

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



---

**Actividad antimicrobiana in vitro de  
*Pseudelephantopus spiralis* (Lessing) Cronquis y  
*Alternanthera halimifolia* (Lamarck) Standley ex Pittier -  
IMET 2011**

---

## TESIS

Para optar el título de QUIMICO FARMACEUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. F.B.Q. GARCÍA BUSTAMANTE, AARÓN ISRAEL

Bach. F.B.Q. ROJAS PÉREZ, CELSO MERARE

ASESOR

Q.F. HUGO MIGUEL PINTO GUERRA

CO-ASESORES

Blga. TERESA DE JESUS MORI DEL AGUILA MSc

Ing. JORGE YSAAC VILLACRÉS VALLEJO MSc

Q.F. ERNESTO ANSELMO NINA CHORA Mg.

Q.F. CARLOS ANDRÉS RAVAROCCI QUIROZ

Iquitos - Perú  
2012

## RESUMEN

---

### Actividad antimicrobiana in vitro de *Pseudelephantopus spiralis* (Lessing) Cronquis y *Alternanthera halimifolia* (Lamarck)

Standley ex Pittier - IMET 2011

---

#### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* y *Pseudelephantopus spiralis* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, a través de los métodos de disco difusión, macrodilución en líquido y sólido. Los resultados de la capacidad antimicrobiana revelaron actividad de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis*, presento baja actividad contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*; y con las concentraciones de 500, 600, 700, 800 y 900 mg/ml contra *E. faecalis* y *E. coli*, la actividad fue moderada. En los resultados de la capacidad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Alternanthera halimifolia*, contra *E. faecalis*, *E. coli* y *S. aureus* se evidencio baja actividad, a concentraciones de 500, 600, 700, 800 y 900 mg/ml contra *P. aeruginosa* no se evidencio actividad. En la determinación de la concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Alternanthera halimifolia* contra *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, no se evidencio actividad pero presento poca actividad contra *E. coli* (CIM de 13.30 mg/ml). La concentración inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis*, presentó poca actividad frente a *E. coli* (CIM de 10.66 mg/ml), *P. aeruginosa* (CIM de 8.00 mg/ml) y *S. aureus* (CIM de 6.66 mg/ml) y moderable actividad frente a *E. faecalis* (CIM de 4.00 mg/ml). En la determinación de la concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Alternanthera halimifolia*, solo presento en la *E. coli* a la máxima concentración (CBM de 213.33 mg/ml), mientras que las demás cepas no presentaron CBM. La determinación de la concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis*, fue que en la *E. faecalis* presento actividad en la penúltima concentración (CBM de 106.66 mg/ml), mientras que en *E. coli* (CBM de 213.33 mg/ml), *S. aureus* (CBM de 213.33 mg/ml) y *P. aeruginosa* (CBM de 213.33 mg/ml) presentaron actividad en la última concentración

**PALABRAS CLAVES:** Actividad antimicrobiana, extractos hidroalcohólicos, capacidad antimicrobiana, concentración inhibitoria mínima, concentración bactericida mínima.

---

**Antimicrobial in vitro activity of *Pseudelephantopus spiralis*  
(Lessing) Cronquis y *Alternanthera halimifolia* (Lamarck) Standley  
ex Pittier - IMET 2011**

---

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of lyophilized hydroalcoholic extracts of leaves of *Alternanthera halimifolia* and *Pseudelephantopus spiralis* against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, through the disk diffusion method, macrodilution in liquid and solid. The results revealed the activity of antimicrobial capacity hydroalcoholic extracts of the leaves of *Pseudelephantopus spiralis*, present low activity against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and the concentrations of 500, 600, 700, 800 and 900 mg / ml against *E. faecalis* and *E. coli*, the activity was moderate. Results in antimicrobial capacity hydroalcoholic extracts of leaves of *Alternanthera halimifolia* against *E. faecalis*, *E. coli* and *S. aureus* is evidenced low activity at concentrations of 500, 600, 700, 800 and 900 mg / ml against *P. aeruginosa* activity is not evidenced. In the determination of minimum inhibitory concentration hydroalcoholic extracts of leaves of *Alternanthera halimifolia* against *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, no evidence of present activity but little activity against *E. coli* (MIC of 13.30 mg / ml). Inhibitory concentration of hydroalcoholic extracts of the leaves of *Pseudelephantopus spiralis*, showed little activity against *E. coli* (MIC of 10.66 mg / ml), *P. aeruginosa* (MIC of 8.00 mg / ml) and *S. aureus* (MIC of 6.66 mg / ml) and moderate activity against *E. faecalis* (MIC of 4.00 mg / ml). In the determination of minimum bactericidal concentration hydroalcoholic extracts of leaves of *Alternanthera halimifolia*, only present in the *E. coli* at high concentration (MBC of 213.33 mg / ml), while the other strains did not show MBC. The determination of minimum bactericidal concentration hydroalcoholic extracts of the leaves of *Pseudelephantopus spiralis*, was that in the *E. faecalis* activity present in the penultimate concentration (MBC of 106.66 mg / ml), whereas in *E. coli* (MBC of 213.33 mg / ml), *S. aureus* (MBC of 213.33 mg / ml) and *P. aeruginosa* (MBC of 213.33 mg / ml) showed activity in the last merger

**KEY WORDS:** Antimicrobial activity, hydroalcoholic extracts, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

## DEDICATORIA

*Quiero dedicarle este trabajo  
A Dios que me ha dado la vida y fortaleza  
para terminar este proyecto de investigación,  
A mis Padres por estar ahí cuando más los necesité; en  
especial a mi Padre por su ayuda y constante cooperación y  
mi novia Ana por apoyarme y ayudarme en los  
momentos más difíciles.*

**CELSO ROJAS**

## DEDICATORIA

*A Dios.*

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*A mis Hermanos*

*Porque siempre he contado con ellos para todo, Joel, Jonathan y Noemí, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad  
¡Gracias!*

**AARON GARCIA**

## **AGRADECIMIENTO**

Al instituto de Medicina Tradicional IMET- ESSALUD, por permitirnos el uso de sus instalaciones para la ejecución de nuestro proyecto de tesis.

Al Instituto Nacional de Salud, por apoyarnos en la adquisición de los materiales biológicos.

Agradecemos la abierta disponibilidad y receptividad del Q.F. Ernesto Nina Chora e Ing. Jorge Villacres Vallejo, por su amistad, confianza, enseñanza y constante presencia en todo momento.

Agradecer también al Q.F. Hugo Pinto Guerra, y al Q.F. Andres Ravarocci Quiroz, que en todo momento han orientado, aconsejado y aportado sus reflexiones, con total compromiso, a esta tesis. Su generosidad, intuición y apoyo han hecho posible que, por fin, el proyecto sea hoy una realidad.

Queremos extender un sincero agradecimiento a las personas que de una manera u otra, participaron en la ejecución de este trabajo.

## INDICES DE TEMAS

RESUMEN

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE GRAFICOS

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

### CAPITULO I

Introducción----- 2

1.1. Problema de investigación ----- 4

1.2. Objetivos ----- 6

CAPITULO II ----- 7

2.1. Marco Teórico ----- 7

2.1.1 *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronq. "chicoria" ----- 7

2.1.1.1 Estudios fitoquímicos y antimicrobianos: ----- 7

2.1.1.2 Clasificación taxonómica ----- 10

2.1.1.3 Descripción botánica ----- 10

2.1.1.4 Usos tradicionales ----- 11

2.1.1.5 Propiedades medicinales ----- 11

2.1.1.6 Forma de uso ----- 11

2.1.2 *Alternanthera halimifolia* (Lam.) Standl. "ojo de pollo". ----- 11

2.1.2.1 Estudios fitoquímicos y antimicrobianos -----

----- 11

2.1.2.2 Clasificación taxonómica ----- 14

2.1.2.3 Descripción botánica ----- 15

2.1.2.4 Usos tradicionales ----- 15

2.1.2.5 Propiedades medicinales: ----- 15

2.1.2.6 Formas de uso ----- 16

2.1.3 Taxonomía, Características Y Patogenia De Las Bacterias ----- 16

2.1.3.1 *Enterococcus faecalis* ----- 16

2.1.3.2 *Staphylococcus aureus* ----- 17

2.1.3.3 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	-----19
2.1.3.4 <i>Escherichia coli</i>	-----21
2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES	-----23
CAPITULO III	-----26
3.1 Metodología y diseño de investigación	-----26
3.1.1 Método de investigación	-----26
3.1.2 Diseño de investigación	-----26
3.1.3 Población y muestra:	-----27
3.2 Instrumentos y materiales	-----29
3.2.1 Material vegetal	-----29
3.2.2 Material Biológico:	-----29
3.2.3 Materiales de laboratorio	-----29
3.2.4 Equipos	-----30
3.2.5 Medios de cultivo y reactivos químicos	-----30
3.3 Procedimiento de recolección de datos	-----31
3.3.1 Recolección de las muestras vegetales	-----31
3.3.2 Preparación del pulverizado vegetal	-----31
3.3.3 Preparación de extractos hidroalcoholico IMET (2007)	-----32
3.3.4 Protocolo para la Liofilización	-----32
3.3.5 Preparación de las Concentraciones	-----32
3.3.6 Preparación de los discos de sensibilidad	-----33
3.3.7 Prueba de Sensibilidad según protocolo del IMET	-----33
3.3.8 Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria	-----34
3.3.9 Determinación de la concentración bactericida mínima	-----36
3.4 Análisis de datos	-----37
3.5 Criterios de bioseguridad	-----38
CAPITULO IV	----- 39
4.1 RESULTADOS	----- 39
4.1.1 Análisis descriptivo de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> “chicoria” y <i>Alternanthera halimifolia</i> “ojo de pollo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomona</i>	

<i>aeruginosa, Escherichia coli y Enterococcus faecalis</i> . Por el método de Disco Difusion -----	39
4.1.2 Análisis descriptivo de la Concentración Mínima Inhibitoria al crecimiento microbiano de los extractos hidroalcoholicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> “chicoria” y <i>Alternanthera halimifolia</i> “ojo de pollo” por el método de Macrodilucion en Medio Liquido. -----	51
4.1.3 análisis descriptivo de la concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis y Alternanthera halimifolia</i> por el método de macrodilución en medio sólido -----	55
4.1.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos in vitro -----	59
4.2 DISCUSION-----	69
4.3 CONCLUSION -----	71
4.4 RECOMENDACIONES -----	72
4.5 BIBLIOGRAFIA -----	73
4.6 ANEXOS-----	80

## LISTA DE CUADROS

<b>CUADRO 01.- variable independiente (x)</b> .....	<b>24</b>
<b>CUADRO 02.- Variable dependiente (Y)</b> .....	<b>25</b>
<b>CUADRO 03.- Plan piloto</b> .....	<b>26</b>
<b>CUADRO 04.- Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición:</b> .....	<b>34</b>
<b>CUADRO 05.- Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición</b> .....	<b>35</b>
<b>CUADRO 06 - Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración Mínima Inhibitoria</b> .....	<b>35</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- Pesado de las hojas secas del ojo de pollo -----	108
FIGURA 2.- Hojas de ojo pollo pulverizado -----	108
FIGURA 3.- Hojas de chicoria pulverizado -----	109
FIGURA 4.- Liofilizado de los extractos hidroalcoholicos -----	109
FIGURA 5.- Inoculado bacteriano -----	110
FIGURA 6.- Estufa -----	110
FIGURA 7.- Siembra de microorganismos en placas -----	111
FIGURA 8.- Microorganismos replicados -----	111
FIGURA 9.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcoholico de ojo de pollo frente a <i>Enterococcus faecalis</i> -----	112
FIGURA 10.- Halos de inhibicion por efecto del extracto hidroalcoholico de ojo de pollo frente a <i>Escherichia coli</i> -----	112
FIGURA 11.- Halos de inhibicion por efecto del extracto hidroalcoholico de ojo de pollo frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> -----	113
FIGURA 12.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcoholico de ojo de pollo frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> -----	113
FIGURA 13.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcoholico de ojo de pollo frente a <i>Staphylococcus aureus</i> -----	114
FIGURA 14.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcoholico de chicoria frente a <i>Enterococcus faecalis</i> -----	114
FIGURA 15.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcoholico de chicoria frente a <i>Escherichia coli</i> -----	115
FIGURA 16.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcoholico de chicoria frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> -----	115
FIGURA 17.- Halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcohólico de chicoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> -----	116

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 01</b> - Promedio del diámetro el halo de inhibición de los extractos hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> frente a microorganismos en ensayo (en milímetros) -----	<b>40</b>
<b>TABLA 02</b> - Promedio del diámetro el halo de inhibición de los extractos hidroalcohólic de <i>Alternanthera halimifolia</i> frente a microorganismos en ensayo (en milímetros) -----	<b>43</b>
<b>TABLA 03</b> - Porcentaje de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de <i>Pseudelephantopus Spiralis</i> frente a microorganismos en ensayo (en porcentajes) -----	<b>46</b>
<b>TABLA 04</b> - Porcentaje de inhibición de los extracto hidroalcohólico de <i>Alternanthera Halimifolia</i> frente a microorganismos en ensayo (en porcentajes) -----	<b>49</b>
<b>TABLA 05</b> - Concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración inhibitoria mínima -----	<b>52</b>
<b>TABLA 06</b> - Concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Alternanthera halimifolia</i> según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración inhibitoria mínima-----	<b>53</b>
<b>TABLA 07.-</b> Promedio de concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración mínima bactericida -----	<b>56</b>
<b>TABLA 08.-</b> Promedio de concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Alternanthera halimifolia</i> según microorganismos patógenos (en mg/ml)y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración mínima bactericida. -----	<b>57</b>

## LISTA DE GRAFICOS

<b>GRAFICO 01</b> - Promedio del diámetro el halo de inhibición de los extracto hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> frente a microorganismos en ensayo (en milímetros) -----	<b>41</b>
<b>GRAFICO 02</b> - Promedio del diámetro el halo de inhibición de los extracto hidroalcohólico de <i>Alternanthera halimifolia</i> frente a microorganismos en ensayo (en milímetros) -----	<b>44</b>
<b>GRAFICO 03</b> - Porcentaje de inhibición de los extractos hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> frente a microorganismos en ensayo (en porcentajes) -----	<b>47</b>
<b>GRAFICO 04</b> – Porcentaje de inhibición de los extracto hidroalcohólico de <i>Alternanthera halimifolia</i> frente a microorganismos en ensayo (en porcentajes) -----	<b>50</b>
<b>GRAFICO 05</b> –Concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> y <i>Alternanthera halimifolia</i> a concentraciones de 512 a 128 mg/ml según microorganismos patógenos (en mg/ml) -----	<b>54</b>
<b>GRAFICO 06</b> - Promedio de concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> y <i>Alternanthera halimifolia</i> a concentraciones de 512 a 128 mg/ml según microorganismos patógenos (en mg/ml) -----	<b>58</b>
<b>GRAFICO 07-</b> promedios de diámetros de halos de inhibición de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> frente a microorganismo en estudio -----	<b>60</b>
<b>GRAFICO 08-</b> promedios de diámetros de halos de inhibición de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de <i>Alternanthera halimifolia</i> frente a microorganismo en estudio-----	<b>62</b>
<b>GRAFICO 9a</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> norfloxacino y blanco frete a <i>E. faecalis</i> -----	<b>64</b>

<b>GRAFICO 9b</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> norfloxacino y blanco frete a <i>E. coli</i> -----	<b>64</b>
<b>GRAFICO 9c</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> , norfloxacino y blanco frete a <i>P. aeruginosa</i> -----	<b>65</b>
<b>GRAFICO 9d</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> , norfloxacino y blanco frete a <i>S. aureus</i> -----	<b>65</b>
<b>GRAFICO 10a</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólic de <i>Alternanthera halimifolia</i> , norfloxacino y blanco frete a <i>E. faecalis</i> -----	<b>67</b>
<b>GRAFICO 10b</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Alternanthera halimifolia</i> , norfloxacino y blanco frete a <i>E. coli</i> -----	<b>67</b>
<b>GRAFICO 10c</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Alternanthera halimifolia</i> , norfloxacino y blanco frete a <i>P. aeruginosa</i> -----	<b>68</b>
<b>GRAFICO 10d</b> - Comparación múltiple de los diámetro de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Alternanthera halimifolia</i> , norfloxacino y blanco frete a <i>S. aureus</i> -----	<b>68</b>

## CAPITULO I

### 1.1. INTRODUCCION

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas primitivas en el tratamiento de enfermedades. Durante mucho tiempo los fármacos naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de especies vegetales con propiedades medicinales y se ampliara la investigación a cerca de los productos que de ella se extraen.

El Perú es un país que posee una extraordinaria riqueza biológica, fuente natural de moléculas bioactivas; La diversidad vegetal llega aproximadamente a unas 50,000 especies detectadas, mientras que el continente europeo posee unas 12,000 especies. Es factible maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, validándolos científica y tecnológicamente. <sup>(9)</sup>

Por otra parte en los países desarrollados existe un creciente interés en utilizar aquello que la naturaleza nos proporciona sin alteración química artificial, “una vuelta a lo natural”. <sup>(61)</sup>

Con un enfoque naturista, las enfermedades infecciosas se pueden interpretar como crisis que desequilibran el estado de salud. La mayoría de las veces las crisis infecciosas se resuelven con rapidez, en días o semanas. Son pocas las ocasiones en que los microbios se comportan como gérmenes patógenos, con capacidad de producir enfermedades graves o persistentes en personas sanas. <sup>(38)</sup>

Las dificultades en los estudios de plantas medicinales, están en la diversidad de principios activos que poseen, lo cual dificulta la identificación de las plantas esenciales; las diferencias que existen entre distintas variedades de una misma especie y las que existen entre distintas épocas y lugares de recolección, dificultan la estandarización de los principios activos. A esto se agrega que ciertas experiencias tienen lugar en determinadas condiciones, que no pueden reproducirse en el laboratorio, lo cual conduce a los investigadores negar la posibilidad de estos estudios, sin notar que están empleando métodos de investigación inadecuados al tipo de experiencia que tratan de reproducir. <sup>(67)</sup>

El presente trabajo pretende demostrar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo” frente a ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Escherichia coli*** y ***Enterococcus faecalis***, sabiendo que estas bacterias son causantes de la mayor parte de enfermedades intrahospitalarias causando problemas dérmicas, respiratorias, estomacales, bucofaríngeas, entre otras.<sup>(67)</sup>

## 1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La medicina tradicional como parte esencial de la cultura de los pueblos ha sido durante siglos guardián de las generaciones pasadas donde, según el cálculo de la organización mundial de la salud (OMS), casi el 80% de los habitantes de la tierra confían en ella para resolver sus principales necesidades de salud. <sup>(69)</sup>

El uso de plantas medicinales en los países desarrollados y en los países en vías de desarrollo obedece a dos razones bien distintas: mientras que en los primeros está resurgiendo en buena medida como respuesta a una medicina iatrogénica en los segundos constituye un recurso ancestral enraizado en el propio medio cultural, erigiéndose como una necesidad primaria en los establecimientos de salud y en la estructura económica de los países pobres, que no pueden costear el elevado gasto farmacéutico que se da en los países desarrollados y que tampoco disponen de una industria farmacéutica eficiente. <sup>(69)</sup>

Los microorganismos enteropatógenos como la *Escherichia coli* son causantes de una gran parte de muertes con EDA (Enfermedades Diarreicas Agudas) que equivale al 29 % a nivel nacional,<sup>(30)</sup> siendo nuestra región la más afectada por esta bacteria. <sup>(33)</sup> Otros microorganismos como ***Enterococcus faecalis*** son causante del 15% de las infecciones intrahospitalarias registradas por el Instituto Nacional de Salud (INS), ***Staphylococcus aureus*** es responsable del 50% ***Pseudomona aeruginosa*** del 70% de dichas infecciones. <sup>(30)</sup>

Los indígenas de la Amazonía Colombiana del distrito de Tumaco lo utilizan como antimaláricos. <sup>(7)</sup>

Sin embargo, el aumento de la disponibilidad de agentes antimicrobianos para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas en hospitales y en la comunidad ha producido la aparición de resistencia de estos patógenos a los antimicrobianos, lo que constituye una preocupación para la salud pública, especialmente en los países menos desarrollados, debido a que en ellos

existen menos opciones económicas y apropiadas de tratamiento. Así mismo, la pérdida de eficacia de ciertos tratamientos por causa de la resistencia a los antimicrobianos aumenta el sufrimiento humano, contribuyendo a la pérdida de productividad y, a menudo, a la mortalidad.

En la Región Loreto existe escasa investigación referente al estudio antimicrobiano de plantas medicinales, no se ha reportado estudios de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo” respecto a estos. Los indígenas de Colombia del distrito de Tumaco utilizan plantas del género ***Pseudelephantopus*** para el tratamiento de malaria.  
(7)(52)(53)

Es de gran importancia que las plantas medicinales usadas tradicionalmente en la amazonia, por sus propiedades medicinales sean investigadas para evaluar su potencial farmacológico como fuente de nuevos principios activos.

El presente estudio tiene por objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo”.

¿Tendrán actividad antimicrobiana in vitro los extractos hidroalcohólicos liofilizados de ***Pseudelephantopus spiralis*** (less.) Cronq. “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** (Lam.) Standl. “ojo de pollo” sobre ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Escherichia coli*** y ***Enterococcus faecalis***?

### 1.3 OBJETIVOS

#### Objetivo General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos y liofilizados de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo” sobre ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Escherichia coli*** y ***Enterococcus faecalis***.

#### Objetivos Específicos:

- Corroborar mediante la prueba de sensibilidad el efecto antimicrobiano de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo” sobre a ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Escherichia coli*** y ***Enterococcus faecalis***.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo”.
- Determinar la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo”.

## CAPITULO II

### 2.1. MARCO TEÓRICO CAPITULO II

#### 2.1. MARCO TEÓRICO

##### 2.1.1 *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronq. “Chicoria”.

No se ha encontrado información de su composición química (pubmed, chemweb, 2002), ni actividad antimicrobiana de la especie, por la cual se detalla trabajos de investigación de actividad fitoquímica y antimicrobiana de plantas a nivel de la familia.<sup>(67)</sup>

##### 2.1.1.1 Estudios fitoquímicos y antimicrobianos:

RAGASA et al (2001). Realizaron una investigación encontrándose en el extracto clorofórmico de *Pseudelephantopus spicatus* obteniendo una sesquiterpenolactona cuya estructura se determinó por amplia unidimensional (1D) y 2D espectroscopia de RMN y espectrometría de masas, encontrándose actividad moderada antifúngica frente a *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, y una baja actividad contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Siendo inactiva contra *Bacillus subtilis*.<sup>(52) (53)</sup>

PERERA et al (2006). Realizaron tamizaje fitoquímico a las hojas de la especie *Pluchea carolinensis* Jacq. G. (Asteraceae) y se sometieron a un fraccionamiento con el empleo de solventes de polaridad creciente. En cada uno de los extractos obtenidos verificaron la presencia de flavonoides y evaluaron la actividad antimicrobiana frente a 7 microorganismos. Detectaron la presencia de flavonoides en los extractos con cloroformo, acetato de etilo y n-butanol, los que presentaron actividad antibacteriana. El extracto con cloroformo había presentado actividad biológica frente a *Bacillus subtilis* a una concentración de 1 000 µg/mL, mientras que los extractos con acetato de etilo y n-butanol mostraron resultados positivos frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a la misma concentración.<sup>(48)</sup>

DEHUSCHLE et al (2006). Analizaron los extractos diclorometánico y etanólico de **Senecio desiderabilis** fueron analizados en relación a su actividad antimicrobiana por el método de micro dilución en caldo. El efecto ocurrió con el extracto diclorometánico frente a **Cryptococcus neoformans** var. **Neoformans** y **C. neoformans** var. **Gatti** (CIM50µg/mL), **Saccharomyces cerevisiae** (25µg/mL) y **Microsporium canis** (25µg/mL). **Pseudomona aeruginosa** multiresistente y **Escherichia coli** no fueron inhibidos por ninguno de los extractos. <sup>(18)</sup>

ERAZO, S (2006). Presentaron el estudio químico preliminar de otra especie de esta familia, **Xenophyllum poposum**. mostrando la presencia de trazas de alcaloides y una mayor cantidad relativa de terpenos, esteroides, flavonoides y cumarinas. La actividad antimicrobiana a 100 y 200 µg/ml. mostro que el aceite esencial, residuo y extractos diclorometanos y metanolico son activos frente a **Staphylococcus aureus**, **Bacillus subtilis** y **Moracella fravus**, e inactivos frente a **Candida albicans** y **Sacharomices cereviceae**. <sup>(21)</sup>

AVILA et al (2006). Presentaron el estudio de la actividad antibacteriana de la especie vegetal **Diplostephiumto limense** (Asteraceae), colectada en el páramo del Nevado del Tolima, A partir de un extracto etanólico crudo, y mediante partición bio-dirigida, obteniendo la fracción más simple de mayor actividad frente a **Staphylococcus aureus** (ATCC 25923). Paralelamente realizaron análisis fitoquímicos a las porciones de mayor bio-actividad obtenida durante todo el proceso, observando que la acción antibacteriana se incrementa al aumentar la polaridad del extracto, donde los terpenos y flavonoides parecen estar relacionados con la acción revelada. Se trata del primer reporte, hasta la fecha conocido, de actividad antibacteriana *in vitro* para **Diplostephium tolimense**. <sup>(6)</sup>

QUIJANO et al (2009). Realizaron un estudio en el rendimiento del aceite de **Galinsoga parviflora** Cav. (0,07% m/m), fue calculado de acuerdo a los pesos de aceite esencial y del material vegetal antes de la destilación, En su composición había mostrado una abundancia en compuestos sesquiterpénicos

y alifáticos, de ellos, los terpenos oxigenados presentaron función alcohólica, aldehídica y algunos ésteres, encontrándose actividad antimicrobiana fuerte sobre las bacterias Gram positivas (***Staphylococcus aureus*** y ***Bacillus cereus***), e inactiva frente a Gram negativas. <sup>(8)</sup>

LACIAR et al (2009). Evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro y la concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de ***Artemisia echegarayi*** extraídas de sus partes aéreas. Utilizaron las técnicas de difusión con discos en agar y micro dilución en placas respectivamente. Además, determinaron la actividad antioxidante de este aceite esencial in vitro por espectrofotometría. En general, tanto las bacterias gram-positivas como las gram-negativas fueron inhibidas por este aceite, con excepción de ***Proteus mirabilis***. ***Listeria monocytogenes*** y ***Bacillus cereus*** que resultaron ser las bacterias más sensibles.

El análisis por cromatografía en fase gaseosa y espectrometría de masa permitieron la identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes mayoritarios del aceite esencial del ajeno. Entre ellos, la tuyoona y el alcanfor se destacaron como los principales responsables de la actividad antibacteriana observada. Los datos preliminares obtenidos en el presente estudio sugieren que el aceite esencial de ***Artemisia echegarayi*** representa una alternativa para promover su empleo como aditivo natural en alimentos. <sup>(34)</sup>

ARANCIBIA et al (2010). Determinaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de dos especies del género ***Senecio*** (Asteraceae) de la región Patagónica: ***Senecio mustersii*** y ***Senecio subpanduratus***, estos aceites esenciales fueron obtenidos mediante hidrodestilación lográndose un rendimiento de 0.81 % para ***Senecio subpanduratus*** y de 0.72% para ***Senecio mustersii***, expresándose como mililitros de aceite esencial por cada 100 gramos de material vegetal fresco. Evaluaron la actividad frente a bacterias y levaduras de importancia clínica: ***Senecio mustersii*** había presentado actividad antibacteriana frente a (***S. aureus***) y ***Senecio subpanduratus*** para todas las bacterias testeadas (***S.aureus***, ***E.coli*** y ***P. aeruginosa***). ***Senecio mustersii*** no presentaron actividad antifúngica,

mientras que **Senecio subpanduratus** presentó actividad contra algunas especies de **Candida**.<sup>(4)</sup>

### 2.1.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de **Pseudelephantopus spiralis** “chicoria”<sup>(27)</sup>, es la siguiente:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliosida
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Género	:	Pseudelephantopus
Especie	:	<b>Pseudolephantopus spiralis</b> (Less.) Cronq.
Distribución	:	Sierra y Selva <sup>(28)</sup>

**Sinonimias:** **Chaetospira funckii** (turezaninow) S. F. Blake, **Chaetospira spiralis** (Lessing) Asplund S. F. Blake, **Distreptus spiralis** (Lessing)<sup>(35)</sup> <sup>(71)</sup>, **Pseudelephantopus funckii** (turezaninow) Philipson<sup>(14)</sup>, **Spirochaeta funckii** (turezaninow).<sup>(8)</sup> <sup>(67)</sup> <sup>(7)</sup>

**Nombre comunes:** Chicoria<sup>(3)</sup>, yerba de caballo, suelda con suelda, axuruna, suelda<sup>(7)</sup>, amargón, amor seco, camillo, totumo.<sup>(68)</sup>

### 2.1.1.3 Descripción botánica

Planta terrestre, hasta 80 cm de altura, tallo cilíndrico, pubescente, no ramificado o poco ramificado, hojas alternas elípticas o abobadas, pubescente, casi todas las hojas emergen de la base del tallo, algo pubescente y glabras en algunas partes, limbo de 7 cm de longitud por 2 cm de ancho en la parte media, inflorescencias en espigas de capítulos largos terminales, con muchas brácteas verdes, pedúnculos y espigas pubescentes, flores lila oscuro o purpura claro, aquenio en forma de trompo.<sup>(7)</sup>

Hierba de sitios abiertos, comunes en potreras y bordes de caminos, hojas arrosetadas, alternas, de base foliar envainadora, lamina simple, lanceolada a elíptica, entre 8 a 14 cm de longitud, margen ondulada, aserrada de ápice agudo, base atenuada, peciolo corto, cabezuelas en glomérulos dispuestas en panículas en la parte terminal o subterminal de la planta, capítulos pequeños de color violeta claro. ***Pseudelephantopus spiralis*** (Less.) Cronq. crece entre 1000 a 2000 metros de elevación, son plantas pequeñas de hasta 60 a 70 cm de altura.<sup>(68)</sup>

### **2.1.2 *Alternanthera halimifolia* (Lam.). Standl. “ojo de pollo”.**

No se han encontrado estudios de actividad antimicrobiana comprobados en esta especie, (pubmed, chemweb, 2002) se detalla trabajos de investigación de actividad fitoquímica y antimicrobiana de plantas del mismo género.

#### **2.1.2.1 Estudios fitoquímicos y antimicrobianos**

BRAKO et al (1993). Realizaron estudios fitoquímicos en hojas de ***Alternanthera halimifolia***(ojo de pollo),encontrando dentro de las hojas: alcaloides, esteroides, cumarinas, glicosidos, hidróxido benzoico, saponinas.<sup>(8)</sup>

DELAPORTE et al (2002). ***Alternanthera brasiliana***, popularmente conocida como la penicilina o terramicina, sus actividades farmacológicas tienen efectos antiinflamatorios, analgésicos y antivirales demostrados.<sup>(13)</sup>

RYAN et al (2004). Al comparar el potencial antibacteriano de las hojas, los segmentos entre nodales, hojas y segmentos nodales obtenidos entre los callos de ***Alternanthera sessilis*** (L.) R.Br. ex DC. Los extractos etanólicos obtenidos de hojas y callos fueron más efectivos contra las bacterias seleccionadas con otros solventes.<sup>(61)</sup>

CANALES et al (2005). Evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de ***Alternanthera caracasana*** HBK contra 11 cepas de bacterias y

una cepa de levadura. El extracto de acetato de etilo mostró actividad antimicrobiana frente a ***Staphylococcus aureus***, ***Staphylococcus epidermidis***, ***Bacillus subtilis***, ***Sarcina lutea***, y una cepa de ***Vibrio cholerae***. No hubo actividad antimicrobiana frente a ***Candida albicans***.<sup>(11)</sup>

PEREIRA et al (2007). El extracto etanólico crudo (70%) de las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y butanol de las hojas de ***Alternanthera brasiliana*** analizados. su actividad se refiere a los antimicrobianos. Las concentraciones de inhibición mínima (MIC). Los experimentos demostraron que el extracto fraccionado tiene actividad antimicrobiana exhibiendo moderada acción, particularmente frente a ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Prototheca zopffii***. El efecto más fuerte que ocurrió fue la fracción diclorometano contra ***Prototheca zopffii*** (MIC ug.mL 312.5). En ninguno de los extractos de los probados son inhibidas las bacterias ***Escherichia coli*** y la levadura ***Candida albicans*** y ***Candida glabrata***<sup>(48)</sup>

JALALPURE et al (2008). Obtuvieron cinco extractos de las hojas de ***Alternanthera sessilis*** de forma exhaustiva por el aparato de Soxhlet con diferentes solventes como el éter de petróleo (40-60 ° C), cloroformo, acetona, metanol y agua destilada en orden ascendente según su polaridad. Los cinco extractos se sometieron a un screening antimicrobiano utilizando la placa en pocillos (microdilución) y métodos turbidimétrico. El extracto cloroformico entre los cinco extractos mostró una zona máxima de inhibición y valores significativos de CIM en estos dos métodos, respectivamente. Por lo tanto tomaron el extracto cloroformico para la selección de la curación de las heridas (incisión, escisión y estudios de granuloma) El extracto cloroformico de hojas de ***Alternanthera sessilis*** a una dosis de 200 mg / ml (vía oral) en todos los modelos mostraron resultados significativos.<sup>(31)</sup>

REIS et al (2009). El extracto acuoso de ***Alternanthera brasiliana*** había mostrado actividad antimicrobiana, no siendo eficaz contra todos los microorganismos que fueron probados, y no tuvo zona de inhibición en la

prueba de difusión en agar, habiéndose observado la turbidez en la prueba de microdilución y puede que el resultado estuvo relacionado con factores ambientales (clima, temperatura, altitud, la contaminación, etc.), métodos de cultivo (fertilizantes y el tipo de suelo) y la edad de la planta. <sup>(57)</sup>

NAGESWAR et al (2009). El extracto crudo de hojas de ***Alternanthera sessilis*** y sus dos fracciones diferentes de crudo, extracto metanólico y extracto acuoso en frío, se sometieron a un examen químico y antimicrobiano preliminar de las investigaciones, encontrándose esteroides, proteínas, glucósidos, carbohidratos, taninos y flavonoides. Probaron el extracto metanólico contra dos gram positivos y dos cepas de bacterias gram negativas y una actividad antifúngica. La prueba de sensibilidad antibacteriana indica que el extracto metanólico inhibió el crecimiento de ***Staphylococcus aureus***, ***Bacillus subtilis***, ***Escherichia coli***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Candida albicans*** en diferentes grados. Sobre esta base, realizaron un estudio para desarrollar una pomada y la formulación de gel. Las formulaciones preparadas de gel y ungüento, fueron evaluados por sus parámetros físicos y actividad antimicrobiana. Concluyeron que la formulación en gel tiene mayor actividad anti-microbiana en comparación a la formulación de la pomada. Los resultados justifican el uso tradicional de ***Alternanthera sessilis***, en el tratamiento de la actividad antibacteriana y antifúngica. <sup>(45)</sup>

GASPARETTO et al (2010). Investigaron el efecto de la quimioterapia antimicrobiana fotodinámica (PACT) utilizando extractos de ***Alternanthera maritima*** sobre la viabilidad de ***Candida dubliniensis***. La composición química de los extractos se determinaron mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas encontrándose esteroides, triterpenos y flavonoides que fueron identificados en los extractos analizados. Los resultados sugieren que la inhibición del crecimiento de ***Candida dubliniensis*** cuando se irradia con un láser de diodo en presencia de extractos de hexano y etanol a partir de ***Alternanthera maritima*** como foto sensibilizadores. La irradiación del láser a extractos crudos en 25mg/mL no redujo significativamente el número de UFC / ml.

### 2.1.2.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Alternanthera halimifolia* (Lam.) Standl. "Ojo de pollo", es la siguiente: <sup>(24)</sup>

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Caryophyllales
Familia	:	Amaranthaceae
Género	:	Alternanthera
Especie	:	<i>Alternantherahalimifolia</i> (Lam.) Standl
Distribución	:	Costa, Sierra y Selva <sup>(28)</sup>

**Sinonimias:** *Achirantes halimifolia* Lamarck, *Achyranthes incana* Moquin, *Alternanthera ficoidea* var, *Halimifolia kuntze*, *Alternanthera polygonoides* var, *Elangata suessenguth*, *Celosía peruviana* van Spand. *Ex Moquin*, *Illecebrum alsinaefolium* Scopoli, *Illecebrum frutescens* Moquin, *Telanthera frutescens* var. *Acutifolia moquin*, *Telanthera halimifolia* (Lamarck) A. Stewaet. <sup>(2) (7) (8)</sup>

**Nombres comunes:** Sanguinaria, yerba blanca, ojo de pollo y picurillo <sup>(8) (7)</sup>

### 2.1.2.3 Descripción botánica

Hierbas anuales o perennes o sufrútices, erguidos, rastreros o trepadores. Tallos articulados, glabros o pilosos. Hojas opuestas, enteras, sésiles o pecioladas, glabras o pilosas, a veces el indumento esteliforme. Inflorescencias dispuestas en espigas breves o capituliformes, solitarias o aglomeradas, a veces con 2 hojas en la base, axilares o terminales, sésiles o pedunculadas. Flores hermafroditas, sésiles o pediceladas, comprimidas dorsalmente, 1-bracteadas y 2-bracteoladas, en ambos casos glabras o pilosas, carinadas o no. Perianto [4 -] 5 tépalo; tépalo libres, frecuentemente desiguales, erectos [o divergentes], nervosos o postulados, a veces espinescentes, glabros o pilosos,

tan largos como las brácteas, a veces más cortos, otras veces más largos. Estambres [2 -] 5; filamentos filiformes o subulados, unidos en un tubo membranáceo corto o largo; anteras oblongas, monotecas; pseudoestaminodios presentes, liguliformes o a veces reducidos a dientes pequeños, enteros, flecosos [lobulados o dentados], tan largos como los filamentos o más largos o más cortos, raras veces ausentes. Ovario esférico u ovoide, a veces comprimido, angostado hacia la base, en algunos casos alado en el margen o en el ápice; estilo corto o largo; estigma capitado o raras veces 2-lobulado. Ultrículo membranáceo, incluso en el perianto persistente, a veces alado, indehiscente. Semilla péndula, lenticular; embrión anular; endosperma farináceo; cotiledones oblongos o subulados; radícula ascendente. <sup>(65)</sup> (20)

### **2.1.3 Taxonomía, características y patogenia de las bacterias**

#### **2.1.3.1 *Enterococcus faecalis***

##### **Taxonomía**

Dominio : Bacteria  
Filo : Firmicutes  
Clase : Bacilli  
Orden : Lactobacillales  
Familia : Enterococcaceae  
Género : Enterococcus  
(ex Thiercelin & Jouhaud 1903)  
Schleifer & Kilpper-Bälz 1984  
Especie : *Enterococcus faecalis*  
(Orla-Jensen 1919)  
Schleifer & Kilpper-Bälz 1984

## Características

Es una bacteria Gram-positiva comensal, que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Como otras spp. Del género **Enterococcus**, **E. faecalis** puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital. La existencia de **Enterococos** se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia viralmente a todos los antibióticos en uso. <sup>(61)</sup>

El hábitat normal de estos es el tubo digestivo de animales de sangre caliente. Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos.

Son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, etc.) por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos congelados y desecados.

Antes de 1984, **E. faecalis** era conocida como **Streptococcus faecalis**. <sup>(60)</sup>

## Patogenia

Puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo; las infecciones de sistema nervioso son menos comunes.

Resiste aminoglicósidos, aztreonam, cefalosporina, clindamicina, las penicilinas semisintéticas (nafcilina , oxacilina, amoxicilina y trimetoprim-sulfametoxazole). La exposición a las cefalosporinas es un riesgo particularmente importante en la colonización e infección con **Enterococos**. Existen una variedad de **Enterococos** que particularmente pueden ser resistente a muchos glicopeptidos como la Vancomicina denominados ERV. <sup>(60)</sup>

### 2.1.3.2 *Staphylococcus aureus*

#### Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Cocci
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: Staphylococcus Rosenbach 1884
Especie	: <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>

#### Características

Conocido comúnmente como estafilococo áureo o dorado, es una bacteria anaerobia gram positiva productora de coagulasa y catalasa que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, pero no infectados por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de ***Staphylococcus aureus*** o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

En la actualidad, este microorganismo se erige como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado, o incluso, con otro paciente.

Son resistentes a la penicilina, siendo los antibióticos más eficaces para combatirlos los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina.

Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos.<sup>(26)</sup>

## **Patogenia**

Es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo.<sup>(26)</sup>

Causan infección de piel, neumonía, sialadenitis, sepsis con o sin metástasis (osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados), orzuelos. Enfermedades por toxinas (síndrome de piel escaldada por estafilococo, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis).

Posee resistencia a través de una beta-lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta-lactamasa está codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas.

La resistencia al óxido nítrico es una cualidad peculiar del ***S. aureus***, capacidad que lo distingue de otros patógenos, incluyendo los comensales ***S. epidermidis*** y ***S. saprophyticus***. Esa resistencia se debe a que el microorganismo produce una enzima llamada lactato-deshidrogenasa, que la faculta para tolerar el estrés causado por el radical del óxido nítrico. Esta observación se ha hecho tanto en especies resistentes a la meticilina como en las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas hospitalarias como adquiridas en la comunidad.<sup>(26)</sup>

### **2.1.3.3 *Pseudomona aeruginosa***

#### **Taxonomía**

Dominio : Bacteria

Filo : Proteobacterias

Clase : Gammaproteobacteria  
Orden : Pseudomonadales  
Familia : Pseudomonadaceae  
Género : Pseudomona  
Migula, 1894  
Especie : *Pseudomona auroginosa*  
(Schroeter 1872)  
Migula 1900

### Características

***Pseudomonas aeruginosa*** (o ***Pseudomonas pyocyanea***) Es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar.<sup>(59)</sup> Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas..<sup>(26)</sup>

Como otras ***Pseudomonas***, ***P. aeruginosa*** secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo). King, Ward, & Raney desarrollaron "***Pseudomonas*** Agar P" (también conocido como "medio King A") para mejorar la producción de piocianina y piorubina; y "***Pseudomonas*** Agar F" (también conocido como "medio King B") para la fluoresceína.<sup>(32)</sup>

***P. aeruginosa*** es a menudo identificada, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas *in vitro*. La identificación clínica definitiva de ***P. aeruginosa*** frecuentemente incluye, tanto identificar la producción de piocianina y fluoresceína como determinar su habilidad de crecer a 42 °C. ***P. aeruginosa*** es capaz de crecer en combustibles como kerosene o gasolina, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga.

## Patogenia

Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, *P. aeruginosa* infecta el tracto pulmonar, tracto urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre.<sup>(66)</sup> Las *Pseudomonas* puede causar neumonías a cualquier grupo de edad,<sup>(21)</sup> necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes agentes aislados en muchos estudios.<sup>(19)</sup> La piocianina es un factor de virulencia de la bacteria y se ha conocido que puede hasta causar muerte en *C. elegans* por estrés oxidativo. Sin embargo, la investigación indica que el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina.<sup>(50)</sup> Uno en diez hospitales se infectan con *Pseudomonas*. La fibrosis quística está también predispuesta a la infección con *P. aeruginosa* de los pulmones. La *Pseudomona aeruginosa* es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua de bebida. El más común causante de altas fiebres en infecciones es *P. aeruginosa*. También ha estado involucrado en foliculitis de tinas de agua caliente, en especial aquellas sin un control higiénico continuo.<sup>(41)</sup>

Con plantas, *P. aeruginosa* induce síntomas de "pudrición de raíces" con *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa* (lechuga).<sup>(54)(55)</sup> Es un poderoso patógeno con *Arabidopsis*<sup>(70)</sup> y con varias spp. Animales: *Caenorhabditis elegans*,<sup>(36) (39)</sup> *Drosophila*<sup>(12)</sup> y *Galleria mellonella*.<sup>(42)</sup> Las asociaciones de factores de virulencia son los mismos para infecciones vegetales y animales.<sup>(54)(56)</sup>

Bajo las últimas condiciones y con microscopía de escaneado laser confocal, grandes aglomerados de *Pseudomona aeruginosa* muerta se han visto en la superficie radicular de *Arabidopsis* y no se observa formación de bio-película. Los estudios con mutantes quorum sensing PAO210 (rhII), PAO214 (lasI), y PAO216 (lasI rhII) demostraron que todas las razas eran patogénicas a *Arabidopsis*, que naturalmente no secretan ácido rosmarínico como un exudado de raíces. Sin embargo, PAO214 fue la única raza patogénica que

emitió exudado dulce, y bio-películas de PAO214 pareció comparable con bio-películas formados en razas salvajes de *Pseudomona aeruginosa*.<sup>(70)</sup>

#### **2.1.3.4 *Escherichia coli***

##### **Taxonomía**

Dominio : Bacteria  
Filo : Proteobacterias  
Clase : Gammaproteobacteria  
Orden : Enterobacteriales  
Familia : Enterobacteriaceae  
Género : Escherichia  
Especie : *Escherichia coli* (*E. freundii*)Migula, 1895

##### **Características**

También conocida por la abreviación de su nombre, ***E. coli***, es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó ***Bacterium coli***. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de ***Escherichia coli***, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.

Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular.<sup>(60)</sup>

## Patogenia

Puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía.

Está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C.

Son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm, o bien 1 a 2 pulgadas) en comparación con los hombres (unos 20 cm, o unas 8 pulgadas). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción entre hombres y mujeres. Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra (una infección ascendente), los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el evento iniciante de la infección es desconocido. Aunque las infecciones ascendentes son las causantes de infecciones del tracto urinario bajo y cistitis, no es necesariamente ésta la causa de infecciones superiores como la pielonefritis, que puede tener origen hematógeno<sup>(59)</sup>

## 2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES

### 2.2.1 Variable Independiente (X).

- Extractos liofilizados de *Pseudelephantopus spiralis* “chicoria” y *Alternanthera halimifolia* “ojo de pollo”

Indicadores:

- Concentración de 500, 600, 700, 800, 900 mg/ml del extracto liofilizado de *Pseudelephantopus spiralis* “chicoria”
- Concentración de 500, 600, 700, 800, 900 mg/ml del extracto liofilizado de *Alternanthera halimifolia* “ojo de pollo”

### 2.2.2 Variable Dependiente (Y)

- Actividad antimicrobiana de *Pseudelephantopus spiralis* “chicoria” y *Alternanthera halimifolia* “ojo de pollo”

Indicadores:

- Diámetro del halo de inhibición en los discos.
- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*
- Concentración bactericida mínima (CBM) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*

**CUADRO 01 –OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: Variable independiente (X)**

<u>VARIABLE INDEPENDIENTE (X)</u>	<u>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</u>	<u>DEFINICIÓN OPERACIONAL</u>	<u>INDICADOR</u>	<u>ESCALA</u>
Extractos hidroalcohólicos liofilizados de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Lessing) Cronquis “chicoria” y <i>Alternanthera halimifolia</i> (Lamarck) Standley ex Pittier “ojo de pollo”	Extractos hidroalcohólicos liofilizados: Producto de la extracción de las hojas obtenidas por maceración en etanol al 70% y conservado en congelación para luego liofilizarlo.	Extractos hidroalcohólicos liofilizados: Extracción por maceración de las hojas con etanol a 70% durante 3 días, agotándolo hasta 4 veces. Posterior filtrado, concentrado en rotavapor, neutralizado y congelado a -22°C para luego liofilizar (-40°C con una presión de $1.33 \times 10^{-3}$ MBARR/72 horas	Concentración de los Extractos hidroalcohólicos liofilizados de <i>Pseudelephantopus spiralis</i> (Lessing) Cronquis “chicoria” y <i>Alternanthera halimifolia</i> (Lamarck) Standley ex Pittier “ojo de pollo”	Intercalar Tipo cuantitativo.

**CUADRO 02 - OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: Variable dependiente (Y)**

VARIABLE DEPENDIENTE (Y)	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
Actividad antimicrobiana	Capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento de microorganismos o de producir su muerte	<p><b>Capacidad antimicrobiana</b>                      Determinación del halo de inhibición tras la aplicación del medio de cultivo, de los discos de sensibilidad impregnados con los extractos en estudio a 18 horas después de la incubación.</p>	<p>Diámetro en milímetros (mm) de la zona de inhibición.</p>	Intercalar Tipo cuantitativo.
		<p><b>Concentración inhibitoria mínima</b>                      Concentración más baja del extracto capaz de inhibir el crecimiento visible de las bacterias, se determina mediante la ausencia de turbidez en una batería de tubos a diferentes concentraciones, después de las 18 horas de realizado a siembra.</p>	<p>Presencia y/o turbidez en los tubos con diferentes concentraciones de extracto.</p>	
		<p><b>Concentración bactericida mínima</b>                      Concentración mínima del extracto capaz de eliminar el crecimiento visible de las bacterias, se determina mediante la ausencia de crecimiento de colonias en las placas con el medio adecuado, después de las 24 horas de realizada la siembra.</p>	<p>Ausencia de crecimiento de colonias en las diversas placas sembradas.</p>	

### **Respuesta a la hipótesis:**

Con la realización de este trabajo de tesis, se pretende tener información que nos permita saber con claridad y profundidad de los últimos estudios realizados con plantas medicinales y técnicas microbiológicas que presentan actividad antimicrobiana frente a microorganismos anaerobios, que se analizara en tres pasos.

- Capacidad antimicrobiana
- Concentración inhibitoria mínima
- Concentración bactericida mínima

Con este trabajo se quiere reforzar y actualizar a las personas que investigan plantas medicinales, en especial a los investigadores de salud; de los últimos estudios y técnicas utilizadas en la actividad antimicrobiana en microorganismos anaerobios.

## CAPITULO III

### 3.1 MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

#### 3.1.1 Método de Investigación

##### Tipo de estudio:

- **Experimental:** Se realizó comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control.
- **Prospectivo:** En el registro de información se tomó en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.
- **Longitudinal:** Se estudió las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

#### 3.1.2 Diseño de investigación:

En el presente estudio se utilizó un muestreo aleatorio simple, y sorteo aleatoriamente de las concentraciones de extractos acuosos sobre los microorganismos sujetos de estudio, teniéndose los siguientes parámetros fisicoquímicos:

**CUADRO 01 - Plan piloto**

		Concentraciones [ ]				
		[ ]1	[ ]2	[ ]3	[ ]4	[ ]5
Control +	norfloxacino	10 ug	10 ug	10 ug	10 ug	10 ug
Muestra 1	chicoria	500 mg	600 mg	700 mg	800 mg	900 mg
Muestra 2	Ojo de pollo	500 mg	600 mg	700 mg	800 mg	900 mg
blanco	Agua destilada	10 ul	10 ul	10 ul	10 ul	10 ul

Nota: todos los ensayos se realizó por triplicado

## 3.2 POBLACION Y MUESTRA

### Población vegetal:

- Estuvo Constituida por el conjunto de hojas de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” que se encuentra en el fundo de zungarochocha en la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo” que se encuentran en el jardín botánico perteneciente al Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD, San Juan - Maynas - Loreto.

### Muestra vegetal:

- 1000 gramos de hojas de ***Pseudelephantopus spiralis*** “chicoria” y ***Alternanthera halimifolia*** “ojo de pollo” que fueron recolectadas del fundo de Zungarochocha en la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y el jardín botánico perteneciente al Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD de forma aleatoria y que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

### Criterios de inclusión:

- Hojas en buen estado.
- Hojas jóvenes.

### Criterios de exclusión:

- Hojas infestadas por microorganismos.
- Hojas secas o en mal estado de conservación.
- Hojas con resto de excremento animal.

### Población bacteriana:

- El estudio se realizó con cepas bacterianas de ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923, ***Pseudomonas aeruginosa*** ATCC 27853, ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Enterococcus faecalis*** ATCC 29212, provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

**Muestra bacteriana:**

- El número de colonias que se empleó para la preparación del inóculo bacteriano será de 3 a 5 colonias de tamaño similar.

**Criterios de inclusión:**

- Cepas que reunieron las características microscópicas y bioquímicas del microorganismo.

**Criterios de exclusión:**

- Cepas que presentaron contaminantes.
- Cepas que no coincidían con el fenotipo del microorganismo.

### 3.3 INSTRUMENTOS Y MATERIALES

#### 3.3.1 Material vegetal

- Hojas secas de *Pseudelephantopus spiralis* “chicoria”
- Hojas secas de *Alternanthera halimifolia* “ojo de pollo”

#### 3.3.2 Material Biológico:

- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

#### 3.3.3 Materiales de laboratorio

- Asa de inoculación
- Disco de sensibilidad estériles de norfloxacino de 10 ug con 6 mm de diámetro.
- Discos estériles de 6 mm de diámetro.
- Embudos de vidrio
- Espátula mediana.
- Guantes quirúrgicos N° 7 ½
- Gradillas para tubos de ensayo.
- Hisopos estériles.
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc
- Marcador de vidrio
- Mascarillas descartables.
- Micropipetas automáticas de 250, 500 y 1000 uL.
- Papel toalla
- Papel filtro Whatman N° 3
- Papel kraft.
- Pipetas 1 y 10 cc
- Placas petri de 10 cm.

- Placas petri de 4 cm.
- Tips descartables.
- Tijeras
- Tubos de ensayo estériles con tapa rosca.
- Vernier o regla graduada en mm.
- Mechero de vidrio de alcohol.

### **3.3.4 Equipos**

- Autoclave (Intermedical trade S.A./Model Mod. Vetical-V)
- Balanza analítica (Mettler Toledo AG 204)
- Cámara de reflujo laminar Magmehelic “forma científic/Model: 13089-79)
- Cámara fotográfica Digital (Lumix – Panasonic)
- Campana de Seguridad (Terra Universal)
- Cocina eléctrica (PRACTICA/Modelo: cocineta eléctrica HP1)
- Estufa de cultivo a 35°C (Merck/Model 1235-2)
- Horno para esterilización (MEMMERT/Typ: UM 500)
- Refrigerador de 2-8°C (MABE Colombia/Modelo: RML10WHPN50)
- Agitador magnetico (JENWAY LTD. Felsted Dunmonw Essex England CM6 3LB/Model: 1200)
- Espectrofotómetro (JENWAY/ Model: 6400)

### **3.3.5 Medios de cultivo y reactivos químicos**

- Agar Trypticasa de Soya
- Agar Mueller Hinton
- Caldo Trypticasa de Soya
- Caldo MuellerHinton
- Tubo de 0.5 de la escala de McFarland
- Ácido sulfúrico concentrado. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Agua destilada.
- Etanol q.p.
- Cloruro de Bario BaCl<sub>2</sub>

### 3.4 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### 3.4.1 Recolección de las muestras vegetales

El *Pseudelephantopus spiralis* “chicoria” fue recolectado del fundo de Zungarococha de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana/ con coordenadas (18 M 0681349 – 9575930) con una altitud de 101 msnm y *Alternanthera halimifolia* “ojo de pollo” fue recolectado en el Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional IMET - ESSALUD, ubicada en el pasaje San Lorenzo N° 205/ con coordenadas (18 M 0691547 – 9583722) con una altura de 116 msnm, ambos en la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto; a orillas del Río Amazonas en la Selva Baja. Es una zona considerada bosque húmedo tropical, presenta temperatura media anual de 26°C.

La identificación de las muestra vegetales se realizo en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Además, en la recolección de las muestras vegetales se tuvo en consideración los siguientes factores:

- Edad de la planta (hojas).
- Estado vegetativo.
- Estación de recolección.

#### 3.4.2 Preparación del pulverizado vegetal

- Se usó las hojas jóvenes.
- Se cortó en pequeños fragmentos.
- Luego se secó al medio ambiente x 5 días
- Se volvió a pesar y luego se procedió a pulverizar, haciendo uso de una licuadora de cuchillas de acero inoxidable.
- El pulverizado se guardó en frascos oscuros y luego se utilizaron.

### **3.4.3 Preparación de extractos hidroalcohólicos IMET (2007)**

Para la preparación de los extractos hidroalcohólicos se procedió de acuerdo al siguiente protocolo:

- Se procedió a macerar las muestras de los vegetales en etanol - agua en una proporción de 7/3 respectivamente.
- Luego se procedió a realizar filtraciones de la muestra, utilizando algodón estéril y se guardó por 48 horas en la refrigeradora a 20°C.
- Luego se llevó a calentamiento en la cocina por espacio de 30 minutos para eliminar el agua y el etanol obteniéndose el extracto acuoso.
- El extracto acuoso se guardó en frascos de color ámbar en refrigeración a 5°C

### **3.4.4 Protocolo para la Liofilización**

- Se colocó las muestras en frascos especiales que soportan grandes presiones.
- Se congeló las muestras a una temperatura de – 42°C.
- Luego se colocó en el equipo de Liofilización por un tiempo de 72 horas.
- Se retiró para su conservación al medio ambiente.

### **3.4.5 Preparación de las Concentraciones**

- Se procedió realizar el cálculo de las concentraciones para cada extracto a utilizar.
- Se pesó 2.5 gr. de extracto liofilizado en 2.5 ml. de agua destilada estéril para obtener la solución stock con una concentración de 1000 mg/ml.
- A partir de esta solución stock se procedió a preparar las siguientes concentraciones: 500 mg/ml, 600 mg/ml, 700 mg/ml, 800 mg/ml, 900 mg/ml.

### 3.4.6 Preparación de los discos de sensibilidad <sup>(43)</sup>

- Los discos de sensibilidad se prepararon utilizando papel Wattman N° 3 y se empleó un perforador convencional. Estos discos se esterilizarán en autoclave a 121C° en 15 libras de presión por 15 minutos.
- Luego se procedió agregar a cada uno de los discos 25 µl de las concentraciones de los extractos vegetales, las que se dejó secar por espacio de 24 horas.

### 3.4.7 Prueba de Sensibilidad según protocolo del IMET

- Se procedió a preparar el medio agar tripticasa de soya (TSA) en placas petri para el cultivo de: ***Staphylococcus aureus*** ***Pseudomona aeruginosa***, ***Enterococcus faecalis*** y ***Escherichia coli***.
- En una estufa se incubó a los microorganismos a 37° C por 18 a 24 horas para obtener cultivos jóvenes.
- Después de los 15 minutos de haber preparado el inoculado bacteriano, y ajustado la turbidez del mismo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inoculo.
- Se inoculo la superficie seca de la placa Mueller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones. Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que se absorba el exceso de humedad.
- Se realizó la prueba por triplicado.
- Se colocó los discos de norfloxacin y la sustancia a diferentes concentraciones, sobre la superficie del agar en forma manual con la ayuda de una pinza estéril. Fueron presionados ligeramente para asegurar el contacto uniforme, sin introducir el disco en el agar.
- Los discos fueron colocados a una distancia de 2.5cm uno del otro y a 1.5cm del borde de la placa.
- Se invirtieron las placas y fueron incubadas a 37°C durante 18 horas.

- Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro completo), usando una regla o calibrador.

### 3.4.8 Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria

- Se prepararon cultivos de 18 horas de las bacterias a estudiar, en agar tripticasa de soya.
- Se incubó en una porción de una colonia aislada en 5 ml. de caldo de Tripticasa de soya y se incubo a 37°C hasta que la turbidez sea visible (2-5 h.). Se Ajusto la turbidez con solución salina o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland aproximadamente 106 ufc/ml.
- Se realizó el ensayo en tubos y se llevo a cabo una dilución al 1/100 de este inculo de aproximadamente 106 UFC/ml.
- Se preparó 15 tubos con 1 ml. de caldo de Mueller - Hinton y otro con 1.8 ml. luego se preparo una solución madre del extracto vegetal liofilizado a una concentración de 5.120 mg/ml.
- Se añadió 0.2 ml. de la solución madre del extracto vegetal al tubo que contenía 1.8 ml. de caldo. A partir de este tubo se preparó diluciones dobles seriadas tomando 1 ml. del 1er. tubo (512 mg/ml) transfiriéndolo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo se transfiriendo 1 ml. al tercer tubo (128 mg/ml.) y así sucesivamente hasta el tubo 14, del cual se tomó 1 ml. y se descarto.
- Se añadió a cada tubo con el extracto vegetal 1 ml. del inculo que contenía aproximadamente 106 ufc/ml.
- Se Incubó los tubos a 37 °C durante 18 horas y luego se procedió a calcular la C.M.I. agitando los tubos donde no habrá desarrollo bacteriano

### CUADRO 02 - Formula para determinar el porcentaje de inhibición:

$$\%INHIBICIÓN: \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro del control}}$$

Los ensayos fueron llevados por triplicado y se realizó cultivos de control de todas las cepas para comprobar su viabilidad.

El criterio que se utilizó para la clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados se detalla en el cuadro 2.

**CUADRO 03 - Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición:**

<b>ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</b>	<b>PORCENTAJE DE INHIBICIÓN</b>
Inactivo	<40%
Poco activo	40 – 50%
Moderado activo	51 – 75%
Buena actividad	>76%

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007

**CUADRO 04 - Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración mínima inhibitoria**

<b>ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</b>	<b>CONCENTRACIÓN INHIBITORIA</b>	<b>MÍNIM</b>
Inactivo	>16 mg/ml	
Poco activo	6 – 15 mg/ml	
Moderado activo	1 – 5 mg/ml	
Buena actividad	< 1 mg/ml	

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007

### **3.4.9 Determinación de la concentración bactericida mínima**

- Una vez leída la CIM se homogenizó el contenido de los tubos y se sembró 100 ul de los tubos donde no hubo crecimiento.
- Se depositó 10 ul de cada tubo sobre el agar TSA y extenderlo con un asa de grasey de esta forma se diluyó la concentración del antimicrobiano vehiculado, se neutralizó el efecto y se favoreció el recuento.
- Se incubó a 38°C y fue leído a las 24, 48 y 72 horas.
- Se recató las colonias que han crecido a las 24, y 48 horas de incubación en las placas donde se sembró el inóculo original.
- Se calculó que cantidad de colonias representan al 0.1%.

### 3.5 ANÁLISIS DE DATOS

Se calculó la media y la desviación estándar de los extractos hidroalcohólicos liofilizado de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* (less.) Cronq. “chicoria” y *Alternanthera halimifolia* (Lam.) Standl. “ojo de pollo”, tomando los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, que se presentó mediante tablas y gráficos. Los datos se procesó mediante un análisis de varianza de una vía (ANVA) con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ ; aplicando el programa SPSS versión 18.0 y las diferencias entre medidas de grupos fueron analizadas mediante el test de comparación múltiples. Valor  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

Se calculó el porcentaje de inhibición de los extracto hidroalcohólico liofilizado de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* (less.) Cronq. “chicoria” y *Alternanthera halimifolia* (Lam.) Standl. “ojo de pollo”, en la prueba de actividad antimicrobiana por el método de disco difusión, estos valores se presentan en tablas y gráficos de acuerdo a las especificaciones del cuadro 2.

Las concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas obtenidas de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* (less.) Cronq. “chicoria” y *Alternanthera halimifolia* (Lam.) Standl. “ojo de pollo”, se presentan en tablas y gráficos para facilitar la visualización y clasificarlos de acuerdo a las especificaciones del cuadro 3 y 4. Se realizó el análisis de varianza (ANVA) utilizando el programa estadístico SPSS v 18.0 y las diferencias entre las medidas de grupos fueron analizadas mediante el test de comparación múltiples. Valor  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

### **3.6 CRITERIOS DE BIOSEGURIDAD**

1. Utilizar en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
2. Utilizar guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que pudieran entrar en contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retiraron de forma aséptica y a continuación se lavo las manos.
3. Lavar las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Usar gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando fue necesario se protegió los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
5. Está prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo en cantinas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal y baños.
6. En las zonas de trabajo está prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
7. Está prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
8. La ropa protectora de laboratorio no se guarda en los mismos armarios o taquillas que la ropa de calle.

## CAPITULO IV

### 4.1 RESULTADOS

4.1.1 ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE *Alternanthera halimifolia* y *Pseudelephantopus spiralis* a CONCENTRACIONES DE 500, 600, 700, 800 Y 900 mg/ml POR EL METODO DE DISCO DIFUSION a las 18 horas

a. Diámetros promedios de los halos de inhibición en el crecimiento bacteriano in vitro de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* por el método de disco difusión se detallan en la tabla 1 y gráfico 1 en lo que se apreciaron a las diferentes concentraciones.

A la concentración de 900 mg/ml se obtuvieron mejores resultados para:

- ***Enterococcus faecalis***: 12.25 mm, el blanco fue constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 20 mm
- ***Escherichia coli***: 15.17 mm, el blanco fue constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 22 mm
- ***Pseudomonas aeruginosa***: 13.83 mm; el blanco fue constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 26 mm
- ***Staphylococcus aureus***: 13.42 mm, el blanco fue constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 21.4 mm

**TABLA 01.-** Promedio del diámetro del halo de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis* frente a los microorganismos en ensayo (en milímetros)

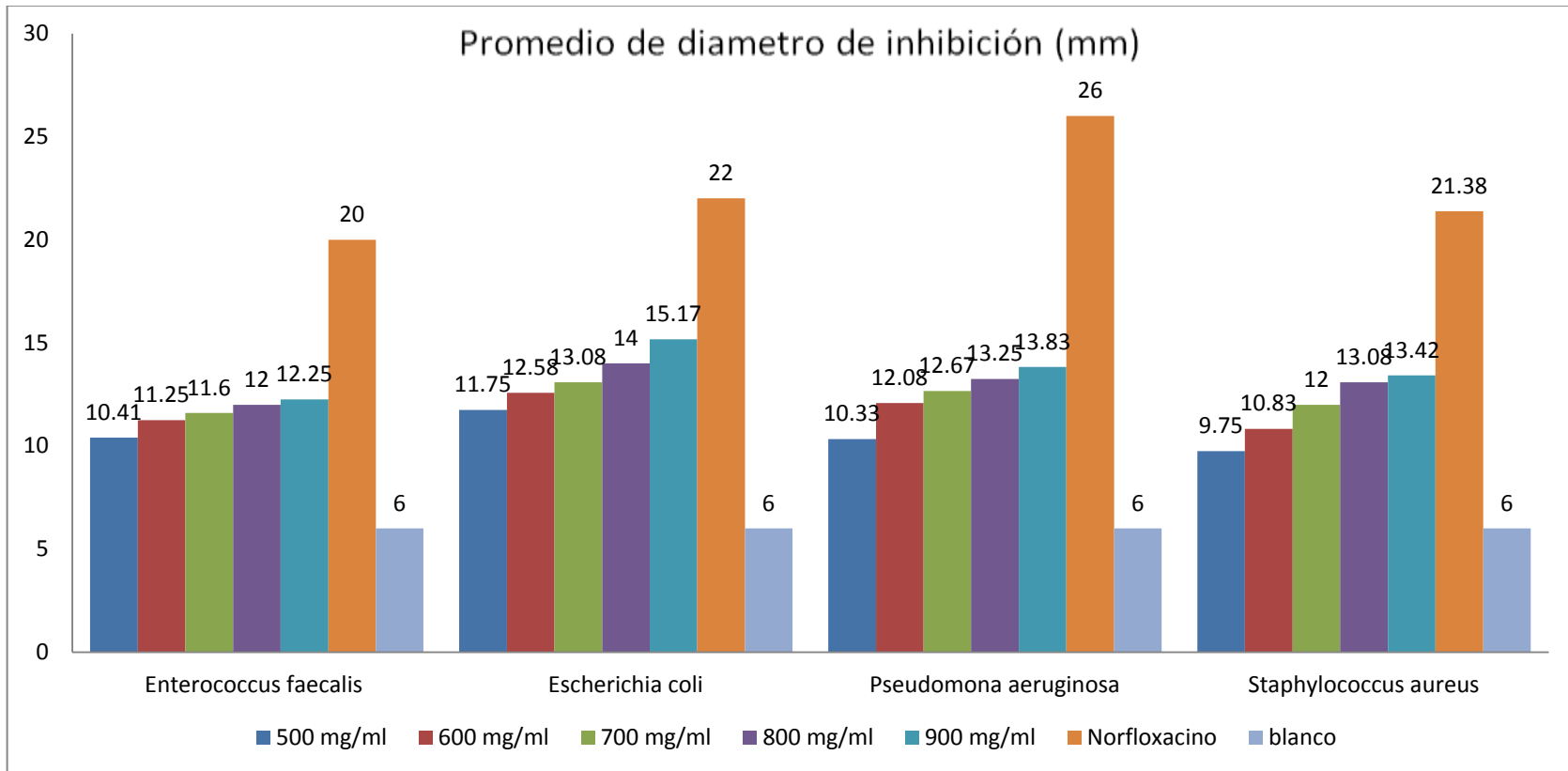
Concentraciones de <i>Pseudelephantopus spiralis</i>	MICROORGANISMOS PATOGENOS			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
500 mg/ml	10.41 ± 1.1	11.75 ± 1.6	10.33 ± 1.4	9.75 ± 0.9
600 mg/ml	11.25 ± 1.1	12.58 ± 1.0	12.08 ± 0.9	10.83 ± 0.8
700 mg/ml	11.6 ± 1.2	13.08 ± 0.9	12.67 ± 1.1	12 ± 0.7
800 mg/ml	12 ± 1.0	14 ± 0.7	13.25 ± 1.2	13.08 ± 0.8
900 mg/ml	12.25 ± 1.1	15.17 ± 0.8	13.83 ± 0.9	13.42 ± 0.7
Norfloxacino	20± 0.89	22±0.89	26± 0.89	21.4±0.45
blanco	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6± 0.0	6± 0.0

p << 0,000 con respecto al blanco y Norfloxacino

FUENTE: Elaborado por los autores

En la tabla 01se apreciaron que existen diferencias significativas entre los diámetros de inhibición de las concentración, antibiótico y blanco por cada microorganismo patógeno con valores de p << 0,000.

**GRAFICO 01** Promedio del diámetro del halo de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis* frente a los microorganismos en ensayo (en milímetros)



FUENTE: Elaborado por los autores

b. Diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano in vitro de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de ***Alternanthera halimifolia*** por el método de disco difusión se detallaron en la tabla 2 y gráfico 2 en lo que se aprecia a las diferentes concentraciones.

A la concentración de 900 mg/ml se obtuvieron mejores resultados para:

- ***Enterococcus faecalis***: 10.5 mm, el blanco constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 20 mm
- ***Escherichia coli***: 11.5 mm, el blanco constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 22 mm
- ***Pseudomona aeruginosa***: 9.33 mm, el blanco fue constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 26 mm
- ***Staphylococcus aureus***: 10.42 mm, el blanco fue constante e igual a  $6.00 \pm 0.0$  mm, mientras que con el antibiótico Norfloxacino 21.4 mm

**TABLA 02.-** Promedio del diámetro del halo de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia* frente a los microorganismos en ensayo (en milímetros)

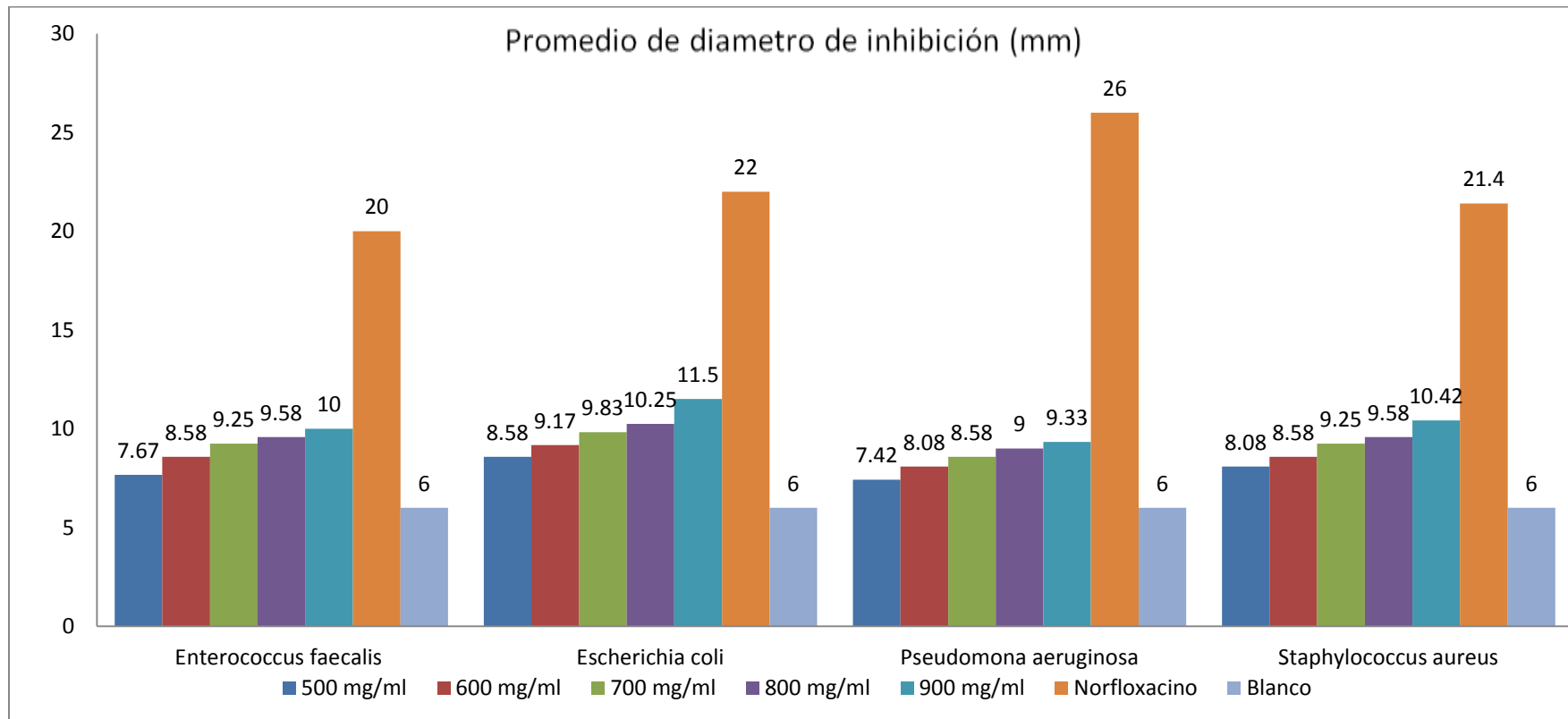
Concentraciones de <i>Alternanthera halimifolia</i>	MICROORGANISMOS PATOGENOS			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
500 mg/ml	7.67 ± 0.7	8.58 ± 0.9	7.42 ± 0.4	8.08 ± 0.7
600 mg/ml	8.58 ± 0.7	9.17 ± 0.9	8.08 ± 0.7	8.58 ± 0.9
700 mg/ml	9.25 ± 0.7	9.83 ± 0.7	8.58 ± 0.5	9.25 ± 1.2
800 mg/ml	9.58 ± 0.7	10.25 ± 0.9	9 ± 0.5	9.58 ± 1.5
900 mg/ml	10.5 ± 1.0	11.5 ± 1.2	9.33 ± 0.4	10.42 ± 1.1
Norfloxacino	20 ± 0.89	22 ± 0.89	26 ± 0.89	21.4 ± 0.45
blanco	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6 ± 0.0	6 ± 0.0

p << 0,000

FUENTE: Elaborado por los autores

En la tabla 02 se apreciaron que existen diferencias significativas entre los diámetros de inhibición de las concentraciones, antibiótico y blanco por cada microorganismo patógeno con valores de p << 0,000.

**GRAFICO 02.-**Promedio del diámetro del halo de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia* frente a los microorganismos en ensayo (en milímetros)



FUENTE: Elaborado por los autores

c. Los porcentajes de inhibición de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de ***Pseudelephantopus spiralis*** se detallaron en la tabla 3 y gráfico 3 en lo que se apreciaron a la diferentes concentraciones:

- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Enterococcus faecalis***: 61.25% a la concentración de 900mg/ml.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Escherichia coli***: 68.95% a la concentración 900mg/ml.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Pseudomona aeruginosa***: 53.19% a la concentración de 900mg/ml.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Staphylococcus aureus***: 62.71% a la concentración de 900mg/ml.

Según los porcentajes de inhibición se puede clasificar a los patógenos frente a las concentraciones de la siguiente manera:

***Pseudomona aeruginosa*** a concentración de 500 mg/ml fue inactivo, y a concentraciones de 600, 700 y 800 mg/ml fue poco activo.

***Staphylococcus aureus*** a concentraciones de 500 y 600 mg/ml fue poco activo. Y los demás microorganismos a diferentes concentraciones estudiadas fueron moderadamente activas.

**TABLA 03.-** Porcentaje de inhibición y su clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis* frente a los microorganismos en ensayo (en porcentajes)

Concentraciones de <i>Pseudelephantopus spiralis</i>	MICROORGANISMOS PATOGENOS							
	<i>Enterococcus faecalis</i>	C1	<i>Escherichia coli</i>	C1	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C1	<i>Staphylococcus aureus</i>	C1
500 mg/ml	52.05	M	53.41	M	39.73	I	45.56	P
600 mg/ml	56.25	M	57.18	M	46.46	P	50.60	P
700 mg/ml	58	M	59.45	M	48.73	P	56.07	P
800 mg/ml	60	M	63.64	M	50.96	P	61.12	M
900 mg/ml	61.25	M	68.95	M	53.19	M	62.71	M

FUENTE: Elaborado por los autores

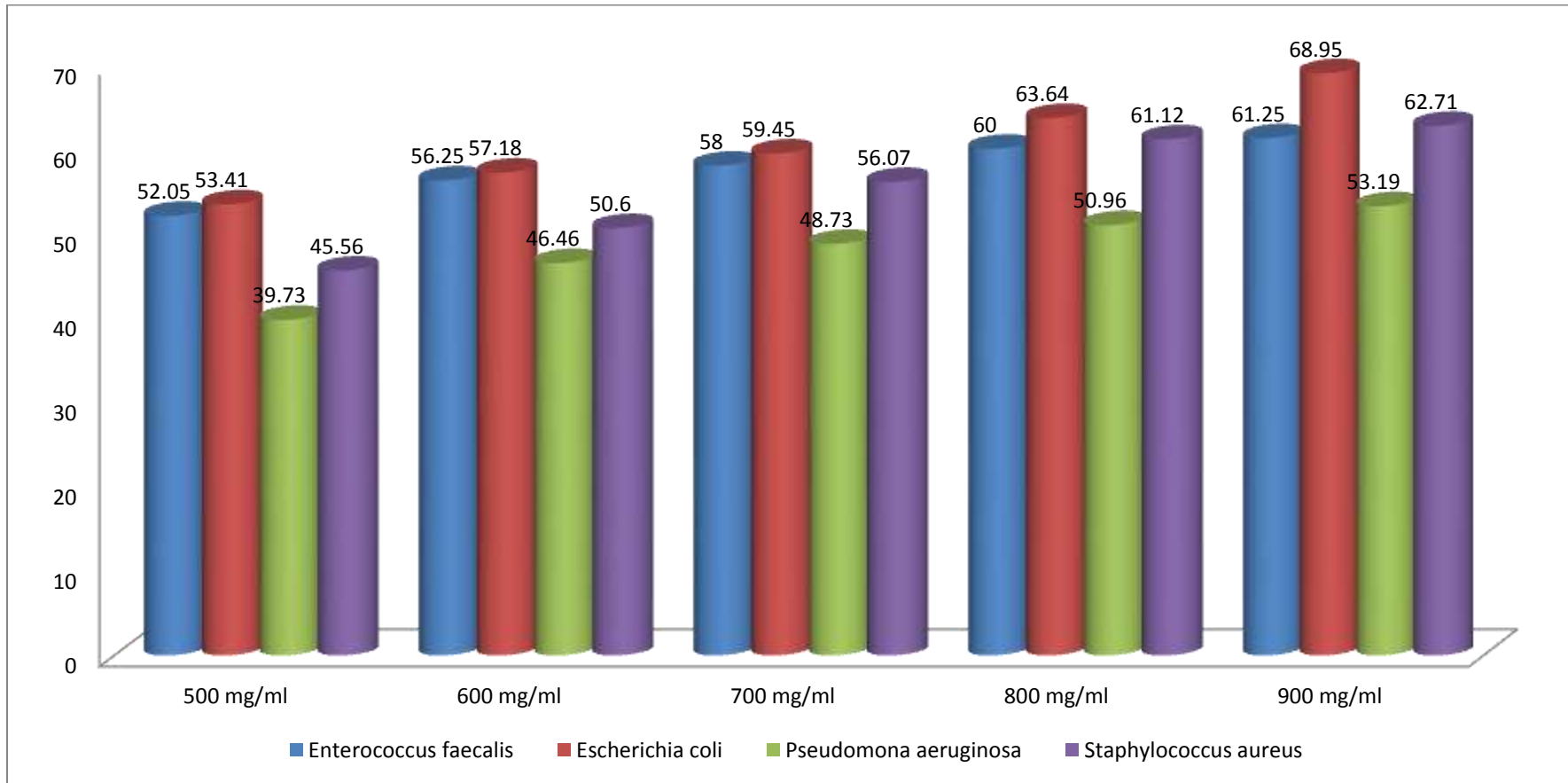
C1: .- Clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados a partir de porcentajes de inhibición

I: Inactivo

P: Poco activo

M: Moderado activo

**GRAFICO 03.-** Porcentaje de inhibición de los extracto hidroalcohólico de *Pseudelephantopus spiralis* frente a los microorganismos en ensayo (en porcentajes)



FUENTE: Elaborado por los autores

d. Los porcentajes de inhibición de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de ***Alternanthera halimifolia*** se detallaron en la tabla 4 y gráfico 4 en lo que se apreciaron a las diferentes concentraciones:

- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Enterococcus faecalis***: 52.5% a la concentración de 900mg/ml.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Escherichia coli***: 52.27% a la concentración de 900mg/ml.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Pseudomona aeruginosa***: 35.88% a la concentración 900mg/ml.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a ***Staphylococcus aureus***: 48.69% a la concentración de 900mg/ml.

Según los porcentajes de inhibición se puede clasificar a los patógenos frente a las concentraciones de la siguiente manera:

***Enterococcus faecalis***; a concentración de 500 mg/ml fue inactivo a 600,700 y 800 fue poco activo y a 900 fue moderado

***Escherichia coli***; a concentración de 500 mg/ml fue inactivo, a concentraciones de 600, 700 y 800 fue poco activo y 900 fue moderado

***Pseudomona aeruginosa***; 500, 600, 700, 800 y 900 fueron inactivo

***Staphylococcus aureus***; a concentración de 500mg/ml fue inactivo y las demás concentraciones fueron poco activas

**TABLA 04.-** Porcentaje de inhibición y su clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia* frente a los microorganismos en ensayo (en porcentajes)

Concentraciones de <i>Alternanthera halimifolia</i>	MICROORGANISMOS PATOGENOS							
	<i>Enterococcus faecalis</i>	C1	<i>Escherichia coli</i>	C1	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C1	<i>Staphylococcus aureus</i>	C1
500 mg/ml	38.35	I	39	I	28.54	I	37.76	I
600 mg/ml	42.9	P	41.68	P	31.08	I	40.09	P
700 mg/ml	46.25	P	44.68	P	33	I	43.22	P
800 mg/ml	47.9	P	46.59	P	34.62	I	44.77	P
900 mg/ml	52.5	M	52.27	M	35.88	I	48.69	P

FUENTE: Elaborado por los autores

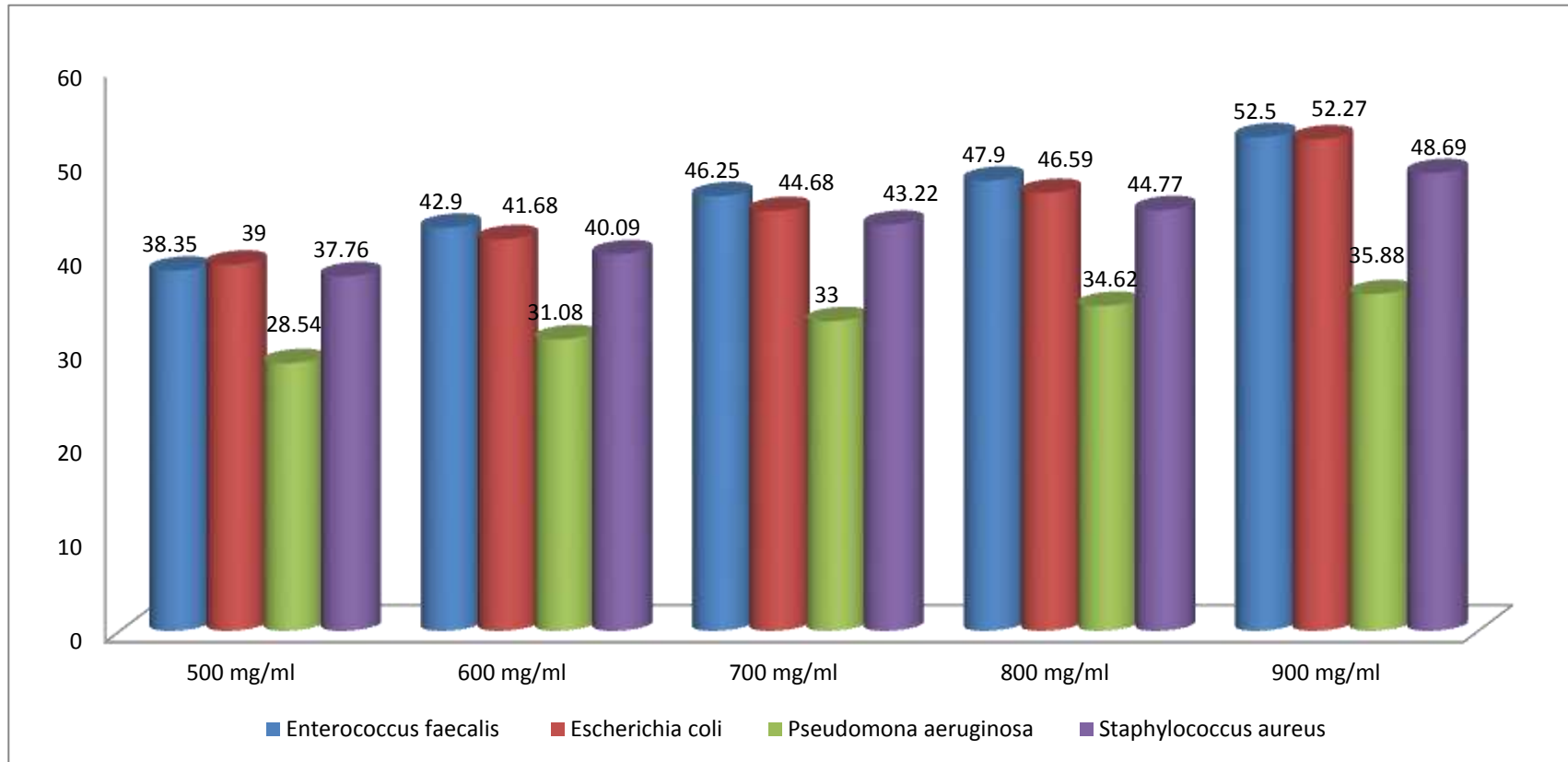
C1: .- Clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados a partir de porcentajes de inhibición

I: Inactivo

P: Poco activo

M: Moderado activo

**GRAFICO 04.-** Porcentaje de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia* frente a los microorganismos en ensayo (en porcentajes)



FUENTE: Elaborado por los autores

#### 4.1.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE *Alternanthera halimifolia* y *Pseudelephantopus spiralis* POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

- a. Concentraciones inhibitorias mínimas promedios de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* por el método de macrodilución en medio líquido frente a los microorganismos patógenos in vitro; se especifican en la tabla 05y grafico 05:

Promedio de concentración inhibitoria mínima frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* fue de 26.66, 13.3, 53.3 y 21.3 mg/ml respectivamente.

- b. Concentraciones inhibitorias mínimas promedios de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* por el método de macrodilución en medio líquido frente a los microorganismos patógenos in vitro; se especifican en la tabla 06y grafico 05:

Promedio de concentración inhibitoria mínima frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* fue de 4, 10.66, 8 y 6.66 mg/ml respectivamente.

**TABLA 05.-** Concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración inhibitoria mínima

CONCENTRACIONES	MICROORGANISMOS PATOGENOS							
	<i>Enterococcus faecalis</i>	C2	<i>Escherichia coli</i>	C2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C2	<i>Staphylococcus aureus</i>	C2
Chicoria	26.66	M	13.3	P	53.3	P	21.3	P
Control	0	N	0	N	0	N	0	N

C2: .- Clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados a partir de la concentración inhibitoria mínima

N: No hubo crecimiento

I: Inactivo

P: Poco activo

M: Moderado activo

**TABLA 06.-** Concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración inhibitoria mínima

CONCENTRACIONES	MICROORGANISMOS PATOGENOS							
	<i>Enterococcus faecalis</i>	C2	<i>Escherichia coli</i>	C2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C2	<i>Staphylococcus aureus</i>	C2
Ojo de pollo	4	I	10.66	P	8	I	6.66	I
Control	0	N	0	N	0	N	0	N

C2: .- Clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados a partir de la concentración inhibitoria mínima

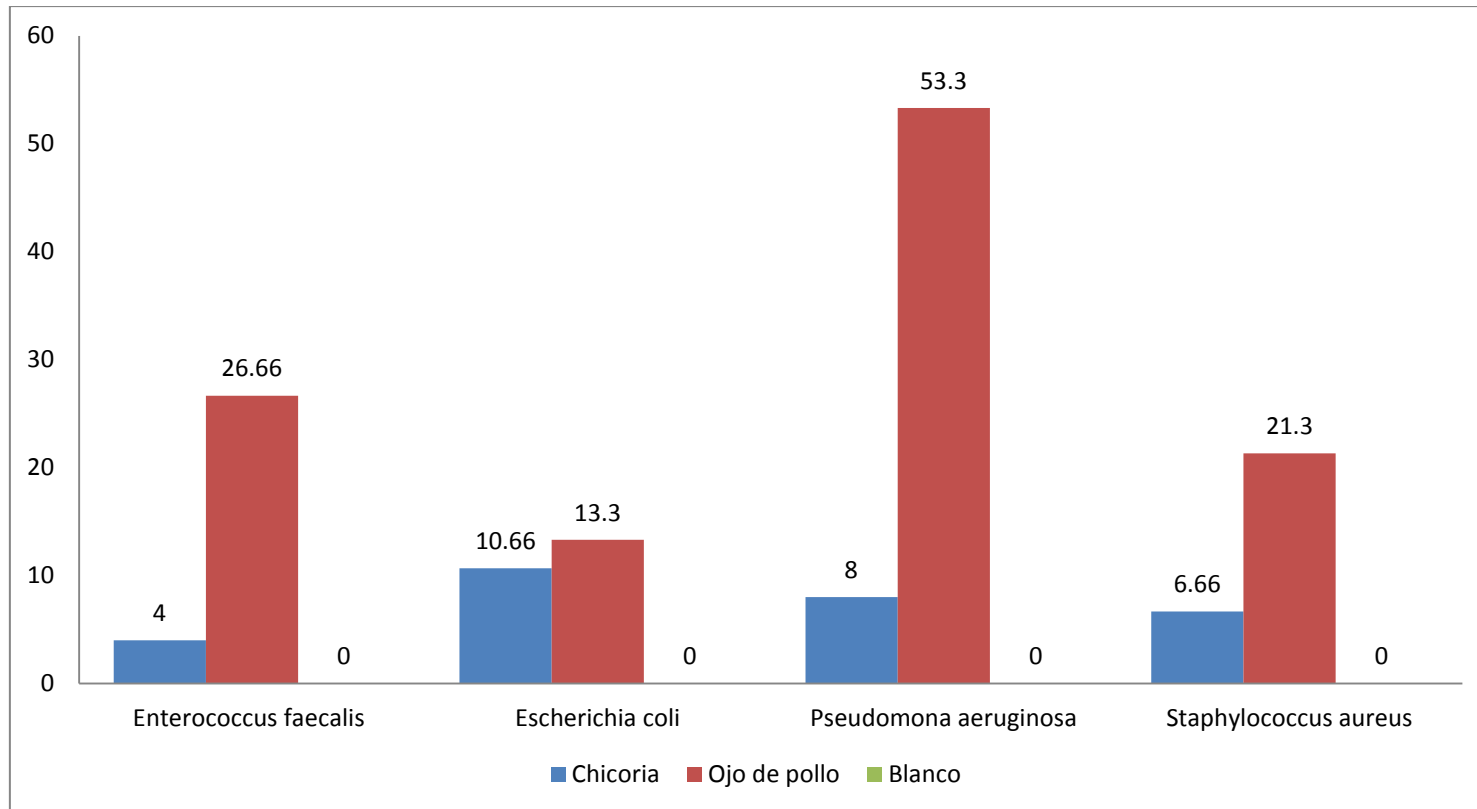
N: No hubo crecimiento

I: Inactivo

P: Poco activo

M: Moderado activo

**GRAFICO 05.-** Concentración inhibitoria mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* y *Pseudelephantopus spiralis* según microorganismos patógenos (en mg/ml)



FUENTE: Elaborado por los autores

4.1.3 ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE *Pseudelephantopus spiralis* y *Alternanthera halimifolia* POR EL METODO DE MACRODILUCION EN MEDIO SOLIDO.

a. Concentraciones bactericida mínimas promedios de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* por el método de macrodilución en medio solido frente a los microorganismos patógenos in vitro; se especifican en la tabla 07 y grafico 06:

- El promedio de concentración bactericida mínima (CBM) frente a *Enterococcus faecalis* 213.33 mg/ml, mientras que en los demás no existe CBM.

b. Concentraciones bactericida mínimas promedios de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* por el método de macrodilución en medio solido frente a los microorganismos patógenos in vitro; se especifican en la tabla 08 y grafico 06:

- El promedio de concentración bactericida mínima frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* fue de 106.67, 213.33, 213.33 y 170.67 mg/ml respectivamente.

**TABLA 07.-** Promedio de concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus spiralis* según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración mínima bactericida; se detalla en las tablas

EXTRACTO	MICROORGANISMOS PATOGENOS							
	<i>Enterococcus faecalis</i>	C3	<i>Escherichia coli</i>	C3	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C3	<i>Staphylococcus aureus</i>	C3
Chicoria	213.33	Pa	.....	Pa	.....	Pa	.....	Pa
Control	0	N	0	N	0	N	0	N

C3: .- Clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados a partir de la concentración bactericida mínima

N: No hubo crecimiento

Pa: Posee actividad

NP: No posee actividad

**TABLA 08.-** Promedio de concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* según microorganismos patógenos (en mg/ml) y Clasificación de la actividad antimicrobiana a partir de la concentración mínima bactericida.

EXTRACTO	MICROORGANISMOS PATOGENOS							
	<i>Enterococcus faecalis</i>	C3	<i>Escherichia coli</i>	C3	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C3	<i>Staphylococcus aureus</i>	C3
Ojo de pollo	106.67	Pa	213.33	NP	213.33	NP	170.67	NP
Control	0	N	0	N	0	N	0	N

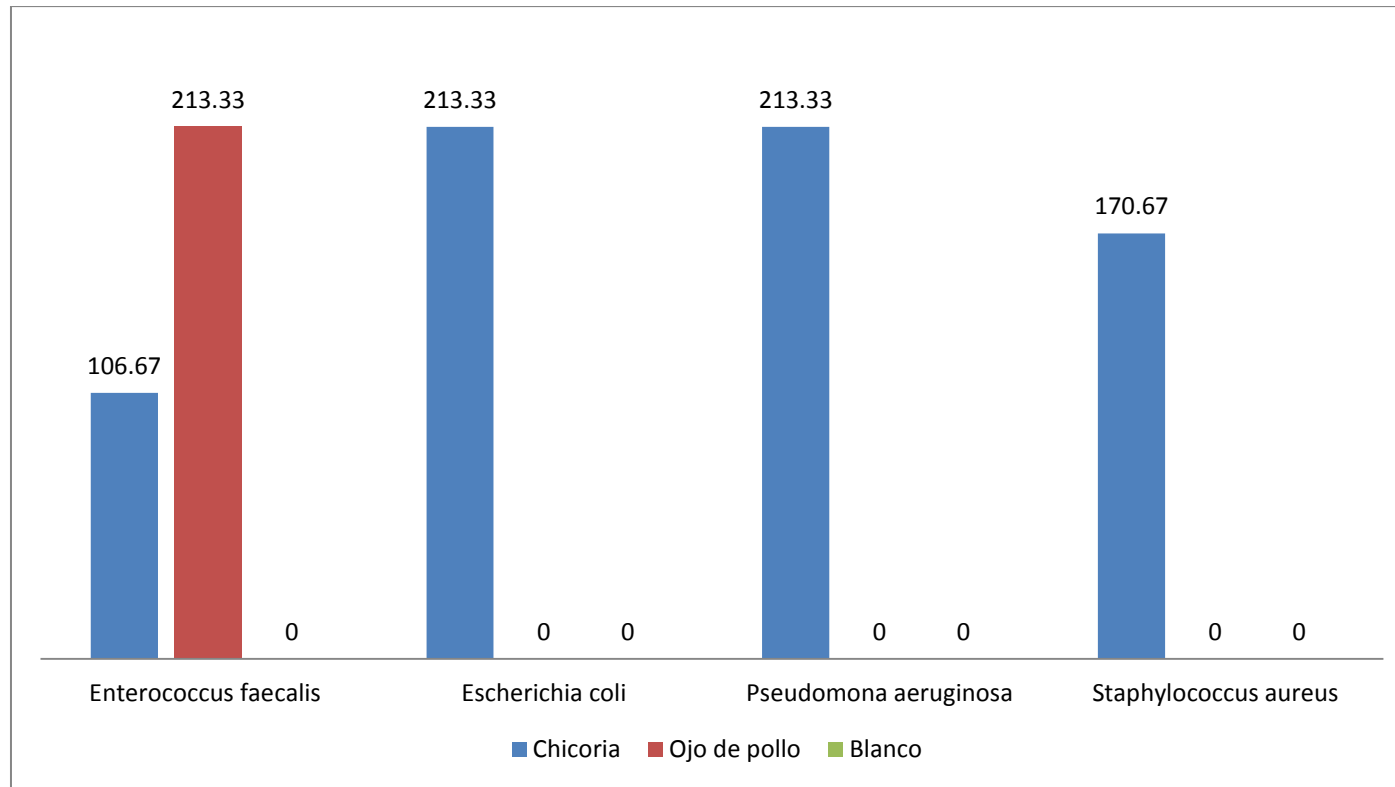
C3: .- Clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos liofilizados a partir de la concentración bactericida mínima

N: No hubo crecimiento

Pa: Posee actividad

NP: No posee actividad

**GRAFICO 06.-** Promedio de concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* y *Pseudelephantopus spiralis* según microorganismos patógenos (en mg/ml)



FUENTE: Elaborado por los autores

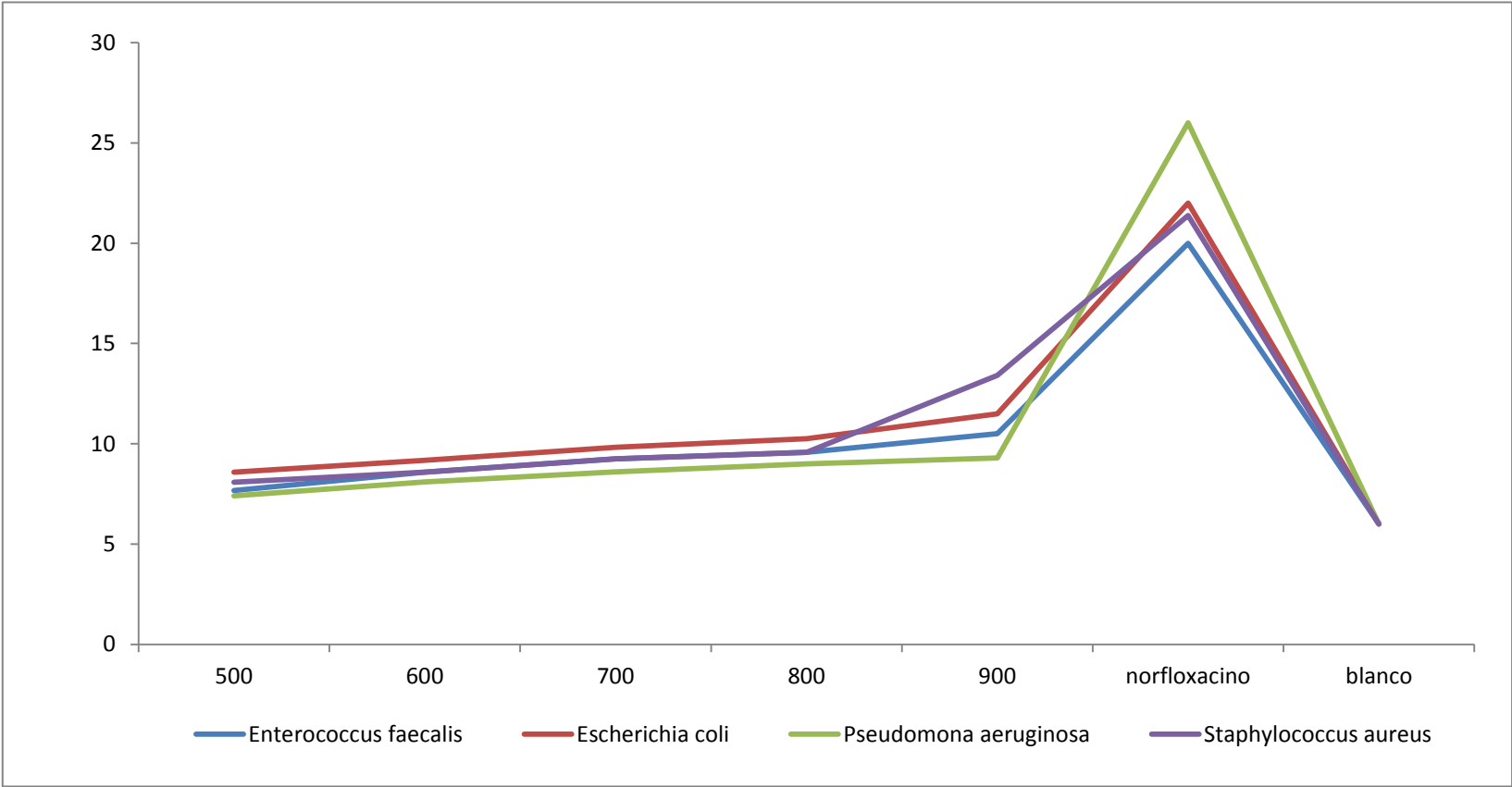
#### 4.1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS *in vitro*

##### A. PROMEDIO DE DIÁMETRO DE HALOS DE INHIBICIÓN POR EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO EN MICROORGANISMOS

Promedios de diámetros de halos de inhibición de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Pseudelephantopus Spiralís* frente a microorganismo en estudio; los resultados se presentaron en el gráfico 7:

- En el gráfico 7 se apreciaron que el mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Enterococcus faecalis* corresponde a norfloxacino (20 mm), seguido por la concentración de 900 mg/ml (12.25 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm). El mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Escherichia coli* corresponde a norfloxacino (22 mm), seguido por la concentración de 900 mg/ml (15.17 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm). El mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* corresponde a norfloxacino (26.00 mm), seguido por la concentración de 900 mg/ml (13.83 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm). El mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* corresponde a norfloxacino (21.4 mm), seguido por la concentración de 900 mg/ml (13.42 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm).

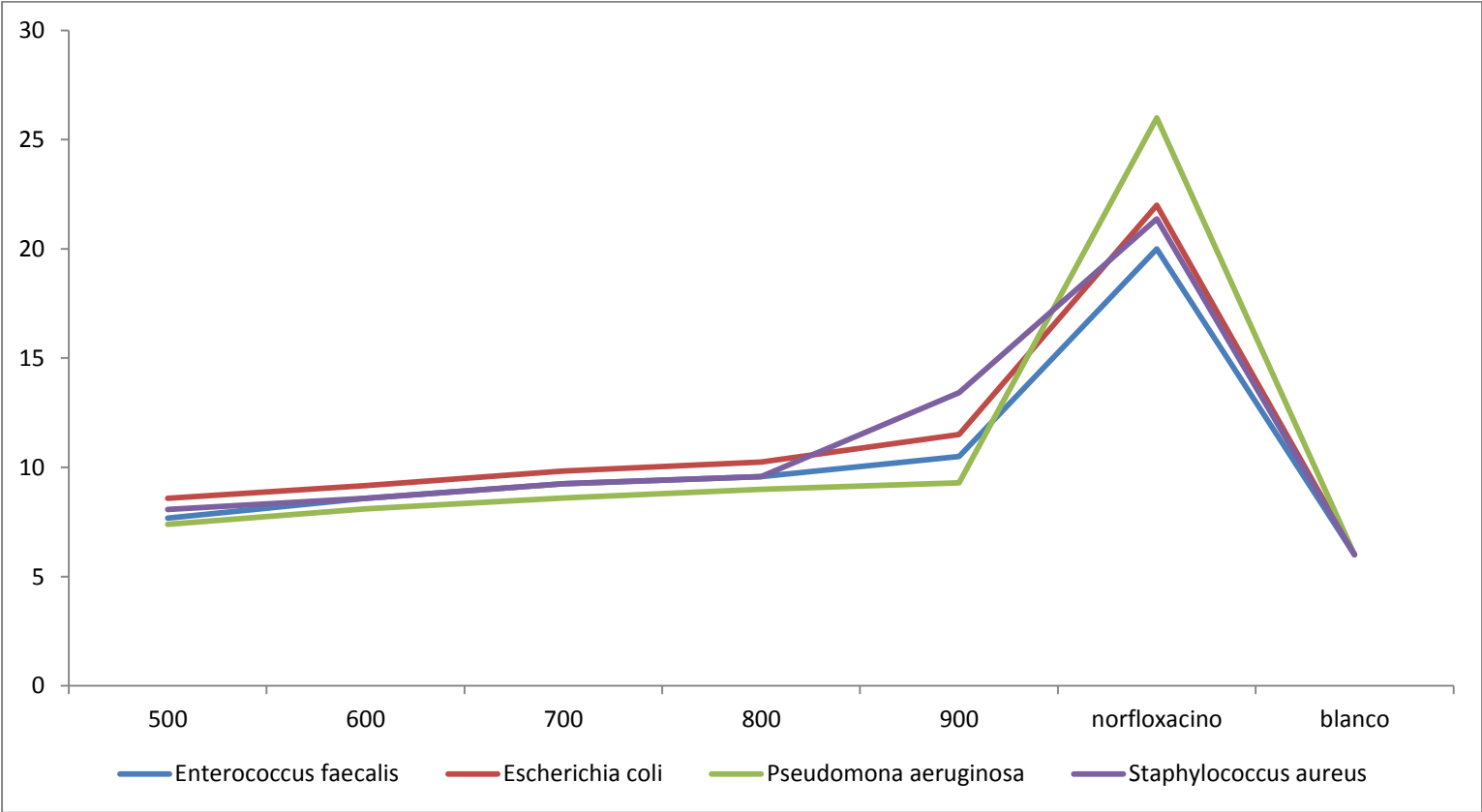
**GRAFICO 7.- PROMEDIOS DE DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE *PSEUDELEPHANTOPUS SPIRALIS* FRENTE A MICROORGANISMO EN ESTUDIO**



Promedios de diámetros de halos de inhibición de extractos hidroalcohólicos liofilizados de las hojas de *Alternanthera halimifolia* frente a microorganismo en estudio; los resultados se presentan en gráfico 8:

- En el gráfico 8 se apreciaron que el mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Enterococcus faecalis* corresponde a norfloxacino (20 mm), seguido por la concentración de 900 mg/ml (10.05 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm). el mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Escherichia coli* corresponde a norfloxacino (22 mm), seguido por la concentración 900 mg/ml (11.5 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm). el mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Pseudomona aeruginosa* corresponde a norfloxacino (26 mm), seguido por la concentración 900 mg/m (9.33 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm). el mayor diámetro de halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* corresponde a norfloxacino (21.4 mm), seguido por la concentración 900 mg/ml (10.42 mm), mientras que el blanco es constante (6.00 mm).

**GRAFICO 8.-PROMEDIOS DE DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS LIOFILIZADOS DE LAS HOJAS DE *ALTERNANTHERA HALIMIFOLIA* FRENTE A MICROORGANISMO EN ESTUDIO**

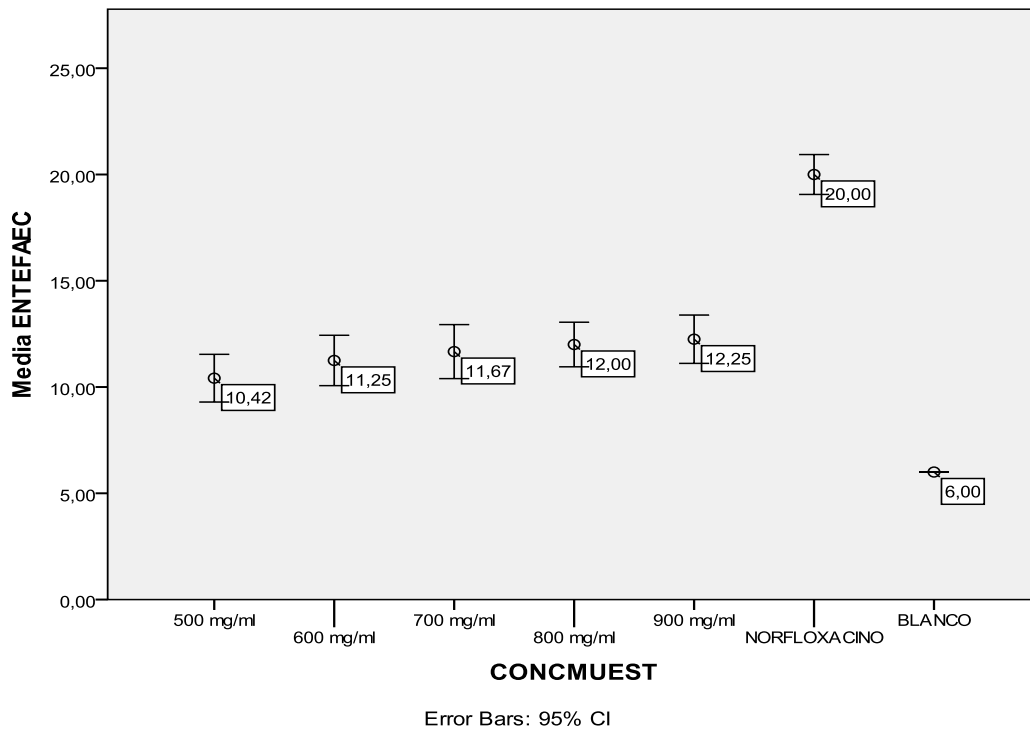


## COMPARACIONES MULTIPLES ENTRE LOS PROMEDIOS DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS HIROALCOHOLICOS EN LOS MICROORGANISMOS ENSAYADOS

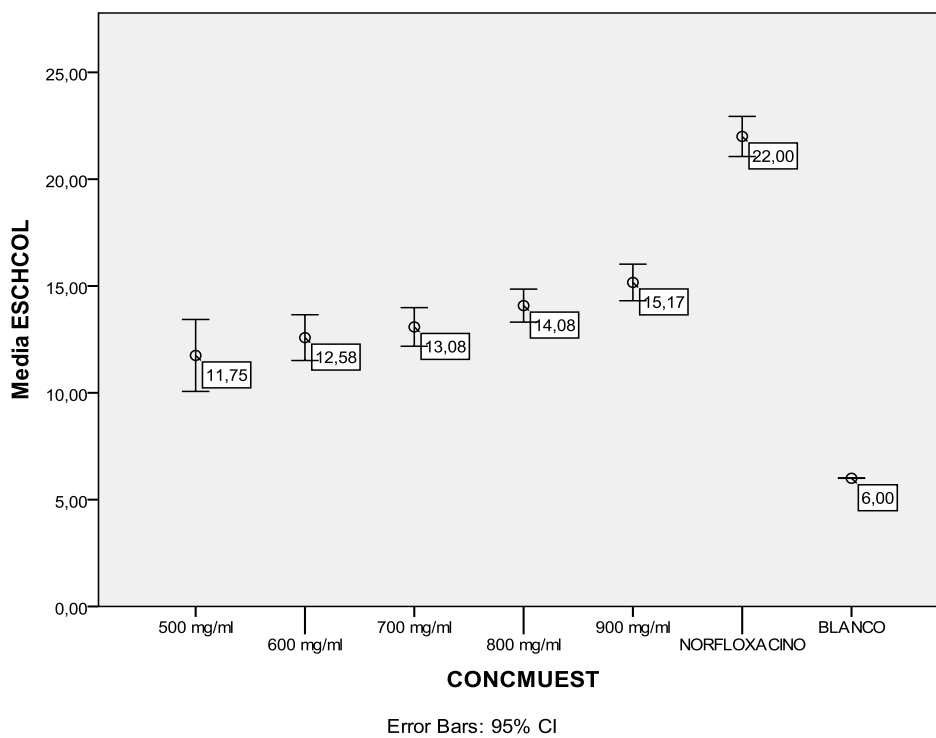
Las diferencias entre los pares de promedios de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Pseudelephantopus spiralis* a diferentes concentraciones se mostraron en el grafico 9, donde se detallaron a continuación por cada microorganismo:

- Con *E. faecalis* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre el norfloxacino frente a todas las concentraciones (500, 600, 700, 800 y 900 mg/ml) y el blanco. El blanco frente a las concentraciones y al norfloxacino a su vez todas las concentraciones frente al norfloxacino y blanco tuvieron diferencias significativas.(VEASE GRAFICO 9A)
- Con *E. coli* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre el norfloxacino frente a todas las concentraciones y el blanco. El blanco frente a todas las concentraciones y al norfloxacino a su vez la concentración de 500 mg/ml frente a la concentración de 800 mg/ml, 900 mg/ml, blanco y norfloxacino. De 900 mg/ml frente al norfloxacino y el blanco tuvieron diferencias significativas. (VEASE GRAFICO 9B)
- Con *P. aeruginosa* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre el norfloxacino frente a todas las concentraciones y el blanco; del blanco frente al a todas las concentraciones y norfloxacino; de 500 mg/ml frente a 700 mg/ml, 800 mg/ml, 900 mg/ml, blanco y el norfloxacino; de 900 mg/ml frente a 500 mg/ml, norfloxacino y blanco. (VEASE GRAFICO 9C)
- Con *S. aureus* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre el norfloxacino frente a todas las concentraciones y el blanco; del blanco frente a todas las concentraciones y norfloxacino; de 500 mg/ml frente a 700, 800, 900 mg/ml, blanco y el norfloxacino; de 900mg/ml frente a 500, 600mg/ml, norfloxacino y blanco. (VEASE GRAFICO 9D)

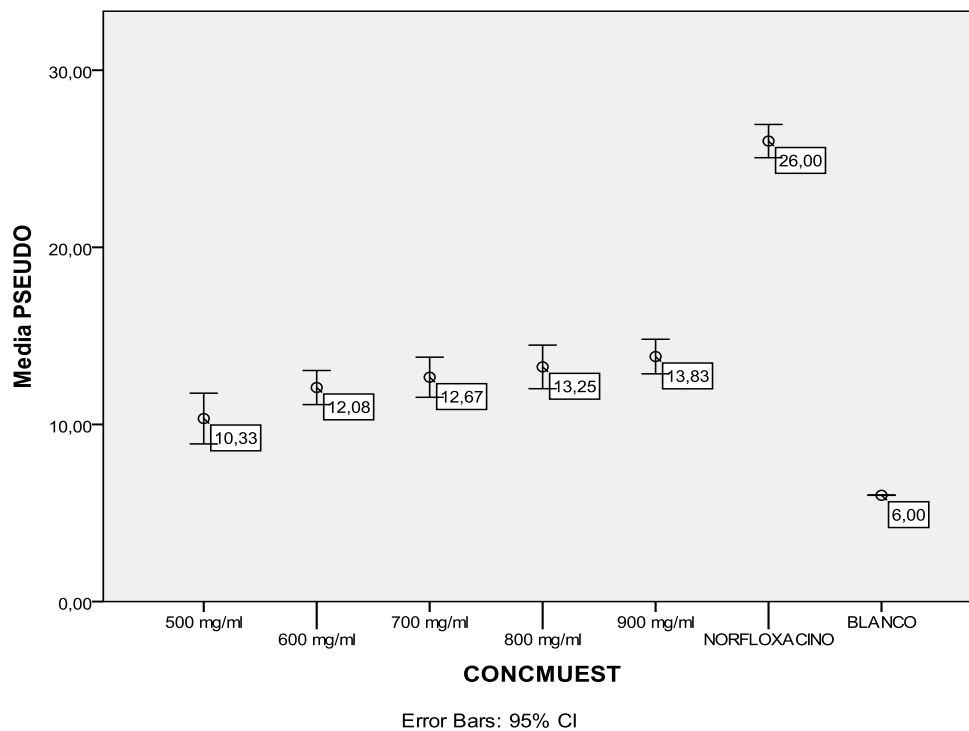
**GRAFICO 9A.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis*, norfloxacino y blanco frete a



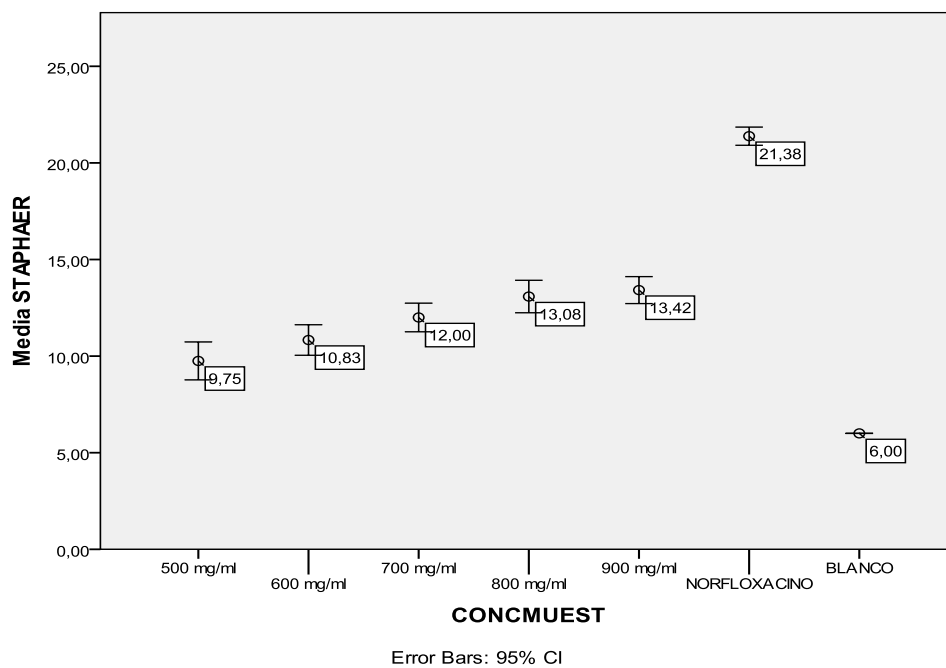
**GRAFICO 9B.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis*, norfloxacino y blanco frete a *E. coli*



**GRAFICO 9C.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis*, norfloxacino y blanco frete a *P. aeruginosa*



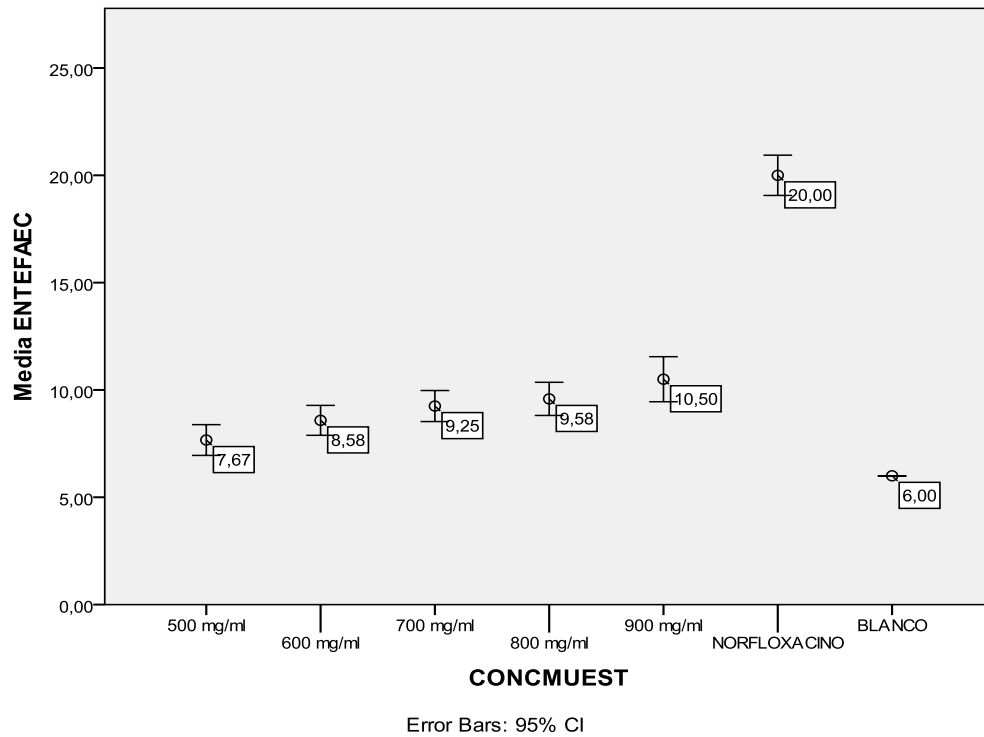
**GRAFICO 9D.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis*, norfloxacino y blanco frete a *S. aureus*



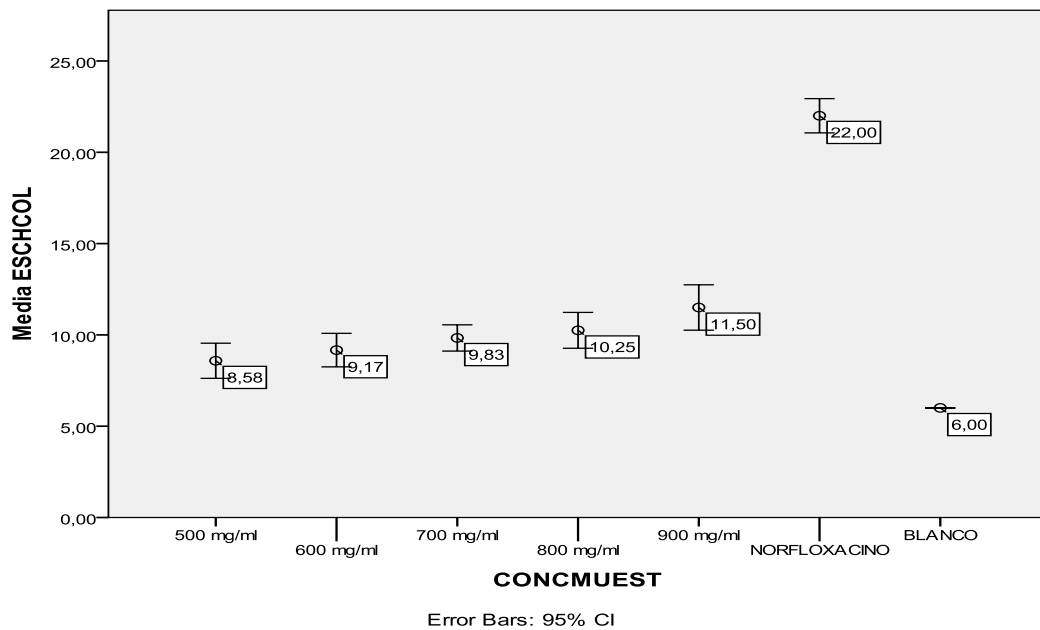
Las diferencias entre los pares de promedios de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Alternanthera halimifolia* a diferentes concentraciones se muestra en el grafico 10, donde se detallaron a continuación por cada microorganismo:

- Con *E. faecalis* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre el norfloxacino frente a todas las concentraciones; del blanco frente a todas las concentraciones y el norfloxacino; de 500 mg/ml frente a las concentraciones de 800 mg/ml, 900 mg/ml, blanco y el norfloxacino; de 900 mg/ml frente a 500 mg/ml, 600 mg/ml, norfloxacino y el blanco. (VEASE GRAFICO 10A)
- Con *E. coli* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre el norfloxacino frente a todas las concentraciones y el blanco; del blanco frente a todas las concentraciones y norfloxacino; de 500 mg/ml frente a la concentración de 900 mg/ml, blanco y norfloxacino; de 900 mg/ml frente a 500 mg/ml, 600 mg/ml, norfloxacino y el blanco. (VEASE GRAFICO 10B)
- Con *P. aeruginosa* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre norfloxacino frente a todas las concentraciones y el blanco; del blanco frente a todas las concentraciones y norfloxacino; de 500 mg/ml frente a 800 mg/ml, 900 mg/ml, blanco y el norfloxacino; de 900 mg/ml frente a 500 mg/ml, 600 mg/ml, norfloxacino y blanco. (VEASE GRAFICO 10C)
- Con *S. aureus* presentaron actividad, sin embargo hubo diferencias significativas entre norfloxacino frente a todas las concentración y el blanco; del blanco frente a todas las concentraciones y norfloxacino; de 500 mg/ml frente a 900 mg/ml, blanco y el norfloxacino; de 900 mg/ml frente a 500 mg/ml, norfloxacino y blanco. (VEASE GRAFICO 10D)

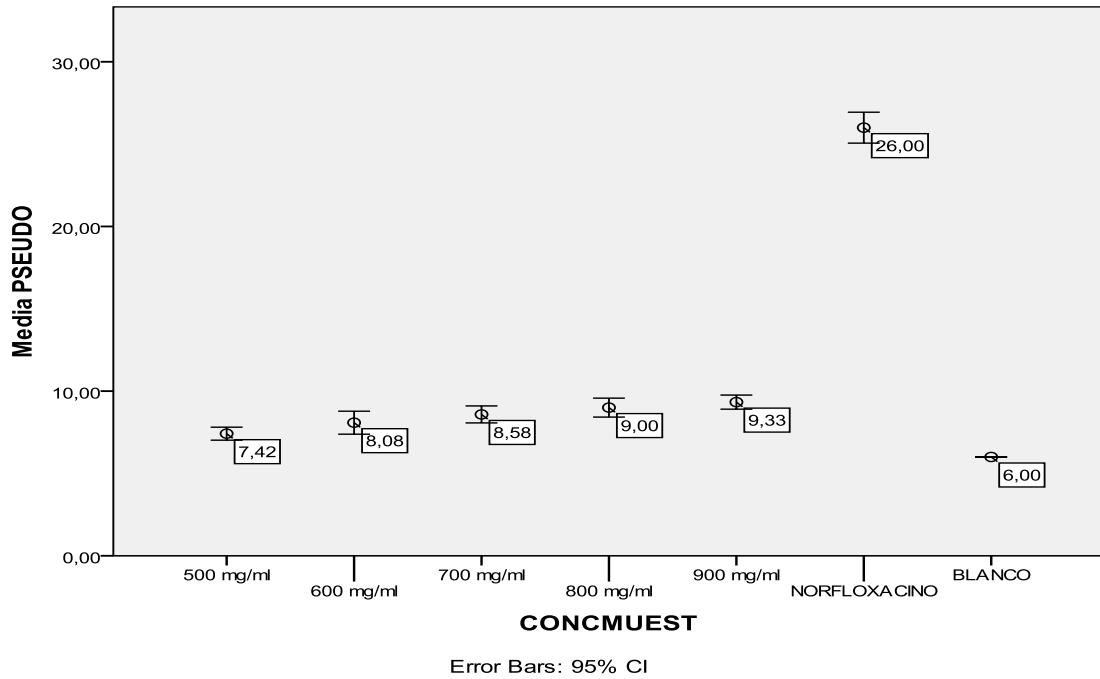
**GRAFICO 10A.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia*, norfloxacino y blanco frete a *E. faecalis*



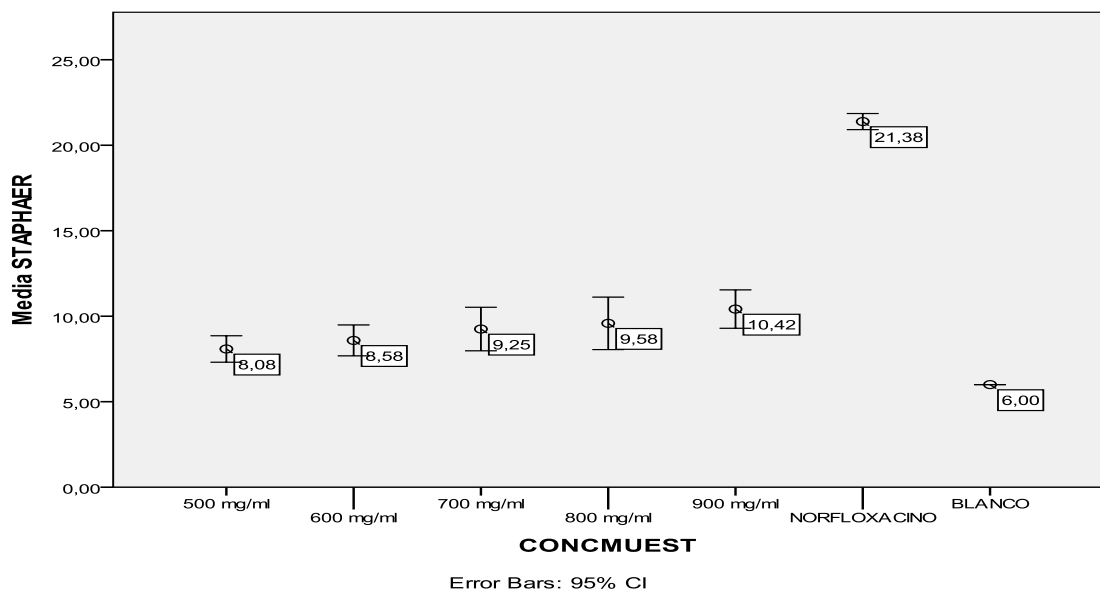
**GRAFICO 10B.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia*, norfloxacino y blanco frete a *E. coli*



**GRAFICO 10C.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia*, norfloxacino y blanco frete a *P. aeruginosa*



**GRAFICO 10D.-** Comparación múltiple del diámetro de inhibición de los extractos hidroalcohólicos de *Alternanthera halimifolia*, norfloxacino y blanco frete a *S. aureus*



#### 4.1 DISCUSIÓN

En lo referente a los resultados obtenidos de los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis* (*Chicoria*) presentaron moderada actividad frente a las cuatro cepas, mientras que en las hojas de *Alternanthera halimifolia* (*Ojo de pollo*) presentaron modera actividad contra *E. faecalis* y *E. coli*, poca actividad frente a *S. aureus* e inactivo frente a *P. aeruginosa*, siendo las ultimas concentraciones las que dieron más actividad antimicrobiano. Sin embargo al comparar nuestros extractos con el norfloxacino se observaron que existía diferencias estadísticas significativas ( $p < < 0.000$ ) entre sus actividades siendo el norfloxacino el que posee la mayor actividad de inhibir el crecimiento de los microorganismo ensayados, al inhibir la síntesis del DNA y como consecuencia se produce la interrupción de la síntesis del ácido teicoico. Por otro lado al observar las tablas 3 y 4 *Pseudelephantopus spiralis* tiene mejor clasificación antimicrobiana sobre todo para *Enterococcus faecalis*, *E. coli* que *Alternanthera halimifolia*.

Además podemos indicar que los diámetros de inhibición, CIM y CBM fue mejor para *Pseudelephantopus spiralis* que *Alternanthera halimifolia* la razón estaría dada por la mayor presencia de flavonoides, fenoles, taninos y glicosidos ya que según Cowan (1999), estos y otros compuestos como las quininas, terpenos, alcaloides y aceites esenciales son responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas, interfiriendo en la síntesis de la pared celular.

Sin embargo la actividad antimicrobiana obtenida por los extractos hidroalcohólicos de *Pseudelephantopus spiralis* contra *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Alternanthera halimifolia* frente a *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, no superaron la actividad del norfloxacino 10 ug (grafico 1 ,2 y tabla 1 y 2), donde se observaron las significancias de las comparaciones de los diámetros de inhibición de los extractos hidroalcohólicos en el cual se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < < 0.000$ ) entre los diámetros del norfloxacino y las concentraciones de los extractos.

Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos del extracto hidroalcohólicos de ***Pseudelephantopus spiralis*** tuvieron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos ensayados lo que nos confirma el estudio hecho por RAGAZA en el año 2001, que nos dice que el género ***Pseudelephantopus*** tiene actividad antimicrobiana frente a ***E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus***, mientras que en el extracto hidroalcohólico de ***Alternanthera halimifolia*** tuvo mayor actividad frente ***E. faecalis* y *E. coli*** lo que contradice el estudio hecho por CANALES, PEREIRA y NAGESWAR que dice que este género tuvo actividad frente ***S. aureus* y *P. aeruginosa***. Esto tal vez se debió a la preparación de la muestra ya que en este ensayo se utilizaron alcohol al 70% por el método de maceración, mientras que los demás utilizaron agua por el método de cocción.

La actividad antimicrobiana presentada por ***Pseudelephantopus spiralis*** y ***Alternanthera halimifolia*** se debería a la presencia de flavonoides según los trabajos de PERERA et al (2006); ERAZO, S (2006). AVILA et al (2006), NAGESWAR et al (2009). La poca actividad frente a ***S. aureus*** e inactivo frente a ***P. aeruginosa*** de ***Alternanthera halimifolia*** en extracto hidroalcohólico puede deberse a la presencia de compuestos dentro de las hojas: alcaloides, esteroides, cumarinas, glicosidos, hidróxido benzoico, saponinas; BRAKO et al (1993). Por lo que es necesario evaluar la actividad antimicrobiana, analgésica en otros solventes como metanólico y clorofórmico debido a que una planta puede contener centenares de metabolitos secundarios de diferente polaridad y que su concentración aumentaría al extraerlos con otros solventes.

## 4.2 CONCLUSIÓN

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

El extracto hidroalcohólico liofilizado de *Pseudelephantopus spiralis* Todas las concentraciones presentaron moderada actividad frente a *E. faecalis* y *E. coli*; 900 mg/ml había presentado moderada actividad frente a *P. aeruginosa*; 700, 800 y 900 mg/ml presentaron modera actividad frente a *S. aureus*.

En extractos hidroalcohólicos liofilizados de *Alternanthera halimifolia* solo a concentración de 900 mg/ml había presentado moderada actividad frente a *E. faecalis* y *E. coli*.

En la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Pseudelephantopus spiralis*, frente a *E. faecalis* fue moderado activo (4mg/ml).

En la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Alternanthera halimifolia*, frente a *E. faecalis* inactivo (26.66mg/ml), *E. coli* poco activo (13.3mg/ml), *P. aeruginosa* inactivo (53.3mg/ml) y *S. aureus* inactivo (21.3mg/ml).

En la determinación de las concentraciones bactericidas mínimas del extracto alcohólico liofilizado de *Pseudelephantopus spiralis*, se clasificaron entre presentaron y no presentaron actividad frente a *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En el *E. faecalis* presentaron actividad (106.67), *E. coli* presentaron actividad (213.33mg/ml), *P. aeruginosa* presentaron actividad (213.33mg/ml) y *S. aureus* presentaron actividad (170.67mg/ml).

#### 4.3 RECOMENDACIONES

- Continuar el trabajo de investigación, en la parte fitoquímica con las muestras que posean actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos en especial de *Pseudelephantopus spiralis*, por poseer mayor actividad, hasta obtener el metabolito responsable de la actividad.
- Continuar la investigación con el extracto de *Alternanthera halimifolia*, utilizando otros métodos de extracción.
- Desarrollar estudios toxicológicos de *Pseudelephantopus spiralis*, *Alternanthera halimifolia*
- Realizar trabajos de investigación similares, principalmente en el campo etnobotánico con otras plantas de nuestra región, en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos en general.

#### 4.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Additional file 1, plants used in herbal mixtures (numbers refer to mixture dendrogram see additional file 3)  
<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1746-4269-6-10-S1.PDF>
2. AGAPITO F., SUNG I. 2002. Fitomedicina, 1100 plantas medicinales, tomo II, Editorial Isabel IRL. Lima-Perú. 373 pp.
3. AMBASHT R., AMBASHT N. 2002. Modern trends in applied terrestrial ecology. Spring Street New York. NY 10013. 351 pp.
4. ARANCIBIA L., NASPI C., PUCCI G., ARCE M. 2010. Aromatic plants from Patagonia: chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Senecio mustersi* and *S. subpanduratus*. *Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia Sur, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 9 (2), 123-126 pp.
5. ARICAPA BARRERA, DIANA. 2009. Actividad Antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. 86 pp.
6. ÁVILA, L.; BAQUERO, E.; VIÑA, A.; MURILLO, E. 2006. Actividad antibacteriana de *Diplostegium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae*, Vol. 13, Núm. 1, Universidad de Antioquia, Colombia. 55-60 pp.
7. BLAIR S. 2005. Plantas antimalaria de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana, Editorial Universidad de Antioquia, 1ra edición, 77-79 pp.
8. BRAKO L. ZORUCHI J. 1993. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. (Catalogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú). Missouri Botanical Garden. Volumen 45. Editorial Assistant Diana Gunter. 167 pp.
9. BUTTERFIELD D. *et. Al.*, 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nut Biochem*. 444-61 pp.
10. BUSSMANN, R., GLENN A., SHARON D., CHAIT G., DÍAZ D., POURMAND K., JONAT B., SOMOGY S., GUARDADO G., AGUIRRE C., CHAN R.,

- MEYER K., ROTHROCK A., TOWNESMITH A. 2011. Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. 72 pp.
11. CANALES M.; HERNÁNDEZ T., FLORES C.; DÍAZ A.; GARCÍA A; AVILA G. 2005. Antimicrobial Activity of *Alternanthera caracasana*. Biología Farmacéutica Volumen 43, Número 4, 305-307 pp.
  12. D'ARGENIO, D., GALLAGHER L., BERG C., MANOIL C. 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* 183:1466-1471
  13. DELAPORTE R., MILANEZE-GUTIERRE M., MELLO J., JACOMASSI E. 2002 Estudio farmacognóstico das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae) Servicio de Difusion de la Creacion Intelectual UNLP. <http://bdu.siu.edu.ar/cgi-bin/query.pl?expression=Amaranthaceae&criteria=subject>.
  14. DELGADO H. 1999. Inventarios de recursos en centros de expendios formales e informales de Puerto Maldonado. *Apuntes de medicina tradicional* N° 88. 15 pp.
  15. DELGADO H. 1989. Inventarios de recursos en centros de expendio formales e informales de Huánuco. *Apuntes de medicina tradicional* N° 76. 16 pp.
  16. DELGADO H. 1990. Inventarios de recursos en centros de expendio formales e informales de Piura. *Apuntes de medicina tradicional* N° 79. 23 pp.
  17. DELGADO H. 1999. Inventarios de recursos en centros de expendio formales e informales de Ucayali. *Apuntes de medicina tradicional* N° 89. 14 pp.
  18. DEUSCHLE, R., CAMARGO, T., FRANCESCATO, L., ALVES, S., EINZMANN, B. 2006, Antimicrobial Activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Faixa de Camobi, Km 9, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS – Brazil, *Acta Farm. Bonaerense* 25(3): 356-9 (2006)
  19. DIEKEMA D. 1999. *Clin Infect Dis*;29: 595 pp.

20. DUKE:, J. A. 1961, Amaranthaceae. In Flora of Panama. Ann. Missouri Bot. Gard. 48:6-50. Part. 4. fasc. 4
21. ERAZO, S. 2006. Actividades biológicas de *xenophyllum poposum* phil. (Asteraceae) planta del altiplano chileno. Facultad de ciencias químicas y farmaceuticas, universidad de chile. Revista de fitoterapia 2006; 6 (2): 165-166. pp
22. FINE M., Smith M., Carson C., Mutha S., Sankey S., Weissfeld L., Kapoor W. 1996. Prognosis and Outcomes of Patients With Community-Acquired Pneumonia. JAMA: 275: 134 pp
23. GASPARETTO A., LAPINSKI T., ZAMUDIO S., KHOURI S., ALVES L., MUNINE. SALVADOR M.2010. Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT).Diario de Fotoquímica y Fotobiología B: Biología. Volumen 99, Número 1,15-20 pp
24. GUERRA G. 2006. Pueblo continente. Revista Oficial de la Universidad Antenor Orrego. Volumen 17 N° 2. 247pp.
25. HARDMAN, J; LIMBIRD, L.: MOLINOFF, P: RUDDON y COLI, A. 1996. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. Novena Edición. Editorial Mc Graw Gill. Interamericana. Editores. SA De C.V México 1095-1190 pp.
26. IGLEWSKI B. 1996. *Pseudomonas*. In: *Baron's Medical Microbiology 4th ed. edición. Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.*
27. INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD. 2005. Manual de plantas de costa rica.  
<http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=6535&-Find>
28. INSTITUTO DE MEDICINA TRADICIONAL. IMET. EsSalud. 1999. Plantas Medicinales del Jardín Botánico. 2 da. Edición. 38 pp.
29. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de normas técnicas 30. Ministerio de Salud. 16-20 pp.
30. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2007. Reporte de las principales enfermedades infecciosas en el Perú. Lima. INS. 15 pp.

31. JALALPURE S., AGRAWAL N., PATIL M., CHIMKODE R., ASHISH T. 2008. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* Linn Green Pharm volumen 2 3<sup>era</sup> edicion 141-144 pp.
32. KING E., WARD M., RANEY D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44** (2): 301-7 pp.
33. KONEMANE., ALLEN S., JANDA W., SCHRECKENBERGER P., WINN W. 2001. Diagnostico microbiológico. 5<sup>ta</sup> edición. Editorial Medsi. Rio de Janeiro – Brasil. 796-809 pp
34. LACIAR, A., VACA, M., CARRIZO, R., SAAD, J. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae) Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. 5700 San Luis. Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 41: 226-231pp.
35. LIOGIER A. 1985. Descriptive flora of Puerto Rico and adjacent island: Acanthaceae to Compositae. La Editorial UPR. 342 pp.
36. MAHAJAN-MIKLOS, S., TAN M., RAHME L., AUSUBEL F. 1999. *Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans pathogenesis model*. *Cell* 96:47-56 pp
37. MALDONADO F., LLANOS F., ZAVALAGA J. 2002. Uso y prescripción de medicamentos antimicrobianos en el hospital apoyo de la merced. *Revista peruana medica*. Lima-Perú. Vol. 19 181-185 pp.
38. MARCEN LETOSA, JUAN. 2000. Antimicrobianos naturales. *Medicina Naturista* N° 2. 104-108 pp
39. MARTINEZ C., PONS E., PRATS G., LEON J. 2004. *Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development*. *Plant J*. 37:209-217 pp.
40. MATSEN J. 1988. Determinaciones y ensayos de sensibilidad bacteriana. Diagnostico y tratamiento clínico por el laboratorio 3era edición. Barcelona. Edit Salvat: 1800
41. MEDLINEPLUS - Enciclopedia Médica: Foliculitis de la tina.  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001460.htm>

42. MIYATA, S., CASEY M., FRANK D., AUSUBEL F., DRENKARD E., 2003, *Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis.*Infect. Immun. 71:2404-2413 pp.
43. MORI T., REATEGUI, R. 2010. Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* “camu camu” y *Cyperus luzulae* “piripiri” sobre microorganismos patógenos. Distrito de Jenaro Herrera Loreto – Perú. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos -Perú. 169 pp.
44. MOSTACERO L. J., MEJIA C. F., GAMARRA T. O. 2002, Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú, volumen I, Editorial Normas Legales, Edición 2002 – Perú. 147 pp.
45. NAGESWAR J., SADANANDAM M. 2009. Antimicrobial studies and evaluation of herbal formulation of *alternanthera sessilis*. El Farmacéutico Indio vol. 8, N° 83, 70-74 pp.
46. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD. 2005. Manual de Bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. 11-12 pp.
47. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A. PFALLER, MICROBIOLOGIA MEDICA, Editorial El Sevier Mosby, Sexta Edicion, 180, 194 Pp
48. PEREIRA D.; SANTOS M.; POZZATTI P.; ALVES S.; CAMPOS M; ATHAYDE M.2007. Antimicrobial activity of a crude extract and fractions from *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze leaves. Servicio de Difusion de la Creacion Intelectual UNLP  
[http://bdu.siu.edu.ar/cgi-bin/query.pl?expression=Amaranthaceae&criteria=subject:](http://bdu.siu.edu.ar/cgi-bin/query.pl?expression=Amaranthaceae&criteria=subject)
49. PERERA, W., GONZÁLEZ, L., PAYO A. 2006. Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*, Productos naturales, Instituto de Ecología y Sistemática, Rev Cubana Farm ;40(2)
50. PRITHIVIRAJ B., BAIS H., WEIR T., SURESH B., NAJARRO E., DAYAKAR B., SCHWEIZER H., VIVANCO J. 2005. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* **73** (9): 5319-28 pp.

51. QUIJANO, C., VANEGAS, C., QUEVEDO, J., GARCÍA, L., GAVIRIA, M., PINO, J. 2009. Composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial en hojas de *Galinsoga parviflora* Cav. de Colombia. XXIX Congreso Latinoamericano de Química. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana, Cuba. 86 pp
52. RAGASA C., RIDEOUT J. 2001. Antifungal Cadinanolide from *Pseudoelephantopus spicatus*. Chemical Pharmaceutical Bulletin. Vol. 49, N° 10 1359.
53. RAGASA C., RIDEOUT J. 2002. Antifungal Cadinanolide from *Pseudoelephantopus spicatus*. ChemInform Abstract. Volume 33, Issue 12.
54. RAHME, L., STEVENS E., WOLFORT S., SHAO J., TOMPKINS R., AUSUBEL F. 1995. *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*. Science 268:1899-1902 pp
55. RAHME L., TAN M., LE L., WONG S., TOMPKINS R., CALDERWOOD S., AUSUBEL F, 1997. *Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13245-13250 pp
56. RAHME, L. , AUSUBEL F., CAO H., DRENKARD E., GOUMNEROV B., LAU G., MAHAJAN-MIKLOS S., PLOTNIKOVA J., TAN M., TSONGALIS J., WALENDZIEWICZ C., TOMPKINS R., 2000, *Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8815-8821pp
57. REIS F., DONIZETE I., De SOUZA T., De MELLO N. 2009. Avaliação da atividade antimicrobiana da planta *Alternanthera brasiliana* coletada em Lavras – MG. UNIFENAS, Alfenas-MG. BRAZIL. 1 pp.
58. RIOS J., RECIO M., VILLAR A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity; A review of the literature. J ethnopharm 23: 127-129 pp.
59. ROGER Y. STANIER, JHON L. INGRAHAM, MARK L. WHEELIS, PAGE R. PAINTER, MICROBIOLOGIA, segunda edición, editorial neverte, 93 pp
60. ROTGER ANGLADA, Rafael 1997. Microbiología Sanitaria y Clínica, Editorial Síntesis España. 297-231 pp.

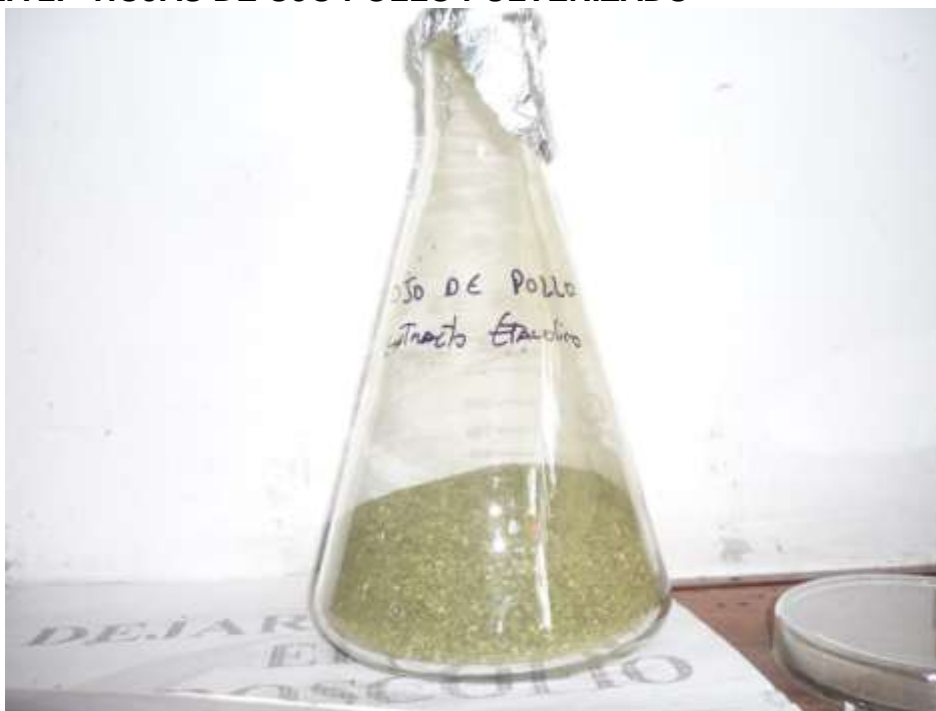
61. RYAN K.; RAY C. 2004. *Sherris Medical Microbiology* 4th ed. edicion. McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
62. SCHLEIFER K., KILPPER-BALZ R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 31–34. pp.
63. SHIVA RAMAYONI, CARLOS 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento.
64. SUMARI, L. ZUMBA, W. 2008. Evaluación de La actividad antimicrobiana in vitro de los extractos liofilizados de ocho ecotipos de *Bixa orellana* l. IMET-ESSALUD. 157 pp.
65. THAIZ, A. ROMERO, B. 1975, *Agronomía Tropical*, Los géneros Venezolanos de las Amaranthaceae,
66. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*  
<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
67. *Tropical American, botany and consevation at kew, preliminary checklist of the compositae Bolivia.*  
[www.kew.org/science/tropamerica/boliviacompositae/genera/Elephantopus.htm](http://www.kew.org/science/tropamerica/boliviacompositae/genera/Elephantopus.htm)
68. VARGAS, W. 2002. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales, 161 pp.
69. VILLAR, L., VILLAVICENCIO O. 2001. Manual de Fitoterapia. Organización panamericana de la salud. EsSalud-Lima. 7-8 pp.
70. WALKER T., BAIS H., DÉZIEL E., SCHWEIZER H., RAHME L., Fall R., VIVANCO J. 2004. *Pseudomonas aeruginosa- Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation.* *Plant Physiology* 134:320-331 pp.
71. WIGGINS L., PORTER D., ANDERSON E. 1971. *Flora of the Galapagos Island.* Stanford University Press. 352 pp.

#### 4.5 ANEXOS

**FIGURA 1.- PESADO DE LAS HOJAS SECAS DEL OJO DE POLLO**



**FIGURA 2.- HOJAS DE OJO POLLO PULVERIZADO**



**FIGURA 3.- HOJAS DE CHICORIA PULVERIZADO**



**FIGURA 4.- LIOFILIZADO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS**



**FIGURA 5.- INOCULADO BACTERIANO**



**FIGURA 6.- ESTUFA**



**FIGURA 7.- SIEMBRA DE MICROORGANISMOS EN PLACAS**



**FIGURA 8.- MICROORGANISMOS REPLICADOS**



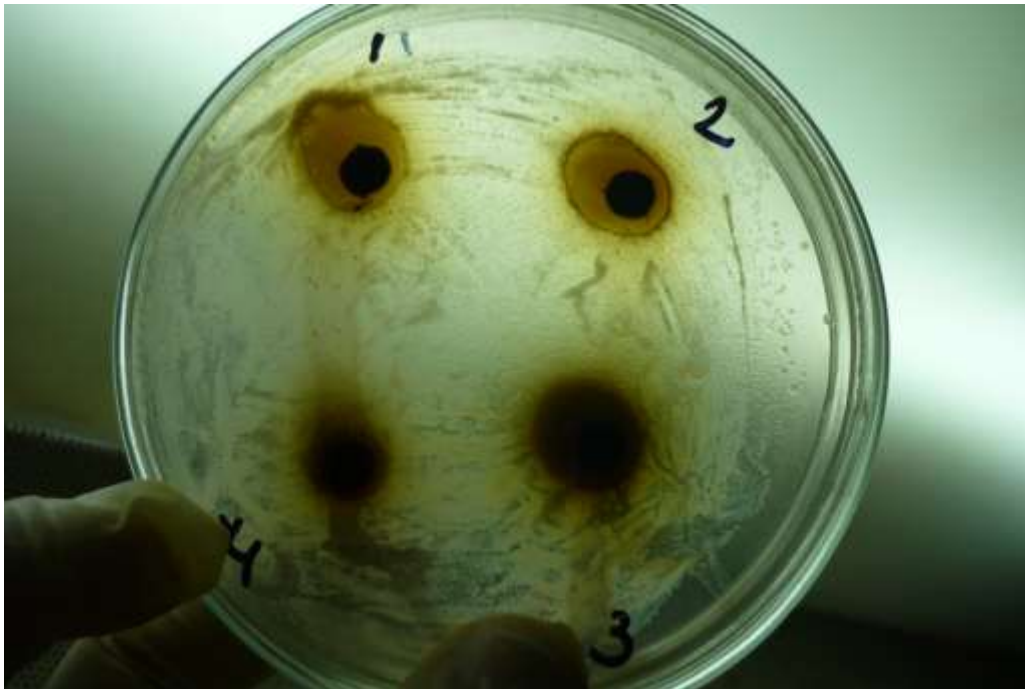
**FIGURA 9.- ANTIBIOGRAMA**



**FIGURA 10.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE OJO DE POLLO FRENTE A *Enterococcus faecalis***



**FIGURA 11.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE OJO DE POLLO FRENTE A *Escherichia coli***



**FIGURA 12.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE OJO DE POLLO FRENTE A *Pseudomona aeruginosa***

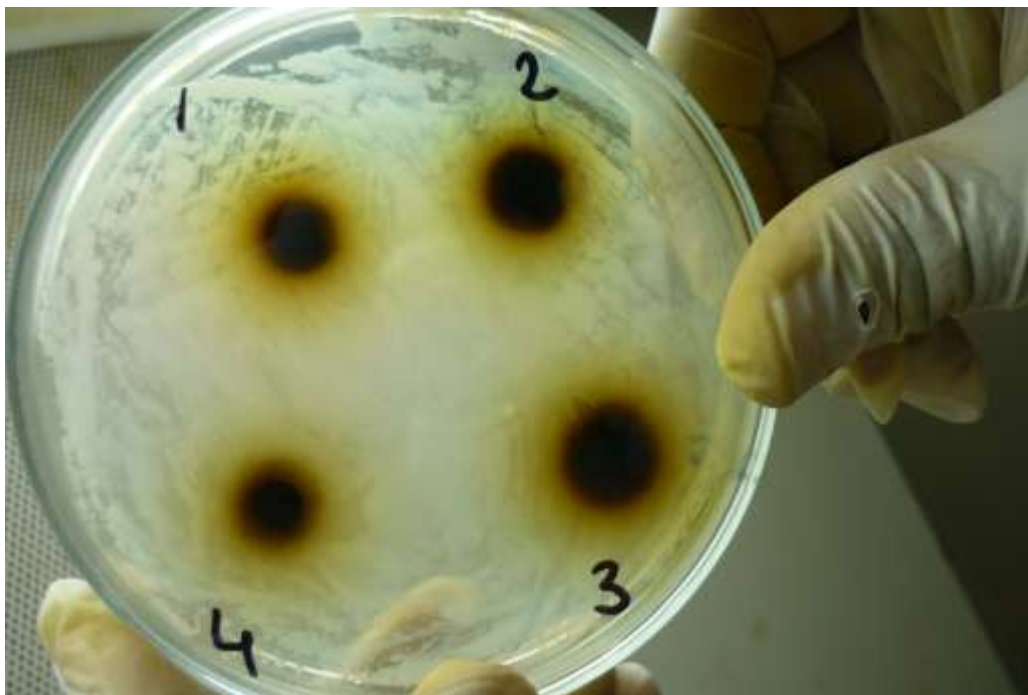


FIGURA 13.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE OJO DE POLLO FRENTE A *Pseudomona aeruginosa*

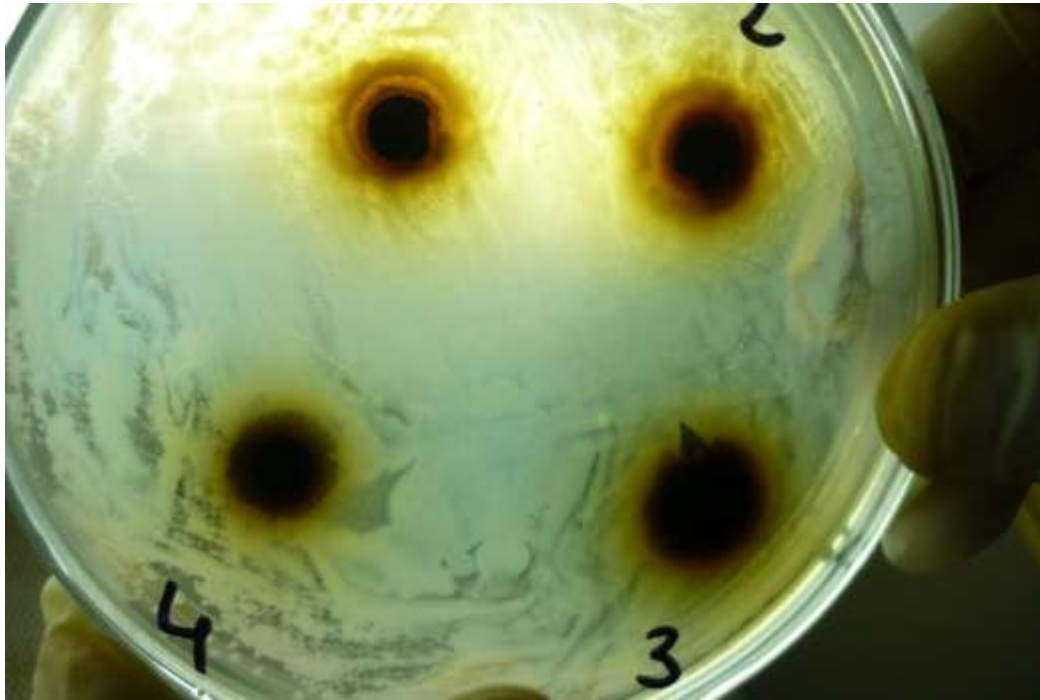
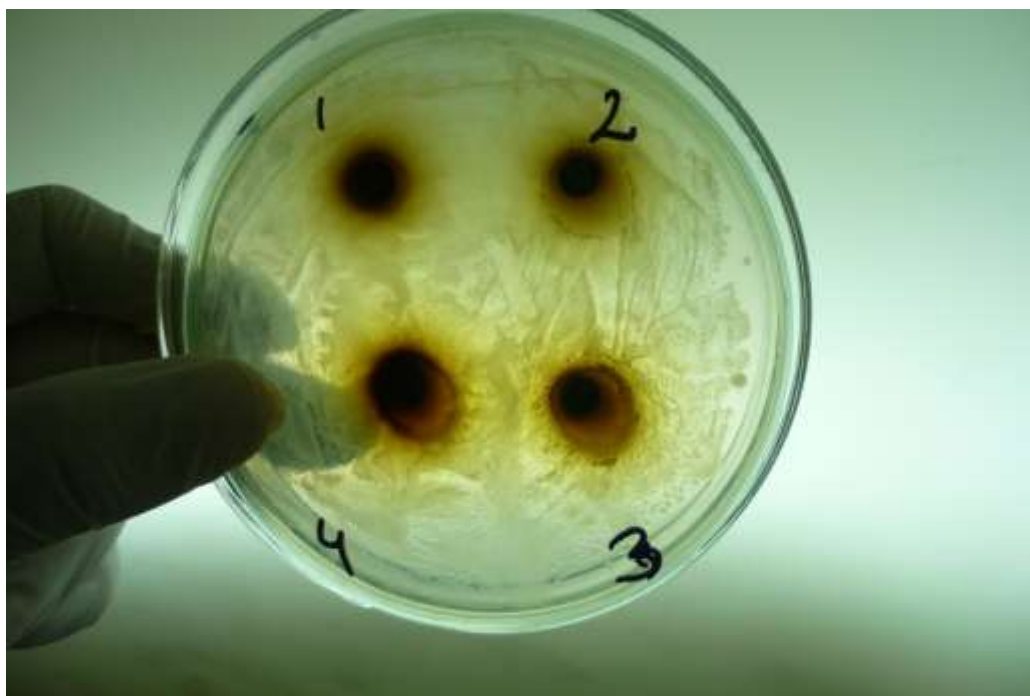
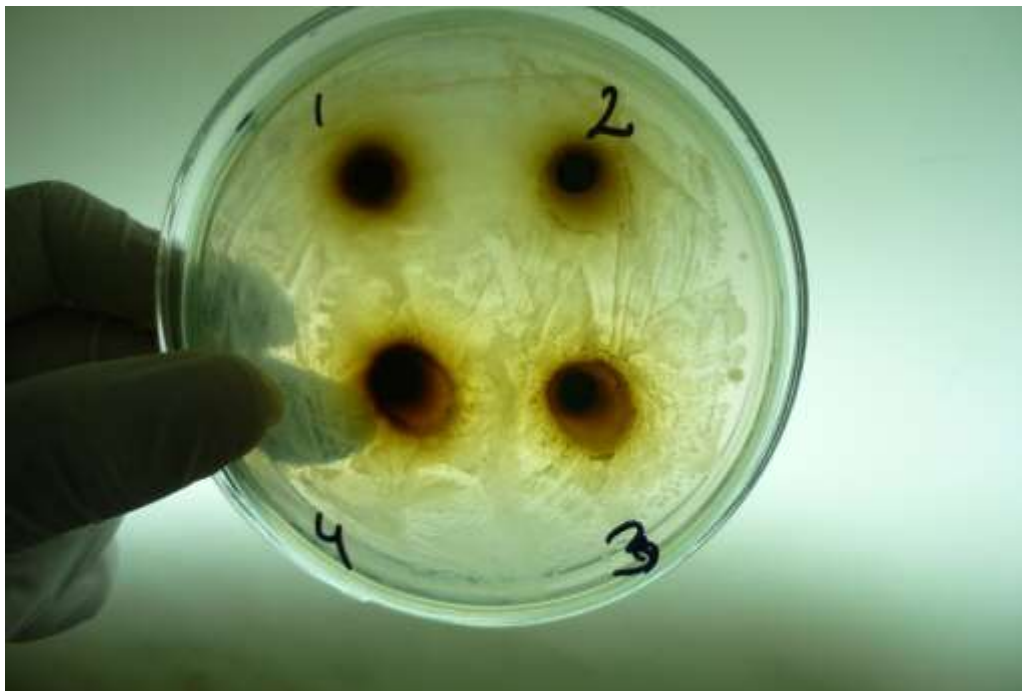


FIGURA 14.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE OJO DE POLLO FRENTE A *Staphylococcus aureus*



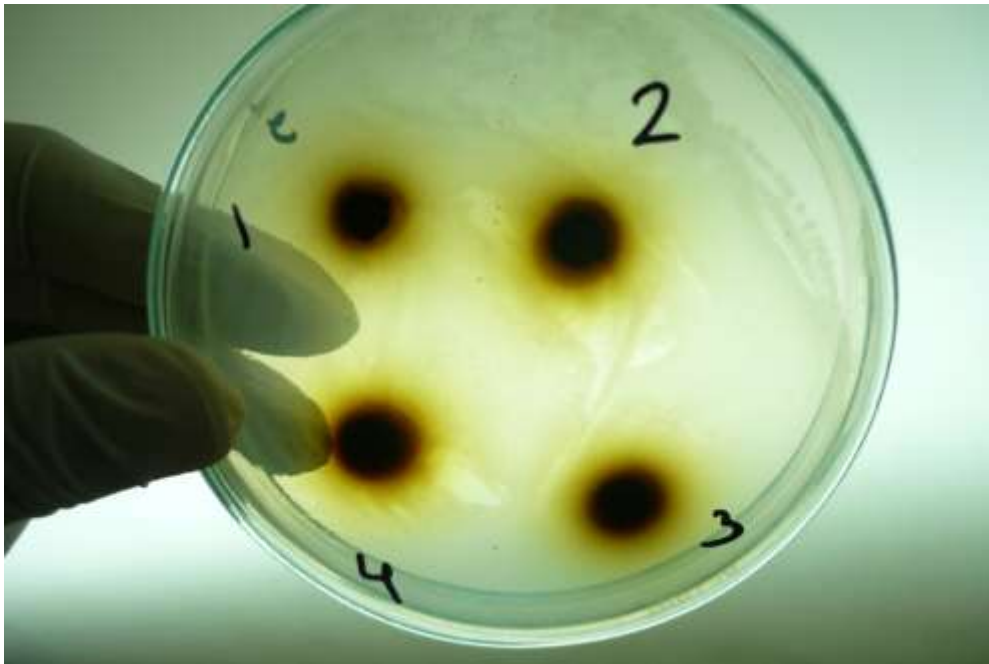
**FIGURA 15.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE CHICORIA FRENTE A *Enterococcus faecalis***



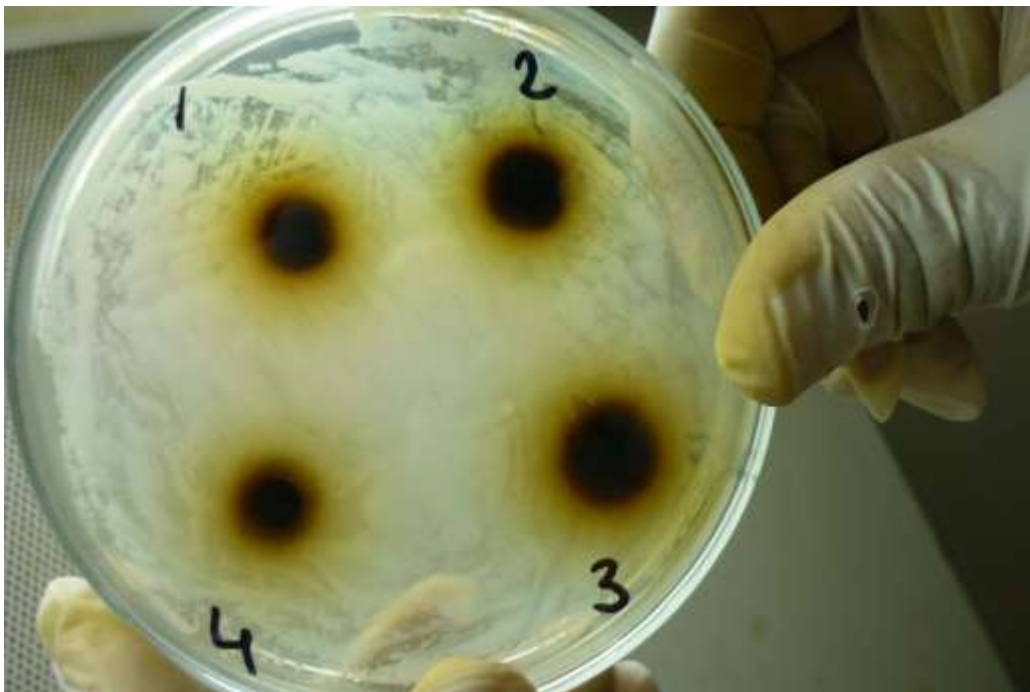
**FIGURA 16.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE CHICORIA FRENTE A *Escherichia coli***



**FIGURA 17.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE CHICORIA FRENTE A *Pseudomona aeruginosa***



**FIGURA 18.- HALOS DE INHIBICION POR EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE CHICORIA FRENTE A *Staphylococcus aureus***



## **PROTOCOLO DE ESTUDIO**

### **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PLANTAS MEDICINALES**

#### **1. Introducción**

Los recursos en plantas con propiedades curativas son inmensos, mejor conocimiento y un mejor de ellas y sus propiedades farmacológicas. Podrían permitir una nueva política en salud.

Hacia finales de los años 50, las determinaciones de susceptibilidad a los antimicrobianos eran un caos. Debido a que no existía un procedimiento estandarizado aceptable- La organización mundial de la salud conformó un comité cuyas deliberaciones proporcionaron los principales fundamentos que condujeron al desarrollo de las técnicas estándares de Anderson primero y de Kirby- Bauer después.<sup>(58)</sup>

Las técnicas de difusión en disco aportan datos cualitativos o semicuantitativo acerca de la sensibilidad de un microorganismo particular a un antibiótico preciso.<sup>(25)</sup>

El de microdilucion es una técnica cuantitativa, muy utilizada actualmente la cual nos permite determinar la concentración mínima inhibitoria al igual que la concentración mínima bacteriana.

#### **2. Objetivo**

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de plantas medicinales.

#### **3. Generalidades**

Centro:

Dirección:

Área:

Fecha de elaboración:

#### **4. Sustancia de ensayo**

Nombre de la planta

Numero de herbario

Parte de la planta

Extracto

Tiempo y lugar de cosecha

Composición Fitoquímico

#### **5. Sistema experimental**

Microorganismo tipificado

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Materiales**

- Asa de inoculación
- Disco de sensibilidad de norfloxacino de 10 ug.
- Discos estériles de 6 mm de diámetro.
- Embudos de vidrio
- Espátula mediana.
- Guantes quirúrgicos N° 7 ½
- Gradillas para tubos de ensayo.
- Hisopos estériles.
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc
- Marcador de vidrio
- Mascarillas descartables.
- Micropipetas automáticas de 250, 500 y 1000 uL.
- Papel toalla
- Papel filtro Whatman N° 3
- Papel kraft.
- Pipetas 1 y 10 cc
- Placas petri de 10 cm.
- Placas petri de 4 cm.
- Tips descartables.
- Tijeras
- Tubos de ensayo estériles con tapa rosca.
- Vernier o regla graduada en mm.

### **6.2. Medios de cultivos y reactivos**

- Caldo tripticasa de soya
- Caldo nutritivo
- Agar tripticasa de soya
- Agar saboraud dextrosa
- Agar muller-hinton
- Agar mac conkey
- Agar cetrimide
- Agar bair packer
- Agar azida sódica
- Agar papa dextrosa
- Solución salina 0.9% estéril

- BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O al 1.175% p/v
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% v/v
- Disco de sensibilidad de amikacina 30 ug
- Disco de sensibilidad de ampicilina 10 ug
- Disco de sensibilidad de gentamicina 10 ug
- Disco de sensibilidad de griseofulvina
- Disco de sensibilidad de nistatina.
- Disco de sensibilidad de norfloxacino 10 ug
- Disco de sensibilidad de nitrofurantoina 300 ug
- Disco de sensibilidad de tetraciclina 30 ug
- Disco estériles de 6mm de diámetro.

### 6.3. Equipos

- Mechero de bunsen
- Estufa de cultivo a 35°C
- Refrigerador de 2-8°C
- Autoclave
- Cámara de reflujo laminar
- Balanza analítica

## 7. Metodologías<sup>(29)</sup>

### 7.1. Preparación del inóculo bacteriano y/o fúngico para las diversas pruebas

Se procederá a sembrar e incubar los microorganismos en las condiciones específicas para cada género siguiendo las pautas indicadas en la tabla.

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones incubación
Escherichia coli	Agar mac conckey	37°C/24 Horas
Enterococcus faecalis	Agar azida sódica	37°C/24 Horas
Pseudomona aeruginos	Agar cetrimide	37°C/24 Horas
Staphilococcus aereus	Agar bair packer	37°C/24 Horas
Candida albicans	Agar papa dextrosa	37°C/24 Horas

### 7.2. Método de crecimiento o de desarrollo previo.

- De las placas de cultivo específico para cada bacteria o hongo se seleccionará al menos 3 a 5 colonias aisladas de apariencia similar. Tocar la superficie de la colonia con un asa de siembra y transferir a un tubo de 5 ml de caldo apropiado, tal como el caldo soya tripticasa.
- Incubar el caldo a una temperatura de 35 a 37°C de 2 a 6 horas, hasta que alcance exceda la turbidez del estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente 1x10<sup>8</sup>UFC/ml.
- Ajustar la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente usar una luz apropiada, mira los tubos contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes.

### 7.3. Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas

- De una placa de cultivo con agar selectivo e incubada por 24h seleccionar colonias aisladas y preparar una suspensión directa en solución salina.
- La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0.5 de Mc.Farland.

#### **A. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA (método de difusión por agar en disco)**

##### **1. Extracto Bruto:**

- Preparar una solución a una concentración de X mg/ml del extracto a evaluar.
- Tomar 25 ul de la solución e impregnar los discos de papel filtro de 6mm de diámetro.
- Secar a -45°Cx 24 horas.

##### **2.- Extractos Fraccionados:**

- Preparar una solución de cada fracción a una concentración de Xmg/ml esta dilución se realizará como se detalla en el siguiente cuadro.

Fracciones	Solventes
Fracción hexánica (F000)	HEXANO
Fracción etanólica 95% (F001)	DMSO
Fracción etanólica 50% (F002)	DMSO
Fracción acuosa (F003)	H2O
Fracción diclorometano (F004)	DMSO
Fracción insoluble (F005)	DMSO
Fracción hexánica (F006)	HEXANO
Fracción metabólica 90% (F007)	DMSO

- Tomar 25 ul de la disolución e impregnar los discos de papel de 6mm de diámetro.
- Secar la fracción hexánica (F000 y F006) a temperatura ambiente, la fracción acuosa (F003) a 45°Cx24 horas y las demás fracciones a 45°Cx 48 horas.

##### **1. Preparación del agar Mueller-Hinton:**

- Preparar el medio de cultivo a partir de la base deshidratada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- En caso del medio de cultivo para las levaduras se agregará al medio de cultivo Mueller-Hinton, 2% de dextrosa y 0.5ug/ml de azul de metileno.
- Colocar 22ml del agar en tubos con tapa rosca, autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance 45°C-50°C.
- Verter el medio fresco y tibio en placas Petri de 100mm de diámetro de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4mm.

- Dejar enfriar a temperatura ambiente y a menos que las placas se usen ese mismo día, debe guardarse en refrigerador de 2°C-8°C.
- Realizar por cada lote de agar Mueller-Hinton la prueba de esterilidad, incubando 2 o 3 'placas de cada lote a 35°C-35°Cx24 horas. Luego descartar las placas.

## **2. Inoculación de las placas**

- Después de los 15 minutos de haber preparado el inoculado bacteriano y/o fúngico, y ajustado la turbidez del mismo, sumergir un hisopo esteril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inculo.
- Inocular la superficie seca de la placa Mueller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones. Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que se absorba el exceso de humedad.

\*Realizar la prueba por triplicado.

## **3. Aplicación de los discos**

- Colocar los discos con los antibióticos y la sustancia a diferentes concentraciones, sobre la superficie del agar en forma manual con la ayuda de una pinza estéril. Presionar ligeramente para asegurar el contacto uniforme, sin introducir el disco en el agar.
- Los discos deben ser colocados a una distancia de 2.5cm uno del otro y a 1.5cm del borde de la placa. Si las placas a utilizar son de 150mm, no deben ir más de 11 discos y en una de 10mm colocar 5 discos.
- Invertir las placas e incubar a 37°C para bacterias y 25°C para levaduras de 16 a 18 horas.

## **4. Control positivo**

- Se utilizarán los siguientes discos de antibióticos como controles:  
Bacterias: Gentamicina 10ug, Nitrofurantoina 300ug, Amikacina 30ug, Norfloxacin 10ug.  
Hongos y levaduras: Nistatina y Ketokonazol.

## **5. Lectura de las placas e interpretación de los resultados.**

- Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro completo), usando una regla o calibrador.
- Con esto se determina el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula.

**%INHIBICIÓN:**  $\frac{\text{Diámetro de la muestra}}{\text{Diámetro del control}} \times 100$

Diámetro del control

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos se evalúa el % de inhibición al 50% de todos los extractos en estudio.

## **B. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (Método de dilución en microplaca)**

Para la determinación de la CMI se utiliza placa de poli-estireno que contiene 96 celdillas (12x8). Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 celdillas (12x8), podemos estudiar con cada una de ellas, y para el mismo microorganismo 8 extractos brutos y/o fracciones y 10 diluciones (la penúltima y la última columna se utilizaran como control de crecimiento)

### **1. Preparación de las microplacas**

- Agregar 10ul del medio estéril TSB en los pocillos a utilizar.
- A la primera columna de pocillos se añade 100ul de los extractos o fracciones a una concentración de 2048ug/ml. De esta manera obtenemos la primera dilución que es de 1024ug/ml.
- De esta primera columna de pocillos, se traspasa 100ul de su contenido a la siguiente columna, y de esta a la siguiente. El proceso se repite hasta la columna 10, eliminado 100ul del contenido de la columna, con objetivo de mantener el volumen final de 100ul en cada pocillo. Si fuera necesario hacer mas diluciones, se puede usar la siguiente fila de pocillos, e ir bajando las concentraciones en base a 2.
- Las dos últimas columnas serán utilizadas como controles (pocillo: sin extracto; negativo: sin inóculo)

### **2. Inoculación:**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de turbidez del inóculo al 0.5 del estándar de MacFarland, mezclar la suspensión y diluir para que la concentración final en cada celdilla sea  $5 \times 10^4$  (UFC/pocillo).

Esto se realizara añadiendo 2.0ml de la suspensión a 38ml de agua (Dilución 1:20)

Con la micropipeta tomar 10ul de esta dilución y agregar en las celdillas. Inocular cuidadosamente la placa de CIM para evitar salpicar de una celdilla a otra.

Se ajusta y diluye el inóculo dentro de 15 minutos después de preparado se puede afectar la concentración de microorganismos y por consiguiente los resultados de la prueba.

Antes de incubar, para controlar que el inóculo final sea el correcto tomar 10ul del pocillo control positivo y se diluye en 10ml de suero fisiológico y de aquí se tomara 100ul y se siembran en 3 placas de TSA a 37°Cx24h, para comprobar el crecimiento. Este debe estar comprendido entre-70 UFC/Placa

### **3. Incubación**

- Colocar la micropipeta a 35°Cx16 a 20 horas-
- Para prevenir que los paneles se deshidraten durante la incubación colocar un sello plástico sobre la placa, o colocar la placa en una funda de plástica, o en otro tipo de recipiente.

#### **4. Lectura de las placas e interpretación de los resultados**

- Retirar la placa de CIM y placa de control de dureza de las incubadoras.
- Examinar la placa de control negativo utilizando luz reflejada y luego utilizando luz transmitida. Esta debe estar claro, sin turbidez.
- A veces la contaminación suele ser casi imperceptible. Si la placa de control de pureza se muestra contaminada, la prueba de CIM no puede ser interpretada y debe ser repetida.
- Revisar el crecimiento de la celdilla de control positivo. Se debe encontrar turbidez o un punto de crecimiento > 2mm lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de CIM.
- Leer el punto final de CIM como la concentración más baja del agente antimicrobiano que *inhibe completamente*, el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico

#### **C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA**

- Una vez leída la CMI se homogeniza el contenido de los pocillos (con agitador, micropipeta o manualmente) y se siembre 100ul. (todo el contenido) de los pocillos donde no hay crecimiento.
- Depositar 100ul de cada tubo sobre el medio de cultivo elegido y extender con un sembrador. De esta forma se diluye la concentración del antimicrobiano vehiculado, se neutraliza su efecto y se favorece el recuento.
- Recontar las colonias que han crecido, tras 24-48 horas de incubación, en las placas donde se sembró el inóculo original.
- Calcular qué número de colonias representa el 0.1%.

#### **Criterios de inclusión:**

- Cepas que reúnan las características microscópicas y bioquímicas del microorganismo.

#### **Criterio de exclusión:**

- Cepas que representen contaminantes.
- Cepas que no coincidan con el fenotipo del microorganismo.

#### **Variable dependiente**

- Diámetro del halo de inhibición (mm) que representan los productos a ensayar, el porcentaje de crecimiento y la contracción mínima inhibitoria.

#### **Variable independiente**

- Dosis de la sustancia de ensayo.

### **Resultados.**

Los resultados se presentaran en cuadros y gráficos. Los resultados obtenidos se evaluaran mediante t-students, análisis de varianza y se aplicara regresión lineal.

### **Cronograma de ejecución**

Revisión bibliográfica.  
Confección del protocolo.  
Ejecución del método.  
Entrega de resultados e informe.

### **Autores**

Confeccionado por: Área de farmacología experimental  
Revisado por:  
Modificado por:  
Aprobado por:

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EN EL INSTITUTO DE MEDICINA TRADICIONAL IMET-EsSALUD**

Extracto a Evaluar:

Género:

Especie:

Nombre Común:

Fecha de Procesamiento:

**1. ANTIBIOGRAMA**

Antibiótico:

Microorganismos ATCC	DZI (mm)			
	Placa N°01	Placa N°02	Placa N°03	X DZI AT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25912				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				

**DZI: Diámetro de la zona de inhibición.**

**ATB: Antibiótico**

**X DZI ATB: Porcentaje del diámetro de la zona de inhibición del antibiótico**

**2. CAPACIDAD ANTIMICROBIANA:**

Microorganismos ATCC	DZI (mm)		
	Placa N°01	Placa N°02	Placa N°03
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25912			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			

**DZI: Diámetro de la zona de inhibición.**



4. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (mg/ml)

<b>Cc. (mg/ml)</b>	<b><i>E. faecalis</i> ATCC 29212</b>	<b><i>E. coli</i> ATC 25912</b>	<b><i>P. auriginosa</i> ATCC 2785</b>	<b><i>S. aureus</i> ATCC 25923</b>

## GLOSARIO

1. BIOENSAYO.- es el uso de un organismo vivo como un agente de prueba para la presencia o concentración de un compuesto químico o un efecto ambiental.
2. DIFUSION.- diseminación de una sustancia por todo el organismo
3. DILUCION.- acto de diluir o diluirse
4. DISPERSAR.- diseminar, esparcir en desorden.
5. ENDOCARDITIS.- inflamación del endocardio.
6. EPITELIZAR.- convertir en epitelio
7. ERV:.- Enterococos resistente a vancomicina
8. FOTOSENSIBILIZAR.- sensibilizar una sustancia u organismo a la influencia de la luz
9. HEMATOGENO.- Que se origina en la sangre o se disemina por la circulación a través del torrente sanguíneo.
10. HIDRODESTILACION
11. HIPERTROFIA.- aumento excesivo del volumen de un órgano.
12. IATROGENICA.- dícese de toda alteración del estado del paciente producido por el medico
13. LASER DE DIODO.- El [diodoláser](#) es un dispositivo [semiconductor](#) similar a los [diodos LED](#) pero que bajo las condiciones adecuadas emite luz láser. A veces se los denomina *diodos láser de inyección*, o por sus siglas inglesas LD o ILD.
14. MULTIRRESISTENCIA.- fenómeno por el que algunas cepas bacterianas son resistentes a la mayoría de los antibióticos actuales. Generalmente, las cepas multirresistentes se transmiten en los hospitales y otros centros de salud.
15. MUESTREO ALEATORIO.- es una metodología de investigación según la cual se toman muestras al azar para después llegar a conclusiones en torno a las mismas.
16. NEFELOMETRO DE MC FARLAND.- instrumento para medir la turbidez de un fluido o para determinar la concentración y tamaño de las partículas en suspensión, por medio de la luz que difunden en un tubo.
17. NODO.- tumor duro y pequeño, que dificulta el juego de las articulaciones tendones o ligamentos.
18. PACT.- Efecto de la quimioterapia antimicrobiana Fotodinámica
19. PIELONEFRITIS.- La pielonefritis o infección urinaria alta es una infección del

riñón y de las vías urinarias.

20. PRUEBA DE TUKEY.- La prueba Tukey se usa en experimentos que implican un número elevado de comparaciones. Es de fácil cálculo puesto que se define un solo comparador, resultante del producto del error estándar de la media por el valor tabular en la tabla de Tukey usando como numerador el número de tratamientos y como denominador los grados de libertad del error.
21. QUORUM SENSING.- es un mecanismo de señalización por el cual las bacterias regulan cambios en su expresión genética en función de su densidad poblacional. Este hecho hace que las bacterias se asocien en comunidades en las que coordinan la expresión de determinados fenotipos que les confieren mayor resistencia y adaptabilidad al medio ambiente, como la expresión de factores de virulencia, y la maduración del biofilm, los cuales tienen un papel importante, entre otros, en el desarrollo de procesos infecciosos. En la actualidad muchas investigaciones se centran en la búsqueda de compuestos que puedan inhibir el quorum sensing (qsi) como blanco antipatogénico y no antibacteriano evitando uno de los problemas más preocupantes en la actualidad: el desarrollo de resistencia a los fármacos.
22. SAPROFITO.- dicese de los microbios que viven normalmente en el organismo humano, especialmente en el tubo digestivo, a expensas de las materias de putrefacción, los cuales pueden ser causa de algunas enfermedades, o dar ocasión a ellas.
23. TRAZAS.- plan, medio elegido para realizar un fin
24. VERNIER.- instrumento de medida, más exacto que la regla