresponde a los agares con cepas de *Pseudomona aeruginosa*. Se realizó el ensayo con la planta del “Huacatay”.

3.3.2 Muestra

- Extracto etanólico de las hojas del Huacatay para las pruebas de Screening Fitoquímico, Cromatografía en capa fina, Prueba de Flavonoides Totales por espectrofotometría *UV-VIS* y Prueba de Solubilidad.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Técnica

- Screening Fitoquímico

Estos ensayos se pueden verificar sobre la misma droga; en forma entera, pulverizada o como es más frecuente en extractos que se pudieron obtener de diferentes procedimientos de extracción de la planta y con diferentes solventes.

Son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación de la droga a estudiar, es por lo general la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de la planta.

También para los ensayos de metabolitos secundarios se les hace prueba, pero van a hacer comunes a todas las plantas es por eso que carece de interés diagnóstico.

Las pruebas para el screening fitoquímico comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación, fluorescencia, microsublimación).

El procedimiento es poner de 2 a 5 mL del extracto de "Huacatay" en los tubos de ensayo para luego agregar de tres (03) a cinco (5) gotas de los reactivos para la identificación de los metabolitos⁽¹⁸⁾.

- Prueba de Cromatografía en capa fina (CCF)

Se le denomina de esta forma a las técnicas de análisis básicas, ya que para la ejecución la muestra no debe ser mucha. Por lo general la utilizan para medir indicadores en los productos naturales.

También es usado para el ensayo semicuantitativo contrastando el nivel de manchas vistas con estándares apropiados.

La localización de estos elementos, de forma aislada, usualmente es producto de métodos particulares o generales, pues la luz ultravioleta detecta los compuestos que se encargan de absorber la longitud de onda larga 365nm y de onda corta a 254 nm⁽²²⁾.

3.5 Equipos, materiales y reactivos

3.5.1 Equipos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

- Balanza Gramera. Para el pesado de las hojas del Huacatay.
- Balanza Analítica. Para el pesado de las dosis del Huacatay.
- Estufa. Para el secado de las hojas del Huacatay.
- Rotavapor. Para la extracción de alcohol de las hojas del Huacatay.
- Espectrofotómetro UV-VIS. Para la cuantificación total de flavonoides
- Plancha de calentamiento. Para el secado de las placas cromatográficas.
- Luz UV 254 y 366 nm. Para ver las manchas de alcaloides autoclave
- Incubadora
- Vernier

3.5.2 Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales:

- Material estéril de Laboratorio
- Papel Kraft
- Matraz Erlenmeyer 250 y 500 mL
- Embudo de vidrio
- Papel filtro
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Fiolas de 50 mL
- Pera de bromo de 250 mL
- Estándar de Quercetina
- Estándar de Cafeína
- Pipeta de 25 mL
- Sacabocado
- Placas Petri
- Micropipetas de 100 uL
- Tubos de ensayo de 15 x 150
- Mechero
- Asa de Kolle

3.5.3 Reactivos

Para el trabajo, se utilizaron los siguientes reactivos:

- De Mayer
- De Wagner
- De Dragendorff
- De ácido Fosfowolframio
- De Sonneschein
- De Reineckato
- De Shinoda (magnesio + ácido clorhídrico concentrado)
- De Cloruro Férrico
- De gelatina al 1%
- Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger)
- De Ninhidrina
- De Fehling A
- De Fehling B
- De Lugol
- De Tricloruro de Aluminio al 2%
- Reactivo 2,4 DNPH
- Reactivo Metanol: Agua (25:75)
- Metanol
- Etanol
- Acetato de sodio 1 M
- Agua destilada
- Alcohol de 96°C
- Cloroformo
- Isopropanol
- Reactivo BAW (Butanol: Agua : AAG) (4:3:1)
- Ácido sulfúrico 2 N
- Hidróxido de sodio al 10%
- Agar Dextrosa Sabouraud (Merck)
- Solución salina fisiológica
- Caldo Tioglicolato
- Dimetil sulfoxido (DMSO)
- Control Positivo "Fluconazol"

3.5.4 Material biológico

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

3.6 Procedimiento experimental

Preparación de la muestra

Las hojas de *Tagetes minuta* L. fueron recolectadas en el distrito de Chaclacayo, región Lima, en forma de tallos con un peso de 20 kg. En el laboratorio de farmacognosia de la UPCH, se procedió a limpiar, seleccionar y separar las hojas con cuidado para el secado de las hojas se utilizó papel kraft para su posterior secado.

Luego, se llevó a la estufa a T 40°C, utilizando esa temperatura para no alterar la calidad de los metabolitos presentes.

Una vez ya seca las hojas de *Tagetes minuta* L. son molidas manualmente, lo cual obtuvimos un peso de 500 gr de hojas totalmente secas.

Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico se obtuvo por maceración, de las hojas de *Tagetes minuta* L. (500 gr) en 1.5 Lt de etanol durante 2 semanas renovando el solvente cada semana y con agitación constante. Al término de la extracción, se filtró el extracto etanólico con papel Whattman para no dejar pasar las hojas y solo líquido para nuestro análisis.

Posteriormente, se llevó la muestra al rotavapor, equipo que es utilizado para la evaporización del solvente. Este trabajo es a una T controlada que no debe exceder a 50 °C, después de un tiempo transcurrido, la muestra es llevada a la estufa a 40°C para obtener el extracto seco en forma de melcocha, obteniéndose un total de 30 g. de extracto puro de *Tagetes minuta* L.

Screening Fitoquímico: Metabolitos Secundarios

A. Prueba para alcaloides

Para la prueba de identificación de alcaloides se realizan ensayos generales como son (Wagner, Mayer, Dragendorff, Scheibler, Sonneschein y Reineckato) sobre el extracto de "Huacatay", se considera que hay presencia de alcaloides si se obtienen cuatro resultados positivos de los ya citados.

Reactivo de Mayer. (Yoduro de mercurio y potasio), es de color blanco o crema en el momento en el que se agrega tres o cinco gotas de acidulada del extracto.

Reactivo de Wagner. (yodo-yoduro de potasio), cuando se le añade tres o cinco gotas se pone de color marrón.

Reactivo de Dragendorff. (Yoduro de bismuto y potasio), en el momento en el que agrega tres a cinco gotas de solución acidulada del extracto, entonces se pondrá de color rojo a naranja.

Reactivo de Scheibler. (Ácido fosfortungtico), cuando se le añade de tres a cinco gotas, entonces adquiere un color blanco.

Reactivo de Sonneschein. (Ácido fosfomolibdico), en el momento en el que se añade de tres a cinco gotas, cambia de coloración a naranja.

Reactivo de Reineckato. ($\text{NH}_4 [\text{Cr} (\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]2\text{H}_2\text{O}$) da un precipitado floculante color rosa cuando se agrega de 3 a 5 gotas.

B. Prueba de Flavonoides y Compuestos Fenólicos

Las plantas condensan una gran pluralidad de elementos fenólicos dadas en la etapa del desarrollo, estos compuestos productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico.

Es interesante señalar que este tipo de metabolitos, caracterizada por su organización posee a las antraquinonas, naftoquinonas y taninos, este último es condensado de un flavonoide como la antocianidina y si es hidrolizable de ácidos fenólicos.

Reactivo de Shinoda. (Limaduras de magnesio + HCl concentrado) presenta un coloración de amarillo a rojo a magenta, en el caso de los flavanoles. Serán flavonas si se presenta una coloración roja, azul o violeta. Si en caso la coloración fuera amarilla, entonces, sería isoflavonas. Se deduce que son isoflavononas, chalconas y auronas si en caso fueran incoloras.

Reactivo de Cloruro Férrico. (Cloruro férrico disuelto en agua), emanará un color azul, verde o negro cuando se agrega de tres a cinco gotas, prueba general.

Reactivo de Gelatina al 1%. (Gelatina + cloruro de sodio) da un precipitado blanco cuando se agrega de 3 a 5 gotas, prueba para taninos.

Reactivo de Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger). Para detectar Antraquinonas y Naftoquinonas, se le añadirá de tres a cinco gotas y luego se pondrá de color rojo.

Metabolitos Primarios

A. Prueba para carbohidratos

Reactivo de Fehling A y B

Para determinar el nivel de carbohidratos, será necesario agregar, a la muestra, 5 mL de Fehling A y B para, posteriormente, llevarlo a baño maría. De esta manera, la aparición de un anaranjado ladrillo precipitado será un indicador de la existencia de carbohidratos.

B. Prueba para almidón

Reactivo de Lugol

Si existe almidón en la muestra, entonces adquirirá el color oscuro luego de añadir tres gotas de Lugol.

C. Prueba para cetonas y alcaloides

Reactivo de 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH)

A la muestra se le agrega una gota de DNPH y se distingue un precipitado amarillo o naranja rojizo evidencia las cetonas en la muestra.

Cromatografía en capa fina para alcaloides

Para la ejecución de este tipo de prueba, es necesario el uso de capa fina para alcaloides. Se utilizó la placa cromatográfica de la marca Merck (TLC Silica gel F254) como fase no permanente para la fase móvil se usó el diluyente de elución de Metanol.

Para la comparación, se aplicó un indicador de cafeína con una concentración de 10 mg/ mL el cual se inyectó 5 µl, situación parecida a la muestra del huacatay.

En la placa cromatografía, se aplicó 5 µl del estándar y de muestra y una vez concluida la corrida se seca la placa en la plancha de calentamiento hasta la evaporación de todo el solvente, para luego aparecer las manchas de desplazamiento en la luz UV 254 nm. Para determinar los alcaloides encontrados se procedió a rociar el ácido sulfúrico al 2 % y luego el reactivo de Dragendorff, como revelador, para una evidencia positiva aparecerán manchas naranjas.

La muestra de “Huacatay” dio positivo para alcaloides.

Cromatografía en capa fina para flavonoides

Para la aplicación de la prueba de cromatografía en capa fina para alcaloides, durante la etapa temporal, fue necesario la utilización de la placa cromatográfica. Mientras que para la etapa permanente se incluyó el solvente de elución de Butanol, Agua y ácido acético glacial en proporción de (20:15:5) respectivamente, esta mezcla se distribuyó en una pera de bromo de 250 mL para luego agitarlo. Se estableció que la etapa temporal fue más compacta que la permanente.

Para la comparación, fue necesario la utilización del estándar de Quercetina en una concentración de 10 mg/ mL, el cual se inyectó 5 µl a la placa cromatográfica, situación parecida sucedió con la muestra de “Huacatay”.

En la placa cromatográfica, se aplica 5 µl del estándar y de muestra luego de haber finalizado la corrida. Acto siguiente, la muestra se secó dentro de una plancha de calor, hasta evaporarse los solventes. Destaca la luz ultravioleta a 254 nm, y utiliza como indicador de tricloruro de aluminio para una muestra positiva, lo cual es particular de las manchas amarillas.

La muestra de “Huacatay” dio positivo para flavonoides.

Prueba de espectrofotometría UV VIS para flavonoides totales Para las técnicas cromatográficas para su separación o detección para flavonoides son muy variadas, así como también en las condiciones en las cuales ellas puedan realizarse.

Método de flavonoides totales. Para adquirir una concentración de 0.024, 0.1 y 0.2 mg/mL en fiolas de 50 mL es necesario ejecutar una prueba bajo una concentración de 1 mg/mL de estándar para luego realizar diluciones.

Después a cada concentración, se le toma 2 mL de alícuota y se añade 6 mL de etanol + 0.4 mL del reactivo de tricloruro de aluminio al 2% + 0.4 mL del reactivo de acetato de sodio 1M y agua cantidad suficiente para 20 mL de volumen total. Se incuba por 30 minutos.

Para las muestras se selecciona una alícuota de 0.5 mL y se agrega 6 mL de etanol + 0.4 mL del reactivo de tricloruro de aluminio al 2% + 0.4 mL del reactivo de acetato de sodio 1M y agua cantidad suficiente para 20 mL de volumen total. Se incuba aproximadamente por treinta minutos.

Para las lecturas en el espectrofotómetro UV-VIS se considera una longitud de onda de 415 nm.

Los resultados fueron los siguientes:

Se obtuvo 16.92 mg de Quercetina / mL de extracto; es decir, los flavonoides totales se expresan en miligramos equivalentes de Quercetina por mililitros de extracto.

Procedimiento experimental (etapa II)

El trabajo realizó experimentalmente la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de la *Tagetes minuta* "Huacatay" (a partir de una muestra llevada a sequedad bajo técnicas especificadas anteriormente) frente a la cepa *Pseudomonaa aeruginosas* ATCC 9027, en concentraciones 20%, 50% y 80%), empleando el método de difusión en Agar (excavación en placa) y evaluando el diámetro del halo que genera. Considerando como controles de susceptibilidades: un blanco dimetilsulfoxido DMSO para descartar que la actividad inhibitoria fuese por el solvente del extracto etanólico. Y un control de actividad antimicrobiana seleccionando la Gentamicina.

De los 30 g que se obtuvo la melcocha, se procedió a retirar 5 g de la muestra, la cual vendría a ser mi 100%.

Preparación a una concentración del 20%

100%.....5 g

20%.....X dio como resultado 1g de extracto seco.

Entonces, tenemos que llegar a 5g con DMSO, pero el solvente DMSO tiene una densidad de 1.1g/mL

Si falta 4g de DMSO seria:

1.1 g -----1 ml

4 g----- X dio como resultado 3.64 mL de DMSO para completar.

Preparación a una concentración del 50%

100%-----5g

50%-----X dio como resultado 2.5g de extracto seco.

Entonces, tenemos que llegar a 5g con DMSO, pero el solvente DMSO tiene una densidad de 1.1g/mL

Si falta 2.5g de DMSO seria:

1.1 g ----- 1 ml

2.5g-----X dio como resultado 2.27 mL de DMSO para completar.

Preparación a una concentración del 80%

100%-----5g

80%-----X dio como resultado 4g de extracto seco.

Entonces tenemos que llegar a 5g con DMSO, pero el solvente DMSO tiene una densidad de 1.1g/mL

Si falta 1 g de DMSO seria:

1.1 g ----- 1 mL

1 g----- X dio como resultado 0.91 mL de DMSO para completar.

Reactivación de los cultivos de cepa Pseudomona aeruginosa

La cepa de Pseudomona aeruginosa sembrado en Agar Soya Trypticase TSA por 24 h a 37 °C.

Preparación y estandarización de los inóculos de cepa Pseudomona aeruginosa

A partir de un cultivo joven, las colonias de la cepa de *Pseudomona aeruginosa* fueron suspendidas en caldo Tioglicolato, incubado a 37 °C , a partir de este, se realizó una dilución con solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5 x 10⁸ UFC/mL).

Preparación del medio de cultivo

La metodología de preparación del medio de cultivo Agar Soya Trypticase TSA se encuentra relacionada a la marca del medio empleado.

Para este estudio, se empleó el medio de marca HIMEDIA, cuya forma de preparación es la siguiente: se pesó 4,0 g de medio Agar Soya Trypticase TSA por cada 100 ml de agua destilada, luego se procedió con la homogenización en baño María hasta lograr la disolución completa.

Luego, se procede con la esterilización en la autoclave del medio de cultivo a 121°C y 15 lb de presión, en un espacio de 15 minutos.

Concluido el tiempo, se retira de la autoclave dejando reposar hasta lograr que su temperatura aproximadamente se encuentre a 45 a 50°C.

Una vez logrado que el medio se encuentre a la temperatura esperada, se incorpora empleando la micropipeta un volumen de 100 µL del inóculo estandarizado de *Pseudomona aeruginosa* por cada 100 ml de agar preparado, homogeneizando con movimientos circulares.

Empleando una pipeta de 25 ml depositamos el Agar Soya Trypticase TSA que contiene el inóculo estandarizado de *Pseudomona aeruginosa* en una placa Petri y se dejó solidificar por un lapso mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente, rotular la placa.

Determinación de la actividad antimicrobiana

Para la inoculación del extracto etanólico de la *Tagetes minuta* “Huacatay” (concentraciones de 20%, 50% y 80%), DimetilSulfóxido DMSO y Gentamicina se utilizó el método de excavación en placa.

A cada placa de Agar Soya Trypticase TSA que contiene el inóculo estandarizado de *Pseudomona aeruginosa*, se hicieron excavaciones en número de tres por cada placa de 8mm de diámetro y 8 mm de profundidad empleando un sacabocado estéril, distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 1: Distribución de placas

Grupos	Blanco	Control positivo	Concentración de extracto
Placa Petri N°1	DMSO	Gentamicin a 40 mg/mL	Extracto 30tanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 20%
Placa Petri N°2	DMSO	Gentamicin a 40 mg/mL	Extracto 30tanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 50%
Placa Petri N°3	DMSO	Gentamicin a 40 mg/mL	Extracto 30tanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 80%

Fuente: Elaboración propia ,2018

Rotular cada una de las placas y proceder a incubar las placas a 37°C por un periodo de 24 horas, todos los ensayos se desarrollaron por quintuplicado.

Lectura de resultados

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, retirar las placas de la incubadora y proceder a medir los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier y proceder con el análisis estadístico de los resultados.

3.7 Técnicas estadísticas de análisis de datos

Inicialmente, los datos obtenidos se sometieron a un análisis a partir de la organización de las fichas de datos, de tal forma que todas estén debidamente numeradas para luego ser trasladadas al ordenador y adaptarlo a la base de datos de Microsoft Excel con los respectivos criterios establecidos del investigador.

La información recolectada se analizó con el especialista que fue asignado en el aula de tecnología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la

Universidad Inca Garcilaso de la Vega con una nueva versión de acceso. Para el efecto, se utilizó parámetros de estadística descriptiva para determinar la distribución de los datos recolectados a través de medidas de tendencia central, dispersión, forma y posición. Además, se aplicó medidas de estadística inferencial para el análisis de las hipótesis de la investigación; los resultados se presentaron en tablas con su respectiva representación gráfica. Para analizar diferencias significativas de medias independientes de los cuestionarios se utilizó la prueba paramétrica del Chi cuadrado. Y se considero un 5% como margen de error estadístico.

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Resultados de la investigación

Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 2: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanolico de las hojas de Tagetes minuta L.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS		
Metabolitos Primarios	Reactivo de identificación	Resultado para “Huacatay”
Almidón	Lugol	Coloración oscura (+)
Cetonas	2,4 DNPH	Formación de un anillo rojizo (+)
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS		
Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Resultado para “Huacatay”
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco (-)
	Wagner	Precipitado marrón (++)
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja (+++)
	Scheibler	Precipitado o Color blanco (+)
	Sonnenschein	Precipitado naranja (-)
	Reineckato	Color rosa (+++)
Compuestos fenólicos y Flavonoides	Shinoda	Color rojo (++)
	Cloruro férrico	Color verde (++)
	Gelatina al 1%	Precipitado blanco (++)
	Reacción de Bortranger	Color rojo (-)
Aminoácidos	Ninhidrina	Color rosado (+++)

Fuente: Elaboración propia, 2018

Identificación de metabolitos primarios y secundarios.

(-) La coloración o precipitado no se evidencia

(+) La coloración o precipitado se evidencia poco

(++) La coloración o precipitado se evidencia moderadamente

(+++) La coloración o precipitado se evidencia notablemente

- **Prueba de Solubilidad**

Para la prueba de Solubilidad es necesario requerir del extracto seco del “Huacatay”, muestra pequeña de Huacatay seco y lo añadimos a los tubos de

ensayo para luego mezclar con unos 3 a 5 mL de los solventes como (Alcohol de 96°, Metanol, Etanol, Cloroformo, Agua y Isopropanol) esta procedimiento determinar qué tipo de solvente es más soluble en relación a la muestra seleccionada.

Se debe tener en cuenta la Polaridad del disolvente debido a que este le da propiedades de solubilización en diferentes solutos.

A continuación los resultados obtenidos:

Tabla 3: Resultados de la prueba de solubilidad “Huacatay”

PRUEBA DE SOLUBILIDAD	
Solventes	Resultado para “Huacatay”
Alcohol 96°	(++)
Metanol	(++)
Etanol	(++)
Cloroformo	(+++)
Agua	(-)
Isopropanol	(+)

Fuente: Elaboración propia, 2018

Leyenda

(-) *La solubilidad no se visualiza*

(+) *La solubilidad en menor grado*

(++) *La solubilidad es moderada*

(+++) *La solubilidad es mayor*

Resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana

Lectura de resultados

Una vez transcurrido el tiempo de incubación retirar las placas de la incubadora y proceder a medir los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier y proceder con el análisis estadístico de los resultados.

Tabla 4: Promedio de desviación estándar extracto etanólico de la Tagetes minuta “Huacatay” 20%

	Concentración de extracto
--	----------------------------------

N° de placas	DMSO	Gentamicina 40 mg/mL	Extracto etanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 20%
1	0 mm	39.3 mm	10.4 mm
2	0 mm	40.0 mm	10.4 mm
3	0 mm	40.0 mm	11.6 mm
4	0 mm	39.2 mm	10.2 mm
5	0 mm	39.6 mm	11.1 mm
Promedio:	0 mm	39.62 mm	10.72 mm
Desviación	0	0.38	0.59

Fuente: Elaboración propia, 2018

Los resultados mostrados corresponden al efecto de extracto etanólico de *Tagetes minuta* L (huacatay) a la concentración de 20%, un control positivo (+) de Gentamicina a una concentración de 40mg/mL y un control negativo (-) de DimetilSulfoxido con cinco ensayos. Las mediciones hechas por un Vernier dieron como promedio de halo inhibitorio 10.72 mm para el extracto y un halo de 39.62 mm para el control positivo de Gentamicina y un halo de 0.0 mm para el control negativo de DimetilSulfoxido.

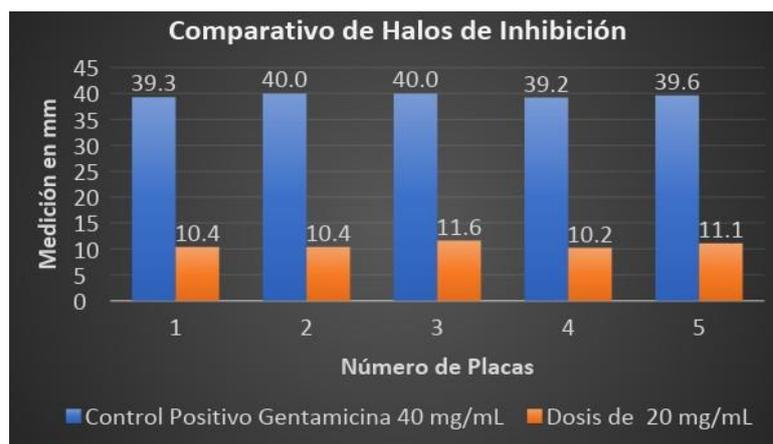


Figura 2: Comparativo de los halos de inhibición extracto etanólico de la *Tagetes minuta* "Huacatay" 20%

Fuente: Elaboración propia, 2018

Tabla 5: Promedio de desviación estándar extracto etanólico de la *Tagetes minuta* "Huacatay" 50%

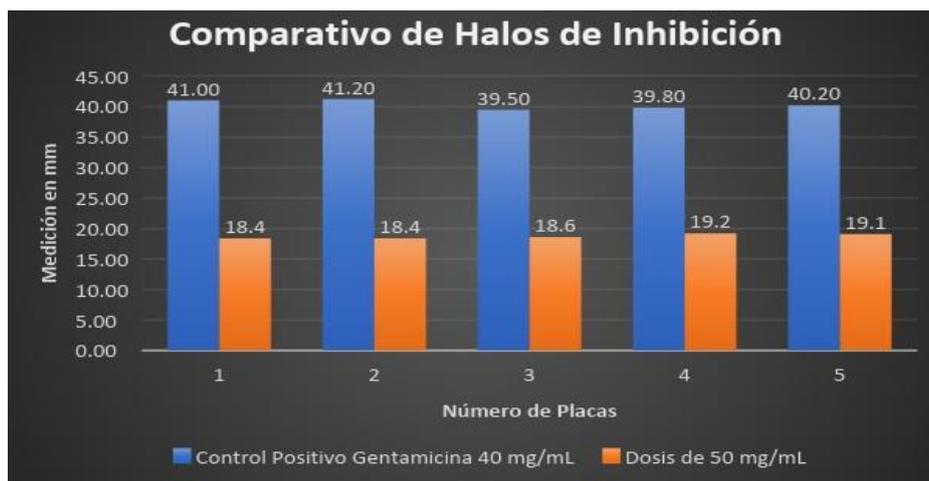
Concentración de extracto

N° de placas	DMSO	Gentamicin a 40 mg/mL	Extracto etanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 50%
1	0 mm	41.0 mm	18.4 mm
2	0 mm	41.2 mm	18.4 mm
3	0 mm	39.5 mm	18.6 mm
4	0 mm	39.8 mm	19.2 mm
5	0 mm	40.2 mm	19.1 mm
Promedio:	0 mm	40.34 mm	18.74 mm
Desviación	0 mm	0.74	0.38

Fuente: Elaboración propia, 2018

Los resultados evidencian que al efecto de extracto etanólico de *Tagetes minuta* L (huacatay) a la concentración de 50%, tiene efecto positivo (+) de Gentamicina a una concentración de 40mg/mL y un control negativo (-) de DimetilSulfoxido, con cinco ensayos. Las mediciones hechas por un Vernier dieron como promedio de halo inhibitorio 18.74 mm para el extracto, un halo de 40.34 mm para el control positivo de Gentamicina y un halo de 0.0 mm para el control negativo de DimetilSulfoxido.

Figura 3: Comparativo de los halos de inhibición extracto etanólico de la *Tagetes minuta* "Huacatay" 50



Fuente: Elaboración propia, 2018

Tabla 6: Promedio de desviación estándar extracto etanólico de la *Tagetes minuta* "Huacatay" 80%

N° de	Concentración de extracto
-------	---------------------------

placas	DMSO	Gentamicina 40 mg/mL	Extracto etanólico de la <i>Tagetes minuta</i> "Huacatay" 80%
1	0 mm	39.5 mm	23.5 mm
2	0 mm	41.5 mm	24.2 mm
3	0 mm	40.6 mm	22.8 mm
4	0 mm	39.8 mm	23.7 mm
5	0 mm	39.7 mm	23.4 mm
Promedio:	0 mm	40.22 mm	23.52 mm
Desviacion	0	0.83	0.51

Fuente: Elaboración propia, 2018

Los resultados mostrados corresponden al efecto de extracto etanólico de *Tagetes minuta* L (huacatay) a la concentración de 80%, un control positivo (+) de Gentamicina a una concentración de 40mg/mL ; y un control negativo(-) de DimetilSulfoxido con cinco ensayos. Las mediciones hechas por un Vernier dieron como promedio de halo inhibitorio 23.52 mm para el extracto, un halo de 40.22 mm para el control positivo de Gentamicina y un halo de 0.0 mm para el control negativo de DimetilSulfoxido.

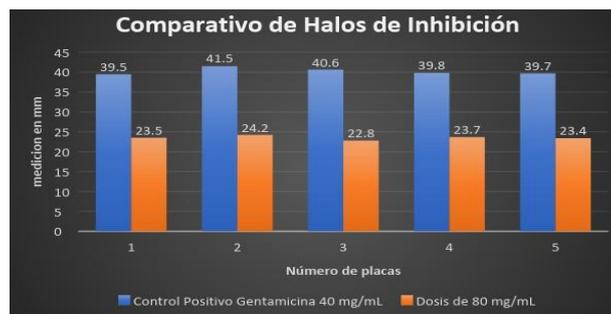


Figura 4: Comparativo de los halos de inhibición extracto etanólico de la *Tagetes minuta* "Huacatay" 80%

Fuente: Elaboración propia, 2018

4.2 Prueba de hipótesis

Tabla 7: Contrastación de hipótesis

Prueba de hipótesis:
H0 = todos los grupos presentan igual inhibición del halo ($p > 0.05$)
Ha = todos o al menos uno de los grupos presentan diferente inhibición del halo ($p < 0.05$)
Criterios de aceptación
Como el nivel de significancia usado es de 0.05 y p hallado es menor a ese valor y $F > F$ crítico, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna, por lo tanto estadísticamente existe disminución del área de cierre en toda las concentraciones ensayadas.

Fuente: Elaboración propia, 2018

Para la contrastación de la hipótesis, se usaron pruebas a lo largo de todo el proceso de investigación, como el tamizaje fitoquímico para saber qué metabolitos tiene las hojas de *Tagetes minuta* L(huacatay) en forma cualitativa, también la cromatografía en capa fina para determinar y dar por sentado que si el extracto tiene metabolitos secundarios como los alcaloides y flavonoides; para saber si tiene efecto antibacteriano, se trabajó con concentraciones del extracto al 20%, 50% y 80%, como un control positivo a la gentamicina a una concentración de 40mg/ml y un control negativo el Dimetilsulfoxido.

Se trabajaron los resultados que aplicando el análisis de varianza de un factor (ANOVA), en el cual se determinó si hay diferencia significativa entre varianzas de los promedios de cada grupo y entre grupos de los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (huacatay).

Y por último se demostró sensibilidad de los halos con respecto a *Pseudomona aeruginosa*, teniendo en cuenta a la escala de Duraffourd.

4.2.1. Hipótesis General

El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) sí tiene actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomona aeruginosa* in vitro.

Para corroborar la hipótesis general, nos vamos a basar en las contrastaciones de las hipótesis específicas ya planteadas.

4.2.2. Contrastación de hipótesis específicas

4.2.2.1 Hipótesis específica 1

H₁. Existen metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) que generen efecto antimicrobiano.

H₀: El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* L (huacatay) no tiene metabolitos secundarios que generen efecto antimicrobiano.

Para la contrastación de esta primera hipótesis específica, se realizó el tamizaje fitoquímico y la cromatografía en capa fina para poder determinar si se obtiene cualitativamente los metabolitos de *Tagetes minuta* L (huacatay)

Los resultados para el tamizaje fitoquímico están referidos en la tabla 2 dándonos como resultado, según el cuadro de leyenda, una evidencia notable (+++) para alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos.

Se concluye, al realizar el tamizaje fitoquímico, una notoriedad de los resultados para alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos, y en cromatografía de capa fina, una serie de flavonoides según se evidenció al ser expuesta a la luz uv 366 nm. Con estos datos, rechazamos la hipótesis nula; eso quiere decir que el extracto etanólico de *Tagetes minuta* (huacatay) sí presenta metabolitos secundarios.

4.2.2.2 Hipótesis específica 2

H₁: Sí existe una concentración del extracto etanólico óptimo de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) con efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en agar.

H₀: El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) no posee concentración óptima que genere efecto antimicrobiano.

Para la contrastación óptima de esta segunda hipótesis específica, se realizó el método de difusión en agar *Tagetes minuta* L (huacatay) para poder determinar si tiene buena concentración y, por lo tanto, genere efecto antimicrobiano.

Los resultados para la concentración de difusión en agar están referidos en la tabla 4, 5 y 6 dándonos como resultado, según el cuadro de leyenda, una concentración al 20% baja, al 50 % media y 80% alta.

Se concluye, que, al realizar el método de difusión en agar, con estos datos rechazamos la hipótesis nula, eso quiere decir que el extracto etanólico de **Tagetes minuta** (huacatay) sí presenta efecto antimicrobiano a distintas concentraciones.

4.2.2.3. Hipótesis específica 3

H₁: Existe en el extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco de Gentamicina.

H₀: El extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) no tiene efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco de Gentamicina.

Para la contrastación de esta tercera hipótesis específica se realizó control positivo (+) de Gentamicina a una concentración de 40mg/mL y un control negativo (-) de DimetilSulfoxido con cinco ensayados. Las mediciones hechas por un Vernier dieron como promedio un halo inhibitorio

Los resultados se muestran en las figuras 2, 3 y 4 dándonos como resultado, según el cuadro de leyenda, una evidencia notablemente (+) para efecto antimicrobiano. Se concluye al realizar el método difusión en agar comparado con el fármaco gentamicina, que presenta efecto antimicrobiano. Con estos datos, rechazamos la hipótesis nula, eso quiere decir que el extracto etanólico de **Tagetes minuta** (huacatay) sí presento efecto antimicrobiano comparado con el fármaco gentamicina.

4.3 Discusión de resultados

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes minuta* L, demostró la presencia de metabolitos secundarios tales como flavonoides y terpenoides. Estos resultados son similares a lo investigado en Ecuador por el autor Uvidia (2012). Este autor encontró la presencia de actividad antimicrobiana del

extracto etanólico y subextractos etéreo de *Tagetes minuta* L y clorofórmico, por reacciones de coloración o precipitación se comprobó la presencia de aceites esenciales, flavonoides y terpenoides en los extractos etanólicos⁽¹⁵⁾.

Se presenció actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar, en el cual se observó que el extracto etanólico de *Tagetes minuta* L. a concentraciones de 20%, 50%, y 80% forma un halo de inhibición de poca sensibilidad, mediana sensibilidad y por último, alta sensibilidad. Estos resultados coinciden con el de Pimentel (2015). Este autor tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico, *Tagetes minuta* mediante el método de Difusión en Agar, Mínima Concentración Inhibitoria. Y demostró actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Tagetes minuta* (huacatay) con efectividad con esta cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados de este estudio concuerdan la presencia de la actividad antimicrobiana⁽¹²⁾.

Además, se demostró, mediante espectrofotometría UV-VIS a 256 nm, la presencia de flavonoides en el extracto de *tagetes minuta* L según, el autor Bazan (2014). El cual también cuantificó flavonoides mediante la espectrofotometría⁽³⁾.

Los resultados de este estudio conciertan la presencia de la actividad antimicrobiana procedente del Huacatay, por lo tanto apoya la investigación propuesta. De igual forma, se sugiere realizar más estudios con el objetivo de obtener resultados más satisfactorios.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Se demostró que el extracto etanólico de las hojas del *Tagetes minuta* (Huacatay) presenta metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos que generan efecto antimicrobiano
2. El grado de concentración al 80% del extracto etanólico de *Tagetes minuta* (Huacatay) presentó un efecto antimicrobiano sumamente sensible en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. El extracto etanólico de las hojas del *Tagetes minuta* (Huacatay) presentó efecto antimicrobiano *in vitro* sensible en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que al momento de compararlo con la gentamicina formó un halo al igual que el fármaco, pero de menor proporción.

5.2 Recomendaciones

1. Se propone el desarrollo de investigaciones con mayor profundidad y con la utilización de otras técnicas con la finalidad de que los resultados encontrados se puedan sostener, en el sentido de que el extracto etanólico de las hojas del *Tagetes minuta* (Huacatay) presentan actividad antimicrobiana.

2. A partir de los resultados encontrados respecto del grado de concentración del extracto etanólico de *Tagetes minuta* (Huacatay), se deben realizar otras investigaciones en la misma orientación a fin de corroborar, estos índices para que puedan ser utilizados adecuadamente.
3. Se deben desarrollar estudios complementarios sobre otras propiedades curativas de la especie *Tagetes minuta* (Huacatay) con el propósito de encontrar alternativas en el tratamiento antimicrobiano.
4. Se debe tener en cuenta los extractos de la especie *Tagetes minuta* (Huacatay), como un componente eficaz para la elaboración de productos antimicrobianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez M. Introducción a la Fitoterapia y la Medicina Tradicional. México DF: Herbal México; 1998. 48-66 p.

2. Fitomedicina. Fitomedicinacl. [Online]. Available from: <http://www.fitomedicina.cl/files/publicacion/Plantas Medicinales, Fitofarmacos y Fitomedicamentos.pdf> 2012/05/19 [Accessed 23 marzo 2018].
3. Bazán Y, Benites J. Características farmacognósticas de las hojas y cuantificación de flavonoides totales del extracto fluido de tagetesminuta (huacatay) provenientes del caserío pedregal, Trujillo, La Libertad; 2014.
4. Corona AL, Miranda MG, Leaños B, Portillo L, Hernández A, Anthon J, et al. Estudio epidemiológico de *Pseudomonasaeruginosa* en pacientes críticos y reservorios. ArchMed Res. 2001; 32(3): 238-42.
5. Moscoso M. Secretos Medicinales de la flora peruana y guía de maternidad, 4ta ed. Madrid: Editorial Mundi-Prensa. España; 2002.
6. Del Fueyo, G. Ontogenia de las glándulas foliares e involucrales de *Tagetes minuta* (Compositae). Bol. Soc. Argent. Bot. 1986.
7. Foca M, Jakob K, Whittier S, Della-Latta P, Factor S, Rubenstein D, Saiman L. Infección endémica por *Pseudomonasaeruginosa* en una unidad de cuidados intensivos neonatales. N Engl J Med. 2000; 343(10): 695- 700.
8. Brack, A, Heinz P. Perú maravilloso. Lima: Epenza Empresa Periodística Nacional. Perú; 2002.
9. Segovia I, Suarez L. Composición química del aceite esencial de *Tageteselliptica* Sm “chincho” y determinación de su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica). Informe de Tesis para el acceso al título profesional de Químico Farmacéutico). Lima: UNMSM; 2010.
10. Vargas A. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tagetes minuta*, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus*

(Tesis para obtener el título profesional). Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.

11. Bazán B, Benites, J. Característica farmacognósticas de las hojas y cuantificación de flavonoides totales de extractos fluido de *Tagetes minuta* L. (Huacatay) provenientes del casería pedregal, provincia Trujillo. La libertad: Universidad Nacional de Trujillo; 2014.
12. Pimentel E, Castillo D, Quintana M, Mautua D, Villegas C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismo de la cavidad bucal. *RevEstomatol Herediana*. Universidad Cayetano Heredia: 25 (4); 2015.
13. Felice, Napolitano F. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetesminuta* L. (Asteraceae) con diferente composición química. *FlavourFragr. J.* 2004; 19: 574–578.
14. Tereschuk ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de tagetes más representativas del noroeste argentino (tesis doctoral). Universidad Nacional de Tucumán; 2005.
15. Uvidia R. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *durantatriacanta*Juss, *Callistemonspeciosus*, Y *Tagetes minuta* L. (Tesis de grado). Ecuador: Escuela Superior Politécnico de Chimborazo; 2012.
16. Ferreyra, R. Flora del Perú: Dicotiledóneas. Lima; 1986.
17. Segovia I, Suarez L. Composición química del aceite esencial de *Tageteselliptica* Sm “chincho” y determinación de su actividad antioxidante,

antibacteriana y antifúngica (Tesis para el título profesional de Químico Farmacéutico). Lima; Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.

18. Visitin A, Bernadello G. Morfología y Anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal Conicet. 2005; 12:8-15.
19. Murga SN. Nemátodos Fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta*, distrito de Virú, La Libertad, Perú. *Neotrophelminthol.* 2007; 1(1): 15- 20.
20. Soule JA. *Tagetes minuta*: Una nueva hierba potencial de América del Sur. New York: New crops. Estados Unidos; 649-54.
21. Gupta M. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello. Colombia; 1995: 161-162 p.
22. Sung I. Fitomedicina 1100 plantas medicinales. Lima: Editorial Isabel. Perú; 257-258.
23. Kiran G.D. Babu, V. Variations in quantitative and qualitative characteristics of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) oils distilled under vacuum and at NTP: 2007.
24. Sung I. Fitomedicina 1100 plantas medicinales. 2.ed. Lima-Perú: Editorial Isabel. 257-258p.
25. Wordpresscom. La Historia de la Gastronomía Peruana. [Online]. Available from: <https://ghperu.wordpress.com/2010/10/30/hito-1-la-pachamanca/> [Accessed 3 abril 2018].
26. Arias B. Uso de plantas medicinales en relación al estado de conservación del bosque en Córdoba. Córdoba-Argentina: *Ecol. Austral.* 2010: 20 (2); 235-246.

27. Micromadridorg. Micromadridorg. [Online]. Available from: http://www.micromadrid.org/pdf/tomo1_tema25.pdf 2012/09/02 [Accessed 3 abril 2018].
28. Pelzcar M. Elementos de Microbiología. 2 da.ed. México D.F: McGraw Hill. México; 1984: 710-713.
29. Elmer W. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color. Buenos Aires: 5aed. Argentina. 2001; 528-535.
30. Divo A. Microbiología Médica. 4a ed. México DF: Interamericana. México; 1990:158,159.
31. ValcarseCodes R, Espino Nuño F. Diccionario Akal de términos biológicos. Ediciones Akal. España; 2003.
32. Flores S. Farmacia galénica. Madrid, Selsa, 1992.
33. Tuyo L. Efecto de la actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. “huacatay” frente a *Candida albicans* (tesis de grado). Tacna; Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2015.
34. Uvidia R. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de *durantatriacantajuss*, *callistemon speciosus*, y *tagetes minuta* L. (Tesis de grado). Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2012.
35. Domingo D. Y Otros. Plantas con acción antimicrobiana. España. Sociedad Española de Quimioterapia. 2003: 16(4); 386-392.

36. Biodiversidad virtual.

<https://www.biodiversidadvirtual.org/herbarium/Tagetes-minuta-L.-img308423.html>

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de consistencia

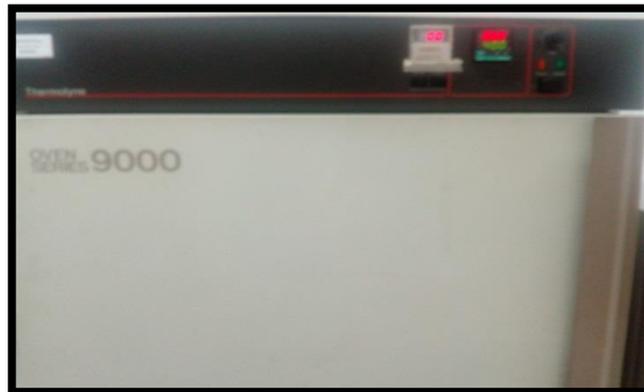
Efecto antimicrobiano del extracto etanolico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) frente a cepa de <i>Pseudomona aeruginosa</i> in vitro.						
PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA
<p>GENERAL</p> <p>¿El extracto etanolico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay) tendrá actividad antimicrobiana en cepas de <i>Pseudomona aeruginosa</i> in vitro??</p>	<p>GENERAL</p> <p>Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) en cepas de <i>Pseudomona aeruginosa</i>.</p>	<p>GENERAL</p> <p>El extracto etanolico de las hojas de <i>tagetes minuta</i> (huacatay) si tiene actividad antimicrobiana en cepas de <i>pseudomona aeruginosa</i>, in vitro.</p>	<p>V.I</p> <p>Extracto etanolico de las hojas de <i>Tagetesminuta</i> (Huacatay)</p>	<p>V.I.</p> <p>Fitoquímica y Microbiológico</p>	<p>V.I.</p> <p>Identificación de metabolitos secundarios concentración: 0, 20, 50 y 80 mg/mL</p>	<p>Diseño: Experimental</p> <p>Tipo: Transversal</p> <p>Nivel: Explicativo</p>
<p>ESPECIFICO</p> <p>1. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay) tendrá metabolitos secundarios que genere actividad antimicrobiana en cepas de <i>pseudomona aeruginosa</i>,in vitro?</p> <p>2.- ¿Existira una concentración óptima del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) que genere un efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar?</p> <p>3. ¿Cuál será el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) in vitro por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco de Gentamicina?</p>	<p>ESPECIFICO</p> <p>1. Identificar si el extracto etanolico de las hojas de <i>tagetes minuta</i> presenta metabolitos secundarios que genere efecto antimicrobiano.</p> <p>2. Precisar la concentración del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) con efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar.</p> <p>3. Comparar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) in vitro por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco de Gentamicina.</p>	<p>ESPECIFICO</p> <p>1.Existen metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i>(Huacatay)</p> <p>2. Si existe una concentración del extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) con efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar.</p> <p>3. Existe en el extracto etanólico de las hojas de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) efecto antimicrobiano in vitro por el método de difusión en Agar comparado con el fármaco de Gentamicina).</p>	<p>V.D</p> <p>Actividad Antimicrobiana en cepas de Pseudomona aeruginosa.</p>	<p>V.D</p> <p>Tamizaje Fitoquímico</p> <p>Solubilidad</p> <p>Cromatografía en capa fina</p> <p>Halo inhibitorio frente a la cepa de <i>Pseudomona aeruginosa</i></p>	<p>V.D</p> <p>Cambios en el diámetro del Halo inhibitorio. medido con un vernier</p>	<p>Población muestra: la muestra estuvo conformada el extracto de Huacatay</p> <p>Instrumento: ficha de observación ad-hoc</p> <p>Instrumento de recolección de datos técnica: observación estructurada no participante de laboratorio</p> <p>Procesamiento y análisis de datos: Análisis descriptivo e inferencial con los programas Excel mediante pruebas: -Anova</p>

Anexo 2: Testimonios fotográficos

1.- Hojas de Huacatay

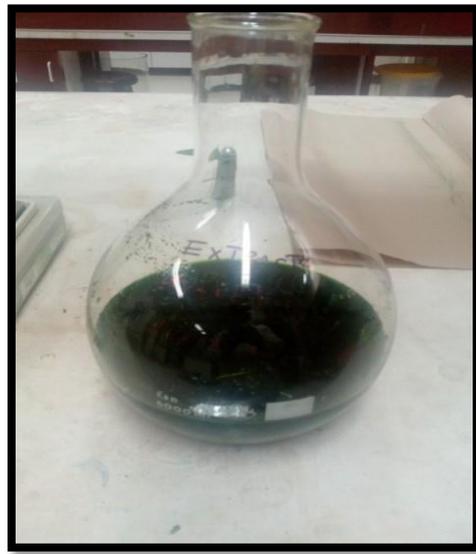
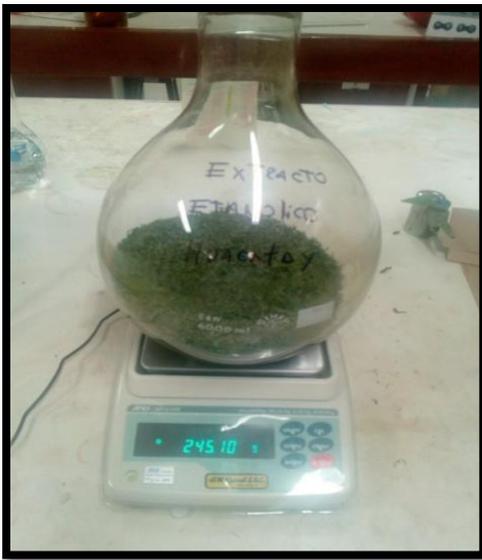


2.- Secado de las hojas de “Huacatay” en la estufa a 40 °C



3.- Triturado de las hojas de “Huacatay” y macerado





4.- Filtrado del extracto etanolico de las hojas de "Huacatay"

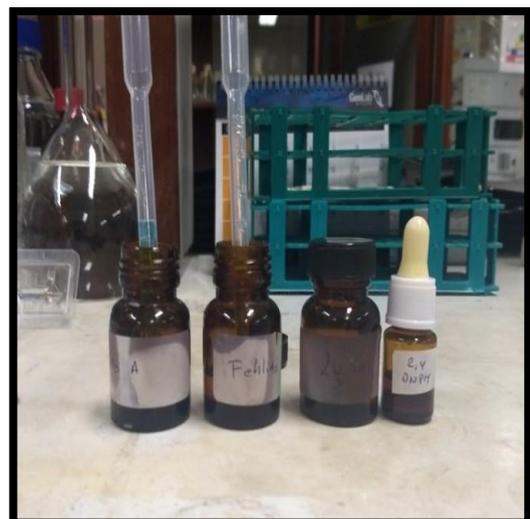
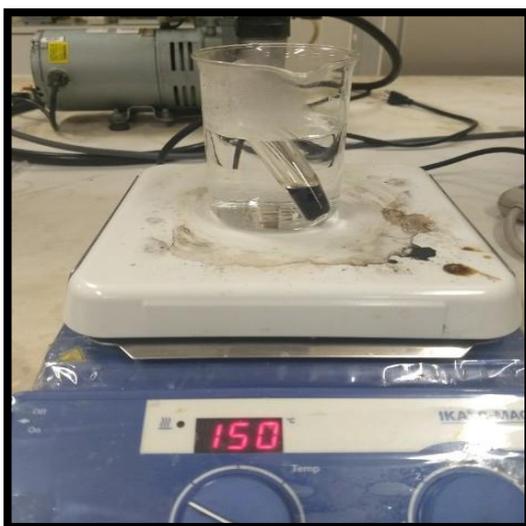
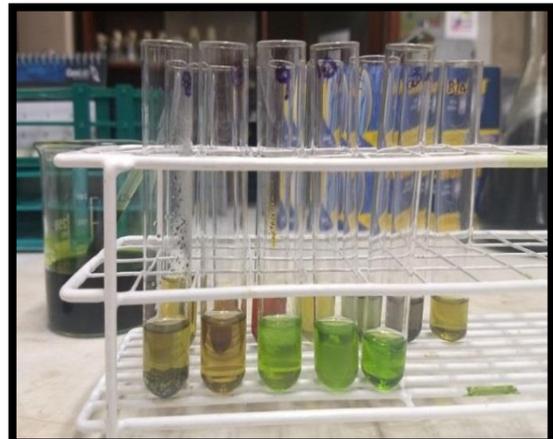
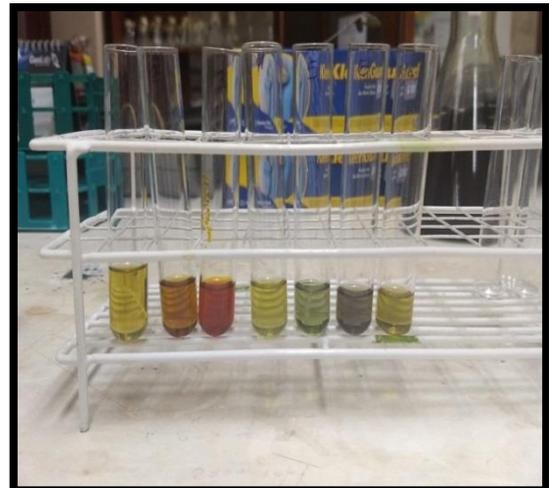




5.- La muestra filtrada en el Rotavapor y luego en la Estufa



6.- Screening Fitoquímico del extracto de las hojas de "Huacatay"



7.- Prueba de Solubilidad

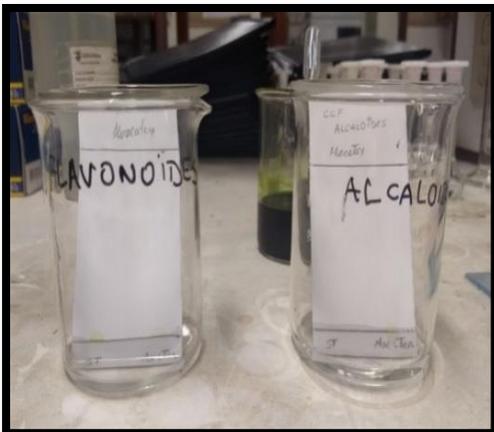
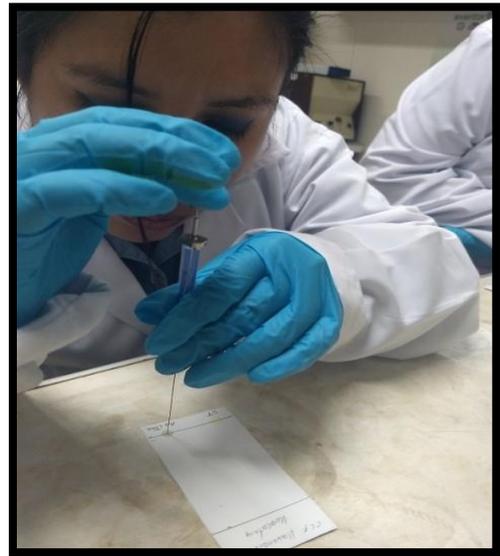
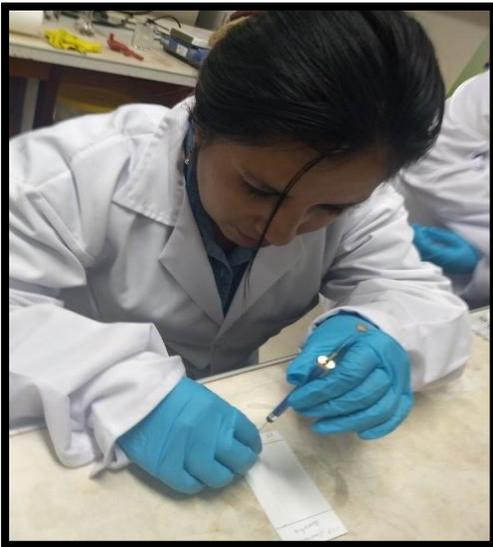


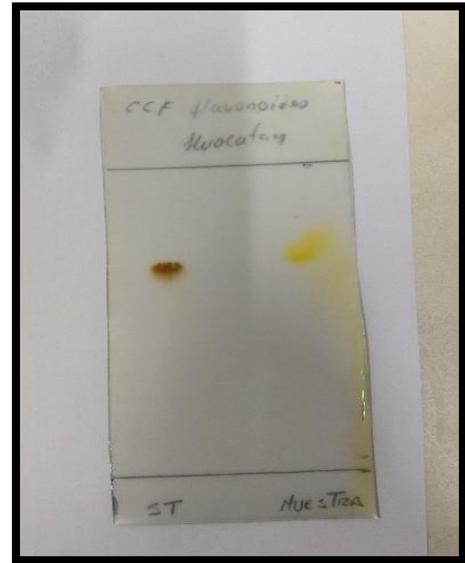
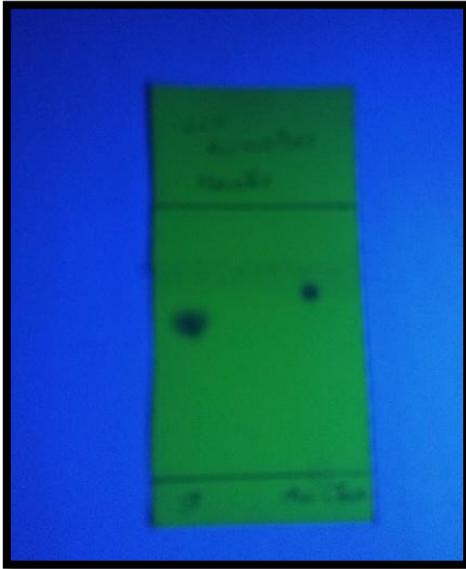
8.- Cuantificación de Flavonoides Totales por UV-VIS





9.- Cromatografía en capa fina de las hojas del huacatay – (Flavonoides y Alcaloides)





Reactivación de los cultivos de cepa *Pseudomona aeruginosa*



La cepa de *Pseudomona aeruginosa* sembrado en Agar Soya Tripticasa
TSA por 24 h a 37 °C.

Preparación y estandarización de los inóculos de cepa

Pseudomonas aeruginosa

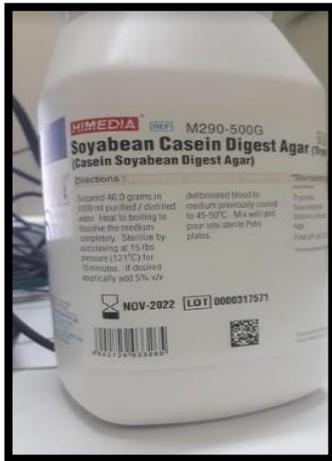


Nefelómetro de MacFarland

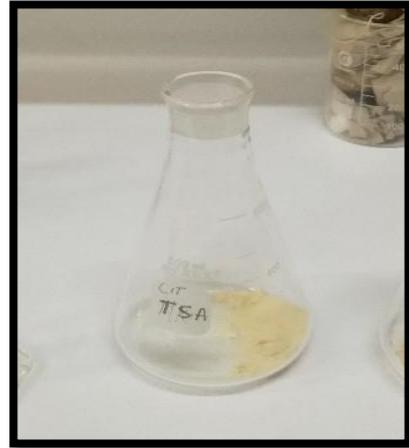


Cepa suspendidas en caldo Tioglicolato, a partir de estese realizó una dilución con solución

Preparación del medio de cultivo

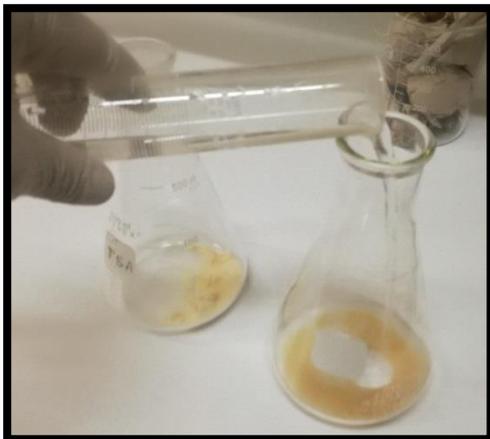


Salina fisiológica estéril



Medio de Cultivo Agar Soya Trypticasa TSA

Colocar el medio de cultivo TSA en un Erlenmeyer 250 mL



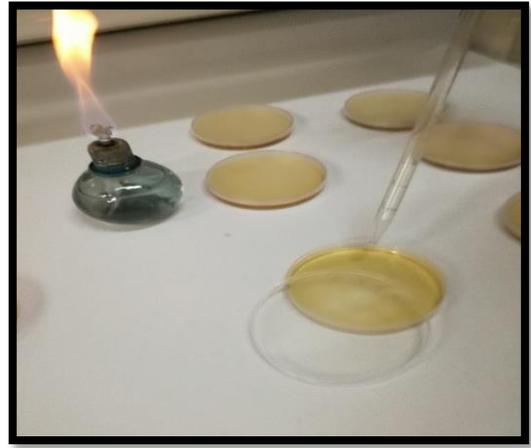
4,0 g de medio Agar Soya Trypticasa TSA por cada 100 ml de agua destilada, homogenizar.



Autoclavar del medio de cultivo a 121°C y 15 lb de presión por un periodo de 15 minutos.



Empleando la micropipeta un volumen de 100 μ L del inculo estandarizado de *Pseudomona aeruginosa* por cada 100ml de agar preparado, homogenizando con movimientos circulares

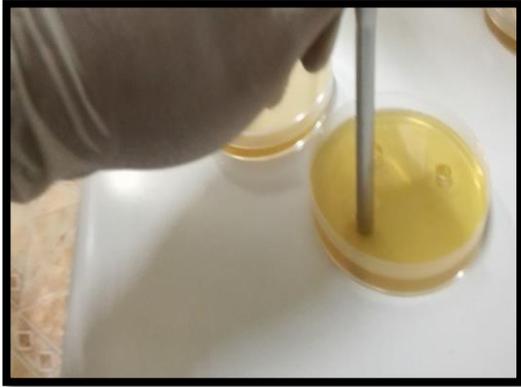


Empleando una pipeta de 25 ml depositamos el Agar Soya Trypticase TSA que contiene el inculo estandarizado de *Pseudomona aeruginosa* en una placa Petri



Dejar solidificar por un lapso mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente

Determinación de la actividad Antibacteriano

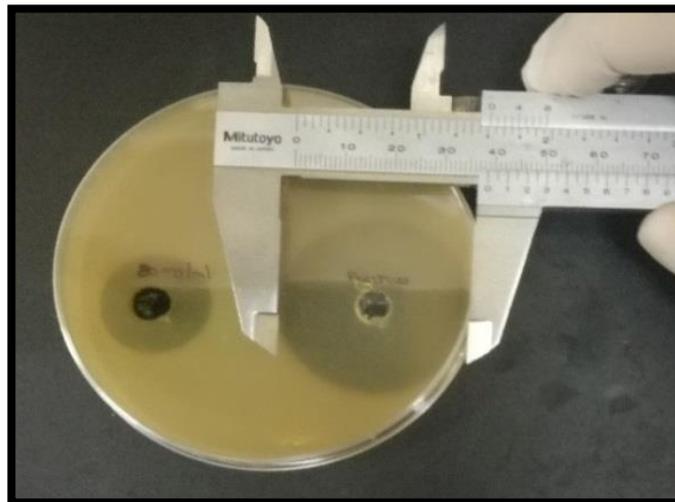
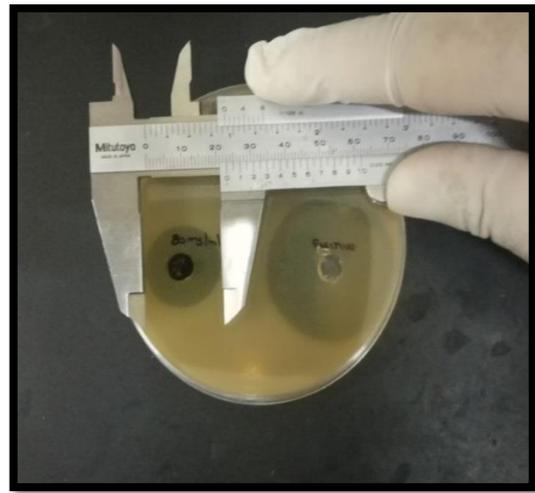


Se hicieron excavaciones en número de tres por cada placa de 8mm de diámetro y 8 mm de profundidad empleando un sacabocado estéril



Inoculación del extracto etanólico de las hojas de la *Tagetes minuta* "Huacatay" (concentraciones de 20%, 50% y 80%), DimetilSulfoxido DMSO y Gentamicina, Rotular cada una de las placas y proceder a incubar las placas a 37°C por un periodo de 24 horas

Lectura de Resultados



Una vez transcurrido el tiempo de incubación, retirar las placas de la incubadora y proceder a medir los diámetros de los halos de inhibición empleando el vernier





Anexo 3: Reporte de contenido por espectrofotometría UV- VIS

COPIA CONTROLADA

	SERVICIO DE CONTROL DE CALIDAD	Código y Versión: FQ-FR-035.00
	ÁREA DE ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS	Fecha de Emisión: 2016-01-11
	REPORTE DE CONTENIDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV- Vis	Página 1 de 1

DATOS DEL PRODUCTO:

Nombre: <u>EXTRACTO ETANOLICO DE HUACATAY</u>	Fabricante: <u>*****</u>
Presentación: <u>Muestra Líquida</u>	Fecha de Vencimiento: <u>S/F</u>
Lote: <u>*****</u>	Norma Técnica: <u>Técnica Interna SCC-UPCH</u>
Código SCC-UPCH: <u>*****</u>	Fecha de análisis: <u>2018-04-09</u>

SISTEMA ESPECTROFOTOMETRICO:

Equipo: <u>ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS</u>	Código: <u>EQ-FQ-32</u>
Longitud de onda: <u>415 nm</u>	

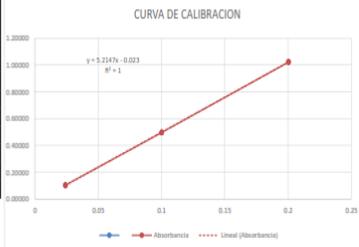
DATOS DEL ESTÁNDAR:

Nombre: <u>QUERCITINA</u>	Primario: <u>✓</u>	Secundario: <u>---</u>	Working Std: <u>---</u>
LOTE: <u>A104792 812</u>		Fecha de Vencimiento: <u>-----</u>	
Potencia: <u>100.0</u> % T/C	Código: <u>---</u>		
Peso molecular en forma de Sal: <u>-</u>	Humedad: <u>---</u> %		
Peso molecular en forma de Base: <u>-</u>			
Peso: <u>50.1</u> mg	Volumen enrase: <u>50</u> mL		

Diluciones de la curva:

24 ug/mL Vol. dilución 1: <u>1.2</u> mL	100 ug/mL Vol. dilución 1: <u>5</u> mL	200 ug/mL Vol. dilución 1: <u>10</u> mL
Vol. enrase 1: <u>50</u> mL	Vol. enrase 1: <u>50</u> mL	Vol. enrase 1: <u>50</u> mL

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0.02405	1	0.02405	0.10232
0.02405	1	0.02405	0.10470
0.02405	1	0.02405	0.10384
0.10020	1	0.10020	0.49644
0.10020	1	0.10020	0.49819
0.10020	1	0.10020	0.49709
0.20040	1	0.20040	1.02140
0.20040	1	0.20040	1.02460
0.20040	1	0.20040	1.02280



ECUACIÓN DE LA RECTA: $Y = 5.215x - 0.023$

a: -0.023
b: 5.215

DATOS DE LA MUESTRA EXTRACTO ETANOLICO DE HUACATAY

Peso o volumen de muestra: 0.50 (mL) Volumen de enrase: 20 (mL)

CÁLCULOS:

MUESTRA	ABSORBANCIA	
MUESTRA A1	2.22490	2.23140
		2.22890

MUESTRA	mg/mL		RSD	PROMEDIO
MUESTRA	16.8897	16.9396	16.9204	0.1487

RESULTADOS: 16.92 mg de Quercitina / mL de extracto

ESPECIFICACIONES / OBSERVACIONES: Los Flavonoides Totales se expresan en mg equivalentes de Quercitina / mL de extracto

CONCLUSIÓN: *****

<u>E. OLIVAR</u> ANALISTA	<u>2018-04-19</u> FECHA DE REPORTE
------------------------------	---------------------------------------



Anexo 4: Certificado del laboratorio



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Lima, 30 de Mayo del 2018

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

S.D.

Mediante la presente se pone en conocimiento lo siguiente:

La Bachiller **Srta. Cordero Hidalgo, Mayra** y la **Srta. Pinedo Caldas, Gisella Betty**, egresadas de la facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la prestigiosa Universidad Inca Garcilaso de la Vega; está haciendo su tesis de Investigación en "Efecto Antimicrobiano del extracto etanolico de las hojas de *Tagetes minuta* (Huacatay) frente a cepa de *Pseudomona aeruginosa* in vitro" en los laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,



Q.F. ERÍK OLIVAR GALLEGOS
Coordinador de Aseguramiento de la Calidad

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN
INVESTIGACIÓN

Anexo 5: Certificado del huacatay



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 214-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de Guisella Betty Pinedo Caldas, estudiante de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: *Tagetes minuta* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Tagetes*

ESPECIE: *Tagetes minuta* L.

Nombre vulgar: "Huacatay".
Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 06 de junio de 2018

ACE/ddb




MAG. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 anexos 5701, 5703, 5704

E-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

Anexo 6: Ficha de observación Ad-Hoc de la marcha fitoquímica

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE LA MARCHA FITOQUIMICA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE HUACATAY (*Tagetes minuta*) FRENTE A CEPA DE PSEUDOMONA AERUGINOSA IN VITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

Nº	Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva	Resultado
1.	CARBOHIDRATO S	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo	++
2.	ALMIDÓN	Lugol	Coloración oscura	+
3.	CETONA S	2,4 DNPH	Formación de anillo rojizo	+
4.	ALCALOIDE S	Mayer	Precipitado blanco	-
		Wagner	Precipitado marrón	++
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	+++
		Scheibler	Precipitado blanco	+
		Sonneschein	Precipitado naranja	-
		Reineckato	Coloración rosa	+++
5.	COMPUESTO S FENÓLICO S	FeCl ₃	Coloración verde	++
6.	TANINO S	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	++
7.	FLAVONOIDE S	Shinoda	Flavonoles: Rojo a magenta	++
8.	AMINOÁCIDO S	Ninhidrina	Coloración violácea	+++
9.	NAFTAQUINONA S " ANTRAQUINONA S Y ANTRANONA S	Bortranger (NaOH 5%)	Coloración roja	-

HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO
CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS

N°

EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE
HUACATAY (*Tagetes minuta*) FRENTE A CEPA DE PSEUDOMONA AERUGINOSA IN
VITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- MENOS DE**
50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....50 () () () () (x)

 2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....50 () () () () (x)

 3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....50 () () () (x) ()

 4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....50 () () () () (x)

 5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....50 () () () () (x)

 6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....50 () () () () (x)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?
Considero que los ítems propuestos son los indicados

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?
Considero que los ítems propuestos son los indicados

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?
Considero que el ítem para Flavonoides debería de ser más detallada con reactivos más específicos.

Fecha: 2018-06-28

Validado por: Erik Olivar Gallegos

Anexo 7: Ficha de observación Ad Hoc de prueba de solubilidad

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DESOLUBILIDAD

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE HUACATAY (*Tagetes minuta*) FRENTE A CEPA DE PSEUDOMONA AERUGINOSA IN VITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

N°	Solventes	Identificación	Resultado
1.	Alcohol de 98°	Soluble o insoluble	++
2.	Metanol	Soluble o insoluble	++
3.	Etanol	Soluble o insoluble	++
4.	Cloroformo	Soluble o insoluble	+++
5.	Agua	Soluble o insoluble	-
6.	Isopropanol	Soluble o insoluble	+

Leyenda:

(-) : Insoluble. (++) : Moderadamente Soluble.

(+) : Poco Soluble. (+++) : Totalmente Soluble.

HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO
CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS

N°

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE HUACATAY (*Tagetes minuta*) FRENTE A CEPA DE PSEUDOMONA AERUGINOSA IN VITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE

50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... () () () () () (x)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?..... () () () () () (x)
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... () () () () (x) ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?..... () () () () () (x)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?..... () () () () () (x)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?..... () () () () () (x)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?
Considero que los ítems propuestos son los indicados, ya que otros pueden muy tóxicos y fiscalizados.
2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?
Considero que los ítems propuestos son los indicados.
3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?
Considero que hay que tener cuidado con el Cloroformo y con el Metanol este último por ser controlado, pero con mayor accesibilidad.

Fecha: 2018-08-28

Validado por: Erik Olivar Gallegos

Anexo 8: Ficha de observación Ad- Hoc de recolección de datos

**FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA
DETERMINAR EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Tagetes minuta*
(HUACATAY) FRENTE A *Pseudomona aeruginosa***

**EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE HUACATAY
(*Tagetes minuta*) FRENTE A CEPA DE PSEUDOMONA AERUGINOSA IN VITRO**

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE HUACATAY (*Tagetes minuta*) FRENTE A CEPA DE PSEUDOMONA AERUGINOSA IN VITRO

INTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea

TABLA

Efecto antimicrobiano *Tagetes minuta* (Huacatay) frente *Pseudomonas aeruginosa* por el método de difusión en agar (excavación en placa) en 100 µl

N° DE PLACA	Concentración (mg/ml) del extracto etanolico de <i>Tagetes minuta</i> (Huacatay) 100 µl				CONTROLES	
					(+) Gentamicina 40 mg/ml	(-) Dimetil Sulfoxido
	Longitud del Halo de Inhibición (mm)					
	0 mg/ml	20 mg/ml	50 mg/ml	80 mg/ml	100 µl	100 µl
1	0	10.4	18.4	23.5	39.5	0
2	0	10.4	18.4	24.2	41.5	0
3	0	11.6	18.6	22.8	40.6	0
4	0	10.2	19.2	23.7	39.8	0
5	0	11.1	19.1	23.4	39.7	0