

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Achyrocline alata* (Huirá huirá) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.”

Tesis presentada por las bachilleres:

Coaquira Choque, Marta Mariza

Quenaya Pauro, Vilma Elvira

Para optar el Título Profesional de:

Químico – Farmacéutico

Asesor:

Q.F. Torres Vela Fernando

AREQUIPA – PERÚ

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

A todos nuestros docentes que en transcurso de la carrera contribuyeron en nuestra formación académica, nos brindaron sus sabias palabras, enseñanzas y consejos.

A Dios por sostenernos y protegernos al estar con nosotras en todo momento de nuestras vidas y proyectos.

A nuestras familias por el apoyo constante e incondicional.

A nuestras amistades que nos brindaron sus palabras de apoyo y consejos en obstáculos que se presentaron en el transcurso de este proyecto.

Muchas gracias

Mariza y Vilma

DEDICATORIA

A mis padres Francisco y María por su amor y apoyo incondicional durante mis estudios

A Dios por guiar siempre mi camino, dándome la fuerza necesaria para seguir adelante y no caer cuando se me presentaban obstáculos.

Vilma Elvira.

A Dios por tantas dadivas inmerecidas en todas las etapas de mi vida, por dirigir cada uno de mis proyectos.

A mis amados padres Juan y Feliciano cuanto valor toman ahora todas sus palabras y sabios consejos, gracias por tanto amor, cariño, paciencia, no imaginan cuanto obra en mí.

Marta Mariza.

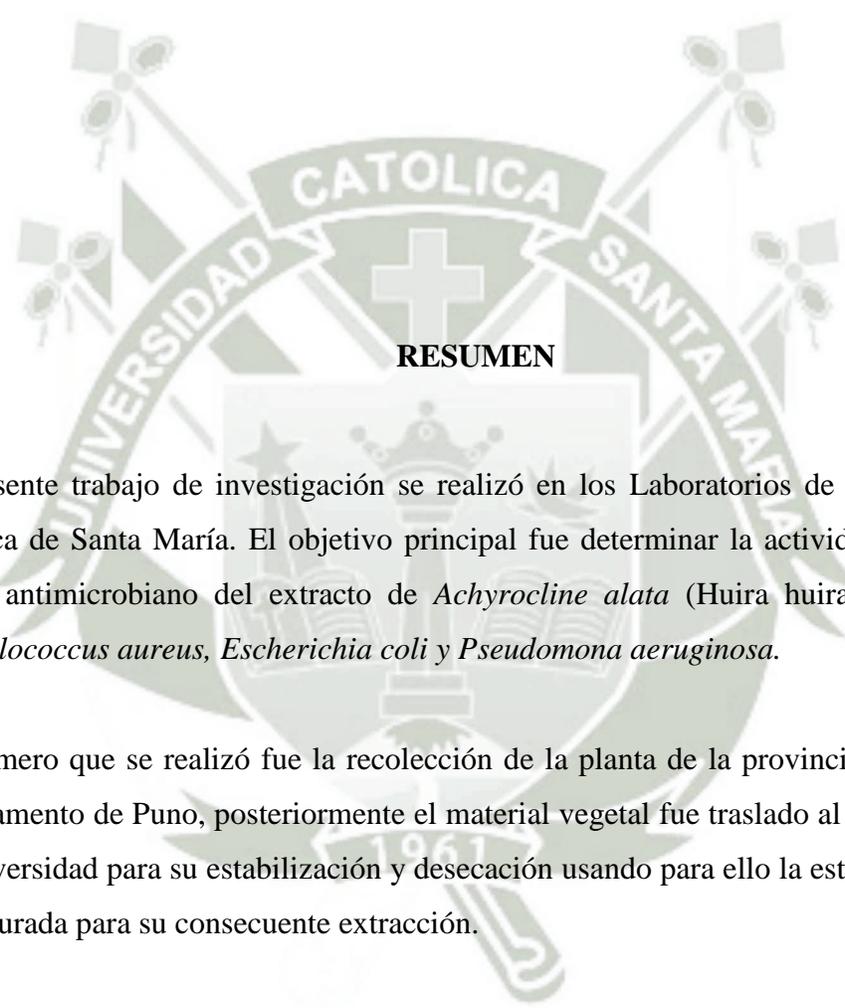
ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
INTRODUCCIÓN.....	V
HIPÓTESIS.....	VII
OBJETIVOS.....	VIII
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 <i>Achyrocline alata</i> (Huirá huirá).....	1
1.1.1 GENERALIDADES.....	1
1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	2
1.1.3 REVISIÓN TAXONÓMICA.....	3
1.1.4 DISTRIBUCIÓN.....	3
1.1.5 USOS.....	4
1.1.6 FITOQUÍMICA.....	5
1.2 DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO	
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.2.1.1 GENERALIDADES.....	5
1.2.1.2 PATOGENICIDAD.....	6
1.2.1.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	7
1.2.1.4 TRATAMIENTO.....	7
1.2.2 <i>Escherichia coli</i>	8
1.2.2.1 GENERALIDADES.....	8
1.2.2.2 PATOGENICIDAD.....	9
1.2.2.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	9
1.2.2.4 TRATAMIENTO.....	11
1.2.3 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	11
1.2.3.1 GENERALIDADES.....	11

1.2.3.2 PATOGENICIDAD.....	13
1.2.3.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	15
1.2.3.4 TRATAMIENTO.....	15
1.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	16
1.3.1 SOXHLET.....	16
1.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	16
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN.....	18
2.1.1 ÁMBITO GEOGRÁFICO.....	18
2.1.2 TIPO DE ESTUDIO.....	18
2.2 MATERIALES.....	19
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	19
2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	22
2.3.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	22
2.3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	24
2.3.3 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL EXTRACTO.....	26
2.3.4 MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CCF.....	27
2.3.5 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	27
2.3.6 PROCESAMIENTO DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO.....	29
2.3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS.....	38
2.3.7.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO HOYO - PLACA - CULTIVO.....	38
2.3.7.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	38
2.3.8 DETERMINACIÓN DE CIM.....	39
2.3.9 DETERMINACIÓN DE CBM.....	42
2.3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44

3.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	45
3.2 MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CCF.....	47
3.3 PROCESAMIENTO DE BACTERIAS EN ESTUDIO.....	51
3.4 DETERMINACIÓN Del EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE <i>Achyrocline alata</i> (Huiru huiru).....	57
3.4.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	57
3.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	61
CONCLUSIONES.....	66
SUGERENCIAS.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXOS.....	73





RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de la Universidad Católica de Santa María. El objetivo principal fue determinar la actividad in vitro del efecto antimicrobiano del extracto de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

Lo primero que se realizó fue la recolección de la planta de la provincia de Chucuito, departamento de Puno, posteriormente el material vegetal fue trasladado al Laboratorio de la Universidad para su estabilización y desecación usando para ello la estufa, finalmente fue triturada para su consecuente extracción.

Se procedió a realizar las extracciones empleando el método de Soxhlet, se usaron solventes de diferente polaridad: el etanol por ser polar, cloroformo medianamente polar y éter de petróleo por ser apolar, obteniendo en el extracto etanólico un rendimiento de 22.26% en promedio, cloroformo 8.62% y 4.59% para éter de petróleo respectivamente.

Para identificar componentes secundarios se efectuó mediante Cromatografía en capa fina (CCF), donde se demuestra la presencia de sustancias terpénicas, taninos y flavonoides, y la reacción para alcaloides fue negativa.

En la última etapa del estudio se valoró la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) evaluando la presencia de halos de inhibición mediante el método microbiológico hoyo- placa- cultivo. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de dilución en tubo, la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el método de siembra en agar, se utilizaron 10 cepas de cada especie las cuales procedieron del Hospital General Honorio Delgado Espinoza, que previamente fueron identificadas.

Finalmente, por el método de dilución en tubo, la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), frente a *Staphylococcus aureus* es de 78 mg/ml, no encontrándose actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Posteriormente se determinó la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se realizó el método de siembra en agar, donde se obtuvo la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a *Staphylococcus aureus* es de 88 mg/ml.

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto etanólico de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) muestra un mayor efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como es el caso de *Staphylococcus aureus*, en cuanto a bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* no presentan efecto antimicrobiano.

Palabras claves: *Achyrocline alata* (Huirá huirá), Soxhlet, actividad antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*

SUMMARY

The present research work was carried out in the Laboratories of the Catholic University of Santa María. The main objective was to determine the *in vitro* activity of the antimicrobial effect of *Achyrocline alata* extract (Huirá huirá) on strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The first thing that was done was the collection of the plant of the province of Chucuito, department of Puno, later the plant material was transferred to the Laboratory of the University for its stabilization and desiccation using the stove for it, finally it was crushed for its consequent extraction.

The extractions were carried out using the Soxhlet method, using solvents of different polarity: ethanol for being polar, chloroform medium polar and petroleum ether for being apolar, obtaining in the ethanolic extract a yield of 22.26% on average, chloroform 8.62% and 4.59% for petroleum ether respectively.

In order to identify secondary components, it was carried out by thin layer chromatography (TLC), where the presence of terpene, tannins and flavonoids was demonstrated, and the reaction for alkaloids was negative.

In the last stage of the study the *in vitro* antimicrobial activity of the extracts of *Achyrocline alata* (Huirá huirá) was evaluated, evaluating the presence of halos of inhibition by the microbiological method, plate-culture. The Minimum Inhibitory Concentration (CIM) by the tube dilution method, the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) by the agar seeding method, were used 10 strains of each species that came from the Hospital General Honorio Delgado Espinoza, which were previously identified.

Finally, by the tube dilution method, the Minimum Inhibitory Concentration (CIM) against *Staphylococcus aureus* is 78 mg / ml, with no antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa*. Subsequently, the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) was determined, the agar sowing method was performed, where the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) against *Staphylococcus aureus* was 88 mg / ml.

The results obtained show that the ethanolic extract of *Achyrocline alata* (Huiru huiru) shows a higher antimicrobial effect against Gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, as for Gram negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa* have no antimicrobial effect.

Key words: *Achyrocline alata* (Huiru huiru), Soxhlet, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*



INTRODUCCIÓN

El Perú, es un país que posee una amplia variedad de especies de flora y fauna que contribuyen a la gran diversidad biológica que enriquece nuestro territorio, y en relación a la flora, tenemos miles de especies botánicas, que pueden ser destinadas para usos distintos, siendo muchas de ellas empleadas en la alimentación, la industria, la farmacia y muchas otras son empleadas con fines medicinales. Una de las plantas conocidas por sus distintas propiedades medicinales es la *Achyrocline alata* (Huirá huirá), la misma que crece principalmente en las regiones andinas y que es utilizada por los pobladores de dichas zonas, quienes utilizan la planta de diferentes preparaciones como infusiones para el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias (gripes, tos, resfríos, bronquitis, neumonías) infecciones gastrointestinales y heridas de la piel infectada en asociación con otras plantas. Al respecto se debe señalar que el uso de ésta planta se realiza de forma empírica por la población debido a conocimientos transmitidos de generación en generación, sin embargo, se han encontrado escasos trabajos científicos que den validez al conocimiento popular y este ha sido uno de los motivos para desarrollar el presente trabajo, porque se trata de una especie vegetal bastante conocida y utilizada por sus propiedades medicinales y en especial es empleado como antimicrobiano.

Debido a lo anterior y considerando que el tema es original y de trascendencia científica y social, consideramos importante la realización del presente estudio, por cuanto va a permitir estudiar y comprobar *in vitro*, si la *Achyrocline alata* (Huirá huirá) efectivamente posee propiedades antimicrobianas. El estudio que se presenta a continuación, tuvo como propósito determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Para ello, se realizó la parte experimental en los laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica mediante la realización de los estudios microbiológicos y la observación sistemática, los mismos que permitieron obtener la información necesaria para la medición de las variables de estudio.

El presente estudio está estructurado en capítulos, en el primer capítulo se presenta el marco teórico que sirve de sustento a la investigación. En el segundo capítulo se presenta los materiales y métodos empleados. El tercer capítulo está dedicado a la presentación y análisis de los resultados así como también la discusión de los mismos. Finalmente se presentan las conclusiones y sugerencias.



HIPÓTESIS

Se sabe que en la medicina tradicional, los pobladores de diversas regiones, emplean las hojas de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) para el tratamiento de diversos tipos de infecciones, entre las que se encuentran las respiratorias, gastrointestinales y cutáneas principalmente; es probable que los extractos de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) presentan actividad antimicrobiana in vitro, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar los métodos extractivos necesarios para obtener el extracto etanólico, clorofórmico y éter de petróleo de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) estableciendo el extracto de mayor rendimiento.
2. Realizar la identificación de grupos de metabolitos secundarios de los extractos de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) mediante la Cromatografía de capa fina.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* mediante las pruebas de Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 *Achyrocline alata* (Huiru huiru)

1.1.1. GENERALIDADES

El género *Achyrocline* perteneciente a la familia *Asteraceae*, consta de veinte a treinta especies distribuidas por las regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur. *Asteraceae* es ampliamente utilizados en América del Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela), tales como: *A. alata*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* y *A. satureioides*. Investigaciones químicas anteriores de *A. alata* y otras especies de *Achyrocline* recogidos en América del Sur (Argentina, Uruguay y Brasil) se llevaron a cabo, mostrando perfiles similares con respecto a sus componentes fenólicos y flavonoides. La planta cuyo nombre vulgar es (Huiru huiru) expresión peruana, además llamada bálsamo del campo y yerba de la vida, planta envuelta enteramente en un bello blanquizco-lanudo. ^(1,38,39)

1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

En el aspecto general es un arbusto pequeño siempre verde, de 30 - 50 cm de altura en el ámbito, tiene abundante follaje en las partes basales, densamente vellosa lanosa. Hojas simples, alternas, alargadas, las inferiores oblongas lineales, de hasta 4,5 cm de largo; los tallos son lineales de 36 cm de largo, capítulos numerosos, reunidos en glomérulos de panículas, flores pequeñas de color amarillo blanquecino; las centrales hermafroditas, tubulosas. Aquenios glabros, de 0,5 mm de largo. (Ver Figura 1) ⁽²⁾



Figura 1. Vista general de la planta y las flores de *Achyrocline alata* (Huirahuirá)

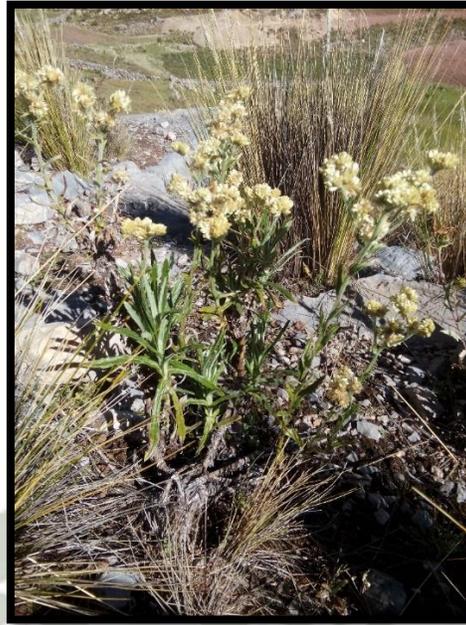
1.1.3. REVISIÓN TAXONÓMICA

Desde el punto de vista botánico la *Achyrocline alata* (Huirá huirá) está clasificada de la siguiente manera:

- Reino: Plantae
- División: Tracheophyta
- Clase: Magnoliópsida
- Orden: Asterales
- Familia: Asteraceae
- Subfamilia: Asteroideae
- Tribu: Gnaphalieae
- Género: Achyrocline
- Especie: Alata
- Nombre científico: *Achyrocline alata*
- Nombre común (Huirá huirá)

1.1.4. DISTRIBUCIÓN

Amplia distribución en Sudamérica, desde Ecuador hasta Chile. En Perú, generalizada en toda la sierra entre los 2,500 y 4,000 msnm, aunque también se encuentra a menores altitudes. Es una especie que suele crecer en todo tipo de suelos a orillas de los caminos, carreteras, en adyacencia a muros y cercos. Fenología en la zona está registrada en floración en Junio-Julio; la fructificación en Agosto. También, en floración en el mes de enero. ⁽³⁾



Fuente: Elaboración propia

Figura 2. Planta de *Achyrocline alata* (Huira huira)

1.1.5. USOS

La medicina tradicional le atribuye propiedades antibacterianas, antitusivas, descongestionantes de las vías respiratorias: para casos de resfríos, tos, ronqueras, bronquitis, se prepara una infusión con una cucharadita de las hojas de la planta por taza de agua, se recomienda utilizar las hojas para beberlas caliente dos a tres tazas al día también se puede usar infusiones para aumentar la sudoración y eliminar las toxinas del cuerpo, y de las membranas pulmonares una taza dos o tres veces al día. La planta se usa para curar heridas en forma de emplastos de hojas, que tiene una cara lisa y la otra cubierta con pelusa, con la cubierta de pelusa más sangre de grado se cubre heridas aplicados directamente a la piel dos veces por día por siete días, pudiendo usarla fresca o seca. La decocción de las hojas para la inflamación intestinal y en casos de infecciones gastrointestinales las hojas hervir una cucharada por un litro de agua, durante cinco minutos, tomar en la mañana y antes de acostarse. Las cualidades curativas

son simplemente basadas en el conocimiento empírico, no comprobados por estudios científicos. (3,4,5,40)

1.1.6 FITOQUÍMICA

Los principios activos de (Huirá huirá) presentan glucósidos antraquinónicos y flavonoides. Taninos; B-sitosterol, esteroides, triterpenos. En partes aéreas, ha sido detectada la presencia de diterpenos tales como ent-pimaranos, flavonoides como 5,8-dihidroxi-3,6,7 trimetoxiflavona y 5,8-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona; acetilenos y carotenoides. No existen estudios biológicos de la planta, sin embargo, al igual que en muchos otros vegetales, la presencia de flavonoides podría justificar, a lo menos en parte, las posibles actividades biológicas que le atribuye la medicina popular (4,5)

1.2. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

1.2.1.1. GENERALIDADES

Staphylococcus deriva del griego *staphylé* que significa “en racimo de uvas”, se trata de cocos gram positivos, que se disponen en agregados (estafilo = cúmulo), aunque también en parejas o cadenas cortas. Su tamaño varía de 0.5 – 1 um de diámetro. Son inmóviles y no esporulados. Crecen en un medio que contiene cloruro sódico al 10% a una temperatura óptima 35-37 °C. Fundamentalmente son aerobios, aunque también anaerobios facultativos. Son catalasa-positivos, gracias a esta reacción se les puede identificar fácilmente respecto a los estreptococos, oxidasa-negativos y fermentan los azúcares. El género *Staphylococcus* se

compone actualmente de 33 especies, 17 de las cuales pueden ser encontradas en clínicas humanas. ⁽⁶⁾

1.2.1.2. PATOGENICIDAD

La capacidad de los estafilococos para producir enfermedades depende de su posibilidad de intercambiar con libertad información genética. Muchas características son transferidas por bacteriófagos, ya sea mediante transducción generalizada por conversión del fago, pero también se ha descrito un proceso similar a la conjugación entre los estafilococos del grupo de fagos II con gran frecuencia ocasionan infecciones cutáneas, mientras que los de grupo de fagos III causan más a menudo infecciones gastrointestinales. Los estafilococos llevan muchos plásmidos que codifican la resistencia a los antibióticos y se demostró que dichos plásmidos se transmiten de manera eficiente entre los estafilococos tanto por transducción como por conjugación.

Los estafilococos se encuentran generalmente en la piel y mucosas del hombre y otros animales. Algunos de los *Staphylococcus* patógenos tanto para el hombre como para los animales producen una enzima denominada coagulasa y la detección de esta enzima se utiliza en el laboratorio para identificar estos microorganismos. Entre los *Staphylococcus* la especie coagulasa-positiva *S. aureus* y dos especies coagulasa negativas *S. epidermidis*, y *S. saprophyticus*, se encuentran con frecuencia en infecciones humanas; ciertamente *S. aureus* es patógeno y recibe esta denominación, así como la sinónima de *Staphylococcus* dorado, porque en placas de agar forma colonias de color amarillo dorado; sin embargo, las colonias pueden ser también de color amarillo limón o blancas, por lo que esta característica no es fundamental. Alrededor de las colonias puede comprobarse

betahemólisis. El dato bioquímico capital, que parece muy relacionado con su patogenicidad, es el ser coagulasa-positivo. Por eso, en la práctica, los términos *S. aureus* y coagulasa positivo son intercambiables.

S. aureus, tiene una alta incidencia como agente de infección, tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Es la primera como agente de infecciones, desde superficiales como el forúnculo, a profunda como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. En el medio hospitalario, es el agente de infección de heridas operatorias y de prótesis más frecuente. *S. aureus*, es capaz de causar cuadros tóxicos por producción de potentes exotoxinas tales como intoxicación alimentaria, síndrome de piel escaldada y shock tóxico, también presenta una gran capacidad de adaptación y supervivencia de esta bacteria, su aumento progresivo de resistencia a los antimicrobianos, en especial en el medio hospitalario, que plantea serios problemas epidemiológicos y terapéuticos. ^(6,7)

1.2.1.3 EPIDEMIOLOGÍA:

S. aureus es una de las bacterias patógenas más importantes a nivel global. Cerca de un cuarto de la población porta alguna de sus cepas en cierta etapa de su vida o todo el tiempo. Desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de *S. aureus* por todo el mundo. Estos se han detectado en una gran variedad de lugares, tales como hospitales, centros de atención y clínicas, y en años recientes, en la comunidad. Actualmente, estos brotes se dividen en infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad. ⁽⁸⁾

1.2.1.4 TRATAMIENTO

La aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina, meticilina y otros antibióticos de amplio espectro hace cada día más difícil la

escogencia de un antibiótico en forma empírica. Si la cepa aislada es sensible a la penicilina (<10% de las cepas), el tratamiento de elección es penicilina G. Si la cepa es resistente a la penicilina, pero sensible a meticilina, la elección es oxacilina. Si el paciente es alérgico a penicilinas y la cepa es *S. aureus* sensible a la meticilina, una opción válida es el uso de cefalosporinas, a menos que la alergia sea de tipo anafiláctico, en cuyo caso está indicado el uso de vancomicina.

Si el germen aislado es SARM, la elección es la vancomicina con dosis empírica de 30 mg/kg al día, dividida en 2-4 dosis diarias. Debido a la aparición de cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina o SARV, se han introducido nuevos antibióticos, entre los que se encuentran linezolid (familia oxazolidinona).⁽⁸⁾

1.2.2. *Escherichia coli*

1.2.2.1. GENERALIDADES

Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, considerada parte de la flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea.⁽⁶⁾

Puede ser inmóvil o móvil por flagelos peritricos, constituye el habitante facultativo del intestino grueso más importante. Las cepas de *E. coli* poseen antígenos flagelares (H), capsulares (K), y somáticos (O), se conocen más de 50 antígenos flagelares, alrededor de 100 capsulares y 170 somáticos, apareciendo en diversas combinaciones. *E. coli* es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano.^(9,10,11)

1.2.2.2. PATOGENICIDAD

Escherichia coli causa multitud de infecciones en el ser humano. Las más frecuentes son las urinarias, pero origina también infecciones de las vías biliares, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal y gastroenteritis, en pacientes debilitados o inmunodeprimidos puede colonizar la piel y las diferentes mucosas y ocasionar una variedad de síndromes clínicos. *Escherichia coli*, puede producir abscesos en cualquier localización a nivel del tejido celular subcutáneo secundarios a la infección de las heridas operatorias. *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, capaz de crecer a 44°C, catalasa-positivo y oxidasa-negativo, que fermenta la glucosa y la lactosa. Estudios de homología del DNA han revelado la existencia de varias especies nuevas del género *Escherichia*: *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. harmanii*. Se desconoce si desempeñan algún papel en la patología humana. *E. coli* es versátil y se adapta bien a sus hábitats característicos, puede crecer en un medio que tan sólo tenga glucosa, en presencia o ausencia de oxígeno. Bajo condiciones anaeróbicas crece por medio de la fermentación, produciendo ácidos mezclados y gas característico como productos finales. También puede crecer mediante respiración anaeróbica, ya que es capaz de utilizar NO_3 , NO_2 o fumarato como aceptores finales de electrones para los procesos respiratorios de transporte de electrones. ⁽⁶⁾

1.2.2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Es difícil conocer con exactitud la epidemiología global de las infecciones oportunistas y la participación de las enterobacterias en ellas, de las infecciones con diagnóstico microbiológico, en el 40 por 100 se hallan involucradas las enterobacterias, siendo *E. coli* la aislada con mayor frecuencia, otros agentes etiológicos son *Pseudomona aeruginosa*,

enterococos, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* con menor frecuencia y por este orden. Es pues, indiscutible que *E. coli*, no solo es la enterobacteria más frecuente en estos procesos, sino en términos absolutos, el primer microorganismo causante de infección oportunista. ⁽¹²⁾

E. coli, puede responder a señales del medio ambiente como sustancias químicas, pH, temperatura, osmolaridad, etc. de maneras distintas. Puede captar, por ejemplo, la presencia o ausencia de sustancias químicas o gases y aproximarse o alejarse de ellos; o puede desarrollar fimbrias que se adhieren específicamente a una célula o receptor celular. En respuesta al cambio de temperatura y osmolaridad puede variar el diámetro de los poros de las porinas de la membrana externa y acomodar moléculas mayores (nutrientes) o excluir sustancias inhibitorias. Aunque *E. coli* es un comensal normal del tubo digestivo, puede, sin embargo, causar manifestaciones patológicas en diversas circunstancias. La emigración desde el ano a la región periuretral, con ulterior ascenso de los gérmenes por la uretra hasta la vejiga urinaria, es la patogenia más habitual de las infecciones urinarias colibacilares. Desde las vías urinarias, *E. coli* puede originar bacteriemias con posible aparición de metástasis sépticas. Aunque la puerta de entrada más frecuente es la urinaria, ello no significa que sea la única que permite el acceso de este germen a la circulación. Según parece, también puede penetrar desde el tubo digestivo, aunque normalmente, las células de Kupffer del hígado fagocitan los bacilos de esta procedencia y los eliminan de la circulación. Sin embargo, en las hepatopatías crónicas, la hipertensión portal con anastomosis portosistémicas permite el acceso de *E. coli* a la circulación general sin pasar por el filtro hepático, con posible bacteriemia y aparición de focos sépticos, como la denominada peritonitis espontánea de los cirróticos. El germen puede llegar al pulmón desde la faringe. En efecto, en pacientes hospitalizados con enfermedades graves, *E. coli* forma parte de la flora

faríngea y, desde ésta, sea por instrumentación o espontáneamente, puede alcanzar los alvéolos originando una neumonía específica. ^(13,14)

1.2.2.4 TRATAMIENTO

Los antibióticos a utilizar deben ser activos in vitro frente a la cepa, y alcanzar concentraciones suficientes en el foco. La capacidad de estas bacterias para adquirir genes de resistencia hace imprescindible la realización antimicrobiana. En infecciones urinarias junto con otros posibles condicionantes son fundamentales para la orientación terapéutica. El cotrimoxazol, las quinolonas y los aminoglucósidos, cuando son activos in vitro, son clínicamente eficaces. En la enteritis por *E. coli* no se ha demostrado la eficacia del tratamiento antibiótico e incluso parece contraindicado en la enteritis hemorrágica. Solamente las formas graves de *E. coli* enteroinvasiva se beneficiarían del tratamiento. ⁽¹²⁾

1.2.3. *Pseudomona aeruginosa*

1.2.3.1. GENERALIDADES

El género *Pseudomonas*, que pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, está constituido por bacterias gramnegativas, ampliamente difundidas en la naturaleza, cuyas especies con mayor importancia en patología médica son *P. aeruginosa*, *P. mallei* y *P. pseudomallei*. Otras especies de *Pseudomonas*, como *P. cepacia*, *Xanthomonas maltophilia*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. stutzeri*, *P. putrefaciens*, *P. alcaligenes* y *P. pseudoalcaligenes*, rara vez producen infecciones bastante semejantes, epidemiológica y clínicamente, a las causadas por *P. Aeruginosa*, es un bacilo gramnegativo, aerobio no fermentador de los hidratos de carbono, provisto de un flagelo polar que le confiere motilidad, y de largos pili que

le permiten adherirse a las superficies. Crece fácilmente en los medios de cultivo ordinarios, en los que se la puede observar aislada, en parejas o formando cadenas cortas. En agar sangre forma colonias planas, de olor peculiar y color verdoso debido a la producción de pigmentos, piocianina y pioverdina. Puede originar también otros dos pigmentos: uno rojo oscuro y otro negro, denominados, respectivamente, piorrubina y piomelanina. La estructura de *P. aeruginosa* es parecida a la de las otras bacterias gramnegativas. Posee igualmente una pared celular de naturaleza lipopolisacárida que actúa como endotoxina.

P. aeruginosa se encuentra ampliamente difundida en la naturaleza, en íntima asociación con ambientes húmedos. Ello se debe a que los requerimientos nutritivos del germen son mínimos, hasta el extremo de que es capaz de multiplicarse en agua destilada. Soporta además una gama muy variada de condiciones ambientales adversas, como temperaturas elevadas o cloración intensa. Constituyen el hábitat natural del germen, el agua, las plantas y la tierra húmeda. Con frecuencia contamina multitud de animales y, entre ellos, el ser humano. Por eso, la población sana alberga a menudo *Pseudomonas* que forman parte, transitoriamente, de la flora microbiana normal saprófita. Así coloniza, con frecuencia variable, zonas húmedas del organismo, como la piel de las axilas, el conducto auditivo, la región perineal y las mucosas. Por ejemplo, se la puede aislar de la mucosa nasal (hasta el 3,3%), la faringe (6,6%) y las heces (2,2-24%) de las personas que no reciben antibióticos.

La *P. aeruginosa* se distribuye extensamente en la naturaleza y es común en ambientes húmedos de los hospitales. Puede colonizar a los humanos normales, en quienes es un saprofito. Causa enfermedad en huéspedes humanos con defensas anormales.

Por otra parte, la afección de los pacientes contribuye en forma notable a la difusión. Así, bajo las escaras de las quemaduras, *Pseudomonas* presenta una multiplicación extraordinaria. También prolifera fácilmente en el tubo

digestivo de los pacientes neoplásicos sometidos a tratamiento citostático, así como en la piel y las mucosas de los pacientes ingresados en hospitales, que reciben antibióticos de amplio espectro alrededor del 25% según las encuestas de prevalencia. ^(6,14,15)

1.2.3.2. PATOGENICIDAD

Solo es patógena cuando se introduce en regiones desprovistas de defensas anormales, por ejemplo, mucosas y piel lesionadas por daño tisular directo; empleo de cateteres intravenosos o urinario; o cuando hay neutropenia, como es la quimioterapia contra el cáncer. Las bacterias se unen a las mucosas o la piel y las coloniza, invaden localmente y producen enfermedad sistémica. Estos procesos se favorecen por pili, enzimas y toxinas, descritas antes. El lipopolisacárido desempeña una función directa en la génesis de la fiebre, choque, oliguria, leucocitosis y leucopenia, coagulación intravascular diseminada y síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto. La *P. aeruginosa* y otras pseudomonas son resistentes a muchos agentes antimicrobianos y, por tanto, se convierten en dominantes e importantes cuando se suprimen las bacterias más susceptibles de la flora normal.

Para la etapa de invasión local resultan primordiales la producción por parte de *Pseudomonas* de varias proteasas, dos hemolisinas y una cápsula. Una de las proteasas es una elastasa que destruye la lámina elástica de los vasos sanguíneos, con producción de hemorragias localizadas y necrosis de la piel, el pulmón y la córnea. Una de las hemolisinas, denominada fosfolipasa C, es termolábil, mientras que la otra es un fosfolípido termostable. Al parecer, ambas actúan conjuntamente destruyendo los lípidos y la lecitina. Se ha sugerido que la fosfolipasa C podría intervenir en la patogenia de la neumonía por *Pseudomonas*, alterando el surfactante pulmonar. La *P. aeruginosa* es capaz de fabricar, en determinadas circunstancias, una cápsula de naturaleza polisacárida, denominada también sustancia mucosa

o glicocálix. Dicha cápsula fija las *Pseudomonas* a las células, impide que sean arrastradas por el mecanismo mucociliar y, al aislar los gérmenes, los protege de la acción de los macrófagos, inmunoglobulinas y complemento. En la etapa de diseminación intervienen, probablemente, los mismos factores expuestos en la anterior. El lípido A de la endotoxina (lipopolisacáridos) de *Pseudomonas*, aunque menos activo que el de los demás gramnegativos, sería capaz de activar los sistemas de coagulación, fibrinólisis, complemento y cininas, ocasionando coagulación intravascular diseminada y shock. Por otra parte, la mayoría de las cepas de *Pseudomonas* son capaces de producir una enzima extracelular, denominada exotoxina A, dotada de actividad necrosante. La lesión más característica de la infección por *P. aeruginosa* es la infiltración bacteriana de las paredes de las arteriolas con trombosis y, como consecuencia, zonas de necrosis o de hemorragia, principalmente en la piel, los pulmones y los riñones.

P. aeruginosa tiene muchos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas; sin embargo, es difícil definir el papel que cada factor desempeña en la enfermedad, y la mayoría de los expertos en este campo creen que su virulencia es multifactorial. Las principales infecciones causadas por *P. aeruginosa*, son bacteriemia (sepsis), neumonía, osteomielitis y artritis, infecciones urinarias, heridas infectadas, infecciones cutáneas, gastrointestinales, entre otras.

Tratamiento entre los betalactámicos pueden usarse carboxipenicilinas (ticarcilina sola o asociada a tazobactam), cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima), de cuarta (cefepima y cefpiroma), monobactam (aztreonam) y carbapenem (imipenem y meropenem). De los aminoglucósidos suelen ser eficaces amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina. Para conseguir el efecto bactericida rápido se combina un betalactámico con un aminoglucósido. Para infecciones del tracto urinario

las quinolonas han demostrado su actividad in vitro y su eficacia clínica, condicionada por el problema de las resistencias.^(6,14,15,16)

1.2.3.3 EPIDEMIOLOGÍA

Es un microorganismo ubicuo, ampliamente distribuido en el suelo, plantas, agua y animales. tanto las cepas ambientales como las de origen endógeno pueden ser patógenas para el hombre. Coloniza principalmente zonas húmedas como periné, axila y oído. El hombre puede actuar como reservorio con porcentajes de colonización son bajos, que aumentan hasta un 50% en hospitales. *P. aeruginosa* se encuentra entre 4 – 5 agentes más frecuentes en infecciones hospitalarias. Es el primero en neumonías, el tercero en infecciones del tracto urinario y esta entre las 10 primeras causas de bacteriemia. Afecta a los recién nacidos y a las víctimas por quemaduras, el agente causal más común es *Pseudomona aeruginosa*.^(12,17)

1.2.3.4. TRATAMIENTO

Es recomendable iniciar la terapéutica después de la toma de muestras. Entre los betalactámicos pueden usarse carboxipenicilinas (ticarcilina sola o asociada a tazobactam), cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima), de cuarta (cefepime y cefpiroma), monobactam (aztreonam) y carbapenem (imipenem y meropenem). De los aminoglucósidos suelen ser eficaces amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina. Para conseguir un efecto bactericida rápido se combina un betaláctamico con un aminoglucósido. Para infecciones del tracto urinario las quinolonas han demostrado su actividad in vitro y su eficacia clínica, condicionada por el problema de las resistencias. La resistencia a imipenem y meropenem puede surgir durante el tratamiento de infecciones por *Pseudomona aeruginosa*.^(12,18)

1.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Permite la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, usando uno o varios disolventes. Dentro de las técnicas extractivas esta la maceración, reflujo, lixiviación o percolación, extracción por arraste con vapor de agua, extracción continua.⁽¹⁹⁾

1.3.1 SOXHLET

Es la técnica mas antigua para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Desarrollada en 1879 sigue siendo hoy en día una técnica aceptada por la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) y usada como procedimiento de referencia con respecto al que se validan otras técnicas más actuales.⁽²⁰⁾

La extracción Soxhlet es un método de extracción continua que se basa en un sistema de reflujo que garantiza la provision de disolvente puro. Para ellos se requiere de un extractor Soxhlet y una fuente de calor que permita la ebullición del disolvente.⁽²¹⁾

1.4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

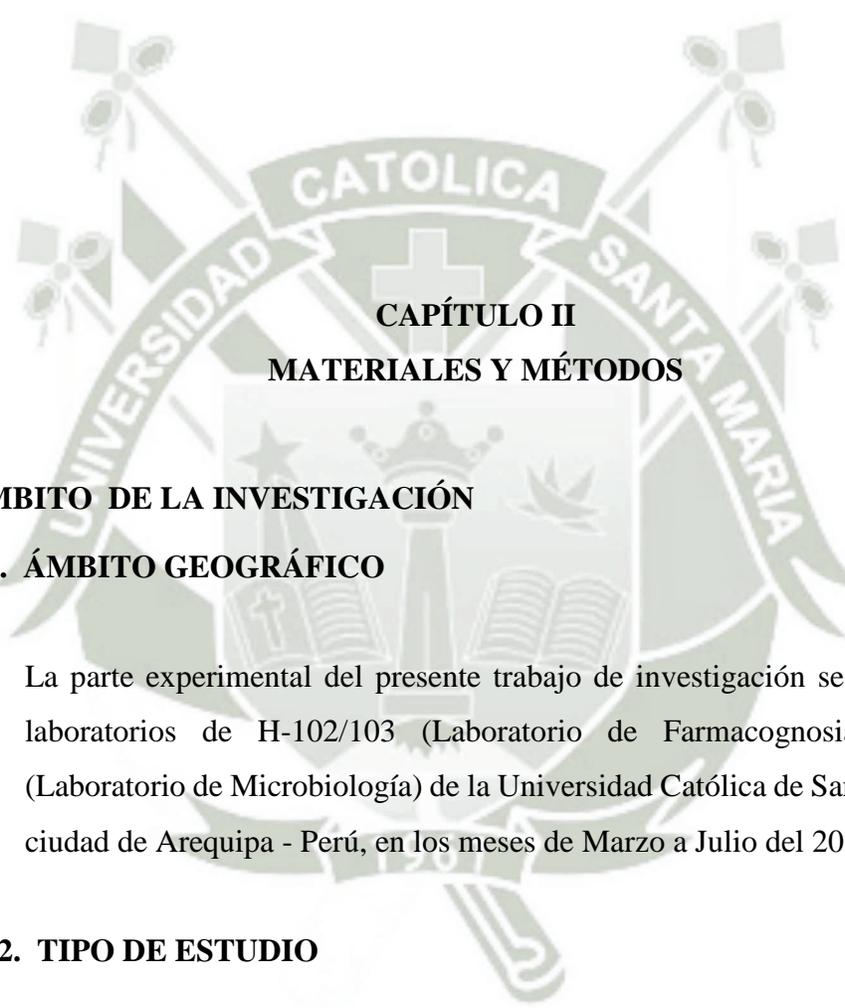
El principio fundamental de la cromatografía en capa fina ya fue establecido por Ismailow y Schraiber (1938), pero no alcanzo una amplia aplicación práctica hasta que Stahl (1956) consiguió que este nuevo proceso de separación resultará un método fiable de trabajo en laboratorio.

Esta técnica microanalítica emplea alúmina como adsorbente, lo mismo que en las columnas cromatográficas, pero en la forma de una capa fina sobre una placa de cristal.

La CCF es una derivación de las técnica de cromatografía en columna. En CCF se utiliza normalmente la técnica de análisis de desarrollo. El proceso se lleva a cabo en cubetas cerradas, por ascencion del disolvente, debiendo colocarse en el interior de la cubeta cubriendo una de sus paredes, una capa de papel filtro impregnada de fase móvil para conseguir una atmósfera saturada en ella. Una vez desarrollada la placa, la visualización de los cromatogramas se realiza, caso de no tratarse de compuestos coloreados, mediante iluminación con luz ultravioleta, si la fase estacionaria lleva un indicador de fluorescencia, o bien mediante el pulverizado de la placa con reveladores de carácter genera (iodo, ácido sulfúrico, etc) o específico (cloruro ferrico, etc) si se requiere visualizar unicamente compuestos de un tipo determinado.

La mayor ventaja de este método es, junto a su gran capacidad de separación, la rapidez del proceso que, en general, requiere solamente 10 – 30 minutos.

La Cromatografía en capa fina resulta adecuada tanto para la separación de vitaminas, terpenos, esteroides y pigmentos como para la de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, ácidos nucleicos, alcaloides, medicamentos e incluso para la de aniones y cationes inorgánicos. ^(22,23,24)



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO

La parte experimental del presente trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de H-102/103 (Laboratorio de Farmacognosia), H-402/403 (Laboratorio de Microbiología) de la Universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa - Perú, en los meses de Marzo a Julio del 2017.

2.1.2. TIPO DE ESTUDIO

Para la realización del presente trabajo, es un tipo de estudio experimental, prospectivo, in vitro.

2.2. MATERIALES

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1.1. *Achyrocline alata* (Huirá huirá)

En este trabajo de investigación se usaron las hojas de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) que fue recolectado en el distrito de Chucuito, en el Departamento de Puno.

2.2.1.2. CEPAS DE MICROORGANISMOS O COLONIAS UTILIZADAS

Las cepas bacterianas empleadas fueron proporcionadas por el laboratorio del Hospital General de Arequipa, se utilizaron cepas de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

2.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.2.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Bagueta
- Embudo de vidrio
- Fiolas 50-100 ml
- Matraz Erlenmeyer 100 y 250 ml
- Probeta 100 ml
- Pipetas de 1ml, 5ml, 10 ml (Hirschmann)
- Placas Petri 100 x 15mm
- Termómetro de vidrio
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitados (Pirex)
- Cuba cromatográfica

- Frascos de color ámbar 100 ml
- Capilares de vidrio

2.2.2.2. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Equipo de extracción Soxhlet
- Rotavapor (Buchi)
- Balanza Analítica (Adventurer)
- Autoclave (Sturdy SA-260MA)
- Estufa (J.P. Selecta)
- Lámpara ultravioleta UV 254-366nm (Camag, modelo: CA004)
- Cocina eléctrica
- Refrigerador
- Incubadora
- Microscopio óptico

2.2.2.3. REACTIVOS

- Etanol (Diproquim, Q.P)
- Cloroformo (Diproquim, Q.P)
- Eter de petróleo (Diproquim, Q.P)
- Cloruro de bario (ClBa_2) 0.048 M
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.36 N
- Reactivo de Kovacs
- Bateria para Coloracion de Gram
 - Cristal violeta
 - Alcohol acetona
 - Lugol
 - Safranina

- Tween 20 (MECK) de grado de reactivo
- Reactivo de Liebermann Burchard
- Reactivo de Dragendorft A y B
- Reactivo de Cloruro de Aluminio
- Reactivo de Cloruro Ferrico

2.2.2.4. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mueller Hinton (Merck)
- Caldo Peptonado (Merck)
- Agar MacConkey
- Agar manitol salado
- Agar TSI (Triple azúcar, Hierro agar)
- Agar LIA (Lisina, Hierro agar)
- Caldo MRVP (caldo Rojo de Metilo, Voges Proskauer) (Merck)
- Agar Citrato de Simmons
- Agar SIM (Sulfuro Indol Movilidad agar)
- Prueba de indol
- Agar EMB

2.2.2.5. OTROS MATERIALES

- Placas silica gel 60F₂₅₄ (Merck)
- Micropipeta 1000ul (Transferpette)
- Papel filtro (Whatman)
- Asa de Kohle
- Espátula
- Mortero
- Gradilla para tubos de ensayo

2.3.1.3. ESTABILIZACIÓN

Se identificó la planta, luego el material vegetal se dispuso envolviéndolas en bolsas de papel craft y se colocó en cajas pequeñas de cartón para trasladarlas a Arequipa, a los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, posteriormente se llevó a estufa a una temperatura de 100°C por quince minutos para evitar la descomposición química. Una vez estabilizadas las hojas se dejó secar a la sombra por un periodo de un mes.

2.3.1.4. DESECACIÓN

Posteriormente se llevó a la estufa por 48 horas a una temperatura de 40°C. Según Skurbis hizo un estudio con estufa a 40, 50, 60 y 70 °C de temperatura, y observó una correlación lineal entre el aumento de aire de secado en la pérdida de la composición química del producto. Martinazzo hizo un estudio que concluye que la temperatura de aire secado a 50°C demuestra ser la más indicada para el secado. ⁽⁴¹⁾

2.3.1.5. PULVERIZACIÓN

Se pulverizaron las hojas con la ayuda de un mortero hasta que queden partículas uniformes.

2.3.1.6. ALMACENAMIENTO

Se almacenaron las partículas trituradas en un frasco de color ámbar que antes fue esterilizado y cerrado herméticamente, luego se rotuló y guardó para su posterior uso.

2.3.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.3.2.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DEL SOXHLET

La extracción por Soxhlet es un método de extracción similar a la digestión y percolación, es un sistema cerrado que permite el flujo del solvente en ciclos.

Es un método de extracción continuo que se utiliza para materiales sólidos. Consiste en colocar el material a extraer, previamente molido y pesado, en un cartucho de celulosa que se introduce en la cámara de extracción, conectada por una parte a un balón de destilación por otra parte a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición y el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante cayendo sobre el material. Cuando alcanza el nivel conveniente sifona por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material. La extracción sólido-líquido, se usa a menudo para extraer un producto natural a partir de su fuente natural, tal como una planta.

El sólido que se va a extraer se coloca en un dedal hecho de papel filtro, el dedal se inserta en el centro de la cámara. Un solvente de bajo punto de ebullición, por ejemplo, éter dietílico o alcohol etílico, se coloca en el balón de destilación de fondo redondo y se calienta hasta el reflujo. Los vapores suben por el lado izquierdo hacia el condensador donde se condensan. El líquido condensado cae dentro del dedal que contiene el sólido. El solvente caliente empieza a llenar el dedal y extrae el compuesto deseado a partir del material vegetal. Una vez el dedal se llena con el solvente, el brazo de la derecha actúa como un sifón, y el solvente, el cual contiene el compuesto deseado disuelto, se regresa dentro del balón de destilación. El ciclo vaporización – condensación- extracción –evacuación

por el sifón, se repite varias veces, y el producto deseado se concentra en el balón de destilación. (25,26,27)

Los extractos se obtuvieron con los solventes: etanol, cloroformo y éter de petróleo. Se empleó etanol al 96% en una cantidad de 150 ml, Cloroformo 150 ml y éter de petróleo 150 ml, muestra de 10 gramos envuelto en papel filtro y se triplicó cada extracción por cada disolvente, la extracción se efectuó hasta que el solvente haya agotado la muestra en el cartucho de papel filtro y así obtuvimos el extracto final.



Figura 3. Método de extracción Soxhlet

Al terminarla extracción del equipo soxhlet, se vertió el extracto en el balón del equipo de rotavapor, ajustando a una velocidad de rotación 60 rpm y a una temperatura entre 50 y 60 °C respectivamente, con el fin de no llegar a una temperatura igual al punto de ebullición de los solventes debido a que deterioraría la muestra es decir el extracto.

Se procedió a concentrar en el equipo Rotavapor y antes que llegue a sequedad se retiró la muestra, finalmente se retiró el balón del equipo y se trasvasó un beacker debidamente tarado, el extracto obtenido fue llevado al Rotavapor para eliminar el etanol, mientras que los extractos clorofórmico y de éter de petróleo se evaporaron a baño maría, hasta sequedad.



Figura 4. Material llevado al Rota-vapor donde se concentró el extracto de *Achyrocline alata* (Huirá huirá)

2.3.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Achyrocline alata* (Huirá huirá)

2.3.3.2. FUNDAMENTO

Se determina la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto. El procedimiento consistió en colocar cada extracto en un vaso previamente tarado y se llevó a baño maría de 50°C, una vez evaporado el solvente, se dejó enfriar en el desecador para obtener un peso constante y se determinó la masa final del extracto seco usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ RE} = \frac{\text{peso de extracto seco}}{\text{peso de hojas secas}} * 100$$

2.3.4. MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

2.3.4.1. FUNDAMENTO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. La cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC) continúa siendo la técnica de análisis de mezclas más versátiles, fácil de emplear y económica de uso en el laboratorio. Esta técnica de separación de mezclas (muestras complejas) por una migración diferencial de los componentes de la mezcla, al ser transportados sobre una fase estacionaria, por un solvente o fase móvil el proceso es posible porque los componentes de la mezcla tienen diferente afinidad por la fase estacionaria y/o fase móvil.

La impulsión de la fase móvil se realizará por la fuerza de capilaridad. Las colocaciones generadas por las sustancias fuertes, reveladores y la distancia recorrida por cada componente de la droga en estudio permiten ver la naturaleza de los componentes.

El grado de afinidad depende de la estructura química de las sustancias a separar y de las fases. La afinidad se produce por la posibilidad de establecer enlaces químicos: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces iónicos, etc. ^(16,28,29,30)

2.3.5.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

2.3.5.1.1. IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS

Para la identificación de terpenos se utilizó una fase móvil de tolueno: acetato de etilo (5:5) y como revelador a Liebermann - Burchard.

2.3.5.1.2. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Para la identificación de taninos se utilizó una fase móvil de metanol y agua (9:1) y como revelador preparación de reactivo de FeCl_3 al 1 % en etanol.

2.3.5.1.3. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la identificación de flavonoides se utilizó una fase móvil tolueno: acetato (5:5), y como revelador preparación de reactivo teniendo como revelador al AlCl_3 al 1% etanol.

2.3.5.1.4. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

Para la identificación de alcaloides se utilizó una fase móvil cloroformo: metanol (9:1) y como reactivo de Dragendorff.

2.3.5.2. PREPARACIÓN DE LA FASE ESTACIONARIA

Conformada por placa sílica gel 20 x 15 cm, que fueron cortados en pequeños cromatofólios de 10 x 3 cm, se procedió a delimitar con lápiz la placa, se sembró la muestra en cada una de las pequeñas placas, luego se pone en contacto con la fase móvil.

2.3.5.3. PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Se realizaron mezclas de disolventes empleados para la fase móvil, como se menciona a continuación. (Ver Tabla 1)

Tabla 1. Componentes de la Fase Móvil para identificación de Terpenos, Taninos, Flavonoides y Alcaloides.

	TERPENOS	TANINOS	FLAVONOIDES	ALCALOIDES
FASE MÓVIL	Tolueno: Acetato de etilo (5:5)	Metanol: agua (9:1)	Tolueno: Acetato (5:5)	Cloroformo: Metanol (9:1)
REVELADORES	Lieberman – Burchard.	Cloruro férico al 1 % en etanol.	Cloruro Férrico al 1% en etanol	Dragendorff

2.3.5.4. REVELADORES EN CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Posterior a la siembra del extracto en la placa de sílica gel se dejó secar a temperatura ambiente por unos minutos, se continuó con la aplicación de los diferentes reveladores, concluyendo con la observación de las placas en la lámpara UV. (Ver Tabla 1)

2.3.6. PROCESAMIENTO DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

En el presente estudio se han utilizado cepas microbianas y patógenas Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, y Gram negativos como *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Una vez obtenidas las cepas microbianas y patógenas se realizaron las pruebas necesarias para comprobar que se trata de las bacterias señaladas, para ello se siguió el procedimiento correspondiente a los estudios bacterioscópicas.

Se utilizaron 10 cepas de bacterias obtenidas del Hospital General de Arequipa.

- *Staphylococcus aureus*,
- *Escherichia coli* y
- *Pseudomona aeruginosa*

2.3.6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN

2.3.6.1.1. *Staphylococcus aureus*

A. AGAR MANITOL SALADO

Los microorganismos que degradan el manitol salado hacen virar el indicador rojo fenol a amarillo, como es el caso del *Staphylococcus aureus*.

Se sembró en superficie un inóculo de la muestra por el método de estría y procedió a incubar durante 24 horas a 37°C.

Se producirá la degradación del carbohidrato a manitol hasta ácido, hace virar el indicador rojo fenol a un color amarillo lo que diferencia de otros *Staphylococcus*.⁽⁴⁷⁾

B. REACCIÓN DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.

Se colocó en una lámina portaobjetos una colonia se agregó dos gotas de peróxido de hidrogeno al 3%.⁽⁴⁷⁾

Se utilizó esta reacción con el objetivo de diferenciar al género *Staphylococcus* y para poder identificar la cepa de *Escherichia coli*, luego de realizar esta reacción observamos los siguientes resultados:

Reacción de la Catalasa: positivo para *Staphylococcus aureus*.

Reacción de la Catalasa: positivo para *Escherichia coli*.

C. COLORACIÓN GRAM

Es un tipo de tinción diferencial empleado para la visualización de bacterias, se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana. Se presentan en racimos irregulares sin flagelos.

Se colocó una asada de bacterias sobre una lámina porta objeto limpia. Se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción. Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de cristal violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño. Se cubrió la lámina con lugol durante un minuto y se procedió a lavar. Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el decolorante alcohol acetona hasta no arrastrar más colorante violeta (10 segundos) Se cubrió la superficie de la lámina con safranina por 1 minuto y se procedió a lavar, se secó al aire a temperatura ambiente, y se observó en el microscopio. ⁽⁴⁷⁾

D. PRUEBA DE LA COAGULASA

La coagulasa es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión de fibrinógeno en fibrina. Es la principal característica que diferencia al *Staphylococcus aureus* de las demás especies que no producen esta enzima.

Se usó 2 gotas de plasma humano, se sacó con la punta del asa de kolhe una muestra de la bacteria y se suspendió en un tubo de ensayo con el plasma y movió de un lado, se dejó incubar a 37°C, se utilizó esta reacción para comprobar que se tratará de cepas de *Staphylococcus aureus* y no de *Staphylococcus epidermidis*, los resultados fueron: Coagulasa positivo: para *Staphylococcus aureus* se observa la formación de grumos.⁽⁴⁷⁾

2.3.6.1.2. *Escherichia coli*

A. AGAR MAC CONKEY

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias diseñadas para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos. Se sembró por el método de estría la muestra de *Escherichia coli* en la placa de agar Mac Conkey y se dejó en la estufa a 37°C Por 24 horas. Se utilizó para comprobar si las colonias de *Escherichia coli*, hidrolizaban o no la lactosa.

Las bacterias fermentadoras de lactosa se observan de color rosado con o sin zona de precipitado alrededor, mientras que las no fermentadoras de lactosa se observan incoloras o transparentes.⁽⁴⁷⁾

B. AGAR LISINA HIERRO (LIA),

Es un medio para detectar enzimas que descarboxilan o desaminan la lisina en bacilos Gram negativos. Adicionalmente detecta enzimas que producen sulfuro de hidrógeno y gas proveniente de la glucosa. No existen Enterobacterias que posean las dos enzimas (descarboxilasa y

desaminasa de la lisina) por lo que sólo se tiene que observar, o una de ambas reacciones o la ausencia de ambas.

Se sembró la muestra de *Escherichia coli* en agar (LIA) (pico fondo) mediante el método de siembra 3 veces picadura y 1 estría, luego se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas y se observó el color en el medio. Si es K/K, se observa tubo color violeta, descarboxilación de la lisina con producción o no de gas, la cual se representa con (G) si es abundante y (g) si es poca. Se interpreta lisina positiva.

Si es R/A, se observa tubo color rojo superficie y amarillo fondo, desaminación de la lisina, con producción o no de gas, la cual se representa con (G) si es abundante y (g) si es poca. Se interpreta lisina desaminasa.

Si es K/K+, se observa tubo color violeta superficie y negro fondo, descarboxilación de lisina, con producción de H₂S la cual se representa por (+), con producción o no de gas, la cual se representa con (G) si es abundante y (g) si es poca.

Si es K/A, se observa tubo color violeta en la superficie y amarillo en el fondo, el color amarillo se debe a la fermentación de glucosa. Puede haber o no producción de gas. Se interpreta lisina negativa, quiere decir que no descarboxilo ni desamino la lisina.⁽⁴⁷⁾

C. TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

Este medio se utiliza para determinar la capacidad de los bacilos Gram negativos para fermentar lactosa, sacarosa y glucosa, así como para determinar su capacidad de producir H₂S (ácido sulfúrico) y gas.

El tubo contiene dos cámaras de reacción, en la parte inclinada (pico de flauta) se fermenta la lactosa y la sacarosa y en la parte profunda se fermenta la glucosa. Se puede fermentar los tres azúcares o uno de ellos lo cual dependerá del microorganismo que se estudie.

Se sembró una muestra de *Escherichia coli* en agar (TSI) (pico – fondo) mediante el método de siembra de picadura y estría, luego se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas, posteriormente se observó el color en el medio.

Si es K/K, se observa tubo color rojo, no fermenta ninguno de los azúcares.

Si es A/A, se observa todo el tubo de color amarillo, fermenta la glucosa, lactosa y sacarosa, con producción o no de gas.

Si es K/A, se observa el tubo en la parte inclinada color rojo y amarillo el fondo, fermenta solo la glucosa, con producción o no de gas, la cual se representa con (G) si es abundante y (g) si es poca.

Si es K/A+, se observa el tubo parte inclinada rojo y amarillo el fondo, fermenta la glucosa, con producción de H₂S la cual se representa por (+), con producción o no de gas, la cual se representa con (G) si es abundante y (g) si es poca. ⁽⁴⁷⁾

D. CALDO PEPTONADO (INDOL)

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa. Se cargó el asa de cole con la muestra de *Escherichia coli* y se le agregó al caldo peptonado agitándolo, se dejó en estufa a 37°C por 24 horas. Luego de la

incubación se agregó una gota del reactivo de Kovacs. Se observará un anillo de color rojo en la superficie del caldo lo cual indica la presencia de la enzima triptofanasa por lo tanto la prueba es considerada positiva.

(47)

E. PRUEBA DE ROJO DE METILO – VOGES PROSKAUER (MR-VP)

En el medio de cultivo, la pluripeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable.

La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol).

Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros.

Se inóculo el caldo MR-VP e incubo por 48 horas a 37°C.

Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1mL de caldo para Voges Proskauer.

En el caldo restante revelar rojo de metilo, agregando 4 a 8 gotas del indicador rojo de metilo. Para revelar Voges Proskauer agregar 10 gotas de α -naftol al 5% y una gota de KOH al 5%.

Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15min.

La prueba Voges – Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo – fucsia de 15 minutos, que indica la presencia de diacetil, producto de oxidación de la acetoína. Que para nuestro caso fue negativo presentando una coloración amarilla.

La prueba rojo de metilo es positiva si se observa un color rojo estable, esto indica que la producción de ácido es suficientemente fuerte para producir el viraje del indicador, lo que significa que el microorganismo fermento la glucosa por la vía de ácido-mixta. Dándonos en nuestro caso rojo de metilo positivo. ⁽⁴⁷⁾

F. PRUEBA DE AGAR CITRATO DE SIMMONS

Determina la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono. Un viraje de color verde al azul marino y crecimiento en la superficie da una reacción positiva, de lo contrario es negativa.

Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en agar Citrato de Simmon (pico-fondo) mediante el método de siembra picadura y estría. Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.

La prueba es positiva (+) cuando el medio cambia de un color verde a un color azul, por alcalinización del medio lo cual produjo un viraje del indicador azul de bromotimol. En el caso de las cepas estudiadas nos dio Citrato de Simmons Negativo. ⁽⁴⁷⁾

2.3.6.1.3. *Pseudomona aeruginosa*

A. TINCIÓN GRAM

Al observar al microscopio va a presentar una coloración roja el cual nos indica que es negativo a la tinción de Gram; se van a observar bacilos medianos y rectos.

B. PRUEBA DE LA OXIDASA

Esta prueba se empleó para poder confirmar la identificación de las cepas correspondientes a *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, Se realiza en un trocito de papel de filtro, de forma que colocamos una gota del reactivo de Kovacs en el papel.

Se tomó una muestra de colonia de *Pseudomona aeruginosa* asa de siembra, que frotaremos sobre el papel.

El resultado será positivo se produce una reacción de color a los pocos segundos. Nuestros resultados fueron: Citocromo oxidasa positivo: a *Pseudomona aeruginosa*. Citocromo oxidasa negativo: a *Escherichia coli*.⁽⁴⁷⁾

C. MAC CONKEY

Se siembra la muestra de *Pseudomona aeruginosa* en agar Mac Conkey en placa y se siembra por agotamiento en zigzag. Se deja en la estufa a 42°C por 24 – 48 horas.

La *Pseudomona aeruginosa* no es fermentadora de lactosa⁽⁴⁷⁾

2.3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS

Los extractos etanólico, clorofórmico y etéreo obtenidos se sometieron a un análisis preliminar en el que se evaluó la actividad antimicrobiana, por el método hoyo – placa, permitiendo elegir al extracto con mayor actividad antimicrobiana, se realizó el siguiente procedimiento:

2.3.7.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO HOYO - PLACA - CULTIVO

Utilizamos el Método de hoyo - placa -cultivo, cuyo fundamento es que la sustancia a investigar al ser colocada en la excavación entra en contacto con la superficie del agar y así se expande hacia el medio circundante, mientras la distancia aumenta en la excavación se observa la reducción logarítmica de la concentración de la sustancia hasta alcanzar un punto en el que el desarrollo microbiano de la superficie del agar ya no es más inhibido, para medir la actividad de la sustancia se debe medir el halo de inhibición formado. El procedimiento es el siguiente:

2.3.7.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Primeramente se seleccionan cuatro a cinco colonias obtenidas a partir del cultivo en placa de las bacterias que se desean estudiar, luego se toca la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfiere a un tubo que contenga de 4 - 5 ml de caldo peptonado, esto se repite en cada una de las bacterias que se están estudiando, posteriormente se ajusta la turbidez del inóculo con caldo peptonado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mac Farland y se compara de forma visual con el estándar, para ello se debe disponer de luz adecuada y se miran los tubos contra un fondo blanco con

líneas negras como contraste. En ese momento la suspensión preparada de cada bacteria debe tener aproximadamente 10^8 UFC/ml.

Para la preparación del medio de cultivo, se preparó Agar Mueller Hinton, a partir de la base deshidratada de acuerdo a las normas de uso, luego se autoclavó y se dejó enfriar en baño de agua hasta que la temperatura fue menor a los 40°C , allí se le agregó 1 ml de inóculo 10^8 UFC/ml por cada 100 ml de medio, lo que permitió obtener una concentración de 10^6 UFC/ml. Luego se plaqueó cerca del mechero para asegurar que el medio fuera estéril. Cuando se obtuvo la consistencia adecuada se efectuaron las excavaciones por cada placa y así se pudo obtener un resultado promedio, luego se incubó a 37°C por 24 horas, y se midieron los halos de inhibición. Según referencias bibliográficas los resultados se expresan como: Sensible (S) cuando presentan halos de inhibición ≥ 20 , Intermedio (I) cuando presentan halos de inhibición $>12 - 19$ y Resistente (R) cuando presenta halos de inhibición ≤ 12 .⁽⁴⁸⁾

2.3.8. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

La Concentración inhibitoria mínima, es definida como la menor concentración del antimicrobiano que inhibe el desarrollo *in vitro* de un microorganismo. Se realizó por el método de dilución en tubo^(47,49)

2.3.8.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO

Este método de dilución en tubo está basado en hallar al tubo donde no se apreció crecimiento bacteriano (sin turbidez). Este tubo indicó la mínima concentración del extracto que se requiere para no producir el desarrollo bacteriano. El procedimiento para la realización de este método se efectuó de la siguiente manera^(47,50)

A. PREPARACIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO MADRE DE *Achyrocline alata* (Huiru huiru)

Se preparó una solución de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) a una concentración de 200 mg/ ml, que se diluyó en 5 ml de agua destilada, a esta solución la denominamos solución madre, se usó Tween 20 a 1% como emulsificante.

B. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se tomaron cuatro o cinco colonias de cepas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*)

Con un asa de siembra y se depositó en un tubo de ensayo estéril conteniendo 10 ml de caldo peptonado estéril.

Para la preparación del inóculo se realizó de manera independiente para las diferentes cepas de estudio.

La obtuvo turbidez del inóculo ajustándola según escala Mc Farland de 10^8 UFC/ml comparando la turbidez de ambos tubos.

Posteriormente se realizó la dilución de 0.1 ml de inóculo preparado en 9.9 ml de caldo peptonado estéril dando concentración final de 10^6 UFC/ml. ⁽⁴⁷⁾



Figura 5. Escala de Mac Farland

C. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Se basa en encontrar el número de microorganismos por unidad de volumen, hasta asegurar que después de la incubación se obtenga un resultado cuantificable.

Las diluciones se realizaron con el extracto etanólico, elegido por su porcentaje, como se muestra en la tabla 2. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas para las bacterias.

Una vez finalizado la incubación, se observó la turbidez, se determinó del punto de quiebre y se anotaron los resultados según las tablas realizadas (Ver Tabla 2). Este procedimiento se repitió para cada cepa patológica estudiada, luego de la incubación se observó los tubos a partir del cual no había turbidez, es decir no hubo crecimiento, este tubo presentó la (CIM) indicando la concentración mínima del extracto de *Achyrocline alata* (Huirahuirá) que inhibió el crecimiento de la cepa patológica estudiada. ⁽⁴⁷⁾

Tabla 2. Esquema de diluciones del extracto etanólico para evaluar el efecto antimicrobiano

soluciones	Tubos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+
Inoculo 10⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0

Fuente: Elaboración propia.



Figura 6. Diluciones del extracto etanólico con cada cepa bacteriana

2.3.9. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Es la concentración donde la sustancia en investigación produce la muerte del 99.9% de las bacterias en estudio.

2.3.8.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA.

Se basa en sembrar en medio sólido los tubos inferiores a la Concentración Inhibitoria Mínima, lo cual determina la concentración mínima capaz de matar totalmente la bacteria.

Se preparó los agares selectivos para cada cepa en estudio: agar manitol salado y agar Mac Conkey, una vez autoclavado se procedió a plaquear en placa Petri estériles y se incubaron para verificar que el preparado esté libre de patógenos.

Una vez que el medio adquirió consistencia adecuada se procedió sembrar a partir de los tubos donde hubo punto de quiebre y no se observó turbidez.

Se dejó incubar por 24 horas a 37°C.

Se observó la inhibición o crecimiento microbiano, luego se procedió a indicar el punto de ruptura en las placas donde no hubo crecimiento ^(47,51)

2.3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidos fueron tabulados y luego se procesaron con el paquete estadístico SPSS, el análisis estadístico se realizó utilizando los siguientes métodos: ANOVA, con la prueba específica de Tukey para establecer si los resultados presentan una diferencia honestamente significativa, esta prueba es un procedimiento exacto y potente y se emplea para comparar datos apareados y medias. También se utilizó la prueba t para establecer si existen diferencias significativas entre las variables. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$ los resultados son presentados en tablas.



CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta los resultados del trabajo motivo de investigación, donde se evalúa la actividad antimicrobiana de los extractos de *Achyrocline alata* (Huiru huiru), se realizó la extracción por el método de equipo Soxhlet, usando diferentes solventes de diferentes polaridades los cuales fueron etanol (polar), cloroformo (medianamente polar) y éter de petróleo (no polar), siendo el extracto etanólico de mayor rendimiento, luego observándose la presencia de halos de inhibición del extracto de *Achyrocline alata* (Huiru huiru).

3.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Según la metodología, el proceso de extracción se realizó con el equipo Soxhlet utilizando tres solventes (etanol, cloroformo y éter de petróleo).

TABLA 3.
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS
EXTRACTOS DE *Achyrocline alata* (Huirá huirá)

Solvente	Nº de extracciones	Vegetal	Extracto blando	Rendimiento (%)
Extracto Etanólico	Muestra 1	10g	2,319	23,19
	Muestra 2	10g	2,222	22,22
	Muestra 3	10g	2,137	21,38
Promedio				22.26±0.91
Extracto Clorofórmico	Muestra 1	10g	1,013	10,13
	Muestra 2	10g	0,762	7,62
	Muestra 3	10g	0,813	8,13
Promedio				8.63±1.33
Extracto Étéreo	Muestra 1	10g	0,499	4,99
	Muestra 2	10g	0,493	4,93
	Muestra 3	10g	0,386	3,86
Promedio				4.59±0.64

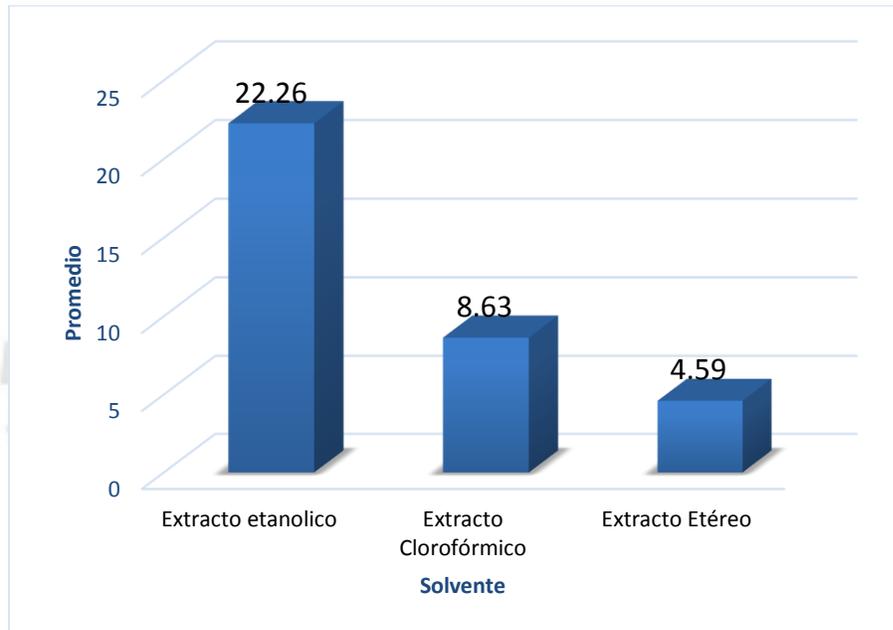
Fuente: Elaboración Propia

En la Tabla 3, se muestra los datos obtenidos para determinar el porcentaje rendimiento de los extractos de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) que corresponde al promedio por triplicado.

Se observa que la extracción con etanol presenta mayor rendimiento con un valor de 22.26 ± 0.91 , seguido por la extracción de cloroformo con un valor de 8.63 ± 1.33 y finalmente, con éter de petróleo se obtuvo porcentaje menor con un valor de 4.59 ± 0.64

GRÁFICO 1.

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Achyrocline alata* (Huirá huirá)



Fuente: Elaboración Propia.

En el gráfico 1, se observa que el mayor rendimiento fue el extracto etanólico con un valor de 22.26%. Existen referencias bibliográficas donde se indica que el extracto etanólico presentó mayor rendimiento de *Rivina Humilis* (Flor blanca) donde se evaluó mediante el mismo método del Soxhlet, lo cual corrobora los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación. Según Alvarado la obtención del porcentaje de rendimiento del extracto metanólico de las hojas de (Huirá huirá) obtenido por el método del Soxhlet fue de 29.41 en cambio con el método de percolación fue de 19.72 ^(32,37)

3.2. MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

Después de la obtención de los extractos se realizó el análisis cromatográfico de capa fina y se presentan los siguientes resultados:

3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.2.1.1. IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS

Para la identificación de terpenos se utilizó una fase móvil de tolueno: acetato de etilo (5:5) y como revelador a Liebermann - Burchard.

La placa cromatografía se observa colores característicos que pertenecen a la presencia de terpenos, bajo la luz UV a 360 nm presenta fluorescencia rosado-lila a azul (Ver Figura 8) con un resultado Rf igual a 0.30, 0.4, 0.45, 0.5.

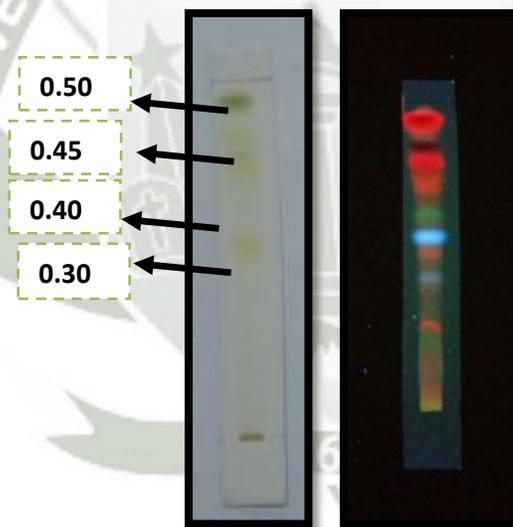


Figura 7. Luz visible **Figura 8.** Con revelador y luz UV a 360nm

Según Ávila M. (2013), presenta el estudio de la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae), colectada en el páramo del nevado del Tolima, la cual cuenta con estudios químicos y

farmacológicos, al igual que muchas otras especies de este ecosistema donde se realizaron análisis fotoquímicos a las porciones de mayor bioactividad obtenidas durante todo el proceso. Se observa que la acción antibacteriana se incrementa al aumentar la simplicidad química del extracto y que terpenos y flavonoides están relacionados con la actividad antibacteriana. ⁽³⁶⁾

3.2.2. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Para la identificación de taninos se utilizó una fase móvil de metanol y agua (9:1) y como revelador preparación de reactivo de FeCl_3 al 1 % en etanol.

La placa de cromatografía se observa colores característicos (ver Figura 9,10) que pertenecen a la presencia de taninos, bajo la luz UV a 360 nm presenta fluorescencia de color azul a verde claro con un resultado R_f igual a 0.84, 0.75, 0.68, 0.67. ⁽³⁶⁾

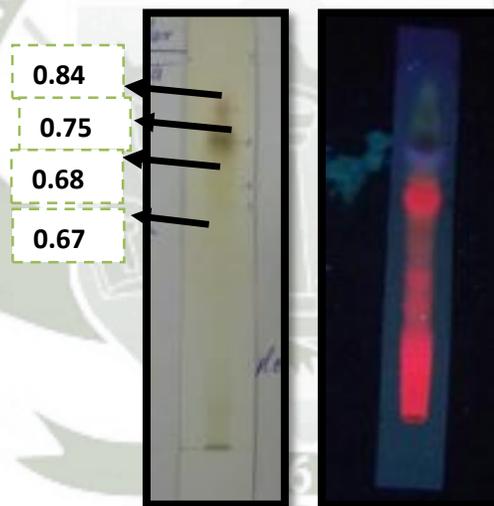


Figura 9. Luz visible

Figura 10. Con luz UV a onda larga

Según estudios registrados la combinación de ensayos colorimétricos y técnicas cromatográficas permite obtener suficiente información sobre el perfil de polifenoles de *E. giganteum*. Como resultado, se determinó la presencia de cianidina y pelargonidina, provenientes de los taninos condensados procianidina y

propelargonidina, respectivamente las identidades de éstos compuestos fueron asignadas teniendo en cuenta sus comportamientos cromatográficos (valores de Rf) frente a testigos puros y por comparación con bibliografía específica.

También se realizaron los estudios de espectroscopía UV-visible, que permitieron obtener los espectros característicos para cianidina y pelargonidina. Siendo glucósidos fenólicos los cuales tienen efectos antimicrobianos, antisépticos urinarios. ⁽³⁶⁾

3.2.3 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la identificación de flavonoides se utilizó una fase móvil tolueno: acetato (5:5), y como revelador preparación de reactivo teniendo como revelador al $AlCl_3$ al 1% etanol.

La placa cromatográfica se observa colores característicos (Ver Figura 11,12) que pertenecen a la presencia de flavonoides, bajo la luz UV a 360 nm presenta fluorescencia de color verde amarillo a azul con un resultado Rf igual a 0.66, 0.67, 0.68, 0.91. ⁽³⁶⁾

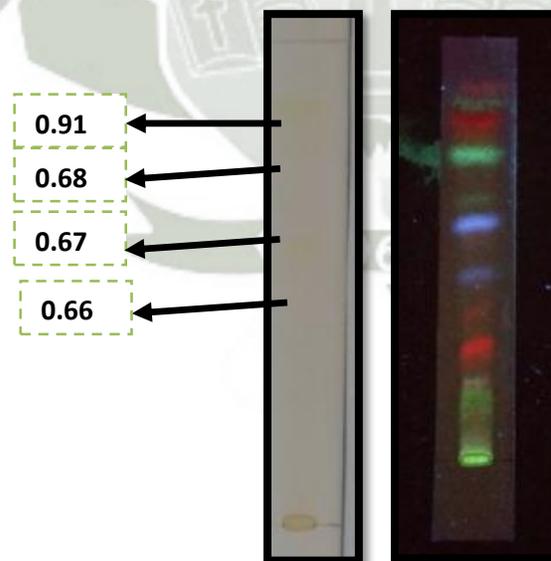


Figura 11. Luz visible

Figura 12. Con revelador UV onda larga

Según bibliografía, teóricamente mencionados en el libro de “Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales” cuyo autor es Olga Lock de Ugaz, donde se menciona que los flavonoides intensifican o cambian de color luego de la exposición con vapores de amoniaco, si se ponen amarillas es indicativo de la presencia de flavonas y/o flavonoles, si viran de amarillo a rojo hay presencia de chalconas y auronas. ⁽³⁷⁾

3.2.4 IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

Para la identificación de alcaloides se utilizó una fase móvil cloroformo: metanol (9:1) y como reactivo de Dragendorff. La placa cromatográfica se observa colores (ver Figura 13,14) que pertenecerían a alcaloides, bajo la luz UV a 360 nm presenta color celeste a amarillo, los cuales fueron tratadas con el agente revelador debiendo aparecer manchas naranjas intensa a marrones, con un resultado no coincidente.



Figura 13. Luz visible

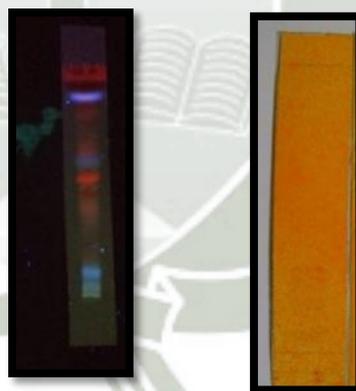


Figura 14. Con revelador luz UV onda larga

3.3. PROCESAMIENTO DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

3.3.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN

A. IDENTIFICACION DE *Staphylococcus aureus*.



Figura 15. Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*

TABLA 4. CUADRO RESÚMEN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*.

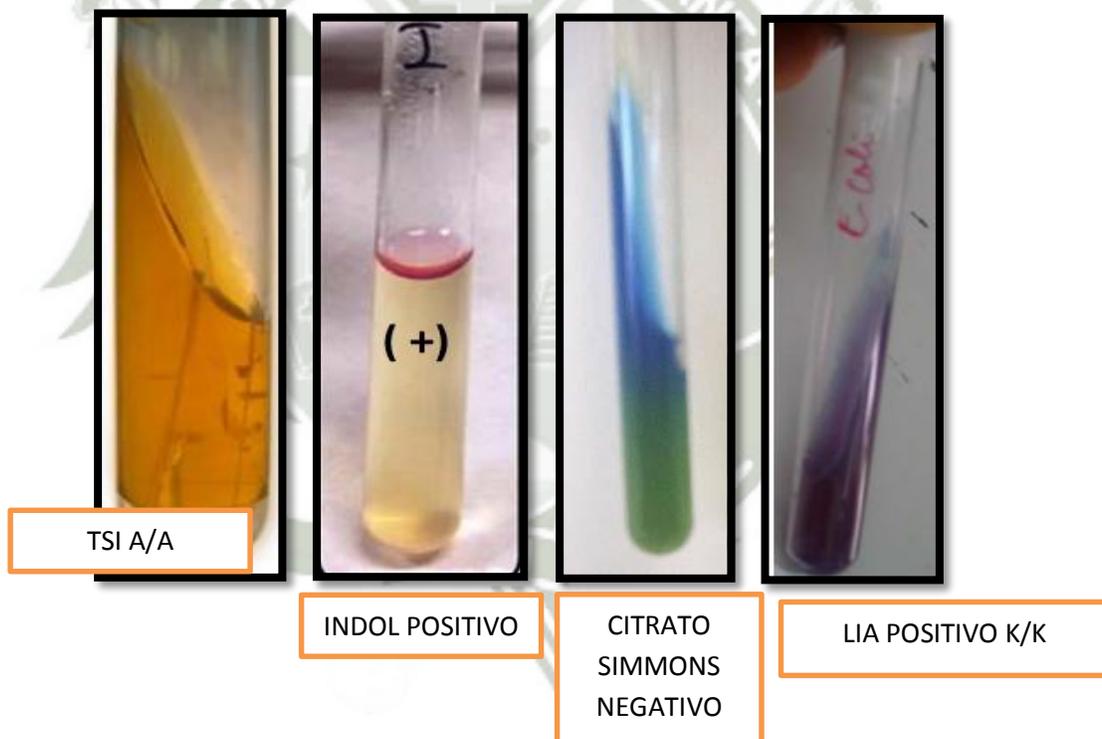
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Manitol Salado	Fermentación de manitol
Prueba de catalasa	Positivo
Prueba de Coagulasa	Positivo
Coloración Gram	Cocos Gram positivos, forma de racimos

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 4. Primero se realizaron las pruebas para cepas de *Staphylococcus aureus*: El agar manitol salado, es un medio de cultivo selectivo para la

identificación de *Staphylococcus aureus*, se observó la degradación del manitol que es un carbohidrato, hizo cambiar de color al indicador rojo de fenol a color amarillo lo cual indicó la acidificación del medio por el consumo del carbohidrato. (Ver Figura 15). La enzima que estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de esta enzima, al observar formación de grumos en el portaobjeto nos indica que la reacción es positiva (Ver Figura 15). La prueba de catalasa es positiva cuando hay una rápida aparición de burbujas de gas o efervescencia (Ver Figura 15).

B. IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*





AGAR MAC CONKEY

Figura 16. Pruebas de identificación para *Escherichia coli*

TABLA 5. CUADRO RESÚMEN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

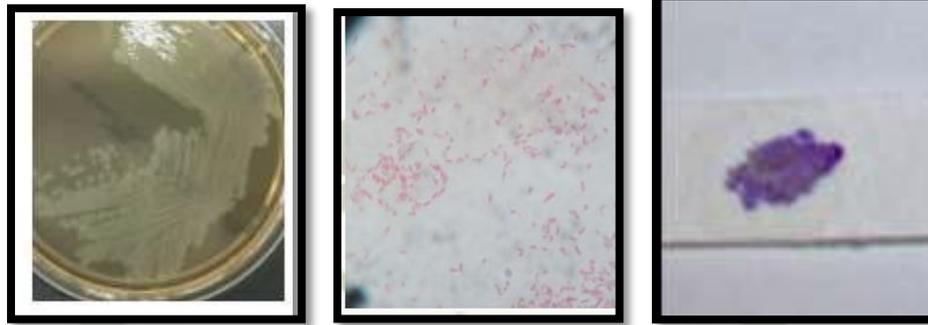
<i>Escherichia coli</i>	
Agar Mac conkey	Colonias rojas, fermenta lactosa
TSI	A/A + - Lactosa (+) Sacarosa (+) Glucosa (+) CO ₂ (+) H ₂ S (-)
LIA	K/K - Lisina (+) Descarboxilación (+) Desaminación (-) H ₂ S (-)
Caldo peptonado INDOL	Positivo
Prueba de Rojo de Metilo	RM (+)
Voges Proskauer	VP (-)
Citrato de Simmons	Negativo
Coloración Gram	Bacilo Gram negativo

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5. La bacteria *Escherichia coli* es un microorganismo Gram negativo, esta enterobacteria creció selectivamente en el Agar Mac Conkey, formando

colonias rojas lo que nos indicó que estuvo fermentando el carbohidrato. Otra prueba es la Triple Azúcar de Hierro (TSI) la cual nos dió como resultado el viraje de color de rojo a amarillo por la acidificación del medio por el consumo de los carbohidratos presentes en este, lo cual se expresa con los símbolos de A/A, porque el pico y el fondo del tubo cambiaron de color (Ver Figura 16). La prueba de Agar Lisina Hierro (LIA) prueba específica para bacteria que descarboxilan la lisina, esta prueba es en tubo en disposición pico/fondo, como la TSI, el microorganismo en estudio dio como resultado la descarboxilación de la lisina, esto se interpretó como K/K por el viraje del color purpura de bromocresol del medio al color violeta (Ver Figura 16). La prueba SIM, detectó la producción de Indol, movilidad, pero no de azufre en el medio por parte de la bacteria, nuestra bacteria no mostro formación de sulfuro ferroso lo cual lo diferencia de otras bacterias, es Indol positivo y presenta movilidad lo cual se ve por la turbidez del medio, y la formación del Indol por adición del reactivo de Kovacs formando un complejo de color rojo (Ver Figura 16). Con la prueba de rojo de metilo – Voges Proskauer se determinó la capacidad de la bacteria de fermentar la glucosa por diferentes vías, nuestra bacteria fermentó la glucosa para formar ácido, por tal motivo es positivo para rojo de metilo y negativo para Voges Proskauer porque al degradar la glucosa en ácido no forma la acetoína que daría un medio neutro (Ver Figura 16). Para la prueba de Citrato de Simmons nos dio como resultado un ensayo negativo ya que el citrato no es la única fuente de energía para nuestra bacteria. (Ver Figura 16)

C. IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomona aeruginosa*



AGAR MACCONKEY

BACILO GRAM NEGATIVO

OXIDASA POSITIVO

Figura 17. Identificación bioquímica de *Pseudomona aeruginosa*

TABLA 6. CUADRO RESÚMEN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomona aeruginosa*

<i>Pseudomona aeruginosa</i>	
Coloración Gram	Bacilos gramnegativos
Oxidasa	Positiva presenta una reacción de color.
Agar Mac conkey	No fermenta lactosa, olor a uvas

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 6 muestra que *Pseudomona aeruginosa* no es fermentadora de lactosa, se observa oxidasa positiva por el cambio de color, y agar Mac Conkey no fermentadora de lactosa.

3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS

Una vez obtenidos los resultados del análisis descriptivo del porcentaje de rendimiento de los 3 extractos se confirmó que el porcentaje de mayor rendimiento es del extracto etanólico con 22.26 % probablemente a que la *Achyrocline alata* (Huiria huiria) tenga mayor cantidad de compuestos polares, a los cuales se identificaron por cromatografía de capa fina (CCF) obteniendo como resultado la presencia de terpenos, taninos y flavonoides, que probablemente sean responsables del efecto antimicrobiano. Con los microorganismos debidamente identificados bioquímicamente, se procedió a determinar el efecto antimicrobiano del extracto de *Achyrocline alata* (Huiria huiria) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*.

Este estudio empezó con la determinación de la actividad antimicrobiana preliminar de los extractos de *Achyrocline alata* (Huiria huiria).

3.3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD MICROBIANA POR EL MÉTODO HOYO – PLACA - CULTIVO

En la tabla N° 7, se muestran los resultados preliminares de la sensibilidad que tienen los microorganismos frente a los extractos etanólicos, clorofórmicos y etéreos de *Achyrocline alata* (Huiria huiria).

TABLA 7. RESULTADOS PRELIMINARES DE LA SENSIBILIDAD MICROBIANA A LOS EXTRACTOS DE *Achyrocline alata* (Huiru huiru) POR EL MÉTODO HOYO PLACA.

EXTRACTO	Halos de inhibición (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Etanólico	18.90	11.00	10.00
Clorofórmico	10.20	10.00	10.00
Éter de petróleo	10.00	10.00	10.00

Fuente: Elaboración propia.

Según el análisis de los diámetros de halos de inhibición en la bacteria *Staphylococcus aureus* la aplicación del extracto etanólico presenta un promedio de 18.9 en comparación con los extractos clorofórmico y etéreo con 11 y 10 respectivamente. Por lo tanto, considerando los resultados del estudio preliminar demostró que el extracto etanólico solo tuvo efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, más no mostró ningún efecto sobre la bacteria *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

3.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Achyrocline alata* (Huiru huiru)

3.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE *Staphylococcus aureus*.

Se procedió a la determinación de la (CIM) mediante el método en tubos empleando el extracto etanólico previamente seleccionado por su mayor rendimiento y su identificación de compuestos. La evaluación se realizó con la bacteria *Staphylococcus aureus*.

**TABLA 8. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) PARA
*Staphylococcus aureus***

Características	Tubos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+	
Inoculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	1
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0	0

Incubar a 37°C por 24 horas

Observación de turbidez											mg/ml	
Cepa bacteriana 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	70
Cepa bacteriana 6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	70
										X		78

Fuente: Elaboración Propia.

Dónde: (+) tubo con crecimiento bacteriano, (-) tubo sin crecimiento.

En la tabla 8. Se observan los resultados de la (CIM) de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, para la bacteria 5 y 10 el punto de corte se encuentra entre los tubos 4 y 5 dando como concentración inhibitoria mínima 70 mg/ml. Mientras que para

las bacterias 1,2,3,4,6,7,8,9 el punto de corte se encuentra entre los tubos 3 y 4 dando como concentración mínima inhibitoria 80 mg/ml.

**TABLA 9. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) PARA
*Escherichia coli***

Características	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inoculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Incubar a 37°C por 24 horas

Observación de turbidez										
Cepa bacteriana 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cepa bacteriana 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cepa bacteriana 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia.

Dónde: (+) tubo con crecimiento bacteriano, (-) tubo sin crecimiento

En la tabla 9. Se observan los resultados de la (CIM) de diferentes cepas de *Escherichia coli*, para la bacteria 3 y 6 el punto de corte se encuentra en el tubo 10 dando como (CIM) 10mg/ml, no presenta actividad antimicrobiana.

**TABLA 10. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) PARA
*Pseudomona aeruginosa***

Características	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inoculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Incubar a 37°C por 24 horas

Observación de turbidez										
Cepa bacteriana 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia.

Dónde: (+) tubo con crecimiento bacteriano, (-) tubo sin crecimiento

En la tabla 10. Se observan los resultados de la (CIM) de diferentes cepas de *Pseudomona aeruginosa*, no presenta actividad antimicrobiana.

3.4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DE *Staphylococcus aureus*.

Se procedió a la determinación de la (CBM) mediante método de siembra en placas. La evaluación fue realizada para la bacteria *Staphylococcus aureus*, obteniéndose el siguiente resultado.

TABLA 11. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) PARA *Staphylococcus aureus*

Características	Tubos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+	
Inoculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0	

Incubar a 37°C por 24 horas

Observación de turbidez											mg/ml	
Cepa bacteriana 1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Cepa bacteriana 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
Cepa bacteriana 10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
											X	88

Fuente: Elaboración Propia.

Dónde: (+) placa con crecimiento bacteriano, (-) placa sin crecimiento

En la tabla 11. Se puede observar que para las bacterias 5 y 10 el punto de corte se encuentra entre los tubos 4 y 5 dando como Concentración Bactericida Mínima 80 mg/ml.

Mientras que para las bacterias 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 el punto de corte se encuentra entre los tubos 3 y 4 dando como Concentración Bactericida Mínima (CBM) 90 mg/ml.

Es probable que la mayor capacidad antimicrobiana de (Huirá huirá) se deba a la presencia de ciertos compuestos químicos como los taninos y flavonoides, componentes que presentan actividad antimicrobiana. Según Cartaya (2001) refiere que muchos flavonoides presentan una actividad antifúngica muy considerable y que constituyen verdaderas barreras frente a la penetración de los hongos patógenos. ⁽³²⁾

Al respecto otros estudios no reportan datos referente de la actividad antimicrobiana de la planta (Huirá huirá), sin embargo, podemos comentar que Campos (2006), hace mención de que la mayor resistencia de las bacterias Gram positivas en relación a las Gram negativas puede deberse a que presentan una cápsula que las protege contra agentes antibacterianos la cual varía según las especies, y por la pared celular formada por 40 capas de mureína y presencia de ácido teicoico a diferencia de las bacterias Gram negativas que no presentan ácido teicoico en su estructura y tiene una red de mureína de una sola capa en su pared celular. ⁽³³⁾

En la investigación realizada por Calla (2016) encontraron que el extracto etanólico de propóleos presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y una limitada contra bacterias Gram-negativas, esta actividad lo atribuyen el alto contenido de flavonoides. Obtuvieron como resultado una CIM de 100 mg/ml y CBM 110 mg/ml demostrando el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

Comparando con el resultado del presente trabajo de investigación, el extracto etanólico de (Huirá huirá) se encontró una CIM de 78 mg/ml y CMB 88 mg/ml aproximadamente casi similar a la estudiada por Calla. ⁽³⁴⁾

**TABLA 12. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) PARA
*Escherichia coli***

Características	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inoculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Incubar a 37°C por 24 horas

Observación de turbidez										
Cepa bacteriana 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia.

Dónde: (+) tubo con crecimiento bacteriano, (-) tubo sin crecimiento

En la tabla 12. Se observan los resultados de la (CBM) en diferentes cepas de *Escherichia coli*, no presenta actividad antimicrobiana. Según Centurión H. (2013), en su investigación, buscó alternativas para la prevención y tratamiento de infecciones de origen alimentario, usando extractos crudos de dos palmas (*Astrocaryum mexicanum* Liebm. ex Mart. Y *Chamaedorea cataractarum* Mart) contra *Escherichia coli*, *Salmonella*

typhimurium y *Bacillus cereus*. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó mediante el método de dilución en caldo y la concentración mínima bactericida (CMB) sembrando las diluciones sin turbidez para observar la presencia de colonias bacterianas, encontrándose que los extractos etanólicos de las especies estudiadas no presentaron una (CMI) ni (CMB) a la mayor concentración probada (200mg/mL).⁽⁴²⁾

**TABLA 13. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) PARA
*Pseudomona aeruginosa***

Características	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inoculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Extracto (200mg/ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo peptonado (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Vol Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. final (mg/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Incubar a 37°C por 24 horas

Observación de turbidez										
Cepa bacteriana 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa bacteriana 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia.

Dónde: (+) tubo con crecimiento bacteriano, (-) tubo sin crecimiento

En la tabla 13. Se observan los resultados de la (CBM) en diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, no presenta actividad antimicrobiana.

P. aeruginosa es naturalmente resistente a la mayoría de las penicilinas, las cefalosporinas de primera, segunda y muchas de las de tercera generación. Esta resistencia basal se debe a la poca permeabilidad de su membrana externa (mucho menor que la de las enterobacterias), a la existencia de varios sistemas de expulsión activa que eliminan los antimicrobianos que alcanzan el interior del microorganismo y a la producción de una beta-lactamas. Las cepas de *P. aeruginosa* son intrínsecamente resistentes a estos β -lactámicos, por lo tanto, se elevada resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos facilita su capacidad devastadora. La aparición de cepas multirresistentes está relacionada con mayor frecuencia de bacteriemia secundaria y muerte. ^(43,44,45)



CONCLUSIONES

1. La actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) tiene efecto frente a *Staphylococcus aureus*, se evidenció la resistencia a *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.
2. Se obtuvo los extractos etanólico, clorofórmico y éter de petróleo de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) por el método de Soxhlet, siendo el de mayor rendimiento el extracto etanólico en un 22.26% y de menor rendimiento el extracto etéreo con un 4.59 %.
3. Se identificaron los grupos de metabolitos secundarios como son terpenos, taninos, flavonoides, evidenciados por Cromatografía de capa fina (CCF).
4. Se determinó que el extracto etanólico de *Achyrocline alata* (Huiru huiru) muestra un efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, tiene una Concentración Inhibitoria Mínima de 78 mg/ml y la Concentración Bactericida Mínima de 88 mg/ml. Además, para *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* no presenta actividad.

SUGERENCIAS

1. Profundizar los estudios experimentales en animales de laboratorio para valorar la efectividad, dosis terapéuticas y toxicidad que pueda presentar el extracto de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) en el caso del uso terapéutico en la población.
2. Realizar estudios para evaluar la actividad antibacteriana por vía tópica en animales de experimentación del extracto de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) sobre *Staphylococcus aureus*. Así como su formulación para la preparación de formas farmacéuticas.
3. Continuar estudios complementarios con la finalidad de evaluar los otros efectos terapéuticos atribuibles en la medicina tradicional a *Achyrocline alata* (Huirá huirá).

BIBLIOGRAFÍA

1. Villagran Carolina y colaboradores. Ciencia indígena de los andes del Norte de Chile. Editorial Universitaria S. A. Santiago de Chile. Primera edición. 2004. 192 p.
2. Severin C. y cols. Efecto de algunos fitoreguladores y estudio histológico sobre la regeneración in vitro de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D C.Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas Vol. 7 (1). 2008.
3. Reynel Rodríguez, Carlos. Plantas para leña en el Sur Occidente de Puno. Facultad De Ciencias Forestales De La Universidad Nacional Agraria-La Molina; 1988.
4. Muñoz Orlando y colaboradores. Plantas medicinales de uso en Chile. Editorial Universitaria. 2da edición. Chile.
5. Femenía Hugo José. Flora de Famantina. 2011. 151p.
6. Koneman Elmer W. y colaboradores. Diagnóstico Microbiológico. 6ta edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2008.
7. T. Stuart Walker. Microbiología. Editorial McGraw-Hill. primera edición. México. 2000. 136p.
8. Tibavizco Diego y colaboradores. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Rev. Biomédica Vol 27 N°2 Bogotá. 20017.
9. Lopardo Horacio y colaboradores. Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. Volumen I. 12p.
10. Romero C. R. y Herrera B. I. síndrome diarreico infeccioso. Editorial Medica Panamericana. México. 2002. 95p.
11. Puerta García y F. Mateos Rodríguez. Enterobacterias. Rev Médica. España. 2010.
12. J.A. García -Rodríguez y J.J. Picazo. Microbiología médica general. tema 19. Harcourt Brace. España. 1998. 233p.
13. Murray R. Patrick. Microbiología Médica. 6ta edición. España: Mosby. 2011.
14. Farreras Rozman. Medicina Interna. 17 ed. Elsevier S.A. España. 2012.
15. Geo F. Brooks y colaboradores. Microbiología médica. Editorial el Manual Moderno. 17va edición. México. 2001. 286p.

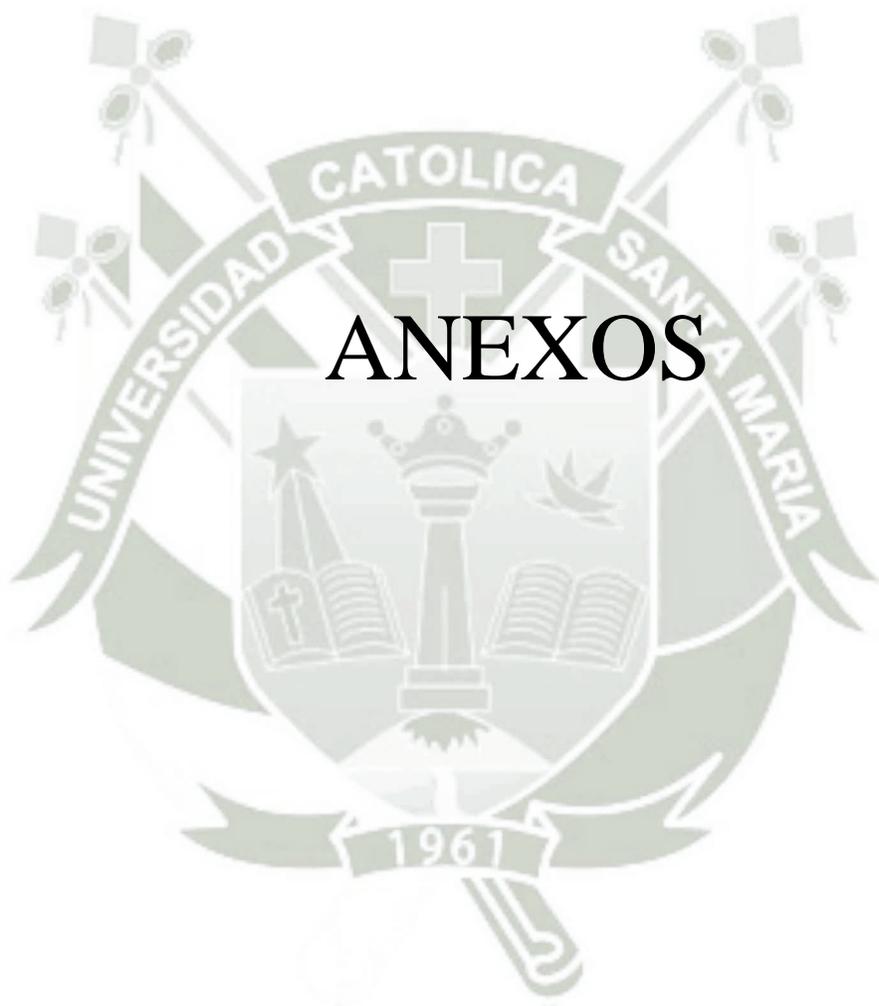
16. García J. A. y colaboradores. Compendio de Microbiología Médica. Ediciones Harcout. España. 190p.
17. Ingraham John L. y Catherine. Introducción a la microbiología. Editorial reverté. Volumen 2. España. 1998.
18. Mendoza P.N. Farmacología médica. Editorial Médica Panamericana. México. 2008.
19. Lamarque Alicia y colaboradores. Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Técnicas extractivas. 1ra edición. Argentina. Editorial Encuentro. 2008. 90p.
20. Canosa María del Pilar. Desarrollo de la Metodología Analítica. Facultad de Química USC. 38p.
21. Casado Eva María y colaboradores. Operaciones básicas de laboratorio. Ediciones paraninfo. 1ra edición. España. 2012. 170p.
22. Hans Beyer y colaboradores. Manual de Química Orgánica. Editorial Reverté. Barcelona. 9 p.
23. Fieser Louis. Experimentos de química orgánica. Editorial Reverté. Barcelona. 2004.
24. Albella J. M. y colaboradores. Introducción a la ciencia de materiales. Editorial CSIC. Madrid. 1993.
25. Guarnizo Anderson y colaboradores. Experimentos de Química Orgánica. Ediciones Elizcom. Colombia. 71p.
26. Castillo García B: Métodos analíticos y técnicas instrumentales empleadas en el aislamiento, identificación y cuantificación de los P.A presentes en plantas medicinales. 2000.
27. Lamarque Alicia, Maestri Damian. Fundamentos Teórico Prácticos de Química Orgánico.
28. Guarnizo Anderson, Martínez Y. Pedro N. Experimentos de Química Orgánica con Enfoque en Ciencias de la Vida.
29. Abbott D. Y Andrews R. S., Introducción a la Cromatografía, 3a ed., Alhambra, Madrid, 1970.
30. Alonso J., Tratado de fitofármacos y Nutraceúticos tratado, Buenos Aires Argentina, Corpus 2da Edición. 2004. 564-567p.

31. Rodríguez-Lira G. Determinación del efecto antibacteriano in vitro de la *rivina humilis* “flor blanca” sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Peudomona aureginosa*. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013.
32. Cartaya. O. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. La Habana. Cuba. Vol 22.2001. 5-14 p.
33. Campos s. Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, (romero) frente a bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans*. Arequipa-Perú. 2006.
34. Calla – Quispe. Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del propolis “propóleos” de tres regiones del sur del Perú sobre el crecimiento de *Cándida Albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Arequipa. UCSM. 2016.
35. Rodríguez Cavallini E. Bacteriología general. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&dq=tincion&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiKtO7WgcPWAhUC5CYKHbi3DOIQ6AEIKDAB#v=onepage&q=tincion&f=false>
36. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *equisetum giganteum l.* (cola de caballo) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Arequipa-2015.
37. Alvarado Nayra. Estudio Fitoquímico preliminar y actividad antioxidante de las hojas de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) y su relación con su contenido de compuestos fenólicos totales. UCSM. Arequipa. 2014.
38. Retta Daiana y colaboradores. Industrial Crops and Products Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. 2012.
39. Zampieron Rafaela y colaboradores. Perfiles comparativos de *Achyrocline alata* DC. y *A. Satureoides* DC. Asteraceae, aplicando HPLC DAD-MS. Universidade Federal Do Parana. Laboratorio De Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharcognosy. 2002.
40. Rengifo Patricia. Medicina tradicional. Huirá huirá. Lima. 2010. Disponible en: <http://pattypao-medicinatradicional.blogspot.pe/2010/09/huirá-huirá.html>

41. Otazu Iosu. Influencia de la temperatura y tiempo de secado en la calidad de hojas de *Cymbopogon citratus*. Brasil.2010.
<http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/2263/577279.pdf?sequence=1>
42. Centurion Dora. Evaluación de la actividad antibacteriana de los Extractos Hexánico de las inflorescencias de palmas comestibles de la Sierra de Tabaco, México. Polibotánica. 2013.
43. *Pseudomonas Aeruginosa*, patógeno nosocomial en expansión. Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica. boletín epidemiológico de infecciones intrahospitalarias España. marzo 2012.
44. Fernández-Cuenca, Felipe. López-Cortésa Luis e. Rodríguez-baño Jesús. “contribución del laboratorio de microbiología en la vigilancia y el control de brotes nosocomiales producidos por bacilos gramnegativos no fermentadores”. enferm infecc microbiol clin. 29 (supl 3):40-46. sevilla, españa. 2011. pág. 40-46.
45. Fariñas, María Carmen. Martínez-Martínez, Luis. “infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores”. Vol. 31. Núm. 06. Junio 2013 - Julio 2013. Pág. 403-409.
46. Córdova, Lizet. Determinación de la actividad antimicrobiana de las semillas de Carica papaya L: “PAPAYA” in vitro frente a las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. 2013
47. Mercedes Jave Márquez. MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA II Guía de Prácticas. Práctica N° 15. 2016.
48. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Nineteenth Informational Supplement, and CLSI document M100-S19. Wayne, PA, USA. 2
49. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul;48 (1):5–16.

50. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* Elsevier; 2016;6(2):71–9.
51. Li Y, Fabiano A, Chemat F. *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry.* 1st Ed. Cham: Springer; 2014. 1-71 p. (SpringerBriefs in Molecular Science).





ANEXO 1.

TINCIÓN DE GRAM

Fundamento

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos: Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglucano (también conocido como mureína). Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido. Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas diferencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglucano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero, por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglucanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea.

Técnica

1. **Tinción inicial:** las células se tiñen de color violeta, el cuales el colorante primario, en este paso todas las células se tiñen de morado
2. **Mordente:** se adiciona yoduro (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta y forma un complejo cristal violeta yoduro. Las células continúan de color morado.
3. **Decoloración:** se adiciona un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera a las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras.
4. **Contratinción:** se vuelve a teñir con safranina o fucsina, de manera que las bacterias Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de rosado fucsia según el colorante empleado, en tanto, las bacterias Gram positivas no se afectan con la contratinción permanecen moradas debido a la contratinción. ⁽³⁵⁾



Fig. Reactivos de Tinción gram

Procedimiento

- Hacer una extensión de la cepa en el portaobjetos, permitir que seque al aire. Se fija el extendido a través de la llama del mechero Bunsen.
- Colocar el extendido en un soporte para el teñido, cubrir la superficie con solución de cristal violeta, después de un minuto de exposición lavar con agua destilada.
- Cubrir el extendido con la solución de yodo – lugol para Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.

- Cubrir la preparación con unas pocas gotas del decolorante alcohol – acetona por 10 segundos o menos.
- Lavar suavemente con agua y colocar sobre la superficie safranina de contraste durante un minuto, lavar con agua corriente, secar y observar en 100x (con aceite de Inmersión).

Interpretación:

Los microorganismos que presenten una coloración violeta al ser vistas al microscopio serán Gram positivas y por el contrario las que presentan coloración roja o rosa serán Gram negativas.



ANEXO 2.
PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR N° 5 DE LA ESCALA DE MC.
FARLAND

Composición:

- Cloruro de bario 0.5mL
- Ácido sulfúrico 99.5mL

Reacción:



Procedimiento:

Para preparar la suspensión estándar se agrega 0.5mL de una solución de cloruro de bario 0.048 M a 99.5ml de una solución de ácido sulfúrico 0.36 N.

Cálculos

- Para 100 mL de cloruro de bario 0.048 M

$$\frac{0.048 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} (100 \text{ mL}) \frac{208.3 \text{ g } Cl_2Ba}{1 \text{ mol}} = 0.99984 \text{ g } Cl_2Ba \text{ en } 100 \text{ mL}$$

- Para 1000 mL de ácido sulfúrico 0.36N

$$\frac{0.36 \text{ Equ}}{1000 \text{ mL}} (1000 \text{ mL}) \frac{98.08 \text{ g}/2}{1 \text{ mol}} \frac{1 \text{ mL}}{1.84} = 9.59478 \text{ mL de } H_2SO_4 \text{ al } 96\%$$

Para llevar al 100%

9.49478-----96%

X-----100%

X=9.99mL de H₂SO₄ en 1000mL

ANEXO 3.

AGAR MUELLER HINTON

Fundamento

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano, presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fórmula (en gramos por litro)

- | | | |
|----------------------------|----------|---------------------|
| - Infusión de carne | 300.0 g. | |
| - Peptona ácida de caseína | 17.5 g. | |
| - Almidón | 1.5 g. | |
| - Agar | 15.0 g. | pH FINAL: 7.3 ± 0.1 |

Preparación

- Suspender 37 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos.
- Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar a 45°-50°C y distribuir en placas de Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

ANEXO 4.

AGAR MANITOL SALADO

Se emplea para el aislamiento selectivo y recuento de Estafilococos patógenos en productos lácteos, cármicos, marinos y otros productos alimenticios. También en productos farmacéuticos y cosméticos.

Fundamento

El efecto inhibitor se debe a la alta concentración de Sodio Cloruro del medio. Con la fermentación de la D (-)-Manita se genera ácido que ocasiona el viraje del rojo de fenol al amarillo, permitiendo así una mayor claridad en el momento de establecer el diagnóstico, ya que la mayoría de los Estafilococos patógenos fermentan este azúcar.

Composición

- | | |
|---------------------|-----------|
| - Extracto de carne | 1.0 |
| - Pluripeptona | 10.0 |
| - d-Manitol | 10.0 |
| - Cloruro de sodio | 75.0 |
| - Agar | 15.0 |
| - Rojo de fenol | 0.025 |
| - Agua Destilada | 1000.0 MI |

Preparación

Pesar 115g del medio de cultivo en 1000 mL de agua destilada, disolver y hacer hervir hasta que el medio este traslucido. Luego se Autoclavar por 15 minutos a 121°C. ⁽³⁵⁾

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Staphylococcus aureus* en agar Manitol Salado por agotamiento en estría en placa.

- Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.
- Manitol positivo fermentador, se produce cambio de coloración del medio a amarillo por la producción de ácido. Manitol negativo no fermentador, el medio permanece de color rojo.

Interpretación

Los microorganismos que degradan el manitol salado hacen virar el indicador rojo fenol a amarillo.



ANEXO 5.

EMB (EOSINA AZUL DE METILO)

Se emplea para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes. Con este medio se puede identificar *Escherichia coli*.

Fundamento

La eosina y el azul de metileno son productos que inhiben parcialmente el crecimiento de microorganismos gram-positivos, entre ellos los Estreptococos fecales. Además la combinación de azul de metileno y la eosina permite diferenciar los gérmenes lactosa positivos de los lactosa negativos.

Composición

- Eosina amarillenta	0.4 g	
- Azul de metileno	0.065 g	
- Lactosa	10.0 g	
- Peptona de gelatina	10.0 g	
- di-potasio Hidrogeno Fosfato	2.0 g	
- Agar	15.0 g	PH final: 7.1 ± 0.2

Preparación

Suspender 37.4g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobre calentar. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.⁽³⁵⁾

ANEXO 6.

AGAR MAC CONKEY

Fundamento

La presencia de las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas. La lactosa presente y el indicador rojo neutro permiten diferenciar los gérmenes fermentadores de este azúcar de aquellos que no lo hacen.

Composición

- Digerido pancreático de gelatina 17.0 g
- Digerido pancreático de caseína 1.5 g
- Digerido péptico de tejido animal 1.5 g
- Cloruro Sódico 5.0 g
- Agar 13.5 g
- Lactosa 10.0 g
- Sales biliares 1.5 g
- Rojo neutro 0.03 g
- Cristal violeta 0.001 g.

Preparación

Suspender 50 g en un litro de agua destilado hasta la dilución completa de la misma, hasta que presente transparencia; esterilizar en autoclave por 15 minutos. Evitar sobre calentar y dispersar en placas petri a razón de 20mL por placa. También se puede dispersar en tubo.

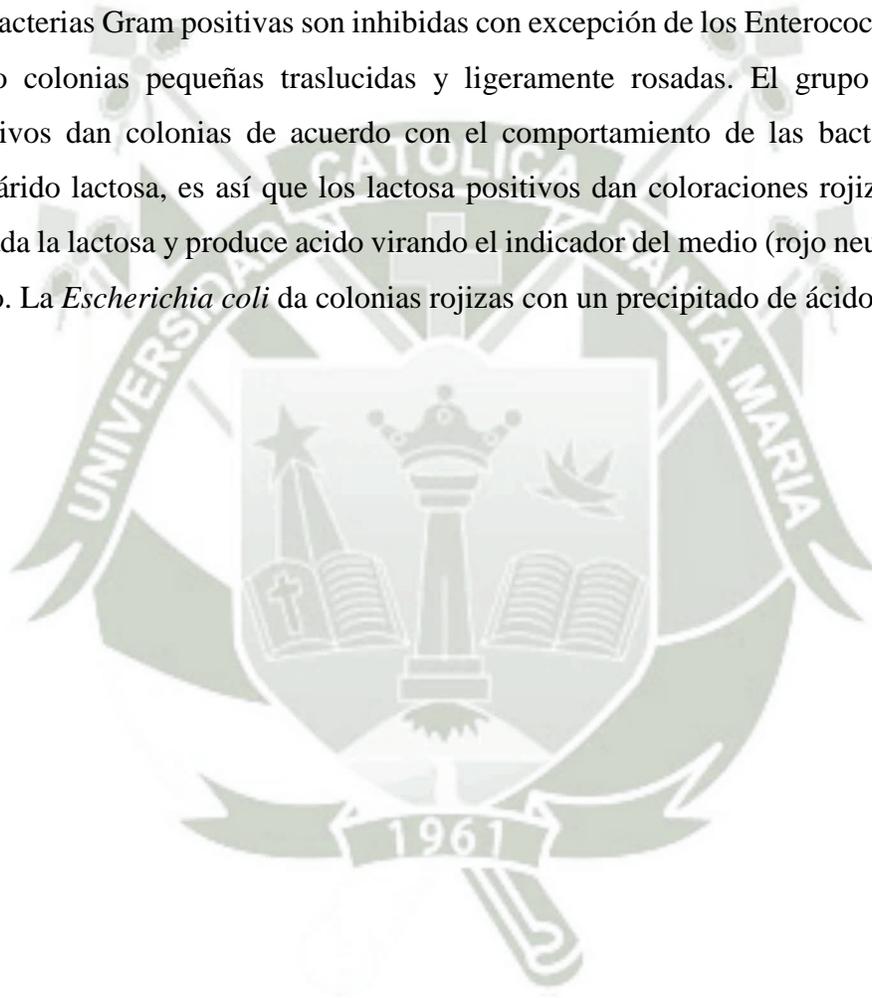
Procedimiento

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey en placa y se siembra por agotamiento en zigzag.

- Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.
- Las colonias se perciben de color rosado que indican que la bacteria *Escherichia coli* es fermentadora de lactosa.
- Produce ácido debido a que degrada la lactosa ocasionando el viraje del indicador rojo neutro a un color rosáceo.

Interpretación

Las bacterias Gram positivas son inhibidas con excepción de los *Enterococcus* que crecen dando colonias pequeñas traslucidas y ligeramente rosadas. El grupo de los Gram negativos dan colonias de acuerdo con el comportamiento de las bacterias frente al disacárido lactosa, es así que los lactosa positivos dan coloraciones rojizas, la bacteria degrada la lactosa y produce ácido virando el indicador del medio (rojo neutro) a un color rojizo. La *Escherichia coli* da colonias rojizas con un precipitado de ácidos biliares. ⁽³⁵⁾



ANEXO N° 7

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

1. PRUEBA DE COAGULASA

La coagulasa se halla presente en dos formas “libre y fija”, cada una de ellas posee propiedades que requieren el uso de técnicas separadas.

- a- **La coagulasa fija (portaobjetos):** Conocida como factor de aglutinación está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivo. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en el plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación. La cual se indica por la aparición de agregados visibles en el portaobjetos.

Procedimiento

- Con un asa de kolle en punta, coger del centro de la placa una colonia a investigar.
- Agregar 1 o 2 gotas de plasma humano o de conejo a un portaobjeto.
- Suspender el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado y observar si hay la aparición de grumos.

Interpretación

La rápida aparición de un precipitado granular o la formación de grumos aparece a los 30seg. Y se considera una reacción positiva.

- b. **Coagulasa Libre (Prueba en tubo):** Es una sustancia semejante a la trombina, que se halla presente en los cultivos de filtrados. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezclan con partes iguales de plasma, se forma un coagulo visible como consecuencia de los factores de coagulación del plasma.

Procedimiento

- En un tubo colocar 0.5ml de plasma.
- Con el asa de kolle en punta coger el centro de la placa una colonia a investigar.

- Mezclar por rotación suave del tubo, evitando remover o agitar el contenido.
- Colocar el tubo en la estufa a 37°C por 4 horas, hasta observar la formación de un coagulo visible. En caso de ser negativo deberá dejarse por 18-24 horas y observar.

Interpretación

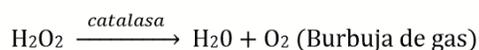
La reacción se considera positiva ante cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. Las bacterias fuertemente positivas pueden producir un coagulo en 1-4 horas. Por lo tanto, pruebas negativas a las 4 horas, deben observarse después de 18/24 horas de incubación. ⁽³⁵⁾



ANEXO N° 8.

2. PRUEBA DE CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado (Fe^{+3}) El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono.

**Técnica**

- Con un asa de kolle en punta colocar en el centro de la placa la colonia a investigar.
- Agregar 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno.
- Suspende el organismo y observar si hay aparición de burbujas debido al desprendimiento del oxígeno.

Interpretación

La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva. ⁽⁴⁶⁾

ANEXO N° 9.

CALDO PEPTONADO (INDOL)

El Indol es uno de los productos de degradación metabólico del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen los triptófanos son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de Indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de Indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos

Fundamento

La prueba del Indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs. La producción de Indol es útil para diferenciar *Escherichia coli* (positiva) de miembros del grupo Klebsiella – Enterobacter (la mayoría negativos).

Composición

- Peptona 20.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Agua destilada 1000 ml.

Preparación

Pesar 25 g del medio de cultivo y diluir en 1000 mL de agua destilada, llevar a ebullición, esterilizar en la autoclave y repartir 2mL por cada tubo de ensayo.

Composición del reactivo de KOVACS

- Alcohol amílico o isoamílico 150.0 mL
- P- dimetilaminobenzaldehído 10.0 g

- Ácido clorhídrico cc 50.0 mL

Procedimiento

Inocular el caldo triptófano con el organismo en estudio e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo. El desarrollo de un vivo color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y una prueba positiva.

Interpretación

La formación de un anillo de color rojo grosella indica una prueba positiva (+), en cambio, la formación de un anillo amarillo indica una prueba negativa (-).

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovacs y Ehrlich. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano.

ANEXO N° 10.

AGAR TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

Fundamento

Este medio como su nombre lo indica está compuesto de tres azúcares glucosa, lactosa y sacarosa. El color del medio recién preparado es rojo ladrillo (pH 7.4) contiene rojo fenol como indicador de pH y hierro para revelar a producción de hidrogeno sulfurado (H_2S). La acidez se manifiesta por el cambio al color amarillo y la alcalinidad al color rojo, simbolizándose la acidez (A) y la alcalinidad (K). Acides en el fondo del tubo (A) y alcalinidad en la parte inclinada (K) K/A significa que la bacteria fermenta la glucosa (K indica lactosa negativa).

En cambio, la fermentación de lactosa y/o sacarosa cambia todo el medio a amarillo A/A, la bacteria fermenta la glucosa y la lactosa. La presencia de gas (resquebrajamiento del medio) y la producción de H_2S (precipitado de dolor negro) en el medio se simbolizan de acuerdo a la intensidad de unas cuatro cruces.

Composición

- Peptona	15g
- Extracto de levadura	3g
- Extracto de carne	3g
- Proteasa de peptona	5g
- Glucosa	1g
- Lactosa	10g
- Sacarosa	10g
- Sulfato de hierro	0,20
- Cloruro sódico	5g
- Tiosulfato de sodio	0,30g
- Rojo fenol	0,024g
- Agar	12g

Preparación

Pesar 65 g para 1000 mL de agua destilada, llevar a ebullición hasta su completa disolución esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Repartir en tubos de ensayo y dejar solidificar en posición inclinada de tal forma que se obtenga pico y fondo.

Interpretación

K/A - +: Significa alcalinidad en la inclinación y acidez en el fondo (fermentación de glucosa), gas negativo y H₂S positivo en la proporción de 1+.

K/A + +: Significa, así mismo, fermentación de glucosa, gas positivo 2+ y H₂S positivo 4+. El color negro en este caso abundante, imposibilita observar el color amarillo del fondo y solo suponerlo.

A/A significa acidez del medio y por lo tanto fermentación de glucosa y lactosa.

Las bacterias que no fermenta los azúcares de TSI no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, en cambio pueden degradar las peptonas tanto aeróbica como anaeróbicamente. La simbolización K/N - - indica alcalinidad sin cambio gas y H₂S negativos.

Procedimiento

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* en agar TSI (pico – fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.

La degradación de los tres hidratos de carbono va a producir un pH ácido ocasionando el viraje del indicador rojo fenol a amarillo

ANEXO N° 11.

AGAR LISINA HIERRO (LIA)

Fundamento

Enterobacteriaceae pueden utilizar la lisina del medio LIA, por los mecanismos de descarboxilación, desanimación o bien ser negativos frente a este aminoácido. Para diferenciar estas reacciones el medio tiene en su composición glucosa y el indicador púrpura de bromocresol. El color del medio es ligeramente azulado (pH 6.7). La descarboxilación de la lisina produce alcalinidad en todo el medio. Por lo tanto, el color azulado se intensifica, simbolizándose K/K. Este tipo de reacción se considera como lisina positiva. La desanimación empieza en la parte inclinada, que cambia al color rojo ladrillo. El fondo del medio aparece amarillo, se interpreta por motivos prácticos como lisina negativa simbolizándose R/A.

Cuando no se produce ninguna de las dos reacciones descarboxilación o desanimación, el medio LIA se observa azulado en la parte inclinada y amarillo en el fondo por fermentación de la glucosa, esta reacción se simboliza K/A; a veces el medio puede presentarse amarillo en su totalidad, simbolizándose A/A. Estas dos lecturas se interpretan, asimismo, como lisina negativa.

En el caso que el color del medio LIA no haya variado sustancialmente a pesar del crecimiento bacteriano, se representara N/N pueden presentarse, porque la acidez, producto de la fermentación de la glucosa se neutraliza por la alcalinidad producida por la descarboxilación, o bien porque la bacteria no utiliza la glucosa.

En este último caso, la bacteria mostrará un LIA K/N y por lo tanto, no le corresponderá a Enterobacteriaceae.

Composición

- Peptona de carne 5.0 g
- Extracto de levadura 3.0 g

- Glucosa 1.0 g
- L-Lisinamonoclorhidrato 10.0 g
- Citrato amoniaco férrico 0.5 g
- Tiosulfato de sodio 0.04 g
- Púrpura de bromocresol 0.02 g
- Agar 15.0 g

Preparación

Pesar 32 g para 1000mL de agua destilada llevar a ebullición hasta su completa disolución esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Repartir en tubos de ensayo y dejar solidificar en posición inclinada de tal forma que se obtenga pico y fondo.

Procedimiento

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en agar LIA (pico – fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.

En el caso de la *Escherichia coli* encontramos que en el presente medio nos debe dar K/K-. Al producir la descarboxilación de la Lisina produciéndose cadaverina el indicador Purpura de Bromocresol va a retornar a su color purpura lo que se interpreta como lisina positiva.

ANEXO N° 12

PRUEBA DE ROJO DE METILO – VOGES PROSKAUER (RM–VP)

Fundamento

Una de las características taxonómicas que se utiliza para identificar los diferentes géneros de enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. Se conocen dos tipos generales la fermentación ácido – mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol. En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido acetona y succinato y los principales productos son el butanodiol, etanol, H₂ Y CO₂.

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo de viraje entre 6.0 (amarillo) y 4.4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácidos mixtos. El Acetil – metil – carbinol (o acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de α - naftol dando un color rojo – fucsia.

Composición

Caldo MRVP

Peptona 7.0 g, Glucosa 5.0 g., Fosfato dipotasico 5.0 g, Agua destilada 1000mL

Indicador de pH rojo de metilo

- Rojo de metilo 0.1 g en 300 mL de etanol a 95°C
- Agua destilada 200mL

Revelador Voges Proskauer

- Alfa – naftol (solución al 5% en etanol 95°)
- Solución de KOH al 40% en agua destilada

Preparación

Pesar 17 g del medio de cultivo y llevarlo a ebullición hasta que este traslucido, esterilizar en la autoclave por 15 min. Repartir en tubos de ensayo para su posterior uso.

Procedimiento

Inocular el caldo RMVP con un cultivo puro de no más de 24 horas del microorganismo en estudio. Incubar a 35°C durante 48 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1mL de caldo a un tubo limpio para Voges Proskauer. En el caldo restante revelar rojo metilo agregando unas 4 a 8 gotas del indicador rojo de metilo. Para revelar Voges Proskauer agregar 0.6 mL (10 gotas) de alfa-naftol al 5% y una gota de KOH al 40%. Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 min.

Interpretación

La prueba rojo de metilo es positiva si se desarrolla un color rojo estable, esto indica que la producción de ácido es suficientemente para producir el viraje del indicador y que el microorganismo fermento la glucosa por la vía de ácido mixto. Un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo. La prueba Voges Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo fucsia luego de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

ANEXO N° 13

AGAR CITRATO DE SIMMONS

Fundamento

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. La utilización de citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento del pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7.6.

Composición

- Fosfatodiácido de amonio 1.0 g
- Fosfato dipotásico 1.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Citrato de sodio 2.0 g
- Sulfato de magnesio 0.2 g
- Agar – Agar 15.0 g
- Azul de bromotimol 0.08 g
- Agua destilada csp. 1000.0 mL

Preparación

Pesar 25 g del medio de cultivo y llevarlo a ebullición hasta que este traslucido, esterilizar en la autoclave por 15 min. Repartir en tubos de ensayo para su posterior uso.

Procedimiento

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en agar Citrato de Simmons (pico-fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.

ANEXO N° 14

PROCEDIMIENTO REALIZADO EN EL TRANCURSO DEL TRABAJO
EXPERIMENTAL



Fig. Molienda de Huirahuirá

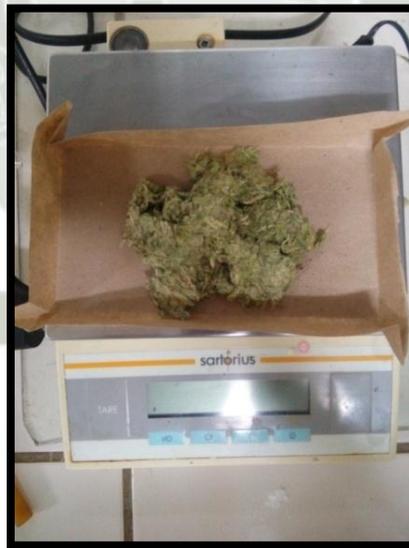


Fig. Pesado de muestra

ANEXOS N° 16

PROCEDIMIENTO REALIZADO EN EL TRANCURSO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

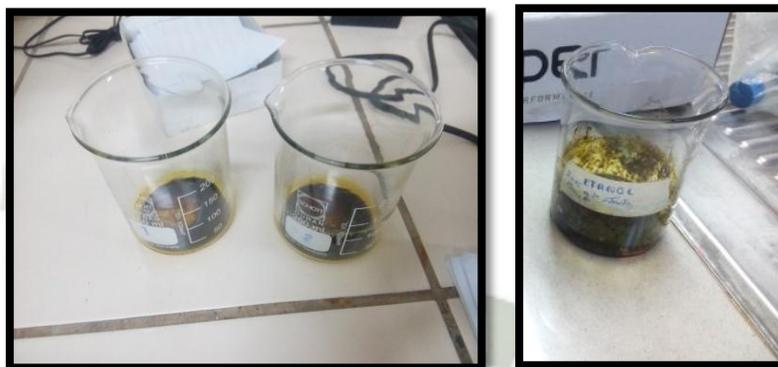


Fig. extracto etanólico, clorofórmico y étereo de *Achyrocline alata* (Huirá huirá)



Fig. Cuba cromatográfica con fase móvil



Fig. Preparación de los reveladores



Fig. Preparación de agares

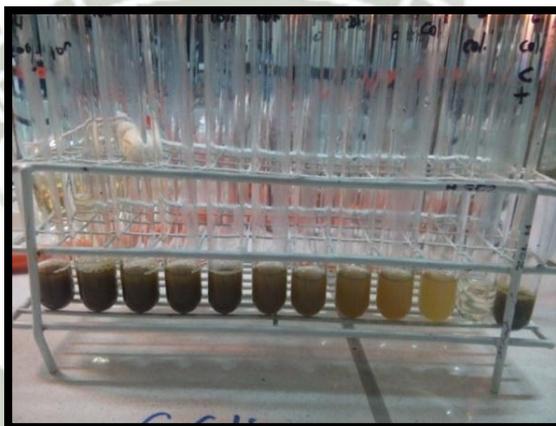


Fig. Concentración Inhibitoria Mínima, método de dilución en tubo

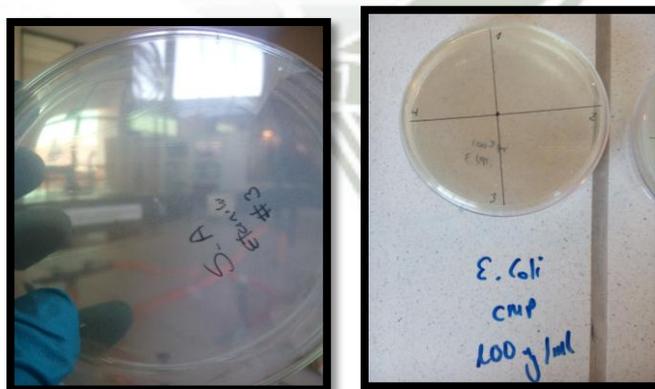


Fig. Concentración Bactericida Mínima, método de siembra en agar

ANEXO N° 17

PRUEBAS PRELIMINARES

**TABLA 14. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTO DE (Huiru huiru)
FRENTE A *Staphylococcus aureus***

Extracto	200	150	100	50
Étanólico	18.90±0.32	16.10±0.74	14.20±0.42	11.60±0.52
Clorofórmico	10.20±0.42	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
Éter de petróleo	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
F	2788,92	683,45	992.25	96.00
P	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

**TABLA 15. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE (Huiru huiru)
FRENTE A *Escherichia coli***

Extracto	200	150	100	50
Étanólico	11.00±0.67	10.40±0.52	10.00±0.00	10.00±0.00
Clorofórmico	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
Éter de petróleo	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
F	22.50	6.00		
P	P<0.05	P<0.05		

**TABLA 16. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE (Huiru huiru)
FRENTE A *Pseudomona aeruginosa***

Extracto	200	150	100	50
Étanólico	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
Clorofórmico	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
Éter de petróleo	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00

ANEXO N° 18

EQUIPOS DE LABORATORIO UTILIZADOS



Fig. Balanza Analítica (Adventurer)



Fig. Estufa (J.P. Selecta)



Fig. Microscopio óptico



Fig. Refrigerador

ANEXO N° 19

EQUIPOS DE LABORATORIO UTILIZADOS



Fig. Autoclave (Sturdy SA-260MA)



Fig. Cepas bacterianas

ANEXO N° 20



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA 7- 2017-HUSA

El Director del *Herbarium Areqvipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Se hace constar que las muestras frescas de hojas y tallos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Achyrocline alata* Kunth DC. de la familia Asteraceae, de nombre común "Huirá Huirá". Dicha muestra fue traída de la Localidad de Chucuito, Departamento de Puno para el estudio de Tesis "Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del Extracto de *Achyrocline alata* (Kunth) DC "Huirá Huirá" en Cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, ejecutado por QUENAYA PAURO VILMA ELVIRA y COAQUIRA CHOQUE MARTA MARIZA de la Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María, para optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE: Asteridae
ORDEN: Asterales
FAMILIA: Asteraceae
GENERO: Achyrocline L.
ESPECIE: *Achyrocline alata* (Kunth) DC

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime conveniente.



Arequipa 9 de Abril del 2017


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Areqvipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ