

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EFECTO ANTIMICROBIANO, *in vitro* DEL EXTRACTO DE *Curcuma longa* L. (palillo) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Y *Candida albicans*.”

**TESIS PRESENTADA POR LOS
BACHILLERES:**

Espinoza Gómez, Angelita Viviana.

La Fuente Rios, Kevin Karl.

**Para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico**

Asesor:

Q.F. Fernando A. Torres Vela.

Arequipa – Perú

2017

AGRADECIMIENTOS

A, nuestros familiares, por el amor y apoyo incondicional, durante nuestra formación tanto personal como profesional.

No nos alcanza las palabras para agradecerles todo el esfuerzo, perseverancia y paciencia que tuvieron para que nosotros logremos nuestras metas.

A nuestro asesor, gran amigo y gran persona el Dr. Fernando Torres.

Gracias por todo el apoyo brindado en nuestra formación profesional.

Un agradecimiento especial, por la ayuda desinteresada de Jorge Luis Santos, Maria Meneses, Rocio Rodríguez, que con su valiosa colaboración ha sido posible la realización de nuestro trabajo de investigación.

Viviana Espinoza y Kevin La Fuente

DEDICATORIA

A, Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, quien me ha guiado y me ha dado fortaleza para seguir adelante.

En especial a, mis padres Ángel y Marisol, quienes me han apoyado para poder concluir mis estudios y por creer en mí en todo momento, por su amor y paciencia brindada.

A, mis hermanas Clelia, Mónica, Sally, Silvana y Perla, por el aliento, motivación y el apoyo incondicional que me brindaron en el transcurso de mi carrera profesional, por promover siempre el desarrollo y el éxito familiar.

A, mis sobrinos Ángela, Emmanuel, Luciana, Abigahil y Elías, para que siempre sigan el ejemplo de estudiar y ser profesionales.

Para que no olviden que con perseverancia y esfuerzo lograran sus metas.

A, Kevin por ser una gran persona, un excelente compañero de tesis y gran amigo, por haberme tenido paciencia y confianza durante la realización de esta tesis.

Viviana Espinoza

A las personas que confiaron en mi al momento de comenzar la carrera universitaria, y me dieron su apoyo incondicional durante todos estos años.

A mis padres, Lucio y Elizabeth por ser las personas que me dieron todo su cariño y ánimos en todo momento, a ellos va dedicado en especial la culminación de este trabajo, son los mejores padres, amigos y personas que pude haber pedido, gracias por todos sus consejos.

A mi tío Gustavo, por apoyarme y seguir apoyándome.

A mis tíos Manuel e ida, por darme la mano a inicios de mi carrera universitaria.

A mis hermanos Lisbeth y Diego por demostrarme lo mucho que valgo para ellos, doy gracias por tener a los mejores hermanos.

A Viviana, mi mejor amiga, por alentarme y darme fuerzas en cada momento, gracias porque sin ti esta tesis jamás hubiese terminado. A sus hermanas Sally, Silvana y Perla por haberme apoyado de forma especial.

A las circunstancias de la vida porque aprendí que nunca estas solo y que todo tiene solución, cuando más oscura esta la noche más cerca está el amanecer, jamás se rindan.

Kevin La Fuente Rios

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1. <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).....	5
1.1.1. CARACTERÍSTICAS	5
1.1.2. HÁBITAT	5
1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	6
1.1.4. USOS.....	6
1.1.5. CONSTITUYENTES ACTIVOS.	7
1.1.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	8
1.2. DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO EN ESTUDIO.	11
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	15
1.2.3. <i>Candida albicans</i>	18
CAPÍTULO II	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO	23
2.2. TIPO DE ESTUDIO.....	23
2.3. MATERIALES.....	23
2.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	23

2.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS.	24
2.4. METODOLOGÍA	27
2.4.1. PROCESAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL	27
2.4.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPÉCIE VEGETAL.....	27
2.4.3. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	33
2.4.4. MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	35
2.4.5. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CLÍNICAS EN ESTUDIO ..	38
2.4.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).	46
2.4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
CAPÍTULO III	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	55
3.1.1. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL.....	55
3.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).....	55
3.1.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo)	56
3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).....	57
3.2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).....	57
3.2.2. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo)	58
3.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).	60

3.3. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF).....	63
3.3.1. IDENTIFICACIÓN GENERAL (TERPENOS).....	64
3.3.2. IDENTIFICACIÓN DE CURCUMINOIDES.....	65
3.3.3. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS.....	66
3.3.4. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.	67
3.4. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CLÍNICAS EN ESTUDIO.	69
3.4.1. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	69
3.4.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE <i>Curcuma longa</i> L. (palillo).	73
CONCLUSIONES	103
RECOMENDACIONES	104
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	105
ANEXOS	111

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Para realizar este proyecto, como primera instancia se recolectó el espécimen vegetal procedente de la ciudad de Puerto Maldonado, del Departamento de Madre de Dios, ubicado en la selva peruana, que posteriormente fue trasladado a los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María de la ciudad de Arequipa para su posterior uso. El rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo), fue pulverizado y llevado a una estufa a una temperatura de 50°C por 72 horas para su correcta desecación, obtenido el producto, se procedió a realizar los análisis físico-químicos, los cuales fueron: humedad 88,75%, cenizas totales 1,35%, acidez titulable 0,01%, grasas totales 0,95%, proteínas 14,53% y fibra 2,10%.

Como segunda instancia se realizó la extracción por el método Soxhlet, para esto se utilizaron tres solventes; etanol, n-butanol y éter de petróleo, realizando 5 extracciones por solventes y un peso de muestra de 10 g de *Curcuma longa* L.(palillo), una vez obtenidos los extractos se evaluó el porcentaje de rendimiento de cada uno, dando como resultado lo siguiente: para el extracto etanólico (15.08 ± 0.02) %, extracto N-butanólico (2.97 ± 0.05) % y extracto éter de petróleo (2.07 ± 0.03) %, se escogió el de mayor rendimiento para el posterior análisis. Con el extracto obtenido se realizó las pruebas para

la identificación fitoquímica, se usó la cromatografía de capa fina (CCF), hallándose curcuminoides, terpenos, taninos y flavonoides.

Las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* fueron obtenidas en diferentes nosocomios de la ciudad de Arequipa los cuales se mencionarán a continuación: Hospital Edmundo Escomel EsSalud, Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza y El Hospital Goyeneche, se llegaron a recolectar 3 cepas de cada microorganismo por hospital, obteniendo un total de 27 cepas clínicas que fueron trasladadas al laboratorio de microbiología H-402 de la Universidad Católica de Santa María donde se realizó su correcta identificación microbiológica.

El efecto antimicrobiano de la *Curcuma longa* L. (palillo) se evaluó por el método de dilución en tubo, obteniendo como resultado para la concentración inhibitoria mínima (CIM) de (3.83 ± 0.25) mg/mL para las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (31.11 ± 3.33) mg/mL para las cepas clínicas de *Escherichia coli* y (27.78 ± 2.64) mg/mL para las cepas clínicas de *Candida albicans*, para la concentración bactericida mínima (CBM) se obtuvo como resultado un valor de (5.00 ± 0.00) mg/mL para las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, (41.11 ± 3.33) mg/mL para las cepas clínicas de *Escherichia coli* y para la concentración fungicida mínima (CFM) se obtuvo un valor de (27.78 ± 2.64) mg/mL para las cepas clínicas *Candida albicans*.

Se concluyó que el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) tiene efecto antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Palabras clave: *Curcuma longa* L. - análisis físico-químico, Soxhlet, extracto etanólico, cromatografía de capa fina, curcuminoides, efecto antimicrobiano.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the in vitro antimicrobial effect of *Curcuma longa* L. (palillo) on strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

In order to carry out this project, as a first instance, the plant specimen from the city of Puerto Maldonado, from the Department of Madre de Dios located in the Peruvian jungle, was later collected and transferred to the laboratory of the Catholic University of Santa María from Arequipa city for later use.

The *curcuma longa* L., rhizome that was pulverized and taken to a stove at a temperature of 50 ° C for 72 hours for its proper drying, obtained the product, the physicochemical analyzes were carried out, which were: humidity 88, 75%, total ash 1.35%, titratable acidity 0.01%, total fat 0.95%, protein 14.53% and fiber 2.10%.

As a second instance extraction was carried out by the Soxhlet method, for which three solvents were used; ethanol, n-butanol and petroleum ether, carrying out 5 extractions per solvent and a sample weight of 10 g of *Curcuma longa* L. (palillo), once the extracts were obtained, it was carried out to evaluate the percentage yield of each, giving As a result the following; For the ethanolic extract (15.08 ± 0.02) %, N-butanolic extract (2.97 ± 0.05) % and petroleum ether extract (2.07 ± 0.03) %, the highest yield was chosen for subsequent use. With the obtained extract the tests for the phytochemical identification were realized,

the thin layer chromatography (TLC), being used curcuminoides, terpenos, tannins, flavonoides and alkaloid.

The strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* were obtained from different hospitals in the city of Arequipa, which will be mentioned as follows: Hospital Edmundo Escomel EsSalud, Regional Hospital Honorio Delgado Espinoza and Hospital Goyeneche, 3 strains of Each microorganism by hospital, obtaining a total of 27 clinical strains that were transferred to the laboratory of microbiology H-402 of the Catholic University of Santa Maria where their correct microbiological identification was realized.

The antimicrobial effect of *Curcuma longa* L. (palillo) was evaluated by the tube dilution method, obtaining as a result for the minimum inhibitory concentration (MIC), an value of (3.83 ± 0.25) mg/mL for the clinical strains of *Staphylococcus aureus*, (31.11 ± 3.33) mg/mL, for the clinical strains of *Escherichia coli* and (27.78 ± 2.64) mg/mL, for the clinical strains of *Candida albicans*, for the minimal bactericidal concentration (MBC), As a result, an value of (5.00 ± 0.00) mg/mL was obtained for the clinical strains of *Staphylococcus aureus*, (41.11 ± 3.33) mg/mL, for the clinical strains of *Escherichia coli* and for the minimum fungicidal concentration (MFC), an value was obtained of (27.78 ± 2.64) mg/mL for the clinical strains of *Candida albicans*.

It is concluded that the ethanolic extract of *Curcuma longa* L. (stick) has antimicrobial effect against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

Key words: *Curcuma longa* L. - physico-chemical analyze, Soxhlet, ethanolic extract, thin layer chromatography, curcuminoids, antimicrobial effect.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la medicina ancestral es un recurso fundamental para la salud humana. Durante mucho tiempo las plantas medicinales, fueron el principal recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de especies vegetales con propiedades medicinales y se ampliara la investigación de los productos que de ella se extraen.

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud en creciente y de gran complejidad, que afecta a todos los individuos y poblaciones alrededor del mundo. Este problema también afectó al Perú siendo unas de las causas relevantes el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales, comunidades, con los animales, en la agricultura que adicionan a las fuerzas del ambiente, a seleccionar y mantener cepas de bacterias resistentes.⁽¹⁾

La especie *Curcuma longa* Linn, familia de la Zingiberaceae, posee innumerables estudios fármaco-toxicológicos a nivel internacional, pero aún las bases de datos y sistemas informativos están poco documentados al respecto. Con las nuevas investigaciones que existen sobre esta planta, se crean grandes posibilidades de obtener fitofármacos con acción antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antibacteriana, entre otras, con menor potencial de efectos adversos.⁽²⁾

Debido a la necesidad de conocer las propiedades medicinales de las plantas y existiendo poca información sobre los efectos antimicrobianos que tiene la *Curcuma longa* L. (palillo) sobre los microorganismos patógenos que son causantes de enfermedades infecciosas en diferentes órganos y sistemas en nuestro cuerpo, se consideró importante la realización de este estudio de investigación para el beneficio de la población y la comunidad científica, para lo cual se planteó el siguiente objetivo: Determinar el efecto antimicrobiano del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

OBJETIVO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

- Determinar el efecto antimicrobiano, *in vitro* del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Obtener el extracto de *Curcuma Longa* L. (palillo) mediante el método de Extracción Soxhlet con solventes de etanol, n-butanol, éter de petróleo y determinar el de mayor porcentaje de rendimiento.
- Identificar que grupos de metabolitos secundarios se encuentran en el extracto de mayor rendimiento de la *Curcuma Longa* L. (palillo) mediante la realización de la técnica de cromatografía de capa fina (CCF).
- Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM) *in vitro* del extracto de *Curcuma Longa* L. (palillo) sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* de diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.

HIPÓTESIS

- Dado que en la medicina tradicional existen antecedentes del uso de la *Curcuma longa* L. (palillo) en enfermedades infecciosas ES PROBABLE que el extracto de *Curcuma Longa* L. (palillo) presente propiedades antimicrobianas sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans in vitro*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO



1.1. *Curcuma longa* L. (palillo).



Figura N° 1.1: Planta *Curcuma Longa* L.

Fuente: www.eol.org / www.ntbg.org.

1.1.1. CARACTERÍSTICAS

Es una planta herbácea de la familia de las zingiberaceae, vivaz por su rizoma, la cúrcuma posee grandes hojas envainadoras con limbo elíptico y penninervado. ⁽²⁾

Las flores amarillas agrupadas en una espiga bracteada, posee una corola con el pétalo posterior desarrollado, el androceo reducido a una estambre fértil y a estaminoides que forman un labelo petaloide, un gineceo con tres carpelos. ⁽³⁾

Actualmente se cultiva en varias partes del mundo, pero principalmente en la india.

1.1.2. HÁBITAT

El origen de la cúrcuma es el sudeste asiático, más concretamente la India y zona meridional de Vietnam. En realidad, no se puede encontrar la cúrcuma en estado salvaje, aunque sí haya sido naturalizada en algunas de estas regiones con clima húmedo. Se trata de una planta tropical, que crece en zonas cálido-húmedas con una alta pluviosidad.

Se puede encontrar desde Polinesia y Micronesia hasta el sudeste asiático, desarrollándose bien en zonas de selva alta y selva baja. Necesita temperaturas de entre 20 y 30 °C y una considerable pluviosidad para prosperar, sobre todo para los siete a diez meses de cultivo. Necesita altos niveles de luz para crecer, por lo que se encuentra en campos abiertos. Crece mejor en suelos francos, fértiles y bien drenados con pH ligeramente ácido (5 a 6).

Sangli, una ciudad en el sur de la India, es uno de los mayores productores de esta planta, cultivan sus rizomas por su empleo como. ⁽⁴⁾

1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA: ⁽⁵⁾

Reino	: <i>Plantae</i>
División	: <i>Magnoliophyta</i>
Clase	: <i>Liliopsida</i>
Subclase	: <i>Zingiberidae</i>
Orden	: <i>Zingiberales</i>
Familia	: <i>Zingiberaceae</i>
Género	: <i>Curcuma</i>
Especie	: <i>Curcuma longa</i> L.
Origen	: Asia tropical.

1.1.4. USOS

La curcumina puede ser usada como colorante alimenticio, siendo un colorante atóxico autorizado (E100) termoestable, poco sensible a variaciones de pH, se utiliza tanto el polvo de rizoma, como la oleorresina, como extractos y disoluciones de curcumina de contenido variable, a veces adsorbidos sobre hidrocoloides. ⁽²⁾

En farmacia, el rizoma de cúrcuma, puede formar parte de la composición de fitomedicamentos empleados tradicionalmente como colerético o colágeno, en el

tratamiento sintomático de trastornos digestivos funcionales de origen hepático y para estimular el apetito. ⁽²⁾

1.1.5. CONSTITUYENTES ACTIVOS.

Los componentes activos de la cúrcuma son la curcumina (diferuloylmetano) y varios aceites volátiles, incluyendo tumerone, atlantona y zingiberone. ⁽⁶⁾

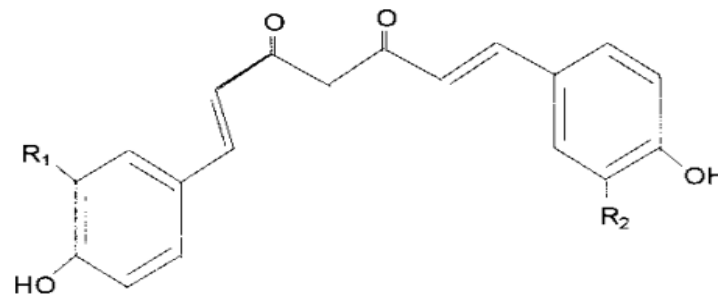
Otros constituyentes incluyen azúcares, proteínas y resinas.

El componente activo mejor estudiado es la curcumina, que comprende 0,3-5,4 % de cúrcuma cruda. ⁽⁷⁾

Los curcuminoides son una familia de sustancias quimiopreventivas presentes en la cúrcuma y en alimentos con extracto de cúrcuma (curry), siendo la curcumina el compuesto fenólico más estudiado.

Estos compuestos se conocen desde hace tiempo, pero ha sido en los años más recientes cuando el interés por ellas ha crecido, y lo ha hecho de forma paralela a la preocupación por los graves efectos secundarios provocados por los inhibidores sintéticos de la ciclooxigenasa- 2 (COX-2) y dirigido por la industria farmacéutica. ^(7,8)

La curcumina es el principal polifenol curcuminóide encontrado en la cúrcuma, junto con otros dos compuestos de la misma naturaleza demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina forman el complejo conocido como azafrán indio, también conocida como diferuloilmetano o 1,7-bis-(4-hidroxí-3-metoxifenil)-1,6- heptadieno-3,5-diona, es un compuesto enólico de bajo peso molecular (369.37 g/mol) con punto de fusión 183°C, de color amarillo en medio ácido (pH 2,5-7) y rojo en medio básico (pH > 7), es soluble en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido, etanol, metanol, hexano y acetona. ^(9, 10) (Figura N° 1.2).



	R ₁	R ₂
Curcumina	OCH ₃	OCH ₃
Demetoxicurcumina	H	OCH ₃
Bisdemetoxicurcumina	H	H

Figura N° 1.2.- Estructura de los Curcuminoides

Fuente: Bengmark S. et al. 2009.

1.1.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

La curcumina tiene acciones antioxidantes, antivirales y antifúngicas. Los estudios han demostrado que la curcumina no es tóxica para los seres humanos. ⁽¹¹⁾

Además, la cúrcuma es un poderoso anti-inflamatorio, facilitando las condiciones como la bursitis, artritis y dolor de espalda. Es probablemente debido a una combinación de tres propiedades diferentes. Es eficaz en la reducción de la inflamación post-quirúrgica, ayuda a prevenir la aterosclerosis al reducir la formación de agregados sanguíneos. ⁽¹¹⁾

En primer lugar, la cúrcuma reduce la producción de inflamación inducida por histamina. En segundo lugar, aumenta y prolonga la acción de la hormona suprarrenal, el cortisol, y, por último, la cúrcuma mejora la circulación, expulsando así las toxinas de pequeñas articulaciones donde los residuos celulares y los compuestos inflamatorios son frecuentemente atrapados. ⁽¹¹⁾

La actividad antiinflamatoria de la curcumina ha sido demostrada tanto en inflamación aguda como crónica, su mecanismo de acción aún no está bien explicado, se cree que ejerce esta actividad debido a la inhibición del aumento de la actividad de las enzimas lisosomales, actividad sobre la síntesis de prostaglandinas, interferencia en la respuesta de los granulocitos a estímulos con el proceso antiinflamatorio. También tiene una actividad estomacal, es antiulceroso y citoprotector. ⁽²⁾

Curcumina inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori*, que causa úlceras gástricas y se ha relacionado con cánceres gástricos. La curcumina puede unirse con metales pesados como cadmio y plomo, reduciendo así la toxicidad de estos metales pesados. Esta propiedad de la curcumina explica su acción protectora para el cerebro. La curcumina actúa como inhibidor de la ciclooxigenasa, la 5-lipoxigenasa y la glutatión-S-transferasa. Es una especia común, conocida principalmente por su uso en platos indios como un ingrediente común en los curries y otras comidas étnicas. La cúrcuma también se ha utilizado durante siglos en la medicina ayurvédica, que integra las propiedades medicinales de las hierbas con los alimentos. Esta hierba extraordinaria ha encontrado su manera en el proyector en el oeste debido a su una amplia gama de beneficios medicinales. ⁽¹¹⁾

La cúrcuma es un potente antioxidante, su principal componente activo, es tan potente y antioxidante como las vitaminas C, E y Beta-Caroteno, lo que convierte a la cúrcuma en una opción de consumo para la prevención del cáncer, la protección hepática y el envejecimiento prematuro. Varios estudios publicados también muestran que la cúrcuma inhibe el crecimiento de varios tipos diferentes de células cancerosas. ⁽¹²⁾

La investigación también ha confirmado los beneficios digestivos de la cúrcuma. Cúrcuma actúa como un colagogo, estimulando la producción de bilis, por lo tanto, el aumento de la capacidad de los órganos para digerir las grasas, mejorar la digestión y eliminar las toxinas del hígado. ⁽¹²⁾

1.1.6.1. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Se sabe que la curcumina, pertenece a la clase de curcuminoides. En la literatura podemos encontrar algunos autores que asocian la actividad antiinflamatoria de la curcumina y sus derivados a la presencia de grupos hidroxilo y fenol en la molécula, siendo esenciales para la inhibición de síntesis prostaglandinas y leucotrienos ^(13, 14, 15, 16).

Por otra parte, algunos autores sugirieron que la acción antiinflamatoria se asocia a la existencia del sistema β -dicarbónico, que tiene los dobles enlaces conjugados responsables de esta actividad ⁽¹⁷⁾. Este sistema parece ser responsable no sólo del poder antiinflamatorio, sino también de la actividad antiparasitaria. ^(18, 19) La presencia de un sistema cetónico dieno proporciona una lipofilia a los compuestos, y por lo tanto probablemente una mejor penetración de la piel. (Ver figura N° 1.3.)

Compounds	Chemical structure	Activity
Curcumin		anti-bacteria <i>Leishmania amazonensis</i> anti-HIV antioxidant anti-inflammatory anti-tumor
Ar-turmerone		snakebite
Methylcurcumin		<i>L. amazonensis</i>
Demethoxy curcumin		antioxidant
Bisdemethoxy curcumin		antioxidant
Sodium curcuminat		anti-inflammatory

Figura N° 1.3: Derivados de la *cúrcuma longa* L. con actividad biológica.

Fuente: CAC Araújo et al. 2001

1.1.6.2. PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS

En la familia Zingiberaceae, el extracto de etanol de *Curcuma longa* L. se encontró que poseen buena actividad antifúngica contra *Trichophyton longifusus*. Otra *Curcuma* de la familia Zingiberaceae, *Curcuma zedoaria* Rosc. Y *Curcuma Malabarica* Vel., también presentó actividad antifúngica que apoya el uso de sus tubérculos en medicina tradicional para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas. ^(20, 21)

1.2. DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO EN ESTUDIO.

1.2.1. *Staphylococcus aureus*.

Las bacterias Gram positivas cuentan con tres capas externas: cápsula, gruesa y membrana citoplásmica, una pared celular delgada la cual consiste de varias capas de peptidoglicano que retienen el cristal violeta utilizado en la tinción de Gram; otros componentes de la pared incluyen redes de ácido teicoico y ácido lipoteicoico. ⁽²²⁾ (Ver figura N° 1.4.)

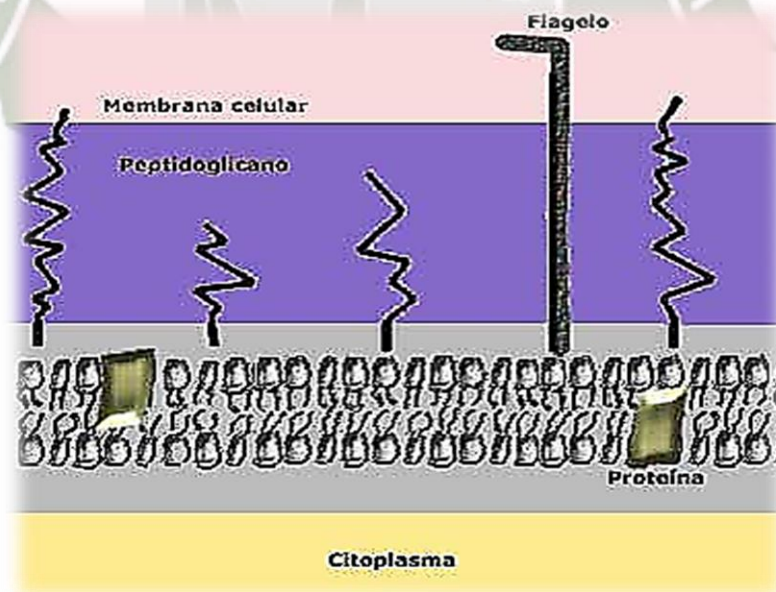


Figura N° 1.4: Pared celular bacteria Gram positiva.

Fuente: Prescott H. 1999

Es con diferencia la especie más patógena, agente etiológico de muchas infecciones. También es conocido como estafilococo dorado por el pigmento no difusible de color amarillo que forma. Bioquímicamente produce coagulasa y fermenta el manitol. En su pared celular se han encontrado en torno a 30 antígenos distintos, siendo los más importantes el polisacárido A, formado por ácidos teicoicos y polímeros de fosfato de ribitol, que induce a la formación de anticuerpos. También se encuentra la proteína A, que forma parte de la pared celular de la bacteria y actúa como un potente agente antigénico. (23)

Debido a estos componentes y otros que forman parte de la pared celular de *S. aureus* presentan diferentes caracteres antigénicos, que se subdividen en tipos, hecho que es utilizado para la tipificación de sueros. (23)

Staphylococcus aureus es un agente patógeno que es considerado como parte de la flora normal, se encuentra en la piel del individuo sano, pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedades. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo. (24, 25)

Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Entre el 30 y el 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y el 20% se mantienen colonizados persistentemente. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal del ser humano y tiene colonización selectiva de narinas (20-40%, en adultos), pliegues intertriginosos, perineo, axilas y vagina, no obstante, las personas colonizadas tienen un riesgo mayor de sufrir infecciones. (26) La colonización por *S. aureus* se da preferentemente en:

- Personas con diabetes tipo 1. (27)
- Usuarios de drogas intravenosas. (28)
- Pacientes con hemodiálisis. (29)
- Pacientes quirúrgicos. (30)

- Personas con SIDA. ⁽³¹⁾

Se ha visto un incremento en la incidencia de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* desde 1970. Según el reporte del Minsa 2014, es la bacteria comúnmente causante de infecciones de heridas e infecciones del tracto sanguíneo. ⁽¹⁾ Así mismo se ha notado un incremento considerable, probablemente debido a la presión antibiótica, de cepas con resistencia a diferentes fármacos antimicrobianos. Entre ellos están el estafilococo resistente a metilina y el estafilococo resistente a vancomicina. ^(15, 32)

1.2.1.1. Identificación.

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa.

Sin duda, la prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada. Se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de la coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos. ⁽³³⁾

1.2.1.2. Pruebas de identificación.

El diagnóstico de enfermedades por *Staphylococcus* esta sugerido por el hallazgo de cocos Gram positivos en racimos en el material biológico. ⁽³⁴⁾

A. Prueba de la coagulasa en porta objetos.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* poseen una coagulasa unida o “factor de agregación” en la superficie de la pared celular. Este factor reacciona

directamente con el fibrinógeno presente en el plasma y produce una rápida aglutinación de las células bacterianas. ⁽³⁴⁾

B. Prueba de la coagulasa en tubo.

La coagulasa detectada por este método es secretada en forma extracelular y reacciona con una sustancia presente denominada “factor de reacción de la coagulasa” para formar un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para formar fibrina. ⁽³⁴⁾

C. Aglutinación con látex

Para realizar estos procedimientos se utilizan partículas de látex recubiertas con plasma. El fibrinógeno unido al látex detecta el factor de aglutinación. Además, las moléculas de inmunoglobulinas también presentes sobre las partículas de látex detectan proteína A, que es la proteína que conforma la pared celular de *Staphylococcus*. ⁽³⁴⁾

D. Hemaglutinación pasiva.

Para el procedimiento de hemoaglutinación pasiva se utilizan glóbulos rojos de carnero sensibilizados con fibrinógeno para detectar el factor de aglutinación en la superficie de las células de *Staphylococcus aureus*. ⁽³⁴⁾

1.2.1.3. Tratamiento

Las Penicilinas Resistentes a la Penicilinas, son antibióticos semisintéticos, obtenidos mediante la adición de una cadena acil al anillo betalactámico, que lo protege, impidiendo su ruptura y consiguiente inactivación por las betalactamasas. ⁽³⁴⁾

La vancomicina es un antibiótico bactericida de espectro reducido, útil para tratar *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a otros antibióticos. ⁽³⁴⁾

El primer aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) fue descrito en Inglaterra en 1961, y se consideró como un patógeno asociado a los cuidados de salud. Posteriormente, en 1963, se reportó el primer brote epidémico de MRSA nosocomial. ^(35, 36, 37)

1.2.1.4. Mecanismo de resistencia a los beta lactámicos

Se han descrito 3 mecanismos que explican la resistencia del *S.aureus* a los β -lactámicos: Hiperproducción de betalactamasa, Modificación de las PBP's y la resistencia intrínseca a la meticilina. El último es el que tiene más significancia clínica. ⁽³⁷⁾

1.2.2. *Escherichia coli*

Las bacterias Gram negativas presentan cápsula, pared celular delgada, membrana externa (lipopolisacárido) y una membrana interna (citoplasmática) así como una capa delgada de peptidoglucano entre ambas, en el llamado espacio periplásmico. ⁽³⁸⁾ (Ver figura N° 1.5.)

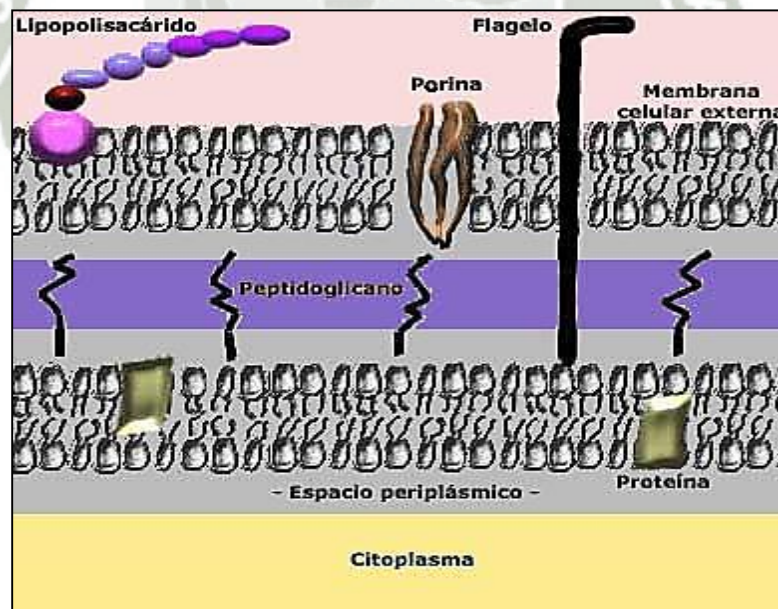


Figura N° 1.5: Pared celular bacteria Gram negativa.

Fuente: Prescott, Harley. 1999

1.2.2.1. Tipos de *E. coli* patógena y síntomas en los seres humanos

Las bacterias *E. coli* patógenas se dividen en seis grupos o variedades, según los mecanismos comunes de patogenicidad y síndromes clínicos: *E. coli* Shigatoxigénica (STEC) o *E. coli* verotoxigénica (ECVT), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD).⁽³⁸⁾

Las siguientes son las principales características y diferencias entre las seis variedades:

- A.** La STEC o ECVT provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta una diarrea sanguinolenta grave. La STEC produce citotoxinas denominadas verotoxinas (VT) o toxinas Shiga (Stx) (debido a su semejanza con la toxina producida por *Shigella dysenteriae*). En un 10% de los casos la infección puede transformarse en una enfermedad mortal.⁽³⁸⁾
- B.** La ECEH es un subconjunto de la STEC que se asocia generalmente a diarrea sanguinolenta. La ECEH y la ECEP producen cambios en la célula del epitelio intestinal denominados lesiones adherentes y destructoras. Animales como los bovinos, y los animales silvestres son portadores asintomáticos de la STEC y la ECEH.⁽³⁸⁾
- C.** La ECET provoca normalmente diarrea acuosa en los niños y en los viajeros a zonas del mundo con deficientes condiciones de sanidad e higiene. La ECET se adhiere al intestino delgado mediante antígenos del factor de colonización y produce enterotoxinas semejantes a la toxina producida por el *Vibrio cholerae*, que son toxinas termoestables (ST) mediadas por plásmido o bien toxinas termolábiles (LT) mediadas por cromosomas.⁽³⁸⁾
- D.** La ECEI penetra y se propaga entre las células intestinales, destruyéndolas y provocando una diarrea sanguinolenta.⁽³⁸⁾

- E. La ECEP provoca una intensa diarrea acuosa y a veces sanguinolenta, particularmente entre los niños en los países en desarrollo. La ECEP se adhiere al epitelio intestinal alterando la función celular. La patología se asocia con la producción de lesiones adherentes y destructoras semejantes a las de la ECEH. La ECEP se diferencia de la STEC porque no produce Stx.⁽³⁸⁾
- F. La ECEA provoca diarreas acuosas y mucosas agudas, persistentes en los niños de corta edad. La ECEA se adhiere en la superficie celular formando una estructura agregativa característica. Una toxina termoestable enteroagregativa que puede contribuir a los síntomas diarreicos.⁽³⁸⁾
- G. La ECAD tiene un perfil menos claro y provoca diarrea en niños de mayor edad. La ECAD se diferencia de la ECEA por su adherencia difusa a la superficie celular.⁽³⁸⁾

1.2.2.2. Patogenia

Escherichia coli puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, Uretritis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.⁽³⁹⁾

Según el reporte del Minsa 2014, es la bacteria comúnmente causante de infecciones del tracto urinario e infecciones del tracto sanguíneo y también presenta un alto riesgo de muerte en pacientes infectados.⁽¹⁾ Las infecciones urinarias son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm), en comparación con los hombres (unos 15 cm). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción en ambos sexos. Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra, los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el origen de la infección es desconocido.

1.2.2.3. Tratamiento

Dentro de los porcentajes de sensibilidad de *E. coli* se destaca la elevada sensibilidad a fosfomicina (99%) y a nitrofurantoína (96%). También presenta altos porcentajes de sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico (93%) y cefalosporinas de segunda y tercera generación, cefuroxima (93%) y cefotaxima (95%) de sensibilidad, respectivamente. La sensibilidad a cotrimoxazol también es baja (76%).⁽⁴⁰⁾

1.2.3. *Candida albicans*

Este género tiene importancia médica, en especial *C. albicans*. Todas las especies de *Candida* forman colonias blanco cremosas, lisas, en agar maltosado o peptonado, excepto *C. krusei*, que tiene aspecto de vidrio.⁽⁴¹⁾

Otra prueba rápida para *C. albicans* es sembrar la levadura sospechosa en aproximadamente 1 mL de suero de caballo estéril en un matraz e incubar a 37°C durante tres horas. Al término de este tiempo casi todas las cepas de *C. albicans* producen tubos germinales, aunque no si el inóculo es denso.⁽⁴¹⁾

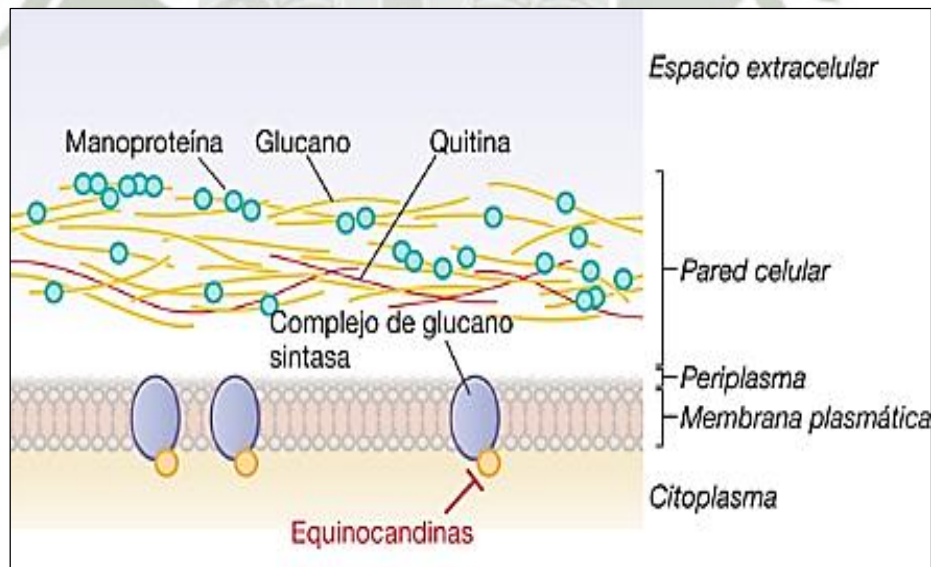


Figura N° 1.6: Pared celular bacteria de *Candida albicans*

Fuente: Randa Hilal-Dandan, Laurence L. Brunton.

1.2.3.1. Vías de infección

La mayor parte de las infecciones son de origen endógeno a partir de los reservorios mucos cutáneos o cutáneos (introducidos a partir de catéteres u otros dispositivos de uso médico, que interrumpen la barrera cutánea), aunque también pueden ser exógenas, por ejemplo en los hospitales, donde las levaduras pueden ser transmitidas a lactantes a partir de mamaderas mal esterilizadas, o a pacientes trasplantados o inmunosuprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal descontaminados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en unidades de cuidados intensivos (UCI), sin la correcta protección.⁽⁴¹⁾

1.2.3.2. Patogenia

El delicado balance o equilibrio que existe entre comensal (levaduras) y hospedero podría romperse y dar lugar al parasitismo o desarrollo de una infección oportunista. El desarrollo de la enfermedad por *Candida* depende de la interacción de ciertos factores: Factores predisponentes para la infección, Patogenicidad intrínseca del microorganismo y Mecanismos de defensa del huésped.⁽⁴¹⁾

A. Factores predisponentes.

Los factores desencadenantes de la enfermedad son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped.⁽⁴¹⁾

Las causas predisponentes se pueden agrupar en:⁽⁴¹⁾

- Locales → maceración, contacto con agua, mala higiene.
- Fisiológicas → recién nacidos, vejez (edades extremas), embarazo.

- Endocrinas → diabetes, hipotiroidismo.
- Alteración de la flora normal → por uso de antibióticos (ATB).
- Enfermedades hematológicas → linfomas, leucemias, anemia aplásica, agranulocitosis, neutropenia, hipo y agamaglobulinemia.

B. Factores iatrogénicos.

Uso prolongado de corticoides, quimioterápicos, inmunosupresores, agentes citotóxicos, alimentación parenteral, trasplantes, cirugía abdominal, utilización de sondas y catéteres, radioterapia, prótesis, hemodiálisis, cateterismo. ⁽⁴¹⁾

C. Enfermedades debilitantes.

Neoplasias, infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), inanición, quemaduras graves y extensas, drogadicción, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas. ⁽⁴¹⁾

Se ha investigado una posible relación entre la candidiasis y el cáncer, bien mediante la producción de micotoxinas o compuestos cancerígenos o mediante el desarrollo de inflamación crónica y procesos que interfieren con el ciclo vital de las células. ⁽⁴¹⁾

1.2.3.3. Criterios a seguir para el diagnóstico de Candidiasis:

Candidiasis cutánea, Candidiasis vaginal, Candidiasis orofaríngea, Candidiasis esofágica, Candidiasis mucocutánea crónica: examen directo positivo (levaduras y/o pseudomicelio) y cultivo positivo para levaduras, con una lesión y signos clínicos compatibles. Candidemia (paciente neutropénico): hemocultivo positivo. ⁽⁴¹⁾

Candidiasis profunda localizada o Candidiasis sistémica (paciente neutropénico): biopsia con examen directo y/o cultivo positivo; orina por punción suprapúbica positiva. ⁽⁴¹⁾

1.2.3.4. Tratamiento de elección de las principales candidiasis.

A. Orofaringea.

Nistatina en solución con enjuagues y luego tragar cuatro veces al día, pero menos eficaz y más difícil para algunos pacientes o fluconazol 200 mg el primer día, después 100 mg al día durante siete días.⁽⁴³⁾

B. Cutánea.

Clotrimazol crema o nistatina o ketoconazol en las zonas afectadas.⁽⁴³⁾

C. Onicomycosis.

Itraconazol 200 mg oral cuatro veces al día durante tres meses o 200 mg oral dos veces al día durante una semana cada mes durante cuatro meses.⁽⁴³⁾

D. Vulvovaginitis.

Miconazol u otra crema vaginal o fluconazol 150 mg oral en dosis única.⁽⁴³⁾

E. Infección urinaria.

Fluconazol 400 mg la primera dosis y después 200 mg al día vía oral durante 14 días.⁽⁴³⁾

F. Candidemia

Candidiasis invasiva fluconazol 800 mg primera dosis, después 400 mg al día iv o voriconazol en caso de sospecha de resistencia a fluconazol o anfotericina B 3-5 mg/kg/día o caspofungina 70 mg primera dosis, después 50 mg al día iv debe mantenerse el tratamiento durante 2 semanas después de la negativización de los hemocultivos.⁽⁴³⁾

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS



2.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO

La parte experimental del presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios H-102 (Laboratorio de Farmacognosia), H 204/205 (Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad) y H-402 (Laboratorio de Microbiología) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

2.2. TIPO DE ESTUDIO

Investigación experimental

2.3. MATERIALES

2.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.3.1.1. *Curcuma longa* L. (palillo)

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se emplearon rizomas de *Curcuma longa* L. (palillo), la cual fue identificada botánicamente por el Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD), Arequipa.

2.3.1.2. Bacterias

Se trabajó con cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Se adquirió 3 cepas de cada microorganismo por hospital, dando así un sub total de 9 cepas por hospital y un total de 27 cepas de los 3 nosocomios, los cuales fueron:

- ❖ Hospital Edmundo Escobel EsSalud.
- ❖ Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza.
- ❖ Hospital Goyeneche.

2.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO, EQUIPOS Y REACTIVOS.

2.3.2.1. MATERIALES DE VIDRIOS.

- Balones
- Frascos de color ámbar
- Cuba cromatográfica
- Capilares
- Pipetas
- Baguetas
- Matraz Erlenmeyer
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Bureta
- Balones Kjeldahl
- Lunas de reloj
- Laminas portaobjetos
- Laminas cubreobjetos
- Placas Petri

2.3.2.2. EQUIPOS

- Termobalanza OHAUS, Modelo: MB35 HALOGEN
- Mufla BARNSTEAD, Modelo: 48000 Furnace
- Estufa MEMMERT, Modelo: U15
- Equipo Kjeldahl SGS, Modelo: HNG
- Extractor solvente VELP SCIENTIFICA, Modelo: SER 148
- Equipo de filtración al vacío LAB. COMPANION , Modelo: VE-11
- Estufa J.P.SELECTA
- Balanza analítica OHAUS, Modelo: Pioneer

- Balanza analítica KERN, Modelo: ABJ-NM/ABS-N
- Cocina eléctrica GALLENHAMP
- Lámpara de luz ultravioleta CAMAG-CA004, Modelo: CA004
- Autoclave BUCHI, Modelo: R-114
- Refrigerador BOSCH, Modelo: KDN43
- Campana extractora SGS, Modelo: HGN
- Mecheros bunsen
- Microscopio.

2.3.2.3. REACTIVOS

- Etanol 96° (J.T.Backer; P.A.)
- Éter de petróleo (J.T.Backer; P.A.)
- N-butanol (J.T.Backer; P.A.)
- Ácido acético (J.T.Backer; P.A.)
- Ácido fórmico (J.T.Backer; P.A.)
- Acetato de etilo (J.T.Backer; P.A.)
- Ácido sulfúrico concentrado (J.T.Backer; P.A.)
- Tolueno (J.T.Backer; P.A.)
- Cloroformo (Merck P.A)
- Metanol (Merck P.A)
- Tween 20 (Pirex)
- Vainillina (USAMIX)
- Reactivo de Cloruro Férrico (UCSM; H-102)
- Reactivo de Dragendorft A y B. (UCSM; H-102)
- Reactivo de Lieberman Burchard (UCSM; H-102)
- Reactivo de Cloruro de Aluminio (UCSM; H-102)
- Alcohol- Acetona. (UCSM; H-402)
- Safranina (UCSM; H-402)

- Cristal violeta (UCSM; H-402)
- Solución de yodo (UCSM; H-402)

2.3.2.4. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mac Conkey BD (BACTO-DIFCO-BBL)
- Agar Manitol Salado BD (BACTO-DIFCO-BBL)
- Agar Sabouraud MICROGEN
- Caldo Peptonado BD (BACTO-DIFCO-BBL)
- Agar Citrato de Simmons Merck
- Agar Lisina Hierro (LIA) Merck
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) Merck
- Caldo MRVP Merck

2.3.2.5. MATERIALES ANEXOS

- Embudo Buchner
- Papel filtro rápido
- Algodón
- Espátula
- Papel kraft
- Mortero de porcelana
- Trípode
- Soporte universal
- Manta de asbesto
- Papel aluminio
- Guantes de látex estériles
- Aza de kolle
- Gradillas para tubos de ensayo
- Pinzas

2.4. METODOLOGÍA

2.4.1. PROCESAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL

2.4.1.1. RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN.

Curcuma Longa L. (palillo) se recolectó en el mes de setiembre del 2016 de una Eco Huerta en la ciudad de Puerto Maldonado, Provincia Tambopata del Departamento de Madre de Dios. (Ver figura N°2.1).

Se acondicionó la muestra vegetal envolviéndola en papel Kraft, se colocó en cajas de cartón para su posterior traslado a los laboratorios de farmacognosia H-102 de la Universidad Católica de Santa María.

Se procedió a seleccionar los rizomas de *Curcuma longa* L. (palillo)

2.4.1.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPÉCIE VEGETAL.

La *Curcuma longa* L. (palillo) fue llevada al Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD), de Arequipa para la identificación de la especie vegetal.



Figura N° 2.1: *Curcuma Longa* L. (palillo)

Fuente: Elaboración propia

2.4.1.3. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.

Se realizó un análisis organoléptico del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo)
Para este análisis se toma en cuenta los siguientes caracteres: color, sabor, olor y aspecto.

2.4.1.4. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE *Curcuma longa* L. (palillo)

A los rizomas frescos se le realizaron los siguientes análisis físico-químicos en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María

A. Determinación de Humedad (Método FQ-V-012)

La humedad es tomada como la pérdida de peso al secado, usando un instrumento de humedad, el cual emplea una balanza de torsión sensible para pasar la muestra y una lámpara infrarroja para secar.⁽⁴⁴⁾

Se soltó el sujetador del plato para muestra, revisándolo para asegurarse de que el plato corra libremente sobre su soporte finamente punteado, y que esté limpio y seco.

Se determinó 5.00 g de la muestra pesada en la misma balanza y se distribuyó cuidadosamente y uniformemente en el platillo, con la temperatura debidamente ajustada, se bajó la tapa de la balanza. La muestra comenzó a perder humedad y la manecilla se movió hacia arriba, después de pasado un tiempo de 10 a 20 minutos, cuando permaneció estable durante 2 minutos se tomó la lectura como porcentaje total de humedad.

B. Determinación de Cenizas (Método FQ-V-024)

La materia seca, se carboniza ó incinera y posteriormente se calcina a 500 ° C a 600 ° C para destruir la materia orgánica de la misma, permitiendo así, la cuantificación de cenizas totales o minerales presentes.⁽⁴⁵⁾

En un crisol a masa constante, se puso de 3.00 g de muestra por analizar; luego se colocó el crisol con muestra en una parrilla y se quemó lentamente el material hasta que ya no desprenda humos, evitando que se proyecte fuera del crisol., luego se llevó el crisol a una mufla y se efectuó la calcinación completa.

Se dejó enfriar en la mufla, se transferió al desecador para su completo enfriamiento y finalmente se determinó la masa del crisol con cenizas.

C. Determinación de Acidez titulable (Método FQ-AL/CMH-012)

Procedimiento usual para determinar la concentración total de ácidos, este método se basa en una titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio en presencia de fenoftaleína como indicador. ⁽⁴⁶⁾

En el caso de algunos productos coloridos, se puede dificultar la determinación del punto final de la titulación utilizando el método de rutina, por lo tanto se recomienda seguir el método potenciométrico. ⁽⁴⁶⁾

Se pesó 10.00 g de muestra triturada y homogenizada, se transfirió a un vaso de precipitados de 200 mL de capacidad previamente estabilizados, se adicionó 100 mL de agua destilada para luego agitar la suspensión por 1 hora, posteriormente se filtró hasta obtener 50 mL de alícuota.

Se tituló con NaOH 0.1 N, hasta obtener un viraje de color rosa pálido permanente. Utilizando como indicador 1 mL de fenolftaleína al 1% y se anotaron los mililitros gastados.

D. Determinación de proteínas (Método FQ-V-011)

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia

orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en SO_2 , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio. El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.⁽⁴⁷⁾

Se determinó la masa, en la balanza analítica, de aproximadamente 1.00 g de muestra y pasarla a un balón Kjeldahl, se añadió 2.00 g de sulfato de cobre, 10.00 g de sulfato de sodio anhidro, 25 mL de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio.

Se preparó un blanco con 0.18 g de triptofano.

Se colocó el matraz en el digestor y se calentó cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, se aumentó gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara y se dejó por 30 minutos más a esa temperatura.

Se enfrió y se añadió de 400 a 450 mL de agua para disolver completamente la muestra, se agregó 3 gránulos de zinc y 50 mL de hidróxido de sodio 50%.

Inmediatamente se conectó el matraz a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer con 50 mL de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador.

Se procedió a destilar hasta que haya pasado todo el amoniaco, que unas gotas de destilado no den alcalinidad con el papel tornasol, aproximadamente 300 mL.

Las primeras gotas de destilado hacen virar el color del indicador de violeta a verde. Se retiró el matraz recibidor y finalmente se tituló el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N.

E. Determinación de grasa (Método FQ-AL/CMH-009)

Este método se basa en la hidrólisis ácida del complejo proteína - grasa, en donde los ácidos hidrolizados retienen la grasa extractable, posteriormente la grasa es extraída con una mezcla de éter, el cual es evaporado y la grasa es determinada directamente. ⁽⁴⁸⁾

Se introdujeron los dedales dentro de los vasos previamente estabilizado, se taro y pesó 10.00 g de muestra, luego agregamos 60 mL de éter etílico a cada vaso, para posteriormente ser colocados en el equipo extractor con solvente.

Se esperó a que se termine todo el proceso de extracción, luego se retiraron los vasos con los dedales y los llevamos al desecador por 1 hora, anotamos hasta peso constante de los vasos.

F. Determinación de fibra (Método FQ-V-022)

Este método se basa en la digestión ácida y alcalina de la muestra obteniéndose un residuo de fibra cruda y sales que con calcinación posterior se determina la fibra cruda. ⁽⁴⁹⁾

A 2.00 g de muestra se le extrajo la grasa, se transferió a un vaso de precipitados de 400 mL de capacidad, previamente estabilizados donde se colocó 200 mL de ácido sulfúrico al 1,25 % al cual se le llevo a ebullición durante 30 minutos.

Se retiró el vaso y se procedió a filtrar, enjuagándolo con agua destilada hirviendo hasta que el agua de lavado tenga un pH igual al del agua destilada, se retiraron los filtrados y se transfirió el residuo al vaso de precipitado con ayuda de 200 mL de NaOH al 1.25 % lo cual se llevó a ebullición exactamente durante 30 minutos.

Se retiró el vaso, se pesó un papel filtro y se procedió a filtrar en Bushner, enjuagándolo con agua destilada hirviendo hasta que el agua del lavado tenga un pH igual al del agua destilada, se transfirió el papel filtro con el residuo a una luna de reloj y se llevó a la estufa a 130° C durante 30 minutos, luego se retiró la luna de reloj, se enfrió y se determinó su masa, posteriormente se colocó el papel filtro con la muestra seca a un crisol previamente estabilizado y pesado el cual se llevó la mufla a 600°C hasta ser calcinado, finalmente se retiró el de la mufla, se enfrió y se determinó su masa.

2.4.1.5. ESTABILIZACIÓN Y DESECACIÓN

Para la estabilización de los rizomas de *Curcuma longa* L. (palillo) recolectadas, primero se procedió a lavarlas para eliminar residuos, luego se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 0.2%, se enjuagaron con agua destilada.

Se procedió a fraccionar en partes pequeñas para lograr un mejor secado y dispuestas en bandejas para ser sometidas a calor seco a una temperatura de 45°C por 72 horas. (Ver Figura N° 2.2)



Figura N° 2.2: Estufa con *Curcuma longa* L. (palillo)

Fuente: Elaboración propia

Una vez estabilizada los rizomas de *Curcuma Longa* L. (palillo), fue dispuesto sobre papel Kraf, y se realizó el proceso de desecación a temperatura ambiente, el cual fue cambiado cada dos días.

Este proceso se llevó a cabo en ambientes ventilados y protegido de la luz solar durante una semana.

2.4.1.6. MOLIENDA Y ALMACENAMIENTO

Los rizomas de *Curcuma longa* L. (palillo) desecados se sometieron a una molienda

hasta la obtención de un polvo fino, el cual se guardó en un frasco de vidrio ámbar, limpio, seco, rotulado y cerrado herméticamente, para su posterior uso.

2.4.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

La extracción es un método de mayor importancia dentro de las operaciones farmacéuticas, por el cual se obtienen los principios activos de la planta de una manera más concentrada, existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo.⁽³⁾

Se realizó en los laboratorios de farmacognosia H-102 de la facultad de ciencias farmacéuticas, bioquímicas y biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María mediante el método de extracción continua Soxhlet.

2.4.2.1. EXTRACCIÓN POR SOXHLET.

Se basa en la extracción continua hasta agotamiento de una muestra por medio de un solvente apropiado a ebullición para finalmente obtenerse el extracto que contiene los componentes solubles de la planta.^(50, 51)

Se procedió a pesar 10.00 g de rizoma previamente pulverizadas de *Curcuma Longa* L. (palillo), se empacó en papel filtro atado con pabito (llamado cartucho) y fue colocado en el cuerpo extractor, paralelamente en el balón se colocó 200 mL del solvente indicado (Etanol, Éter de petróleo y N-butanol), procediéndose a armar el equipo Soxhlet.

Se ejecutaron varios ciclos de extracción para cada uno de los solventes hasta agotamiento de la droga, fueron realizadas a las siguientes temperaturas:

Extracción con Etanol 96°: Se realizó por 8 horas a temperatura de 78.4°C siendo el punto de ebullición del solvente, ejecutándose 15 ciclos.

Extracción con Éter de petróleo: Se realizó por 5 horas a temperatura de 40°C siendo el punto de ebullición del solvente, ejecutándose 20 ciclos.

Extracción con N-butanol: Se realizó por 12 horas a temperatura de 117°C siendo el punto de ebullición del solvente, ejecutándose 10 ciclos. (Ver figura N° 2.3)

Dicho procedimiento se realizó por quintuplicado para cada solvente.

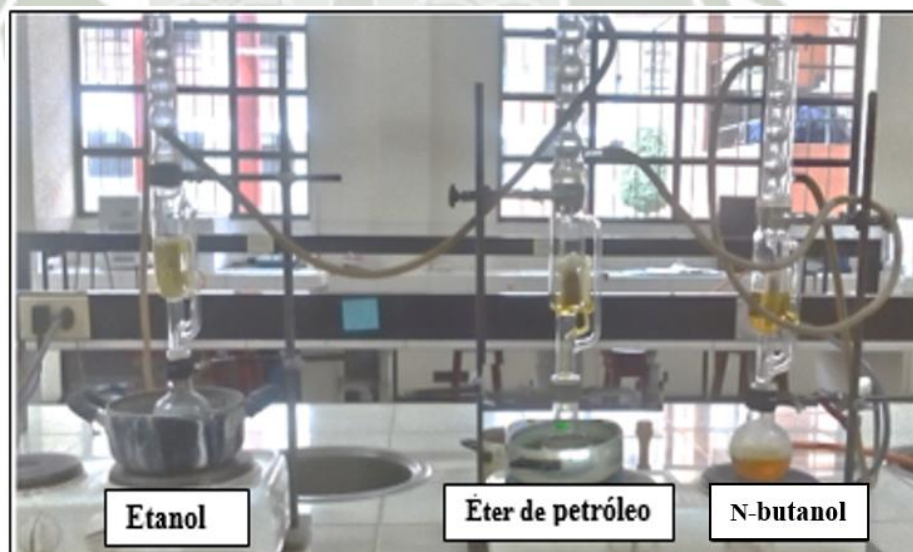


Figura N° 2.3: Extracción por Soxhlet

Fuente: Elaboración propia

2.4.2.2. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN

El porcentaje del rendimiento de extracción o el porcentaje de sólidos solubles se fundamenta en determinar la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto obtenido. ⁽⁵²⁾

Cuando se concluye la extracción de los componentes del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo) provenientes de la extracción con el equipo Soxhlet las cuales fueron arrastradas por los solventes utilizando (etanol, n-butanol y éter de petróleo), se llevaron los extractos a los vasos de precipitados previamente estabilizados y pesados, se llevaron a baño maría hasta sequedad total, para finalmente ser pesados y determinar su porcentaje de rendimiento por diferencia de pesos. El porcentaje de rendimiento se determina por la siguiente ecuación:

$$\%RE: \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso de la muestra seca}} \times 100$$

2.4.2.3. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DE LOS EXTRACTOS DE *Curcuma longa*. L (palillo)

En este apartado nos centraremos en las características organolépticas de los extractos de etanol, n-butanol y éter de petróleo de la *Curcuma longa* L. (palillo), tomándose en cuenta los siguientes caracteres: color, olor y aspecto.

2.4.3. MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

La cromatografía en capa fina o película fina o más comúnmente llamada TLC, es una técnica muy empleada para la separación, identificación y determinación de componentes puros de una mezcla en base a la diferencia de propiedades físicas de aquellos, debido a su simplicidad, bajo costo relativo, alta sensibilidad y velocidad de separación. ⁽⁵³⁾

La CCF funciona en el mismo principio que toda cromatografía: un compuesto tendrá afinidades diferentes para las fases móvil y estacionaria, y esto afecta la velocidad a la que migra. El objetivo de la CCF es obtener puntos bien definidos y bien separados.
(53)

Fase estacionaria: Esta fija en una columna o en una superficie plana de vidrio. Está conformada por placa de sílica gel 20 x 15.

Fase móvil: Se desplaza sobre o a través de la fase estacionaria, acarreado una mezcla de disolventes en la que se encuentra el analito.

Una vez obtenida el porcentaje de rendimiento de los 3 extractos se procede a seleccionar el de mayor rendimiento, para identificar por CCF la mayoría de los compuestos de metabolito secundarios presenten en el rizoma de naturaleza polar.

2.4.3.1. PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL Y REVELADORES.

Con el fin de identificar a los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) se realizaron las siguientes mezclas de disolventes empleados para la construcción de la fase móvil con sus correspondientes reveladores. Son como se muestran a continuación.

A. Identificación general.

Para la identificación general se preparó una fase móvil de acetato de etilo: metanol: agua, relación (90: 20: 10) y se usó el revelador ácido sulfúrico al 5 % y vainillina al 1% en etanol.

B. Identificación de curcuminoides.

Para la identificación de curcuminoides se preparó una fase móvil de cloroformo: metanol: ácido acético glacial relación (95: 5: 1) y se observaron a luz UV 254 nm.

C. Identificación de taninos

Para la identificación de taninos se preparó una fase móvil de metanol: agua, relación (70: 30) y se usó el revelador cloruro férrico 1% en etanol.

D. Identificación de flavonoides

Para la identificación de flavonoides se preparó una fase móvil de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua, relación (60: 10: 10: 20) y se usó el revelador cloruro de aluminio al 5% en etanol.

2.4.3.2. DESARROLLO CROMATOGRÁFICO

Se colocó un volumen adecuado de la fase móvil en cubas cromatográficas de vidrio, se esperaron un tiempo de 15 a 20 minutos para garantizar la saturación de medio.

Por otro lado, se procedió a realizar el sembrado en las placas de silica gel que fueron cortadas en pequeños cromatofolios de 10 x 2 cm, con el uso de un lápiz señalamos la línea de sembrado para delimitar la placa posteriormente fueron puestas en contacto con la fase móvil hasta que su ascenso este aproximadamente 1 cm del extremo superior de las placas. Una vez secas se procedió a llevar las placas a luz UV y a identificación con reveladores químicos. (Ver figura N° 2.4)



Figura N° 2.4: Desarrollo Cromatográfico de *Curcuma longa* L. (palillo)

Fuente: Elaboración propia

2.4.4. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CLÍNICAS EN ESTUDIO

Las cepas clínicas aisladas en estudio *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, en cantidad de 27 unidades fueron obtenidas de distintos nosocomios.

Para mantener estables las cepas clínicas se realiza la conservación y replicación de cepas utilizando diferentes medios de cultivo:

- Agar Mac Conkey para la replicación de *Escherichia coli*.
- Agar Manitol salado para *Staphylococcus aureus*
- Agar Sabouraud para *Candida albicans*.

Los cultivos y medios de replicación deben ser considerados de acuerdo con la naturaleza de cada muestra, de los microorganismos que se investigan y de la flora saprofita o patógena que se pueden encontrar. El uso de medios de cultivo adecuados debe brindar como resultado, el rápido crecimiento de microorganismos viable que directamente o mediante posteriores resiembras formaran colonias aisladas disponibles para su estudio.

2.4.4.1. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.

2.4.4.1.1. *Staphylococcus aureus*.

A. Fermentación de manitol.

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina.⁽⁵⁴⁾ Fue elegido para la conservación y selectividad del *Staphylococcus aureus*.

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

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

B. Coloración Gram.

Es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas, se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana. ⁽⁵⁴⁾

Se presentan en racimos irregulares sin flagelos. ⁽⁵⁴⁾

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.

Se observó al microscopio a 40X y posteriormente a 100X con aceite de inmersión.

C. Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. ⁽⁵⁴⁾

Hay un desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno lo cual indica que la prueba es positiva, esta diferencia a los *Staphylococcus* de los *Streptococcus* que son catalasa negativa ⁽⁵⁴⁾

Se colocó en una lámina portaobjeto una colonia, se agregó 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%.

D. Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina. Es la principal característica que diferencia al *Staphylococcus aureus* las demás especies no producen esta enzima ⁽⁵⁴⁾

En un tubo de ensayo estéril se colocó 0.5 mL de plasma y con el asa de col, se colocó una colonia de *Staphylococcus aureus* y se mezcló por rotación suave del tubo evitando remover o agitar el contenido, se colocó el tubo en la incubadora a 37°C por 4 horas, hasta la formación de un coágulo visible se considera una reacción positiva. ⁽⁵⁶⁾

2.4.4.1.2. Escherichia coli.

A. Agar Mac Conkey

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias diseñado para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos. Fue elegido para la conservación y selectividad de la *Escherichia coli*. ⁽⁵⁴⁾

Se sembró por el método de estría la muestra de *Escherichia coli* en placa de agar Mac Conkey y se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas.

Las bacterias fermentadoras de lactosas se observan de color rosado con o sin zona de precipitado alrededor, mientras que las no fermentadoras de lactosa se observan incoloras o transparentes. ⁽⁵⁴⁾

B. 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.⁽⁵⁴⁾

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.⁽⁵⁴⁾

Se sembró 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.⁽⁵⁴⁾

Si es A/A, se observa todo el tubo de color amarillo, fermenta la glucosa, lactosa y sacarosa, con producción o no de gas.⁽⁵⁴⁾

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.⁽⁵⁴⁾

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.⁽⁵⁴⁾

C. 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. ⁽⁵⁴⁾

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. ⁽⁵⁴⁾

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. ⁽⁵⁴⁾

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. ⁽⁵⁴⁾

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. ⁽⁵⁴⁾

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. ⁽⁵⁴⁾

Se cargó el aza de cole con la muestra de *Escherichia coli* y se le agrego al caldo peptonado agitándolo y se dejó en la 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. ⁽⁵⁴⁾

E. Prueba de rojo de metilo - Voges Proskawer (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. ⁽⁵⁴⁾

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. ⁽⁵⁴⁾

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

Luego de finalizado el tiempo de incubación se transfirió 1 mL de caldo para Voges Proskawer.

En el caldo restante se reveló con rojo de metil, agregando 4 a 8 gotas del indicador rojo de metilo.

Para el revelar Voges-Proskawer se agregó 10 gotas de alfa naftol al 5% y 1 gota de hidróxido de potasio al 5%.

Se agitó cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se dejó reposar por 10 a 15 minutos.

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. ⁽⁵⁴⁾

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

2.4.4.1.3. *Candida albicans*.

La identificación para hongos como *Candida albicans*, se realizó mediante pruebas microbiológicas de identificación específicas. ⁽⁵⁴⁾

A. Agar Sabouraud

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo, etc.). ⁽⁵⁴⁾

Se tomó una asada de la cepa en estudio y se procedió a sembrarla en una placa con agar Sabouraud por el método de estría, se dejó a medio ambiente por 48 horas y se observó crecimiento del microorganismo.

B. Tinción Gram.

Técnica rápida que nos permitía la identificación de la cepa *Candida albicans*. ⁽⁵⁴⁾

Se colocó una azada de suero fisiológico y una colonia levaduriforme; disgregue suavemente sobre una lámina portaobjeto limpia.

Se dejó secar a temperatura ambiente o pasando suavemente por la llama para obtener la fijación del frotis con la finalidad de que el material no sea arrastrado mediante el proceso de tinción.

Se colocó el preparado sobre un soporte de tinción y se cubrió la superficie con solución de cristal violeta.

Luego de un de exposición de cristal violeta, se lavó con pequeño chorro de agua de caño y se cubrió el preparado con yodo de Gram durante 1 minuto.

Se lavó con pequeño chorro de agua de caño luego se sostuvo el portaobjeto entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con unas gotas del decolorante alcohol-acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Se requiere unos 10 segundos más o menos.

Se cubrió la superficie con la safranina por 1 minuto, se lavó a chorro débil con agua de año, se secó al aire a temperatura ambiente y se observó al microscopio en 40 X y 100 X.

C. Examen directo.

El examen directo de una cepa clínica correctamente tomada es el medio más simple y rápido, la microscopía sigue siendo una de las herramientas más antiguas y útiles ya que la mayoría de los hongos se pueden detectar sin tinción.⁽⁵⁴⁾

Se cogió una asada de la colonia más aislada y se colocó sobre un portaobjeto, al cual se le agrego 2 gotas de hidróxido de potasio al 10%, posteriormente se le colocó un portaobjeto para poder observarlo al microscopio de 10X hasta 40X.

D. Prueba del tubo germinativo

La prueba del tubo germinal, conocida como prueba de filamentación en suero, solo *Candida albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales.⁽⁵⁴⁾

Se tomó un inóculo muy pequeño de una colonia aislada de levaduras y se suspendió en 0.5 mL de suero humano normal, los tubos inoculados se incubaron a 35°C durante 3 horas, luego de la inoculación, se colocó 1 gota de la suspensión de levaduras en un portaobjeto limpio, se le colocó un cubreobjetos y se examina con bajo poder luminoso, en busca de tubos germinativos.

2.4.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Curcuma longa* L. (palillo).

El efecto antimicrobiano es una de las tantas armas con las que contamos en el laboratorio para determinar si una droga tiene efecto sobre ciertos microorganismos.

Los métodos para evaluar el efecto antimicrobiano están clasificados, en dos grupos principales: métodos de dilución, métodos de difusión, los cuales utilizamos en el extracto de *Curcuma longa* L.(palillo) sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

2.4.5.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM).

Es definida como la menor concentración en la que un antimicrobiano inhibe el desarrollo de los microorganismos. Se realizó por el método de dilución en tubo. ⁽⁵⁴⁾

2.4.5.1.1. MÉTODO DILUCIÓN EN TUBO

El método de dilución en tubo consiste en atacar al microorganismo de interés con agentes antimicrobianos en un medio líquido (caldo de cultivo). ⁽⁵⁴⁾

En cada agente patógeno se prueba la sustancia activa a distintas concentraciones. El rango de concentración es probado para cada antimicrobiano que se encuentra disuelta en los tubos de ensayo con medios de cultivo bacteriano. Posterior a la incubación se

determina cual es el tubo que no se aprecia turbidez por lo tanto da la concentración inhibitoria mínima de la sustancia que se requiere, para no producir el desarrollo de microorganismos, pero puede darse el caso que el extracto a investigar imposibilite la correcta visualización del crecimiento microbiano por lo que se procede a sembrar en placas. ⁽⁵⁴⁾

A. Preparación de la solución madre del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo).

Se preparó una solución del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) obtenido por el método de extracción por Soxhlet a una concentración de 10 mg/mL y de 100 mg/mL a estas soluciones las denominamos solución madre. (Ver figura N° 2.5)

Se utilizó Tween 20 a 1 % para diluir completamente la solución madre, al cual se le realizó un blanco para descartar que presente efecto antimicrobiano. (Ver Anexo 4.)

Para la concentración de 10 mg/mL, se preparó con 1.5 g de extracto seco en agua destilada c.s.p 150 mL.

Para la concentración de 100 mg/mL, se utilizó 1.5 g del extracto seco en agua destilada c.s.p 15 mL.



Figura N° 2.5: Solución Madre

Fuente: Elaboración propia

B. Preparación de inóculo.

Se seleccionó 4 a 5 colonias de las cepas en particular (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*).

Se tocó la superficie de cada colonia con una aza de siembra y se transfirió a un tubo que contenga 5 mL de caldo peptonado.

Para el caso de la preparación del inóculo se utilizó el mismo procedimiento para las diferentes cepas estudiadas.

Se ajustó la turbidez del inóculo con caldo peptonado hasta que se obtuvo la turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland la que equivale a 10^8 UFC/mL.

Luego se procedió a realizar una dilución 1/100 del inóculo para obtener una solución 10^6 UFC/mL.

Para realizar este paso correctamente se debe usar luz apropiada y colocar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

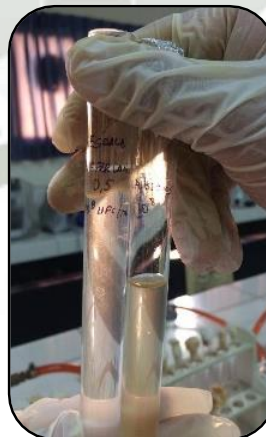


Figura N° 2.32: Turbidez a la escala de Mac Farland

Fuente: Elaboración propia.

C. Preparación de las diluciones

El recuento por dilución proporciona una idea del número de organismos vivos presentes en una muestra que son capaces de multiplicarse en un medio líquido determinado. Se basa en encontrar el número de microorganismos por unidad de volumen, hasta asegurar que después de la incubación se obtenga un resultado cuantificable.⁽⁵⁴⁾

Una vez obtenido el extracto etanólico que fue elegido por su alto porcentaje de rendimiento se empezó a realizar las diferentes diluciones. Se trabajó con una cantidad total de 27 microorganismos, siendo 9 cepas por cada especie: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, procedentes de los 3 diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.

Se agregó a cada tubo los mililitros necesarios de la solución de extracto madre de acuerdo a la concentración final.

Posteriormente a cada tubo se le agregó del 1000 uL de inóculo, turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland la que equivale 10^6 UFC/mL.

Luego se agregó la cantidad de caldo peptonado para estandarizar los volúmenes, obteniendo 2 mL para cada tubo.

Luego se procedió a incubar por 24 horas a 37°C , para exponer a los microorganismos en estudio con el extracto.

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 N° 2.1 y N° 2.2)

Este procedimiento se repitió para cada uno de los microorganismos en estudio.

TABLA N° 2.1. Diluciones a una concentración de 10 mg/mL de la solución madre.

CARACTERÍSTICAS	TUBOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 10 (mg/mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Inóculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Concentración final (mg/mL)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Incubar a 37° C por 24 horas										

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 2.2. Diluciones a una concentración de 100 mg/mL de la solución madre

CARACTERÍSTICAS	TUBOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 100 (mg/mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Inóculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Concentración final (mg/mL)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Incubar a 37° C por 24 horas										

Fuente: Elaboración propia

2.4.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) Y CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).

Es la Concentración donde la sustancia en investigación produce la muerte del 99.9 % de las bacterias en estudio.⁽⁵⁴⁾

2.4.5.2.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA.

Se basa en sembrar en medio sólido los tubos inferiores a la concentración mínima inhibitoria, lo cual determina la concentración mínima capaz de matar al microorganismo. (54)

Se preparó los agares selectivos para cada cepa en estudio: agar manitol salado, agar Sabouraud y agar Mac Conkey, una vez autoclavado se procedió a plaquiar en placas 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.

2.4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el ordenamiento, interpretación y análisis estadísticos de los datos, se utilizó el software Excel y Minitab para lo cual se utilizaron los siguientes instrumentos estadísticos. (55)

2.4.6.1. MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL.

En medida de tendencia central se determinó mediante cálculos con los parámetros de promedio, moda y mediana.

2.4.6.2. MEDIDA DE DISPERSIÓN.

2.4.6.2.1. DESVIACIÓN ESTÁNDAR. (D.S.)

Se determinó la medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio. ⁽⁵⁵⁾

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

Dónde:

- \sum sum significa "suma de"
- x es un valor de un conjunto de datos.
- \bar{x} es la media del conjunto de datos
- n es el número de puntos de datos.

2.4.6.2.2. VARIANZA

Se determinó la media de las diferencias con las medias elevadas al cuadrado. Se calculó sacando el cuadrado de la desviación estándar: σ^2 . ⁽⁵⁵⁾

2.4.6.3. PRUEBAS DE HIPÓTESIS

2.4.6.3.1. ANOVA (análisis de varianza).

Prueba que se utilizó para determinar la diferencia significativa entre K número de grupos para contrastar la hipótesis nula de que las medias de distintas poblaciones coinciden. ⁽⁵⁶⁾

En esta prueba de significancia se demostró estadísticamente si el efecto hallado al aplicar los tratamientos es debido a los mismos o a otros factores fuera del tratamiento. ⁽⁵⁶⁾

F de V	SC	GL	CM	FC
Entre grupos				
Dentro de grupos				
Total				

Dónde:

F de V = fuentes de variable

GL = grados de libertad

FC = prueba F

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrados medios

$P > 0.05$: diferencia no significativa.

$P < 0.05$: diferencia significativa.

2.4.6.4. PRUEBA DE ESPECIFICIDAD

2.4.6.4.1. TEST DE TUKEY

Sirve para probar todas las diferencias entre medias de tratamientos de una experiencia. Se aplicó una vez obtenido los datos del análisis de varianza (ANOVA), es decir si en el análisis de varianza los resultados obtenidos para los grupos sea una diferencia significativa a los diferentes tratamientos. Se procedió a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente o más específico.⁽⁵⁶⁾

De no hallarse significancia en la prueba de análisis de varianza (ANOVA) no será necesario realizar el test de Tukey.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En el siguiente capítulo se dará a conocer los diferentes resultados obtenidos en la investigación con la finalidad de detallar todos los procesos que se trabajaron, donde se llegó a demostrar el efecto antimicrobiano del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

3.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La *Curcuma longa* L. (palillo) se obtuvo de una Eco Huerta de la ciudad de Puerto Maldonado, provincia de Tambopata del departamento de Madre de Dios, una vez trasladados a los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María de la ciudad de Arequipa.

3.1.1. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL.

La *Curcuma longa* L. (palillo) fue llevada al Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD) de Arequipa, donde identificaron la especie vegetal como *Cúrcuma longa* L. (Zingiberaceae), procedente de la ciudad de Puerto Maldonado, provincia Tambopata y departamento de Madre de Dios, a los 12° 35,59' LS-69° 11,34' LO y a 139 m de elevación. (Ver Anexo 1.).

3.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE *Curcuma longa* L. (palillo)

La *Curcuma Longa* L. (palillo) es un tallo subterráneo que presenta las siguientes características. (ver tabla N° 3.1)

TABLA N° 3.1: Análisis organolépticos

Color	Amarillo anaranjado
Sabor	Picante, ligeramente amargo
Olor	Aromático sui géneris
Aspecto	Cilíndrico , rugoso

Fuente: Elaboración propia



Figura N° 3.1: *Curcuma longa* L. (palillo)

Fuente: Elaboración propia

En la figura N° 3.1. Se observa una característica principal del rizoma que es su coloración amarillo intenso, probablemente se deba a la presencia de curcumina que es principio activo de la *Curcuma longa* L. (palillo)

3.1.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE *Curcuma longa* L. (palillo)

Con los análisis físico-químicos realizados se obtuvo la caracterización de los rizomas cultivados en el departamento de Madre de Dios (Ver Anexo 2.), encontrando diferencias con reportes de otra región de otros Países ^(57, 58)

Debido a las características ambientales y fisiológicas de los rizomas, se podría pensar en el hecho, de ser cultivados en una región más húmeda con temperaturas más altas, estos parámetros pueden alterar las composiciones químicas tal como se pudo observar en los rizomas de las tres regiones. (Ver tabla N° 3.2).

La composición química de la planta es variable según el cultivar, se podrá encontrar diferentes porcentajes de metabolitos secundarios. ⁽²⁾

TABLA N° 3. 2. Composición físico-química

Parámetros	Madre de Dios (Perú)	Quindío (Colombia)	Portuguesa (Venezuela)
Humedad (%)	88.75	84.73	72.63
Cenizas totales (%)	1.35	3.90	1.40
Grasas totales (%)	0.95	0.051	7.54
Fibra (%)	2.10	11.88	8.35
Acidez titulable (%)	0.01	-	-
Proteínas (%)	14.53	-	-

Fuente: Elaboración propia

3.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Curcuma longa* L. (palillo)

Una vez obtenida la muestra de *Curcuma longa* L. (palillo) se procedió a realizar la extracción con solventes de diferentes polaridades los cuales fueron etanol, n-butanol y éter de petróleo.

Estas extracciones se llevaron a cabo por el método de Soxhlet, colocando 10.00 g del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo) con 200 mL de cada uno de los solventes mencionados extrayendo hasta agotamiento de la muestra.

Posteriormente los extractos obtenidos fueron llevados a evaporación a baño maría. Luego de obtener los extractos secos se procedió a realizar los cálculos para la determinación de sus respectivos porcentajes de rendimiento. (Ver Anexo 3.)

3.2.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE *Curcuma longa* L. (palillo)

Los extractos de *Curcuma Longa* L. (palillo) presentaron las siguientes características. (ver tabla N° 3.3)

TABLA N° 3.3. Caracteres organolépticos.

CARACTERÍSTICAS	TIPO DE EXTRACTO		
	ETANÓLICO	ETÉREO	N-BUTANÓLICO
Color	Amarillo –naranja intenso	Amarillo pálido	Amarillo
Olor	Fuertemente aromático	Ligeramente aromático	Aromático Sui generis
Aspecto	Extracto seco.	Extracto seco.	Extracto seco.

Fuente: Elaboración propia

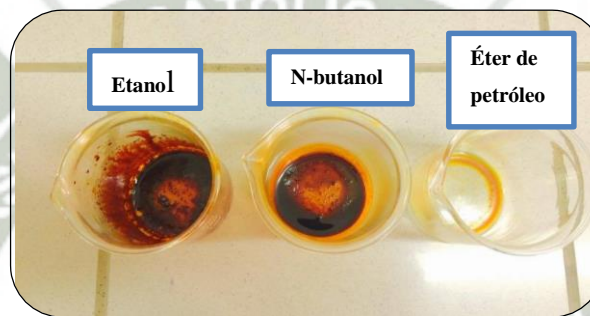


Figura N° 3.2 Extractos de *Curcuma Longa L.* (Palillo)

Fuente: Elaboración propia

En la Figura N° 3.2, el extracto etanólico presenta una coloración amarillo naranja intenso probablemente se deba a la presencia de su compuesto principal llamado curcumina a diferencia del extracto de éter de petróleo que es amarillo pálido y al del extracto de N-butanol que es amarillo naranja de poca intensidad.

3.2.2. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Curcuma longa L.* (palillo)

Los extractos de *Curcuma longa L.* (palillo) obtenido por el método de Soxhlet se traspasó a vasos de precipitados debidamente tarados para obtener el peso real de cada uno de los extractos y poder calcular el porcentaje de rendimiento. Los porcentajes de rendimiento se calcularon utilizando la siguiente formula:

$$\text{rendimiento} = \frac{\text{Pvaso mas coprecipitado} - \text{Pvaso vacio}}{\text{Pvaso mas muestra} - \text{Pvaso vacio}} \times 100$$

Para certificar la obtención de los extractos de *Curcuma longa* L. (palillo) en cantidad suficiente, a los tres solventes empleados se le realizaron cinco repeticiones mediante el equipo extractor Soxhlet obteniéndose un promedio final de los porcentajes de rendimientos para cada uno de los extractos (etanólico, n-butanólico y éter de petróleo). (Ver tabla N° 3.4), (Ver Anexo 3.)

TABLA N° 3.4. Porcentaje de rendimiento promedio de los extractos secos de *Curcuma longa* L. (palillo)

SOLVENTE	EXTRACTOS	DROGA (g)	EXTRACTO SECO (g)	RENDIMIENTO (%)
ETANOL	1 ^{ra} extracción	10.00	1.5102	15.10
	2 ^{da} extracción	10.00	1.5084	15.08
	3 ^{ra} extracción	10.00	1.5054	15.05
	4 ^{ta} extracción	10.00	1.5062	15.06
	5 ^{ta} extracción	10.00	1.5104	15.10
N-BUTANOL	1 ^{ra} extracción	10.00	0.2998	3.00
	2 ^{da} extracción	10.00	0.2879	2.88
	3 ^{ra} extracción	10.00	0.3001	3.00
	4 ^{ra} extracción	10.00	0.2981	2.98
	5 ^{ra} extracción	10.00	0.2991	2.99
ÉTER DE PETRÓLEO	1 ^{ra} extracción	10.00	0.2022	2.02
	2 ^{da} extracción	10.00	0.2092	2.09
	3 ^{ra} extracción	10.00	0.2041	2.04
	4 ^{ra} extracción	10.00	0.2102	2.10
	5 ^{ra} extracción	10.00	0.2097	2.10

Fuente: Elaboración propia

3.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Curcuma longa* L. (palillo).

Una vez obtenidos los resultados de los porcentajes de rendimiento, procedimos a realizar un análisis descriptivo, en el cual presentamos los datos principales para observar las diferencias entre los porcentajes de los tres extractos de *Curcuma longa* L. (palillo).

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que el porcentaje de mayor rendimiento es del extracto etanólico obteniendo un promedio de 15.08 % con una desviación estándar de 0.02 y un coeficiente de variación de 0.15%, siguiéndole el extracto de n-butanol con un rendimiento de 2.97% con una desviación estándar de 0.05 y un coeficiente de variación de 1.72%, por último el extracto de éter de petróleo con un rendimiento de 2.07%, una desviación estándar de 0.03 y un coeficiente de variación de 1.81%. (Ver tabla N° 3.5).

TABLA N° 3.5. Análisis estadístico descriptivo de los rendimientos (%) de los extractos de *Curcuma longa* L. (palillo) para cada tipo de solvente.

	ETANOL	N-BUTANOL	ÉTER DE PETRÓLEO
RECUESTO	5	5	5
PROMEDIO (%)	15.08	2.97	2.07
DESVIACIÓN EST.	0.02	0.05	0.03
CV (%)	0.15	1.72	1.81

Fuente: Elaboración propia

Para la selección del solvente a emplear en los métodos posteriores, se realizó el análisis estadístico de comparación ANOVA (Ver tabla N° 3.6). El valor F en ANOVA fue de 155205.88 el cual es mayor a 3.89, esto nos dice que existe al menos una diferencia entre los grupos. La probabilidad fue menor a 0.05, por lo cual se concluye los porcentajes de rendimientos obtenidos en el tratamiento de *Curcuma longa* L. (palillo) con los tres solventes no es la misma.

TABLA N° 3.6 Análisis de variancia de los rendimientos (%) de los extractos de *Curcuma longa* L. (palillo) para cada tipo de solvente.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Orígenes de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	527.7	2	263.85	15520 5.88	1.62 E-27	3.89
Dentro de los grupos	0.02	12	0.0017			
TOTAL	527.72	14				

Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenido los resultados por el análisis de varianza, se procedió a realizar una prueba confirmatoria (Tukey).

Primero se realizó de forma manual los cálculos para determinar la comparación en parejas Tukey que nos dio a conocer si hay igualdad o no entre los grupos estudiados, el valor en tablas el cual se halló como resultado del total de grupo y los grados de libertad del residuo, y nos dio un valor en tablas para Tukey de 3.77, gracias a esta valor pudimos hallar la d.m.s. el cual fue 0.0689. (Ver tabla N° 3.7). Se usaron las siguientes afirmaciones:

- $|X_a - X_b| \geq \text{d.m.s.} = \mu_a \neq \mu_b$
- $|X_a - X_b| < \text{d.m.s.} = \mu_a = \mu_b$

Segundo se realizó los cálculos de las medias de los extractos en el programa Minitab, donde se confirma la diferencia entre los porcentajes de rendimientos obtenidos con cada solvente. (Ver tabla N° 3.8).

TABLA N° 3.7 Comparaciones en parejas de Tukey

Comparación	Xa-Xb	d.m.s.	Conclusión
Extracto etanólico y extracto de n-butanol	12,11	0,0689	$\mu_A \neq \mu_B$
Extracto etanólico y extracto de éter de petróleo	13,01	0,0689	$\mu_A \neq \mu_C$
Extracto de n-butanol y extracto de éter de petróleo	0,9	0,0689	$\mu_B \neq \mu_C$

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 3.8 Información de agrupación Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
Etanólico	5	15.0780	A
N-butanol	5	2.9700	B
Éter de petróleo	5	2.0700	C

Fuente: Minitab

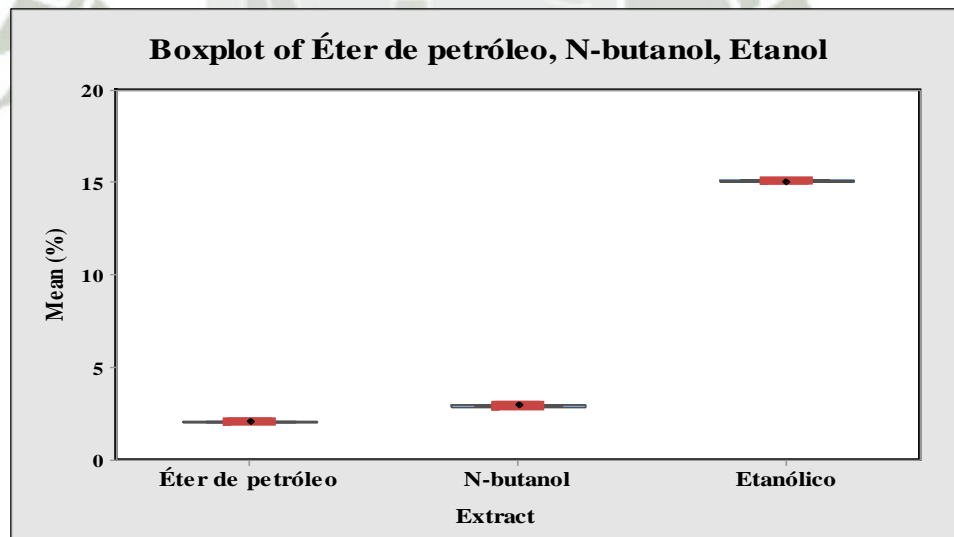


Figura N° 3.3: Promedios de los rendimientos (%) de los extractos de *Curcuma longa* L. (palillo) para cada tipo de solventes.

Fuente: Minitab

En la figura N° 3.3, gráfica de caja y bigotes la cual muestra los promedios para cada tipo de solventes así se ve para el éter de petróleo un valor de $(2.07 \pm 0.03) \%$ para n-butanol $(2.97 \pm 0.05) \%$ y para el extracto con solvente etanólico $(15.08 \pm 0.02) \%$, con ello se puede concluir que el extracto etanólico presento mayor rendimiento respecto a los otros solventes empleados.

Por tal motivo se procedió a elegir a este extracto para realizar el posterior análisis en cromatografía en capa fina y su evaluación microbiológica.

El alto porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) probablemente se deba a que contiene alta cantidad de compuestos fenólicos, la especie vegetal puede llegar a tener un 8% de curcuminoides según el cultivar (JEAN BRUNETON, 2004), los curcuminoides son solubles en etanol, la diferencia probablemente sean otros compuestos solubles en etanol. ⁽²⁾

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

Una vez obtenido los 3 extractos, se eligió el extracto etanólico debido a su elevado porcentaje de rendimiento, probablemente debido a un alto contenido de sustancias polares.

Posteriormente se le realizó la prueba de cromatografía de capa fina y se identificó los principales metabolitos secundarios presentes en la *Curcuma longa* L. (palillo).

Armani et al. (2012). Establece que la actividad antimicrobiana de la planta se debe a la presencia de curcuminoides, terpenos, taninos, flavonoides y alcaloides. ^(59, 60, 61, 16)

3.3.1. IDENTIFICACIÓN GENERAL.

Para la identificación general se usó una fase móvil de acetato de etilo: metanol: agua (97:20:10), en esta cromatografía se buscó separar compuestos tipo monoterpenos, diterpenos y triterpenos con grupos funcionales polares.

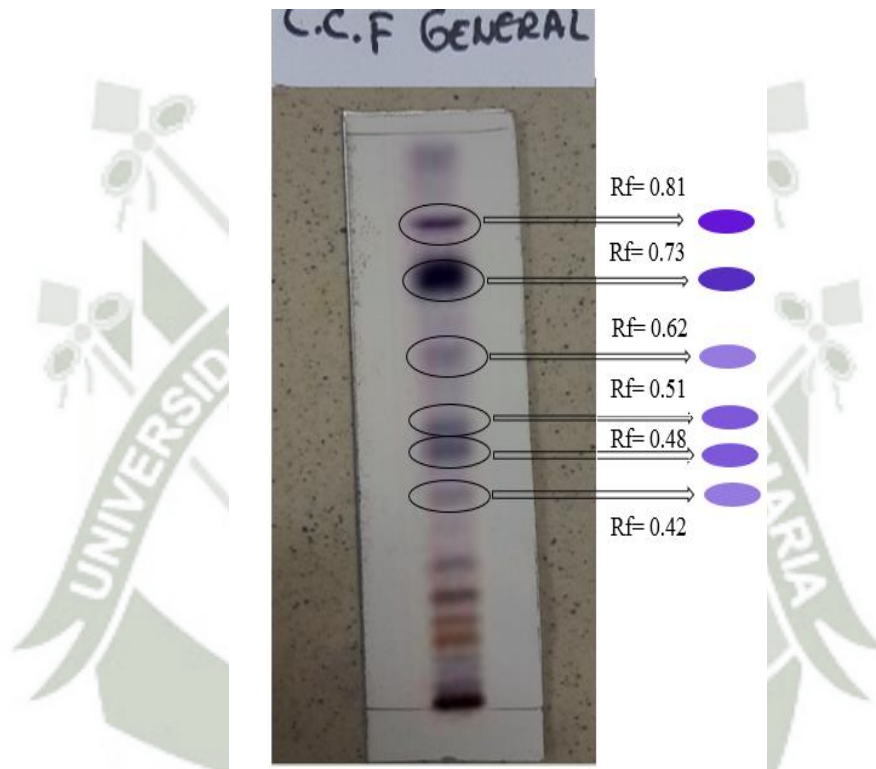


Figura N° 3.4: CCF general

Fuente: Elaboración propia

En la figura N° 3.4, resultados obtenidos en la placa cromatografía, donde se aprecia bandas que van de color violeta pálido a azul violeta intenso, que demuestran la presencia de terpenos en la *Curcuma longa* L. (palillo). Luego se observan las placas cromatográficas en una lámpara UV a una longitud de onda de 254 nm. Se siendo sus Rf de 0.42, 0.48, 0.51, 0.62, 0.73 y 0.81

Según H. WAGNER, S. BLADT, 1996, Las correspondientes manchas con un Rf de 0.51 y 0.81 nos indica que probablemente pertenecen a sesquiterpenos. ⁽⁶²⁾

3.3.2. IDENTIFICACIÓN DE CURCUMINOIDES.

Para la identificación de curcuminoides se usó como fase móvil cloroformo: metanol: ácido acético glacial relación (95: 5: 1) a UV.

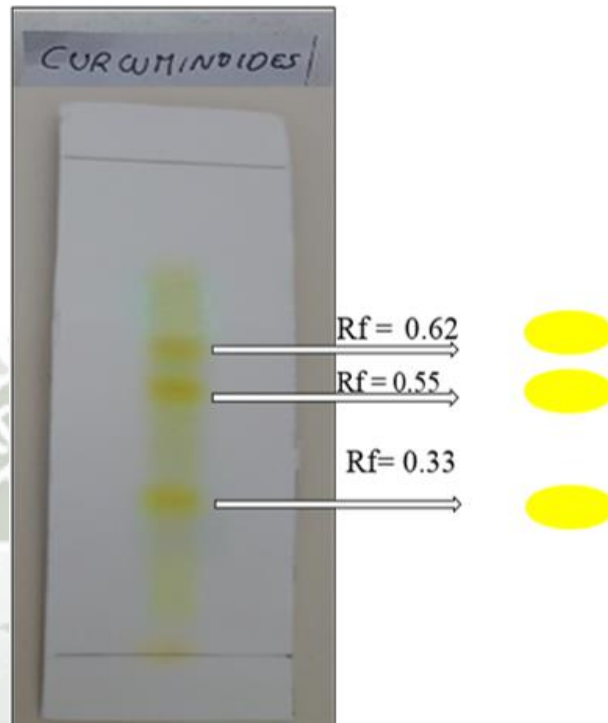


Figura N° 3.5: CCF de los Curcuminoides.

Fuente: Elaboración propia

En la figura N° 3.5, placa cromatográfica con bandas de colores amarillos característicos que pertenecen a la presencia de los compuestos tipos curcuminoides: curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina. Luego se observa las placas cromatografías en una lámpara UV a una longitud de onda de 254 nm. Se siendo sus Rf los siguientes: 0.33, 0.55 y 0.62.

Los resultados en la evaluación de los pigmentos presentes en la *Curcuma longa* L. (palillo) se identifica la curcumina, por la correspondencia en Rf (H. WAGNER, S. BLADT, 1996), una mancha muy cercana y debajo corresponde a la demetoxicurcumina,

que se define con cierta intensidad, y otra de Rf obtenida, corresponde a la bisdemetoxicurcumina, la que resulta particularmente intensa. ⁽⁶²⁾

3.3.3. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS.

Para la identificación de taninos se usó como fase móvil metanol: agua (90:100).

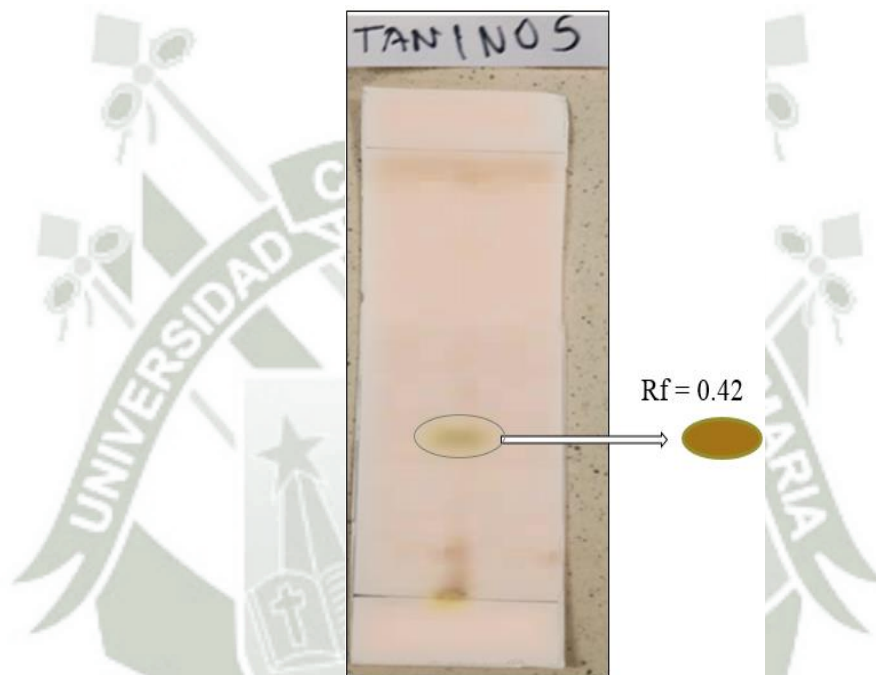


Figura N° 3.6: CCF de taninos.

Fuente: Elaboración propia

En la figura N° 3.6, placa cromatográfica con una banda marrón claro. Los colores característicos que pertenecen a la presencia de taninos varían de color verde a marrón (JEAN BRUNETON, 2004).

Lo que nos indica que probablemente los taninos están presentes en la *Cúrcuma longa* L. (palillo). Luego se observan las placas cromatografías en una lámpara UV a una longitud de onda de 254. Se siendo su Rf de: 0.42.

3.3.4. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

Para la identificación de Flavonoides se usó como fase móvil acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:24).

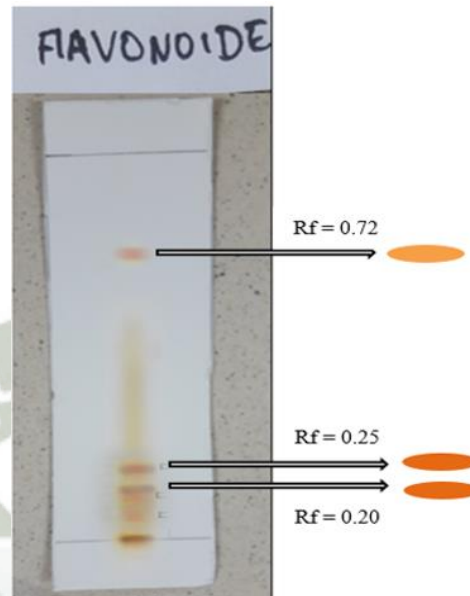


Figura N° 3.7: CCF de Flavonoides

Fuente: Elaboración propia

En la figura N° 3.7, Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (Palillo) presenta manchas de color amarillo naranja, lo cual indicaría la presencia de flavonoides. Luego se observa las placas cromatografías en una lámpara UV a una longitud de onda de 254. Se siendo su Rf de: 0.20, 0.25 y 0.72.

Los flavonoides presentan coloraciones amarillo característico, como también coloraciones que varían de naranjas y rojas, dependiendo del revelador a usar (JEAN BRUNETON, 2004).

Los resultados obtenidos de la Cromatografía de capa fina (CCF) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo), se observan los diferentes grupos de metabolitos secundarios con sus respectivos Rf y colores que se observaron en la placa cromatográfica. (ver tabla N° 3.9)

TABLA N° 3.9 Resumen de los resultados de la Cromatografía de Capa Fina (CCF) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo)

GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	RF	COLORACIÓN
CROMATOGRAFÍA GENERAL (TERPENOS)	0.42	violeta pálido
	0.48	violeta pálido
	0.51	Azul violeta
	0.62	Violeta pálido
	0.73	Azul violeta intenso
	0.81	Azul violeta intenso
CURCUMINOIDES	0.33	Amarillo
	0.55	Amarillo
	0.62	Amarillo
TANINOS	0.42	Marrón claro
FLAVONOIDES	0.20	Naranja
	0.25	Naranja
	0.72	Naranja pálido

Fuente: Elaboración propia

Según Villacís J, 2009 el extracto etanólico es el mejor método de extracción porque posee una mayor capacidad de extracción de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana, en su mayoría son compuestos con afinidad en solventes polares como lo es el etanol. ⁽⁶³⁾

Los metabolitos secundarios son responsables de diversas acciones farmacológicas y una de ellas es la actividad antimicrobiana de los taninos, flavonoides y fenoles (Valencia C. 1995), lo cual queda demostrado en investigaciones realizadas por Alzamora L.*et al*, 2001 y Añanca E. 2009.

3.4. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CLÍNICAS EN ESTUDIO.

Una vez recolectadas las 9 cepas clínicas por microorganismo de los tres establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa, los llevamos al laboratorio 402 de la Universidad Católica de Santa María y se procedió a realizar la identificación bioquímica.

3.4.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.

En las pruebas bioquímicas se determinaron las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Estas pruebas requirieron para su lectura el crecimiento del microorganismo donde se incubaron durante 24 h.

Primero se realizó las pruebas de identificación para las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y se obtuvieron los siguientes resultados:

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 el color amarillo lo cual indicó la acidificación del medio por el consumo del carbohidrato. (Ver figura N°3.8 - A)

Después de haber identificado el microorganismo lo primero que se hace para identificar una bacteria es saber si pertenece al grupo de las Gram positivas o Gram negativas, entonces sabiendo esto se realizó el método de tinción Gram para identificarla, dando como resultado que esta bacteria al tener una capa gruesa de peptido glucano se tiñó de color azul, evitando que se decolore por el alcohol acetona siendo así una bacteria del grupo de las Gram positivas. (Ver figura N°3.8 - B)

Para la identificación de la bacteria *Staphylococcus aureus* se usó también la prueba de la catalasa, esta prueba al ser positiva nos muestra específicamente que se trata del *Staphylococcus aureus*, la enzima catalasa desdobra el peróxido de hidrógeno en agua y

oxígeno dándonos como resultado el desprendimiento de burbujas (ver figura N°3.8 - C), esta prueba usada en microbiología es la mas sencilla de hacer para identificarla.

La enzima que estimula la conversión del fibrinogeno en fibrina, comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de esta enzima, dándonos como resultado coagulasa positiva. (Ver figura N°3.8 - D)

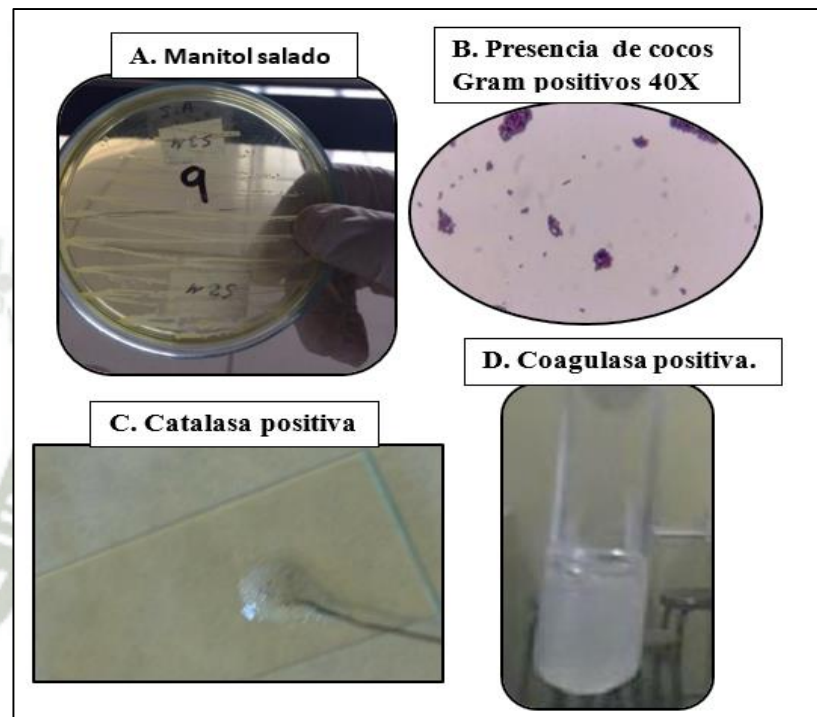


Figura N° 3.8: Identificación bioquímica de *Staphylococcus aureus*

Fuente: Elaboración propia.

En el caso de las cepas clínicas de *Escherichia coli* se obtuvieron los siguientes resultados:

La bacteria *Escherichia coli* es un microorganismo Gram negativo, esta enterobacteria creció selectivamente en el agar macconkey, formando colonias rojas lo que nos indicó que estuvo fermentando el carbohidrato, (Ver figura N° 3.9 – A)

Para la correcta identificación de este microorganismo, se realizó diferentes pruebas bioquímicas la cual la diferencia de los otros grupos de enterobacterias.

Una de estas pruebas es la Triple azúcar de hierro (TSI) la cual nos dio 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. si el pico y el fondo del tubo cambiaron de color. (Ver figura N° 3.9 – B).

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, esto solo se da en medio ácido, si el microorganismo no descarboxila la lisina pero si fermenta la glucosa el medio cambia al color amarillo y no al violeta, es por eso la diferencia. (Ver figura N° 3.9 – C)

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 N° 3.9 – D)

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 N° 3.9 – E)

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, lo cual se ve al no cambiar de color el medio. (Ver figura N° 3.9 – F)

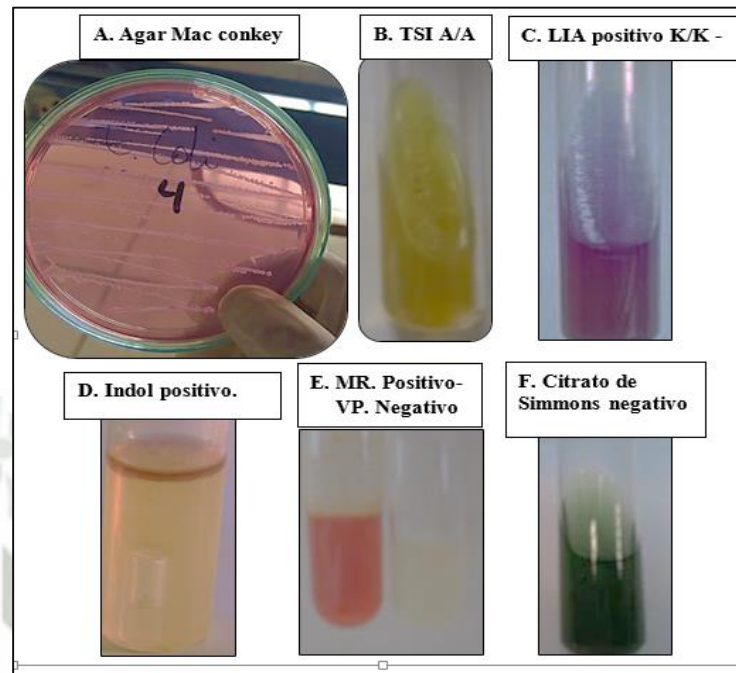


Figura N° 3.9: Identificación bioquímica de *Escherichia coli*.

Fuente: Elaboración propia.

Por último, en la identificación bioquímica para las cepas clínicas de *Candida albicans* se obtuvieron los siguientes resultados:

Las cepas clínicas de *Candida albicans* fueron sembradas en el agar selectivo Sabouraud, en este estudio macroscópico se pudo observar colonias blanquecinas, cremosas, lisas y rugosas. (Ver figura N° 3.10 – A)

A estas cepas se le realizaron la prueba de tinción Gram, al teñirse de color azul se observaron al microscopio presencia de levadura y pseudohifas Gram positivas (Ver figura N° 3.10 – B)

Para su correcta identificación se tuvo que hacer el examen directo en el microscopio observando así levaduras ovaladas de 3-5 micrómetros de diámetro y la presencia de blastoconidias y pseudohifas. (Ver figura N° 3.10 – C)

Finalmente, la prueba de tubo germinativo se realizó en una siembra de suero humano, dándonos un resultado rápido, confirmandos que estas cepas clínicas son *Candida albicans*. (Ver figura N° 3.10 – D)

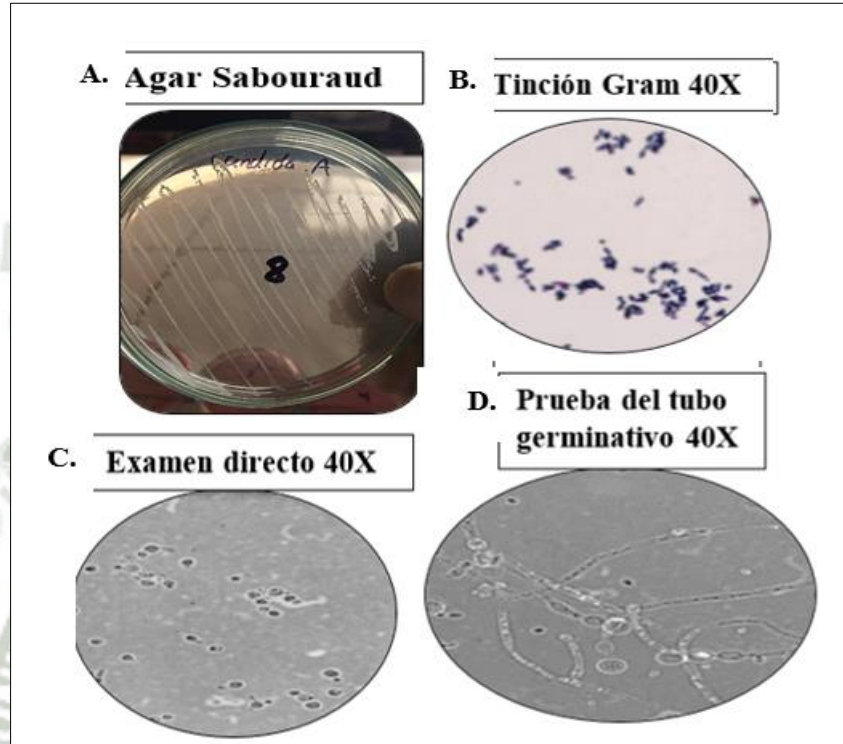


Figura N° 3.10: Identificación bioquímica de *Candida albicans*.

Fuente: Elaboración propia

3.4.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Curcuma longa* L. (palillo).

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 15.08 % probablemente a que la *Curcuma longa* L. (palillo) tenga mayor cantidad de compuestos polares, a los cuales se identificaron por cromatografía de capa fina (CCF) obteniendo como resultado la presencia de curcuminoides, terpenos, taninos y flavonoides, que probablemente sean responsables del efecto antimicrobiano del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre la cepas clínicas en estudio.

Con los microorganismos debidamente identificados bioquímicamente, se procedió a determinar el efecto antimicrobiano del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

3.4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Curcuma longa* L. (palillo).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó mediante el método de dilución en tubos. Este método se aplicó para hallar la menor concentración en la que una droga inhibe el crecimiento microbiano. El efecto de la *Curcuma longa* L. (palillo), se evaluó observando la presencia o ausencia de turbidez.

A continuación, en la tabla N° 3.10, se puede observar los resultados correspondientes de la concentración inhibitoria mínima (CIM) que dió como resultado al exponer a las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, con el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) a distintas concentraciones por el método de dilución en tubo.

Se observa que para todas las cepas *S. aureus* del hospital Edmundo Escomel EsSalud, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano esta entre el tubo número 7 y 8, correspondientes a la concentración de 3.5 y 4 mg/mL. Siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 4 mg/mL.

En las cepas clínicas adquiridas en el hospital Honorio Delgado Espinoza se observa que para de *S. aureus* 1, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano esta entre el tubo número 6 y 7, correspondientes a la concentración de 3 y 3.5 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3.5 mg/mL, para las cepas de *S. aureus* 2 y 3 el punto de corte se encuentra entre los tubos 7 y 8 siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 4 mg/mL.

Y en el caso de las cepas clínicas adquiridas en el hospital Goyeneche, se puede observar que para las cepas de *S. aureus* 1, el punto de corte del tubo con crecimiento y el

de no crecimiento microbiano esta entre el tubo número 7 y 8, correspondientes a la concentración de 3.5 y 4 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 4 mg/mL, para la cepa de *S. aureus* 2 y 3 el punto de corte se encuentra entre los tubos 6 y 7 dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 3.5 mg/mL.

TABLA N° 3.10. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma Longa* L. (palillo) sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/mL)	1	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Cepas clínicas										
<i>S. aureus</i> 1 (EsSalud)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> 2 (EsSalud)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> 3 (EsSalud)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> 1 (H. Honorio)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 2 (H. Honorio)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> 3 (H. Honorio)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> 1 (H. Goyeneche)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> 2 (H. Goyeneche)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 3 (H. Goyeneche)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

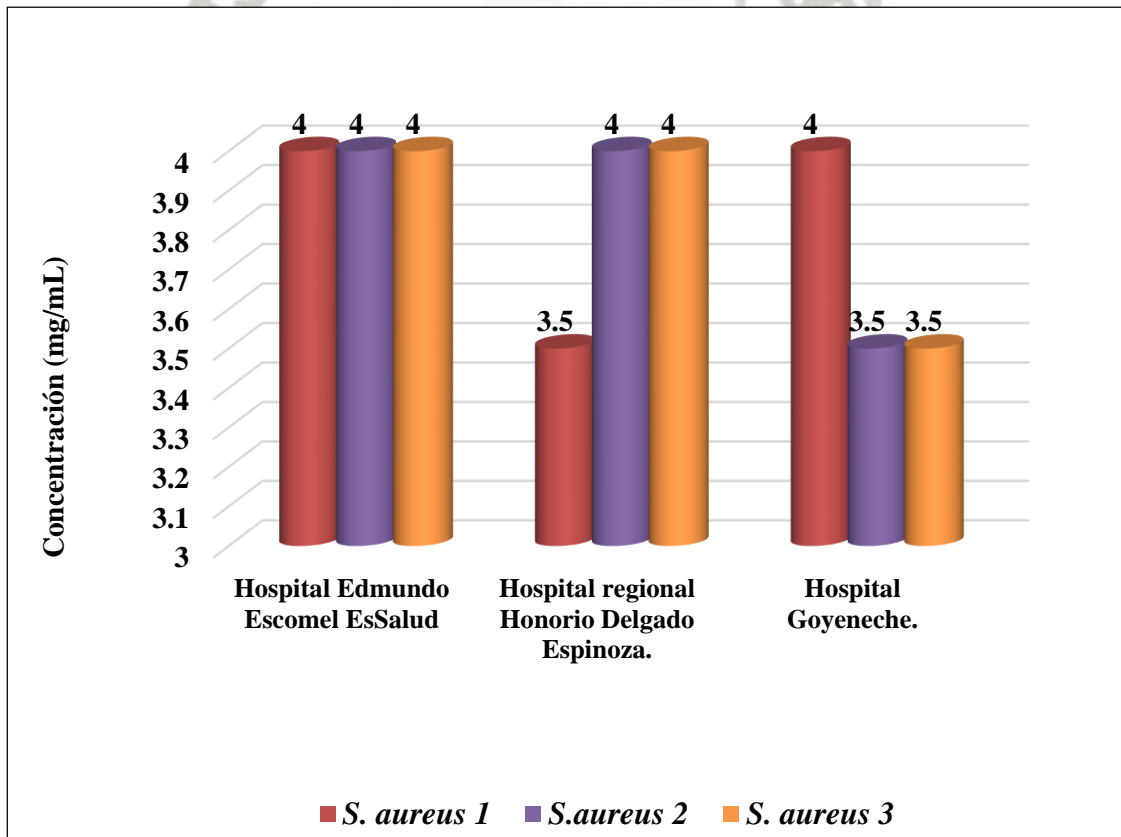
Fuente: Elaboración propia.

- : Sin crecimiento bacteriano +: Con crecimiento

Por otro lado, en la figura N° 3.11 presentamos el gráfico donde se compara la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* relacionando el establecimiento de salud donde fueron adquiridas.

Existe diferencia de la concentración inhibitoria mínima (CIM), siendo menor sobre las cepas de *S. aureus* 1 del hospital Honorio Delgado Espinoza y las cepas de *S. aureus* 2 y 3 del Hospital Goyeneche, probablemente se deba a la poca resistencia que presentaron las cepas frente a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto en estudio. Esto debido al genotipo y fenotipo de dichas cepas clínica. ^(64, 65, 66)

Figura N° 3.11. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3.11, observamos los resultados correspondientes de la concentración inhibitoria mínima (CIM) que dió como resultado al exponer a las cepas clínicas de *Escherichia coli* con el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) a distintas concentraciones por el método de dilución en tubo.

Se observa que para las cepas clínicas adquiridas del hospital Edmundo Escomel EsSalud, las *E. coli* 1 y 3, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano esta entre el tubo número 5 y 6, correspondientes a la concentración de 25 y 30 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 30 mg/mL, para la *E. coli* 2 el punto de corte se encuentra entre los tubos 6 y 7, dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 30 mg/mL.

En las cepas clínicas adquiridas en el hospital Honorio Delgado Espinoza, se puede observar que para las *E. coli* 1, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano esta entre el tubo número 4 y 5, correspondientes a la concentración de 20 y 25 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 25 mg/mL, para la *E. coli* 2 y 3 el punto de corte se encuentra entre los tubos 5 y 6, dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 30 mg/mL.

Y en el caso de las cepas clínicas adquiridas en el hospital Goyeneche, observamos que para las *E. coli* 1 y 2, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano esta entre el tubo número 6 y 7, correspondientes a la concentración de 30 y 35 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 35 mg/mL, para la *E. coli* 3 el punto de corte se encuentra entre los tubos 5 y 6, dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 30 mg/mL.

Dada la variación de los resultados se puede ver que las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) no caen en una misma concentración lo cual indica diferentes respuestas de las cepas de *Escherichia coli* frente al extracto.

TABLA N° 3.11. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma Longa L.* (palillo) sobre cepas de *Escherichia coli*.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/mL)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Cepas clínicas										
<i>E. coli 1 (EsSalud)</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli 2 (EsSalud)</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli 3 (EsSalud)</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli 1 (H. Honorio)</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli 2 (H. Honorio)</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli 3 (H. Honorio)</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli 1 (H. Goyeneche)</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli 2 (H. Goyeneche)</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli 3 (H. Goyeneche)</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

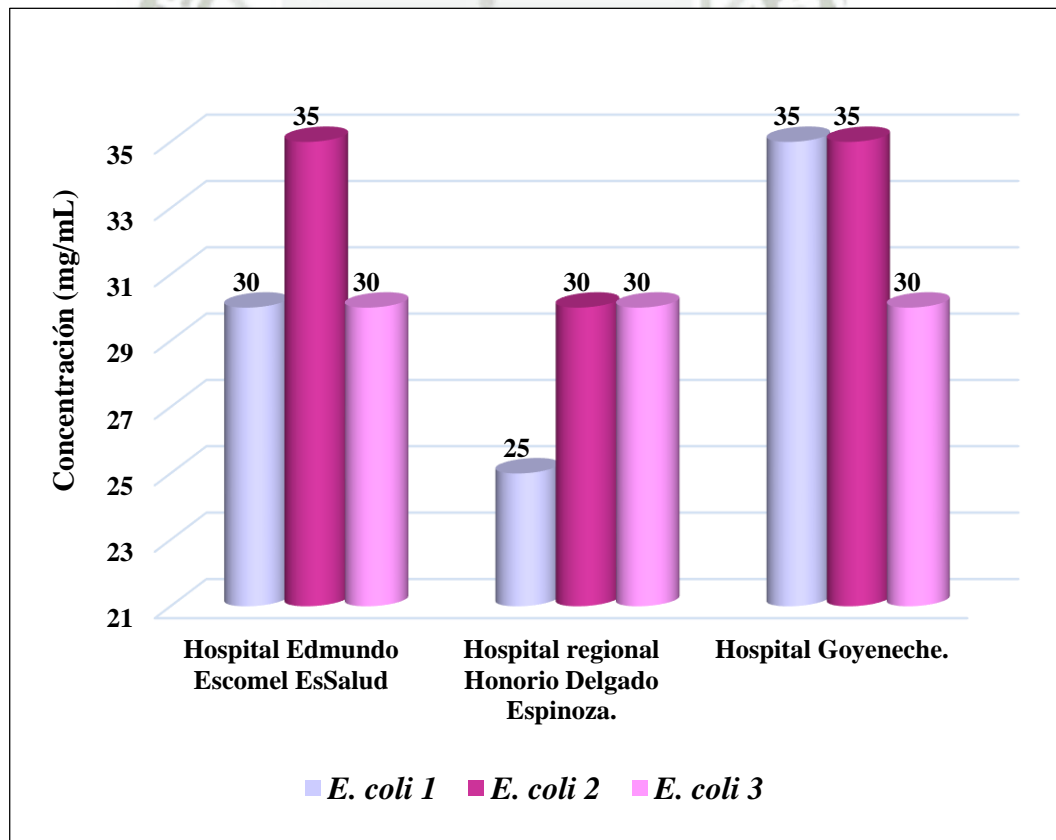
- : Sin crecimiento bacteriano

+: Con crecimiento

En la figura N° 3.12 presentamos el gráfico de comparación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas de *Escherichia coli* relacionando el establecimiento de salud donde fueron adquiridas.

Debido al genotipo y fenotipo que presenta cada bacteria ⁽⁶⁵⁾, se observó la diferencia de la concentración inhibitoria mínima (CIM), siendo mucho menor sobre la cepa de *E. coli* 1 del hospital Honorio Delgado Espinoza, pero mayor en la cepa de *E. coli* 2 del EsSalud y en las cepas *E. coli* 1, 2 del Hospital Goyeneche, probablemente se deba a la resistencia que tuvo cada cepa frente a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto en estudio ⁽⁶⁴⁾. (Ver Anexo 4.)

Figura N° 3.12. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Escherichia coli*.



Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N° 3.12, se describirá los resultados correspondientes a la concentración inhibitoria mínima (CIM) que dio como resultado al exponer a las cepas de *Candida albicans* al extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo).

En el caso de las cepas clínicas adquiridas en hospital Edmundo Escomel EsSalud, se observa que para las cepas de *C. albicans* 1 y 3, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 5 y 6, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 30 mg/mL, para la *C. albicans* 2, el punto de corte se encuentra entre los tubos 4 y 5, dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 25 mg/mL.

Describiendo a las cepas clínicas adquiridas del hospital Honorio Delgado Espinoza, se observa que para las cepas de *C. albicans* 1 y 2, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano está entre el tubo número 5 y 6, correspondientes a la concentración de 25 y 30 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 30 mg/mL, para la *C. albicans* 3, el punto de corte se encuentra entre los tubos 4 y 5, dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 25 mg/mL.

Por último, en las cepas clínicas obtenidas del hospital Goyeneche, se observa que para las cepas de *C. albicans* 1, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento microbiano está entre el tubo número 5 y 6, correspondientes a la concentración de 25 y 30 mg/mL, siendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 30 mg/mL, para la *C. albicans* 2 y 3, el punto de corte se encuentra entre los tubos 4 y 5, dando como concentración inhibitoria mínima (CIM) 25 mg/mL.

Dada la variación de los resultados se puede ver que las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) no caen en una misma concentración lo cual indica diferentes respuestas de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto.

TABLA N° 3.12. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma Longa L.* (palillo) sobre cepas de *Candida albicans*

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/mL)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Cepas clínicas										
<i>C. albicans</i> 1 (EsSalud)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 2 (EsSalud)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 3 (EsSalud)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 1 (H. Honorio)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 2 (H. Honorio)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 3 (H. Honorio)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 1 (H. Goyeneche)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 2 (H. Goyeneche)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 3 (H. Goyeneche)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

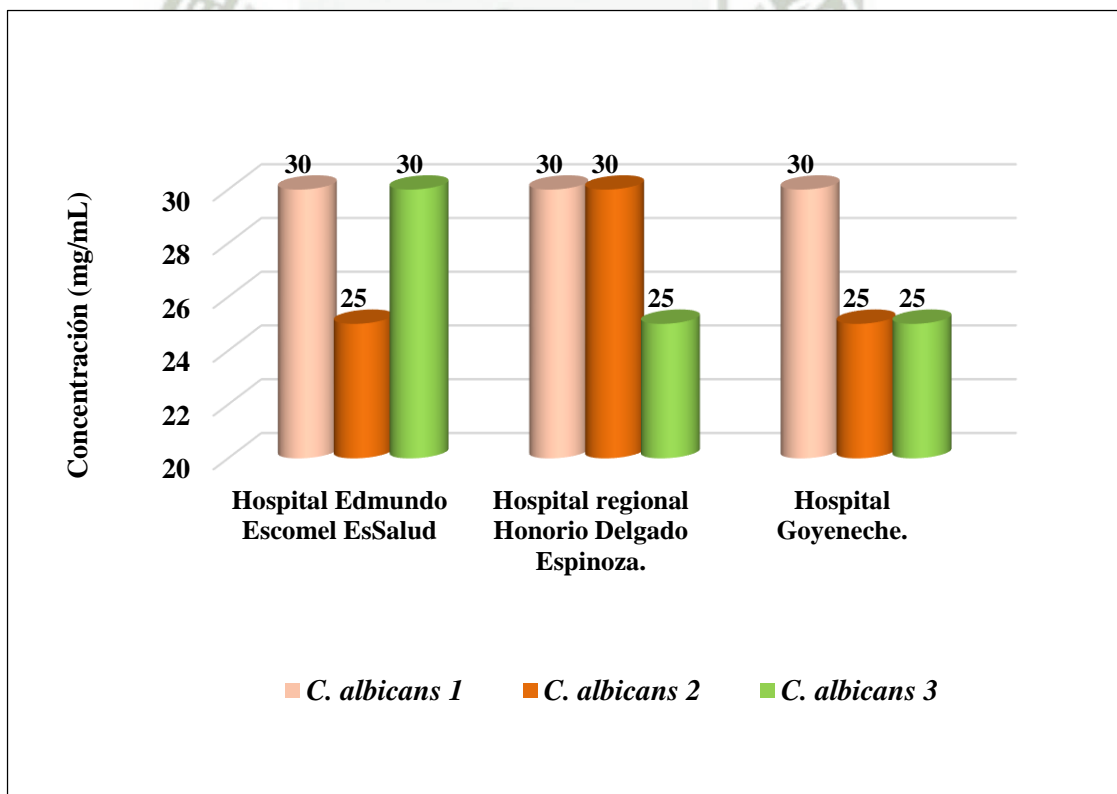
- : Sin crecimiento bacteriano

+: Con crecimiento bacteriano

En la figura N° 3.13 presentamos el gráfico de comparación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas de *Candida albicans* relacionando el establecimiento de salud donde fueron adquiridas.

En este caso también se observó la diferencia de la concentración inhibitoria mínima (CIM) sobre estas cepas clínicas, siendo menor sobre la cepa de *C. albicans* 2 del EsSalud, la cepa de *C. albicans* 3 del hospital Honorio Delgado Espinoza y en las cepas *C. albicans* 2, 3 del Hospital Goyeneche.

Figura N° 3.13. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Candida albicans* de los tres distintos establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.



Fuente: Elaboración propia

3.4.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Curcuma longa* L. (palillo) SOBRE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Una vez obtenidos los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas en estudio, procedimos a realizar un análisis descriptivo, en el cual presentamos los datos principales para observar las diferencias de dichas concentraciones. Podemos decir que la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue mayor sobre las cepas clínicas de *Escherichia coli* con un promedio de (31.11 ± 3.33) mg/mL, luego sobre las cepas clínicas de *Candida albicans* con un promedio de (27.78 ± 2.64) mg/mL y por último sobre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* con un promedio de (3.83 ± 0.25) mg/mL. (Ver tabla N° 3.13).

TABLA N° 3.13. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas en estudio.

Nosocomios	Concentración inhibitoria mínima (CIM)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Hospital Edmundo	4	30	30
Escomel EsSalud	4	35	25
	4	30	30
Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza.	3.5	25	30
	4	30	30
	4	30	25
Hospital Goyeneche.	4	35	30
	3.5	35	25
	3.5	30	25

Fuente: Elaboración propia

Se realizó el análisis estadístico de comparación ANOVA (Ver tabla N° 3.14). El valor F en ANOVA fue de 329.97 el cual es mayor a 3.40, esto nos dice que existe al menos una diferencia entre los grupos. La probabilidad fue menor a 0.05, por lo cual se concluye que la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* no es la misma.

TABLA N° 3.14 Análisis de Variancia de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas en estudio.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Orígenes de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	3985.57	2	1992.79	329.97	3.4863 E-18	3.40
Dentro de los grupos	144.94	24	6.0394			
TOTAL	4130.52	26				

Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenido los resultados por el análisis de varianza, se procedió a realizar una prueba confirmatoria (Tukey).

Primero se realizó de forma manual los cálculos para determinar la comparación en parejas Tukey que nos dio a conocer si hay igualdad o no entre los grupos estudiados, el valor en tablas el cual se halló como resultado del total de grupo y los grados de libertad del residuo, y nos dio un valor en tablas para Tukey de 3.77, gracias a esta valor pudimos hallar la d.m.s. el cual fue 2.89 (Ver tabla N° 3.15).

Se usaron las siguientes afirmaciones:

- $|X_a - X_b| \geq \text{d.m.s.} = \mu_a \neq \mu_b$
- $|X_a - X_b| < \text{d.m.s.} = \mu_a = \mu_b$

Segundo se realizó los cálculos de las medias de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* en el programa Minitab, donde se confirma la diferencia entre dichas concentraciones. (Ver tabla N° 3.16).

TABLA N° 3.15 Comparaciones en parejas de Tukey

COMPARACIÓN	$ X_a - X_b $	d.m.s.	CONCLUSIÓN
CIM <i>S. aureus</i> y CIM <i>E. coli</i>	27.28	2.89	$\mu_A \neq \mu_B$
CIM <i>S. aureus</i> y CIM <i>C. albicans</i> .	23.95	2.89	$\mu_A \neq \mu_C$
CIM <i>E. coli</i> y CIM <i>C. albicans</i> .	3.33	2.89	$\mu_B \neq \mu_C$

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 3.16 Información de agrupación Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
<i>Escherichia coli</i>	9	31.11	A
<i>Candida albicans</i>	9	27.778	B
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	3.8333	C

Fuente: Minitab

En la figura N° 3.14, se puede observar la gráfica de caja y bigotes la cual muestra los promedios de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre los microorganismos en estudio de los diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa. Siendo para las cepas de *Staphylococcus aureus* un promedio de (3.83 ± 0.25) mg/mL, para las cepas de *Candida albicans* un promedio de (27.78 ± 2.64) mg/mL y para las cepas de *Escherichia coli* un promedio de (31.11 ± 3.33) mg/mL. En base a estos resultados podemos decir que el

extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) presenta algún efecto inhibitorio, pero a distintas concentraciones para cada especie de microorganismo, siendo mayor en *E. coli* y *C. albicans*, según Gul et al. (2004) Probablemente se deba a la membrana externa de cada cepa, que fue capaz de restringir la penetración de la sustancia a menor concentración, por lo tanto, el efecto varía según morfología y estructura del microorganismo. (38, 41, 61)

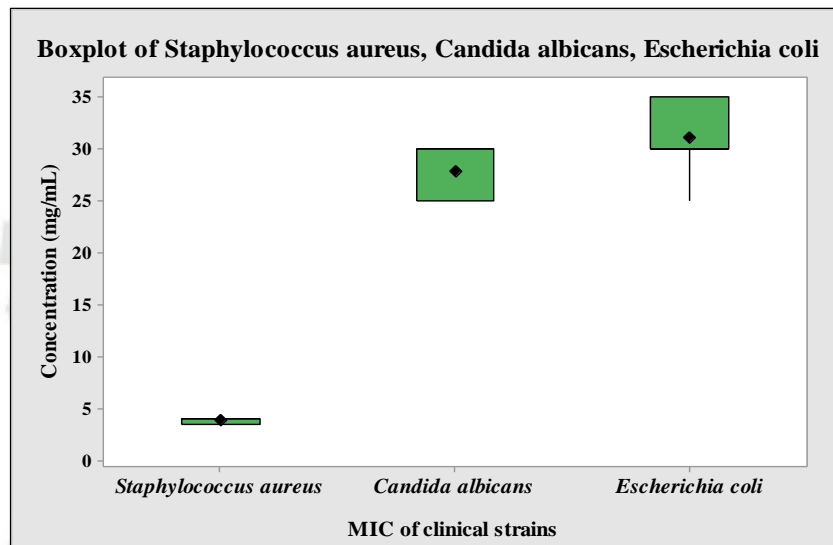


Figura N° 3.14: Promedios de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clinicas en estudio.

Fuente: Minitab

3.4.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) Y CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Curcuma longa* L. (palillo).

A continuación, presentamos las tablas con los resultados obtenidos, los cuales mediante la concentración bactericida mínima (CBM) se determinó si el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) tuvo actividad bactericida o bacteriostática sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Y esto se evidencia si coinciden la concentración inhibitoria mínima (CIM) con la concentración bactericida y fungicida (CBM Y CFM).

En tabla N° 3.17, N°, observamos los resultados referidos a la concentración bactericida mínima (CBM) que resultó de ser expuestos a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* por el método de dilución en agar.

Para todas las cepas clínicas adquiridas de los tres nosocomios, se observa que la placa 3 y 4 correspondiente a una concentración de 5 mg/mL no hubo desarrollo bacteriano por la ausencia de colonias en el agar, por lo tanto, la concentración bactericida mínima (CBM) es de 5 mg/mL.

TABLA N° 3.17. Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de *Curcuma Longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/mL)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
<i>S. aureus</i> 1 (EsSalud)								+	+	-
<i>S. aureus</i> 2 (EsSalud)								+	+	-
<i>S. aureus</i> 3 (EsSalud)								+	+	-
<i>S. aureus</i> 1 (H. Honorio)							+	+	+	-
<i>S. aureus</i> 2 (H. Honorio)								+	+	-
<i>S. aureus</i> 3 (H. Honorio)								+	+	-
<i>S. aureus</i> 1 (H. Goyeneche)								+	+	-
<i>S. aureus</i> 2 (H. Goyeneche)							+	+	+	-
<i>S. aureus</i> 3 (H. Goyeneche)							+	+	+	-
SEMBRADO							Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4
CBM para <i>Staphylococcus aureus</i>: 10 mg/mL										

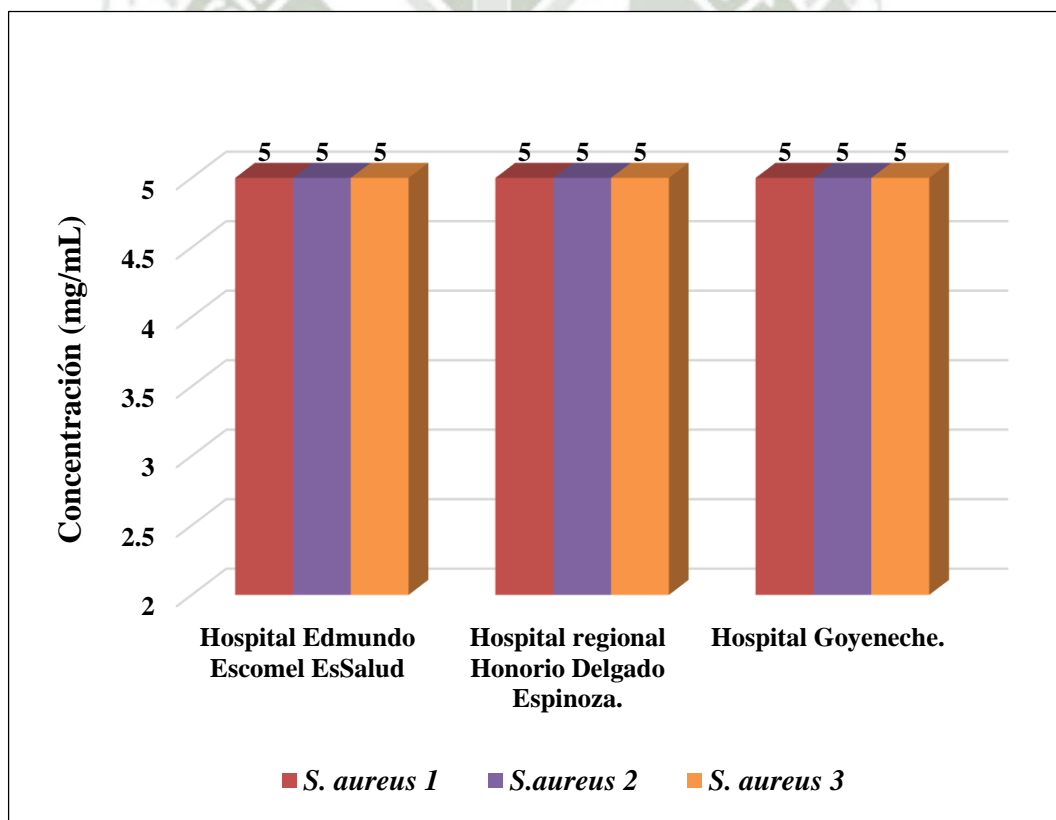
Fuente: Elaboración propia

\: Tubo descartado - : Sin crecimiento bacteriano +: Con crecimiento bacteriano

En la figura N° 3.15, se puede observar las concentraciones mínimas bactericida (CBM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* de diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.

Se observa que no hay diferencia de la concentración bactericida mínima (CBM) sobre las cepas clínicas de los tres nosocomios, todas fueron susceptible a una mayor concentración del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) siendo este de 5 mg/mL, logrando penetrar la pared celular y eliminando a las cepas a un 99.9%.^(67, 1) (Ver Anexo 4.)

Figura N° 3.15. Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaboración propia.

A continuación, en la tabla N° 3.18, se puede observar los resultados correspondientes a la concentración bactericida mínima (CBM) que dio como resultado al exponer a las cepas de *Escherichia coli* al extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) a distintas concentraciones por el método de dilución en tubo.

Paras las cepas clínicas adquiridas en el hospital Edmundo Escomel EsSalud, las *E. coli* 1 y 3 a partir de la placa 4 no hubo desarrollo bacteriano, siendo la concentración bactericida mínima (CBM) de 40 mg/mL, pero en el caso de la cepa de *E. coli* 2 a partir de la placa 5 no hubo desarrollo bacteriano, siendo la concentración bactericida mínima (CBM) de 45 mg/mL.

En el caso de las cepas clínicas adquiridas en el hospital Honorio Delgado Espinoza, se observa que la cepa de *E. coli* 1 a partir de la placa 3 no tuvo crecimiento bacteriano, siendo la concentración bactericida mínima (CBM) de 35 mg/mL, pero en el caso de las cepas de *E. coli* 2 y 3 a partir de la placa 4 no tuvo crecimiento bacteriano, por lo tanto, la concentración bactericida mínima (CBM) es de 40 mg/mL.

Por último, con las cepas clínicas adquiridas en el hospital Goyeneche, podemos observar, que para las cepas de *E. coli* 1 y 2 a partir de la placa 5 no tuvo crecimiento bacteriano, siendo la concentración bactericida mínima (CBM) de 45 mg/mL, pero en el caso de la cepa de *E. coli* 3 a partir de la placa 4 no tuvo crecimiento bacteriano, por lo tanto, la concentración bactericida mínima (CBM) es de 40 mg/mL.

Dada la variación de los resultados se puede ver que las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) no caen en una misma concentración lo cual indica diferentes respuestas de las cepas de *Escherichia coli* frente al extracto.

TABLA N° 3.18. Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de *Curcuma Longa L.* (palillo) sobre cepas de *Escherichia coli*.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/mL)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
<i>E. coli</i> 1 (EsSalud)	\	\	\	\	\	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> 2 (EsSalud)	\	\	\	\	\	\	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 3 (EsSalud)	\	\	\	\	\	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> 1 (H. Honorio)	\	\	\	\	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 2 (H. Honorio)	\	\	\	\	\	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> 3 (H. Honorio)	\	\	\	\	\	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> 1 (H. Goyeneche)	\	\	\	\	\	\	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 2 (H. Goyeneche)	\	\	\	\	\	\	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 3 (H. Goyeneche)	\	\	\	\	\	+	+	-	-	-
SEMBRADO	\	\	\	\	placa 1	placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6
CBM para <i>Escherichia coli</i> : 100 mg/mL										

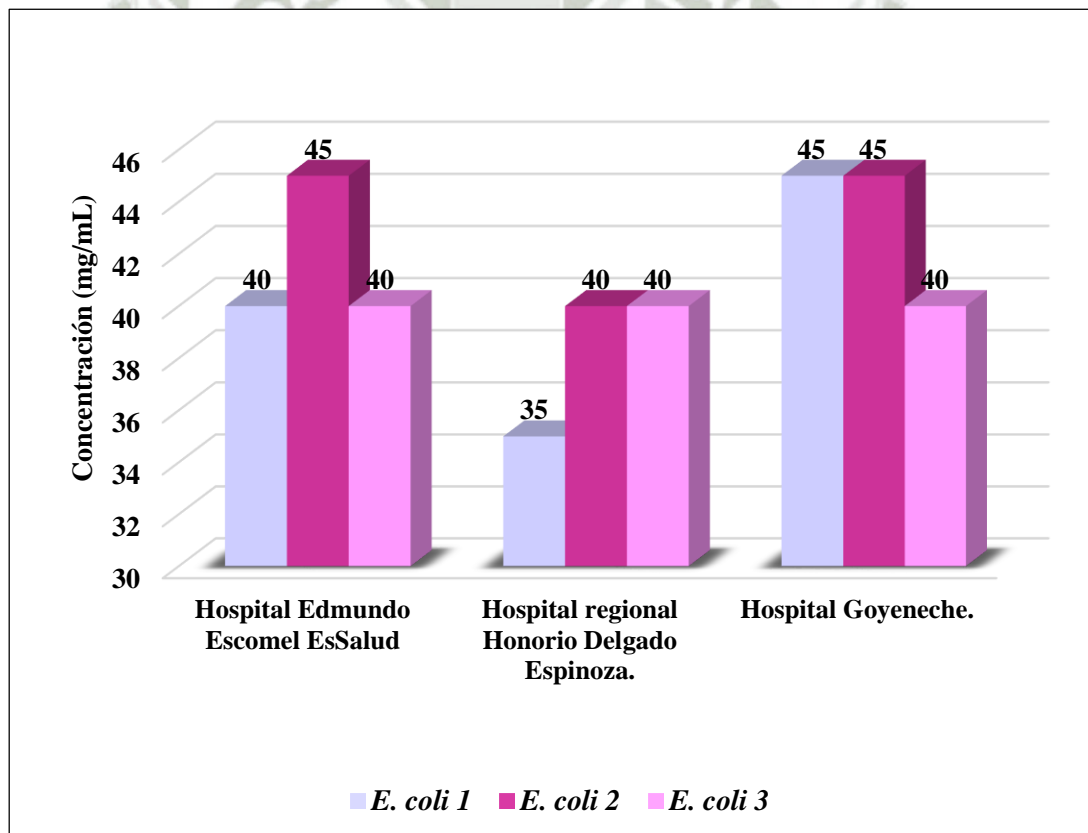
Fuente: Elaboración propia

\: Tubo descartado - : Sin crecimiento bacteriano +: Con crecimiento bacteriano

En la figura N° 3.16, observamos la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Escherichia coli* de diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.

Se distingue las cepas clínicas las cuales fueron susceptibles a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) los cuales fueron de 45 mg/mL, seguidas por la concentración de 40mg/mL y por último a una concentración de 35 mg/mL, a estas concentraciones las cepas de *Escherichia coli* de los tres nosocomios fueron eliminadas a un 99.9%.^(67, 1) (Ver Anexo 4.)

Figura N° 3.16. Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Escherichia coli*.



Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3.19, se describirá los resultados correspondientes a la concentración fungicida mínima (CFM) que dio como resultado al exponer a las cepas de *Candida albicans* al extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo).

Con las cepas clínicas obtenidas del hospital Edmundo Escomel EsSalud, observamos, que para las cepas de *C. albicans* 1 y 3 desde la placa 2 no hubo desarrollo microbiano por la ausencia de colonias en el agar, por lo tanto, la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) es de 30 mg/mL, para la cepa de *C. albicans* 2 a partir de la placa 1 no tuvo crecimiento microbiano, por lo tanto, la concentración fungicida mínima (CFM) es de 25 mg/mL.

Para las cepas clínicas adquiridas en el hospital Honorio Delgado Espinoza, se observa, que para las cepas de *C. albicans* 1 y 2 desde la placa 2 no hubo desarrollo microbiano por la ausencia de colonias en el agar, por lo tanto, la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) es de 30 mg/mL, para la cepa de *C. albicans* 3 a partir de la placa 1 no tuvo crecimiento microbiano, por lo tanto, la concentración fungicida mínima (CFM) es de 25 mg/mL.

Por último, para las cepas clínicas adquiridas del hospital Goyeneche, se observa que para las cepas de *C. albicans* 2 y 3 desde la placa 1 no hubo desarrollo microbiano por la ausencia de colonias en el agar, por lo tanto, la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) es de 25 mg/mL, para la cepa de *C. albicans* 1 a partir de la placa 2 no tuvo crecimiento microbiano, por lo tanto, la concentración fungicida mínima (CFM) es de 30 mg/mL.

Dada la variación de los resultados se puede ver que las concentraciones fungicidas mínimas (CFM) no caen en una misma concentración lo cual indica diferentes respuestas de las cepas de *Candida albicans* frente al extracto.

TABLA N° 3.19. Concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma Longa L.* (palillo) frente a *Candida albicans*.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/mL)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
<i>C. albicans</i> 1 (EsSalud)						-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 2 (EsSalud)					-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 3 (EsSalud)						-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 1(H. Honorio)						-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 2 (H. Honorio)						-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 3 (H. Honorio)					-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 1 (H. Goyeneche)						-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 2 (H. Goyeneche)					-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> 3 (H. Goyeneche)					-	-	-	-	-	-
SEMBRADO					Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6
CBM para <i>Candida albicans</i>: 100 mg/mL										

Fuente: Elaboración propia

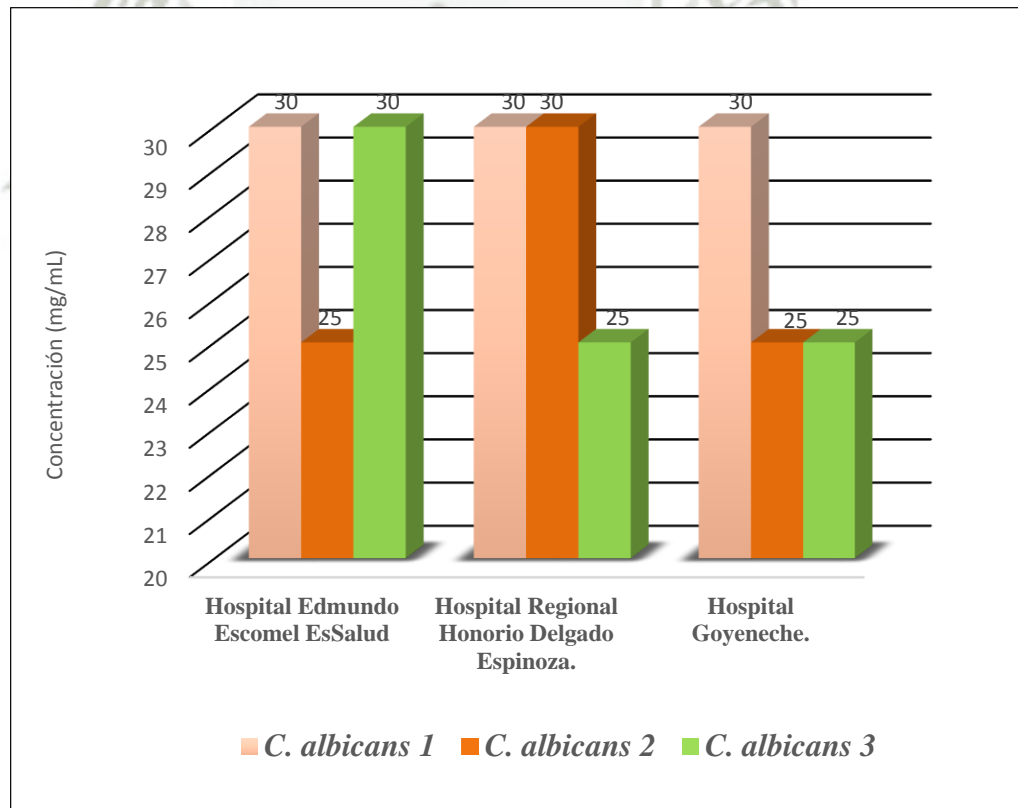
\: Tubo descartado - : Sin crecimiento bacteriano +: Con crecimiento bacteriano

En la figura N° 3.17, observamos la concentración fungicida mínimas (CFM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Candida albicans* de diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.

Se distingue las cepas clínicas susceptibles a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo), siendo de 25 mg/mL y 30 mg/mL respectivamente, a estas concentraciones las cepas de *Candida albicans* de los tres nosocomios fueron eliminadas a un 99.9%. (Ver Anexo 4.)

Por lo tanto, el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) cumple su función potente fungicida. ^(68, 69) (Ver Anexo 4).

Figura N° 3.17. Concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Candida albicans*.



Fuente: Elaboración propia

3.4.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) Y DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Curcuma longa* L. (palillo) SOBRE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*

Una vez obtenidos los resultados de la concentración bactericida y fungicida mínima (CBM y CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas en estudio, procedimos a realizar un análisis descriptivo, en el cual presentamos los datos principales para observar las diferencias de dichas concentraciones. Teniendo como promedio de (5.00 ± 0.00) mg/mL sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, (27.78 ± 2.64) sobre las cepas de *Candida albicans* y (41.11 ± 3.33) mg/mL sobre las cepas de *Escherichia coli*. (Ver tabla N° 3.20)

TABLA N° 3.20. Concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida Mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas en estudio.

Nosocomios	Concentración bactericida y fungicida mínima (CBM CFM)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Hospital Edmundo Escomel EsSalud	5	40	30
	5	45	25
	5	40	30
Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza.	5	35	30
	5	40	30
	5	40	25
Hospital Goyeneche.	5	45	30
	5	45	25
	5	40	25

Fuente: Elaboración propia

Se realizó el análisis estadístico de comparación ANOVA (Ver tabla N° 3.21). El valor F en ANOVA fue de 498.6154 el cual es mayor a 3.40, esto nos dice que existe al menos una diferencia entre los grupos.

La probabilidad fue menor a 0.05, por lo cual se concluye que la concentración bactericida mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* no es la misma.

TABLA N° 3.21. Análisis de Variancia de la concentración bactericida mínima (CBM) y concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas en estudio.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Orígenes de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	6001.85	2	3000.926	498.6 154	2.833 <i>E-20</i>	3.40
Dentro de los grupos	144.44	24	6.01851			
TOTAL	6146.30	26				

Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenido los resultados por el análisis de varianza, se procedió a realizar una prueba confirmatoria (Tukey).

Primero se realizó de forma manual los cálculos para determinar la comparación en parejas Tukey que nos dio a conocer si hay igualdad o no entre los grupos estudiados, el valor en tablas el cual se halló como resultado del total de grupo y los grados de libertad

del residuo, y nos dió un valor en tablas para Tukey de 3.77, gracias a esta valor pudimos hallar la d.m.s. el cual fue 2.89 (Ver tabla N° 3.22).

Se usaron las siguientes afirmaciones:

- $|X_a - X_b| \geq \text{d.m.s.} = \mu_a \neq \mu_b$
- $|X_a - X_b| < \text{d.m.s.} = \mu_a = \mu_b$

Segundo se realizó los cálculos en el programa Minitab de las medias de la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, donde se confirma la diferencia entre dichas concentraciones. (Ver tabla N° 3.23).

TABLA N° 3.22. Información de agrupación Tukey

COMPARACIÓN	$ X_a - X_b $	d.m.s.	CONCLUSIÓN
CBM <i>S. aureus</i> y CBM <i>E. coli</i>	36.11	2.89	$\mu_A \neq \mu_B$
CBM <i>S. aureus</i> y CFM <i>C. albicans</i> .	22.78	2.89	$\mu_A \neq \mu_C$
CBM <i>E. coli</i> y CFM <i>C. albicans</i> .	13.33	2.89	$\mu_B \neq \mu_C$

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 3.23 Información de agrupación Tukey

Factor	N	Mean	Grouping
<i>Escherichia coli</i>	9	41.11	A
<i>Candida albicans</i>	9	27.78	B
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	5	C

Fuente: Minitab

En la figura N° 3.18, se puede observar la gráfica de caja y bigotes la cual muestra los promedios de las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) y las concentraciones fungicidas mínimas (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre los microorganismos en estudio de los diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa. Siendo para las cepas de *Staphylococcus aureus* un promedio de (5.00 ± 0.00) mg/mL, para las cepas de *Candida albicans* un promedio de (27.78 ± 2.64) mg/mL y para las cepas de *Escherichia coli* un promedio de (41.11 ± 3.33) mg/mL. En base a estos resultados podemos decir que el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) presenta algún efecto bactericida y fungicida, pero a distintas concentraciones para cada especie de microorganismo, siendo mayor en *E. coli* y *C. albicans*. Por lo tanto, según la concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM), muestra una mejor actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y con menor actividad sobre as cepas de *Candida albicans* y *Escherichia coli*.

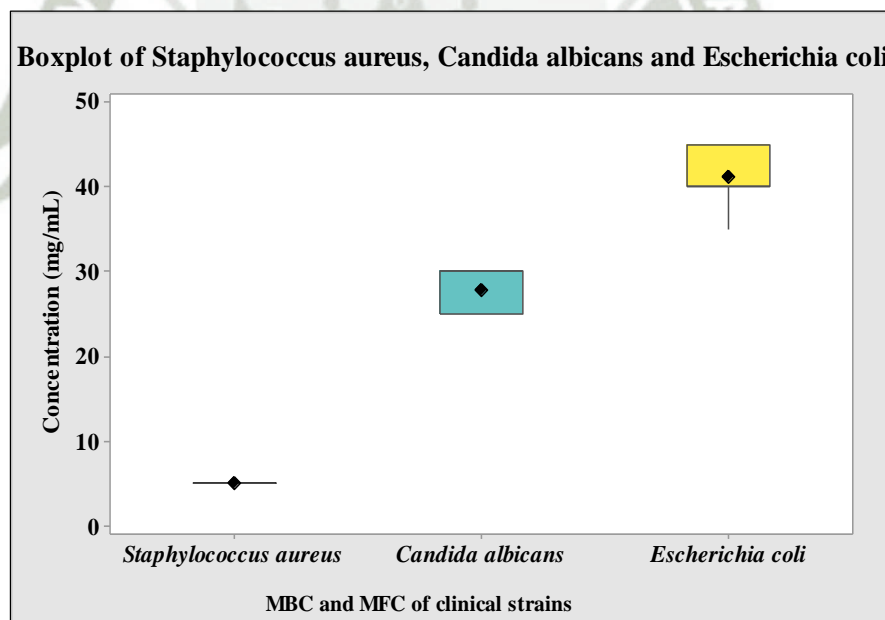


Figura N° 3.18: Concentraciones bactericidas mínimas (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clinicas en estudio.

Fuente: Minitab

En la tabla N° 3.24 y en la figura N° 3.19, se muestra la comparación general de la concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicidas mínima (CFM) del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* de los diferentes establecimientos de salud de la ciudad de Arequipa.

Se deduce que para las 9 cepas de *Staphylococcus aureus*, la concentración inhibitoria mínima (CIM) promedio fue de (3.83 ± 0.25) mg/mL lo cual que difiere con la concentración bactericida mínima (CBM) promedio que fue de (5.00 ± 0.00) mg/mL, lo que significa que a 3.83 mg/mL las cepas de *S. aureus* se encontraban inhibidas y necesitaban una concentración más alta para inhibir su desarrollo al 99.9 %, dada la CIM es menor que la CBM, significa que el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) pudo inhibir el desarrollo de colonias de las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* sin producir muestre celular y que esta se produjo a una mayor concentración.

En el caso de las cepas de *Escherichia coli* el promedio de la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue de (31.11 ± 3.33) mg/mL lo cual que difiere con la concentración bactericida mínima (CBM) que fue de (41.11 ± 3.33) mg/mL, por lo tanto, significa que a 31.11 mg/mL las cepas de *E. coli* se encontraban inhibidas y necesitaban una concentración más alta para inhibir su desarrollo al 99.9 % ,en este caso también dada la CIM es menor que la CBM, significa que el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) pudo inhibir el desarrollo de colonias de las cepas clínicas de *Escherichia coli* sin producir muestre celular y que esta se produjo a una mayor concentración.

Por último, en el caso de las cepas de *Candida albicans*, la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue de (27.78 ± 2.64) mg/mL la cual coincide con la concentración fungicida mínima (CFM) que fue de (27.78 ± 2.64) mg/mL, lo que significa que a esta concentración las cepas de *C. albicans* son inhibidas al 99.9 %, dada que la CIM y la CFM son iguales, ello significa que las concentraciones del extracto etanólico

de *Curcuma longa* L. (palillo) necesarias para inhibir el desarrollo de colonias de las cepas clínicas de *Candida albicans* y producir la muerte celular son idénticas.

TABLA N° 3.24. Concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM).

CEPAS CLÍNICAS	CIM (mg/mL)	CBM Y CFM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(3.83 ± 0.25)	(5.00 ± 0.00)
<i>Escherichia coli</i>	(31.11 ± 3.33)	(41.11 ± 3.33)
<i>Candida albicans.</i>	(27.78 ± 2.64)	(27.78 ± 2.64)

Fuente: *Elaboración propia*

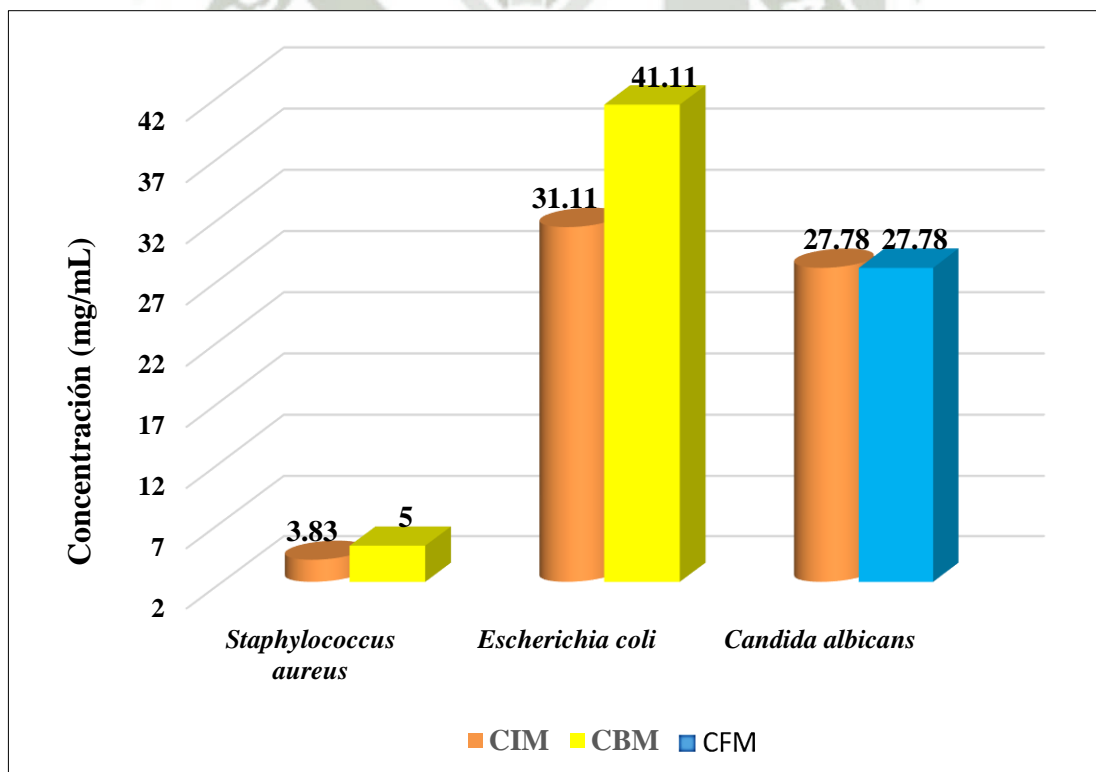


Figura N° 3.19: Promedio general de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM).

Fuente: *Elaboración propia.*

Se puede observar que el *Staphylococcus aureus* fue la cepa más sensible al extracto, esto tal vez se deba a la composición de su pared celular la cual tiene una capa gruesa de péptido glucano y proteínas lo cual facilita el ingreso de componentes polares lo cual causaría la muerte microbiana (Cowan M. et al.1999).

En el caso de *Escherichia coli*, fue una mayor concentración inhibitoria mínima (CIM) y una concentración bactericida mínima (CBM) de (31.11 ± 3.33) mg/mL y de (41.11 ± 3.33) mg/mL lo cual se pueda deber a su membrana celular la cual actúa como una barrera para diferentes tipos de sustancia, incluyendo los antibióticos. ⁽³⁸⁾

Para *Candida albicans* la concentración del extracto nos dio (27.78 ± 2.64) mg/mL en concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración fungicida mínima (CFM) lo cual resulta interesante porque según PFALLER EN EL 2007 este tipo de hongo se presenta como constituyente normal de la microflora humana y se considera como un patógeno oportunista, cuando se rompe el equilibrio de control para este hongo puede causar enfermedades como la candidiasis y la candidemia. ⁽⁷⁰⁾

Gul et al. (2004), demostró que el extracto alcohólico del rizoma de la cúrcuma, inhibe el crecimiento in vitro de algunas bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, sin embargo, no inhibió el crecimiento de cepas de *Escherichia coli*, a diferencia de nuestro extracto que si las inhibió a una concentración de (31.11 ± 3.33) mg/mL.

Eugenio Torres R , et al (2014) reporta que el aceite esencial de *Curcuma longa* L. (palillo) tiene una actividad antibacteria frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, siendo efectiva frente a estas 2 ultimas cepas, con un CBM de 32 mg/mL para *S.aureus* y 8 mg/mL para *B. subtilis*, en comparación con nuestra investigación para *Staphylococcus aureus* estos resultados son muy altos, siendo el nuestro de (5.00 ± 0.00) mg/mL, cabe resaltar que Eugenio Torres R, et al (2014) utiliza el aceite esencial de la planta y nosotros el extracto

etanólico, esto probablemente haga la diferencia, dado que el etanol extrae la mayoría de compuestos con actividad antimicrobina esto lo confirma Villacis J, 2009.

Otra investigación realizada por Jonás Velasco y Pedro Navarro en el 2013 con la misma planta pero de un extracto hidroalcohólico demuestra una CMI de 8 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, en nuestro caso obtuvimos una CMI de (3.83 ± 0.25) mg/mL para la misma bacteria. ⁽⁷¹⁾

Otro trabajo de investigación presentado por Luisa H. en el 2016 utiliza el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) donde trabaja con las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* donde obtiene una CMB de 12.5 y 31.25 mg/mL respectivamente, la cual comparamos que nuestro extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (palillo) es más efectivo contra cepas de *Staphylococcus aureus* y menos efectiva contra *Escherichia coli*.

Entonces queda comprobado el efecto antimicrobiano del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, los resultados fueron comparados con diferentes trabajos de investigación demostrando que nuestro extracto etanólico muestra una buena actividad antimicrobiana buena contra *Staphylococcus aureus* y mediana actividad contra *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Avellaneda *et al.* en el 2005 señala que una cepa antibacteriana es muy sensible cuando presenta una CMI menor a 12.4 mg/mL, una mediana sensibilidad si esta entre 12.5 y 50 mg/mL y baja sensibilidad cuando la CMI esta entre 50 y 100 mg/mL.

Dado esta afirmación podemos decir que nuestro extracto presenta un buen y mediano efecto antimicrobiano sobre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, esto tal vez debido a la presencia de los diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en el rizoma, método de extracción y solvente utilizado.

CONCLUSIONES

PRIMERA

Se determinó el efecto antimicrobiano, *in vitro* del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

SEGUNDA

Se obtuvo el extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) mediante el método de extracción Soxhlet y como resultado se determinó el siguiente rendimiento para los diferentes solventes: etanol: (15.08 ± 0.02) %, n-butanol: (2.97 ± 0.05) % y éter de petróleo: (2.07 ± 0.03) %. Escogiéndose el de mayor rendimiento.

TERCERA

Se identificó los grupos de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) para establecer su composición química y se identificó: curcuminoides, terpenos, taninos y flavonoides.

CUARTA

Se logró establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM) *in vitro* del extracto de *Curcuma longa* L. dando los siguientes resultados:

CIM	▪ <i>Staphylococcus aureus</i> : (3.83 ± 0.25) mg/mL
	▪ <i>Escherichia coli</i> : (31.11 ± 3.33) mg/mL
	▪ <i>Candida albicans</i> : (27.78 ± 2.64) mg/mL
CBM	▪ <i>Staphylococcus aureus</i> : (5.00 ± 0.00) mg/mL
	▪ <i>Escherichia coli</i> : (41.11 ± 3.33) mg/mL
CFM	▪ <i>Candida albicans</i> : (27.78 ± 2.64) mg/mL

RECOMENDACIONES

- Evaluar el desarrollo de una forma farmacéutica tópica de *Curcuma longa* L. (palillo).
- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de *Curcuma longa* L. (palillo) sobre otras cepas bacterianas.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de la *Curcuma longa* L. (palillo) en cepas bacterianas multidrogo resistentes.
- Evaluar el efecto antimicrobiano exclusivamente de los curcuminoides.
- Para la conservación del extracto de *Curcuma longa* L. se debe de guardar el producto en un frasco ámbar con tapa hermética.
- No usar el solvente n-butanol, para el método de extracción en Soxhlet.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en Hospitales del Perú: Ministerio de Salud; 2014.
2. Jean Bruneton, FARMACOGNOSIA, fitoquímica, plantas medicinales, 3ª edición, editorial ACRIBIA, ZARAGOZA (España), 294-296.
3. KUKLINSKI, Claudia. Farmacognosia. Estudio de las drogas y medicamentosas de origen natural. Editorial omega S.A. Barcelona-España 2000.
4. Paula Saiz de Cos, Cúrcuma I (*Curcuma longa L.*), (2014) Reduca (Biología). Serie Botánica. 7: 84-99.
5. Blgo. Ms. Cs Victor Quipuscoa Silvestre, Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD), Constancia de ubicación taxonómica.
6. Valencia, Cira. Fundamentos de Fitoquímica. Editorial Trillas S.A. España 1995.
7. Bengmark, S., M. Mesa y A. Gil, Efectos saludables de la cúrcuma y de los curcuminoides, Nutrición Hospitalaria 24(3):264-272 (2009).
8. Armando Alvis, Guillermo Arrazola y Walter Martinez, Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de Cúrcuma (*Curcuma longa*), Información Tecnológica Vol. 23 N° 2 – 2012, 12-15.
9. Ravindran, P., K. Nirmal y K. Sivaraman, Turmeric the genus *Curcuma*. Taylor y Francis Group, (2007). New York, p 47-453.
10. Casas, J., H. Castillo, J. Noy, A. Palomares y R. Rodríguez, Elaboración de papel indicador a base de extractos naturales: una alternativa fundamentada en experiencias de laboratorio para el aprendizaje del Concepto de pH, Revista Eureka Enseñ. Divul. Cien., 9(2):302-314 (2009).
11. CAC Araújo, LL Leon, Biological Activities of *Curcuma longa L.*, July 2001, Rio de Janeiro, Vol. 96(5): 723-728.
12. M. del Mar Magariños Losada, Carlos Rodríguez Pascual; “Situaciones clínicas más relevantes. Candidiasis” capítulo 44, 446-447.

13. Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Akao N, Kondo K, Tsuda Y 1993. Nematocidal activity of Turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bul* 41: 1640-1643.
14. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U 1992. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem Pharm Bull* 40: 387-391.
15. Lowy, Franklin D. (1998). "Staphylococcus aureus infections". *NEJM* (en inglés) (Estados Unidos: Massachusetts Medical Society) 339 (8): 520-532.
16. Iwakami S, Shibuya M, Tseng CF, Hanaoka F, Sankawa U 1986. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by phenolic compounds. *Chem Pharm Bull* 34: 3960-3963.
17. Claeson P, Pongprayoon U, Sematong T, Tuchinda P, Reutrakul V, Soontornsaratune P, Taylor WC 1996. Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*: a novel type of topical anti-inflammatory agents: structure-activity relationship. *Planta Med* 62: 236-240.
18. Araújo CAC, Alegrio LV, Castro D, Lima MEF, GomesCardoso L, Leon LL 1999. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 791-794.
19. Araújo CAC, Alegrio LV, Castro D, Lima MEF, Leon LL 1998. *Leishmania amazonensis*: in vivo experiments with diarylheptanoids from Leguminosae and Zingiberaceae plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. II): 306.
20. Khattak, S.; Saeed, P.; Ullah, H.; Ahmad, W.; Ahmad, M. *Fitoterapia* 2005, 76.
21. Wilson, B.; Abraham, G.; Manju, V. S.; Mathew, M.; Vimala, B.; Sundaresan, S.; Nambisan, B. J. *Ethnopharmacol.* 2005, 99, 147.
22. Prescott, Harley, Klein. *Microbiología*. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 4ª ed. 1999
23. Raquel Granados Perez, M^a Carmen Villaverde Peris, "MICROBIOLOGIA, bacteriología, características y clasificación bacteriana, virología, características y técnicas bioquímicas, (1997), Editorial paraninfo, p79.

24. Gil de M, Mónica (2000). «Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina» (PDF). Revista chilena de infectología (Chile: Scielo) 17 (2).
25. Richardson, AR; Libby SJ, Fang FC (2008). “A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables Staphylococcus aureus to resist innate immunity”. Science (en inglés) (Estados Unidos: American Association for the Advancement of Science) 319: 1672-6
26. Hurtado, MP; de la Parte, MA; Brito A (Julio de 2002). “Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica”. Rev Soc Ven Microbiol (Venezuela: Scielo) 22 (2): 112-118.
27. Tuazon CU; Pérez A; Kishaba T; Sheagren JN. “Staphylococcus aureus among insulin-injecting diabetic patients: an increased carrier rate”. 1975: 1272.
28. Tuazon CU; Sheagren JN. “Increased rate of carriage of Staphylococcus aureus among narcotic addicts” J Infect Dis 1974: 725-7.
29. Yu VL; Goetz A; Wagener M; et al. “Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on hemodialysis: efficacy of antibiotic prophylaxis”. 1986 (315): 91-6.
30. Weinstein HJ. “The relation between the nasal staphylococcal carrier state and the incidence of postoperative complications”. N Engl J Med 1959 (260): 1303-8.
31. Weinke T; Schiller R; Fehrenbach FJ; Pohle HD. “Association between Staphylococcus aureus nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus”. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992 (11): 985-9.
32. Emori TG; Gaynes RP. “An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory”. Clin microbiol review, 1993 (6).
33. Marcos Vivoni A, Meurer MB. “Application of molecular techniques in the study of Staphylococcus aureus clonal evolution”. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005
34. Koneman, Md. “Diagnostico Microbiológico”, editorial medica panamericana, quinta edición, 1999.
35. Jevons, M. "Celbenin"-resistant staphylococci. BMJ. 1961; 124-5.

36. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yatuba K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40:135-6.
37. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep.* 51:565-7.
38. FAO – División de Producción y Sanidad Animal, EMPRES Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales 39, www.fao.org.
39. Robert Orenstein; Edward S. Wong (1999). «Urinary Tract Infections in Adults». *American Academy of Family Physicians:* 1225-1236.
40. L. Blasco Loureiro, C. Souto Moure, M.A. Marchena Fernández. Infecciones del tracto urinario. Pautas de tratamiento empírico de la infección no complicada según los datos de sensibilidad antimicrobiana de un área de salud. *Farmacia de Atención Primaria*, 4(1):20-23
41. Dra. Marisa Biasoli; “CANDIDIASIS”,(2013-1).
42. Hooper, Samuel J.; Wilson, Melanie J.; Crean, St. John (2009). “Exploring the link between microorganisms and oral cancer: A systematic review of the literatura”. *Head and Neck* 31 (9): 1228-1239.
43. M. del Mar Magariños Losada Carlos Rodríguez Pascual, CANDIDIASIS, Tratado de geriatría para residentes.
44. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (%) Método Rápido de la Termobalanza NMX- F-428 1982.
45. DETERMINACIÓN DE CENIZA (%) Método gravimetrico adaptado de NTP 209.265.2001.
46. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE EN ALIMENTOS (%) ISO 750.1998 Fruit and vegetable products – Determination of titrable acidity.
47. ALIMENTOS, DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (%) FOODS. DETERMINATION OF PROTEINS NMX-F-068-S-1980.
48. DETERMINACIÓN DE GRASA (%) Adaptado del Método gravimetrico NTP 209.263.2001.
49. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA (%) Adaptado de NTP 205.003.1980.

50. Harwood, Laurence M.; Moody, Christopher J. (13 Jun 1989). Experimental organic chemistry: Principles and Practice (Illustrated ed.). Wiley-Blackwell. pp. 122–125
51. Soxhlet, F. (1879). "Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes". Dingler's Polytechnisches Journal (in German). 232: 461–465.
52. Carlos Eduardo Núñez. "Extracciones con Soxhlet". 2008, cenunez.com.ar.
53. Touchstone, Joseph C. *Practice of thin layer chromatography*. 2nd ed. New York: Wiley, 1983.Print.
54. Mercedes Jave Marquez, MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA II Guía de Prácticas, Practica N° 15, 2016.
55. Meyer P.L., Probabilidades y Aplicaciones Estadísticas. Addison - Wesley Iberoamericana. México 1986.
56. José Vicéns Otero; Ainhoa Herrarte Sánchez; Eva Medina Moral, ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA), ENERO 2005,
57. Ríos, V., A.L. Duque C., D.F León R. Caracterización espectroscópica y cromatográfica de curcumina extraída de los rizomas de Cúrcuma (cúrcuma longa l.) Cultivada en el departamento del Quindío, octubre 2009.
58. Barrero, M. y R.J. Carreño. Evaluación de los pigmentos de cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 1999. 49 (4): 491-504.
59. Alzamora Libertad, Morales Liliana, Armas Lourdes, Fernández Gilma. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Revista Peruana de Biología*, 2001, Vol. 62, n° 2, p 156 -161.
60. Cowan M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999.
61. Gul N. Mujahid, Y. Jehan N. Ahmad S. Estudios sobre el efecto antibacteriano de las diferentes fracciones de Curcuma longa contra asilamientos urinarios de infección de las vías. *Pakistan Diario de Ciencias Biológicas*. 2004.
62. H.Wagner, S. Bladt, "PLANT DRUG ANALYSIS" a Thin Layer Chromatography Atlas, Second Edition, 1996.

63. Villacís, J. (2009). Temas de Medicina Natural: Fitomedicina. Ambato: Ed. Universidad Técnica de Ambato.
64. Obregón L. (2003). Fitoterapia: Importancia de su desarrollo al servicio de salud. FITO 2003. Lima, Perú.
65. Mejia K, Rengifo E. (2000). Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. Segunda edición AECI-GRL-IIAP. Pag 7-8.
66. L. Betancor, M. Gadea, K. Flores. Genética Bacteriana.
67. Añanca, E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis Bachiller. Facultad de Farmacia y Bioquímica: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, 2009.
68. Bonifaz A., Micología Médica Básica, 3a edición, México, D.F., McGraw-Hill Editores S.A. 2010.
69. Clancy J., Yu, V., Morris A., Snyderman D., Nguyen M. Fluconazole MIC and the Fluconazole Dose/MIC Ratio Correlate with Therapeutic Response among Patients with Candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005.
70. Pfaller, M A. and Diekema, D. J. Epidemiology of invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007, vol 20.
71. CALDERONE, R.; BRAUN, P. (1991): Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 55(1): 1-20.

ANEXOS

Anexo 1.

CERTIFICADO DE RECONOCIMIENTO DE LA ESPECIE BOTÁNICA



INSTITUTO CIENTIFICO MICHAEL OWEN DILLON (IMOD)
Investigación, Conservación, Educación y Transformación de Recursos

CONSTANCIA

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO CIENTÍFICO MICHAEL OWEN DILLON
IMOD, DE AREQUIPA

HACE CONSTAR:

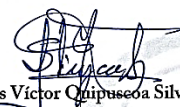
Que, la muestra de planta presentada por: ANGELITA VIVIANA ESPINOZA GÓMEZ y KEVIN KARL LA FUENTE RIOS, para realizar su tesis: "EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LA *CÚRCUMA LONGA* L. (PALILLO) SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *ESCHERICHIA COLI* Y *CANDIDA ALBICANS*", fue recolectada en la ciudad de Puerto Maldonado, Provincia Tambopata y Departamento de Madre de Dios, a los 12° 35,59' LS-69° 11,34' LO y a 139 m de elevación, corresponde a la especie *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) y tiene la siguiente ubicación taxonómica:

Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Soperorder: Liliales
Orden: Zingiberales
Familia: Zingiberaceae
Género: *Curcuma*
Especie: *Curcuma longa* L.

Se le expide la presente, a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Arequipa, 01 de octubre del 2016




Mg. Cs Víctor Quijuseoa Silvestre
C. B. P. 2484
Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD)
vquijuscoas@hotmail.com

Dirección: Av. Jorge Chávez No. 610 Cercado, Arequipa - Perú
www.imod.org.pe - correo: imod.per@gmail.com

Anexo 2.

INFORME DE ENSAYO DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA
MUESTRA VEGETAL.



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA23A17.002557

Nombre del Cliente : ESPINOZA GÓMEZ ANGELITA VIVIANA/LA FUENTE RÍOS
KEVIN KARL
Dirección del Cliente : RESIDENCIAL HUARANGUILLO BARRA – 7 DPTO 108 /
CALLE ESPAÑA 102 – A SATÉLITE GRANDE JLBYR
RUC : -
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : RIZOMA DE CÚRCUMA LONGA L. DE HUERTA DE LA CIUDAD
DE PUERTO MALDONADO – MADRE DE DIOS
Tamaño de muestra : 400g
Fecha de Recepción : 23/01/2017
Fecha de Inicio del Ensayo : 23/01/2017
Fecha de Emisión de Informe : 26/01/2017
Página : 1 de 1

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE HUMEDAD (%) Método Rápido de la Termobalanza NMX-F-428 1982	88,75
DETERMINACIÓN DE CENIZA (%) Metodo gravimetrico adaptado de NTP 209.265.2001	1,35
DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE EN ALIMENTOS (%) ISO 750:1998 Fruit and vegetable products - Determination of titratable acidity	0,01
ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (%) FOODS .DETERMINATION OF PROTEINS NMX-F-068-S-1980.	14,53
DETERMINACIÓN DE GRASA (%) Adaptado del Metodo gravimetrico NTP 209.263.2001	0,95
DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA (%) Adaptado de NTP 205.003.1980	2,10

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del laboratorio de ensayo y control de calidad.



Dr. Jaime Cárdenas García
C.Q.F.P. 01575 - C.Q.F.D.A. 00562
Director Técnico
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Anexo 3.

CÁLCULO DE RENDIMIENTO PARA LOS DIFERENTES EXTRACTOS.

EXTRACCIÓN CON ETANOL.

- Primera extracción.

Peso del balón vacío: 126,7680

Peso de la muestra: 10,0010

Peso del balón + extracto seco: 128,2782

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{128,2782 - 126,7680}{10,0010} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 15.10$$

- Segunda extracción

Peso del balón vacío: 105,5520

Peso de la muestra: 10,008

Peso del balón + extracto seco: 107,0604

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{107,0604 - 105,5520}{10,0008} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 15.08$$

- Tercera extracción.

Peso del balón vacío: 103,7788

Peso de la muestra: 10,0005

Peso del balón + extracto seco: 105,2842

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{105,2842 - 103,7788}{10,0005} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 15.05$$

- Cuarta extracción.

Peso del balón vacío: 103,7802

Peso de la muestra: 10,0007

Peso del balón + extracto seco: 105,2864

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{105,2864 - 103,7802}{10,0007} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 15,06$$

- Quinta extracción.

Peso del balón vacío: 105,5534

Peso de la muestra: 10,0008

Peso del balón + extracto seco: 107,0638

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{107,0638 - 105,5534}{10,0008} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 15,10$$

EXTRACCIÓN CON N-BUTANOL.

- Primera extracción.

Peso del balón vacío: 103,7612

Peso de la muestra: 10,0009

Peso del balón + extracto seco: 104,061

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{104,061 - 103,7612}{10,0009} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,99$$

- Segunda extracción.

Peso del balón vacío: 126,7589

Peso de la muestra: 10,0003

Peso del balón + extracto seco: 127,0468

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{127,0468 - 126,7589}{10,0003} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,88$$

- Tercera extracción.

Peso del balón vacío: 105,5610

Peso de la muestra: 10,0005

Peso del balón + extracto seco: 105,8611

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{105,8611 - 105,5610}{10,0005} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 3,00$$

- Cuarta extracción.

Peso del balón vacío: 103,7692

Peso de la muestra: 10,0006

Peso del balón + extracto seco: 104,0673

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{104,0673 - 103,7692}{10,0006} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,98$$

- Quinta extracción.

Peso del balón vacío: 126,7705

Peso de la muestra: 10,0002

Peso del balón + extracto seco: 127,0696

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{126,7705 - 127,0696}{10,0002} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,99$$

EXTRACCIÓN CON ÉTER DE PETRÓLEO.

- Primera extracción.

Peso del balón vacío: 105,5602

Peso de la muestra: 10,0003

Peso del balón + extracto seco: 105,7624

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{105,7624 - 105,5602}{10,0003} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,02$$

- Segunda extracción.

Peso del balón vacío: 126,7685

Peso de la muestra: 10,0004

Peso del balón + extracto seco: 126,9777

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{126,9777 - 126,7685}{10,0004} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,09$$

- Tercera extracción.

Peso del balón vacío: 103,7802

Peso de la muestra: 10,0008

Peso del balón + extracto seco: 103,9843

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{103,9843 - 103,7802}{10,0008} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,04$$

- Cuarta extracción.

Peso del balón vacío: 103,7756

Peso de la muestra: 10,0011

Peso del balón + extracto seco: 103,9856

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{103,9856 - 103,7756}{10,0011} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,10$$

- Quinta extracción.

Peso del balón vacío: 105,5597

Peso de la muestra: 10,0003

Peso del balón + extracto seco: 105,7694

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{105,7694 - 105,5597}{10,0003} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 2,10$$

Anexo 4.
IMÁGENES DE LOS RESULTADOS



Figura N° 4.1: Solventes utilizados



Figura N° 4.2: Extractos de *Curcuma longa* L. (palillo)



Figura N° 4.3: Sembrado en la placa cromatográfica.



Figura N° 4.4: Corrida cromatográfica.

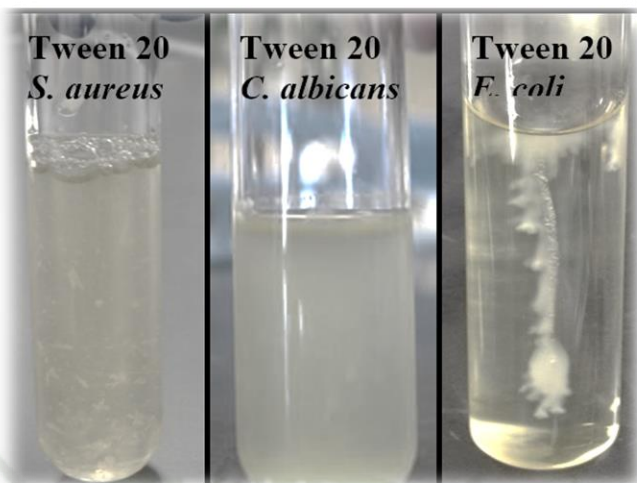


Figura N° 4.5: Prueba blanco con Tween 20 con inóculo de las cepas clínicas, sin efecto antimicrobiano



Figura N° 4.6: Obtención del extracto seco y la solución Madre en concentraciones de 10 mg/mL y 100 mg/mL



Figura N° 4.7: Zona estéril para la preparación de los materiales biológicos.

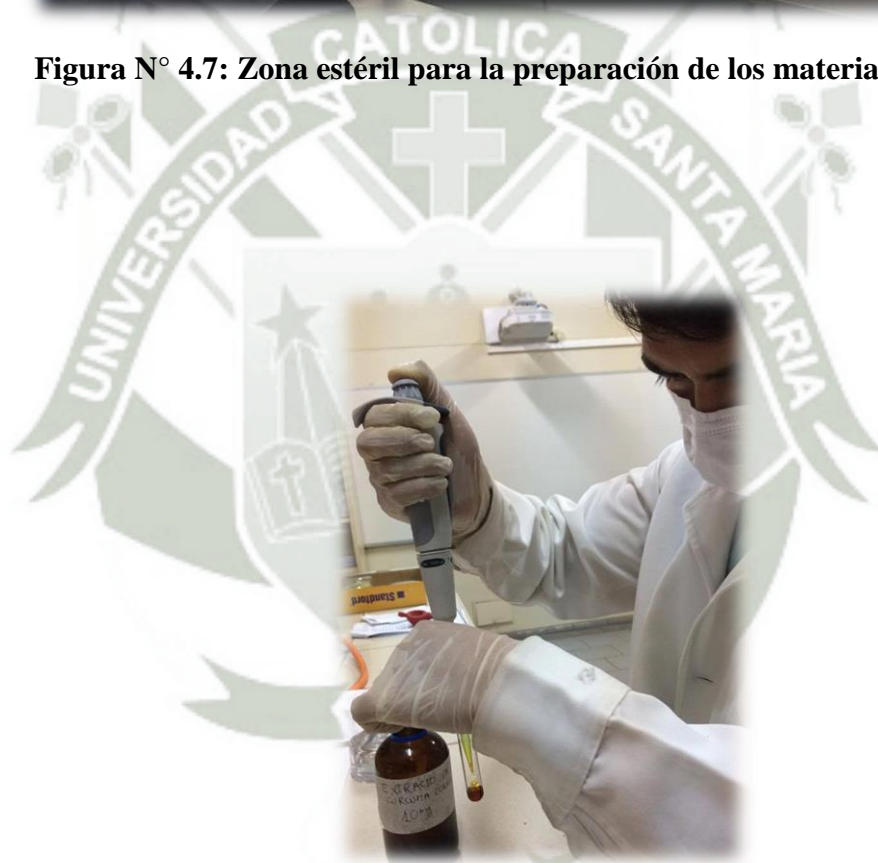


Figura N° 4.8: Dilución en tubo de la concentración Madre



Figura N° 4.9: Concentración inhibitoria mínima (CIM).

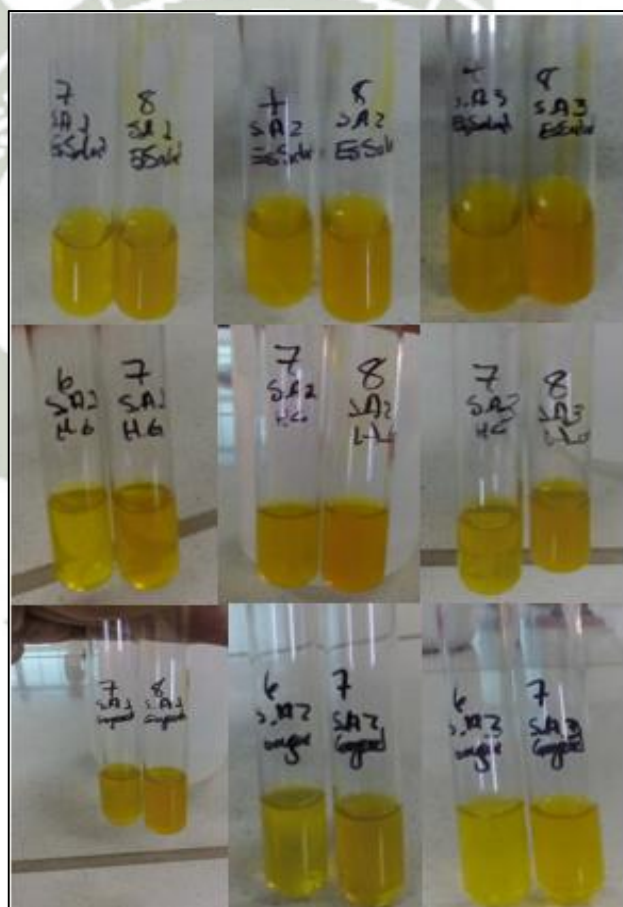


Figura N° 4.10: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

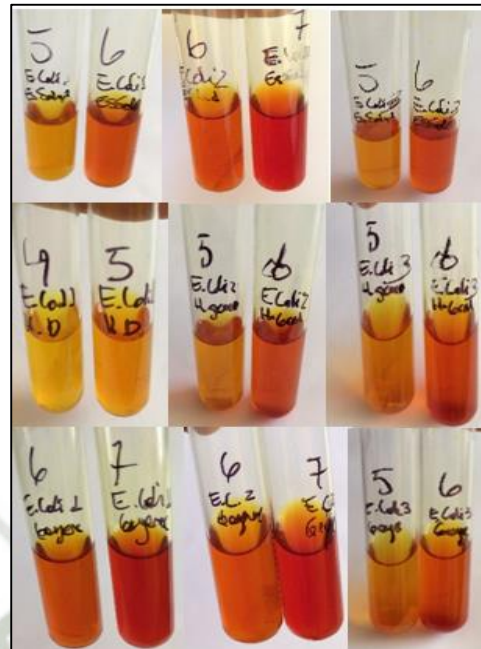


Figura N° 4.11: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas clínicas de *Escherichia coli*.

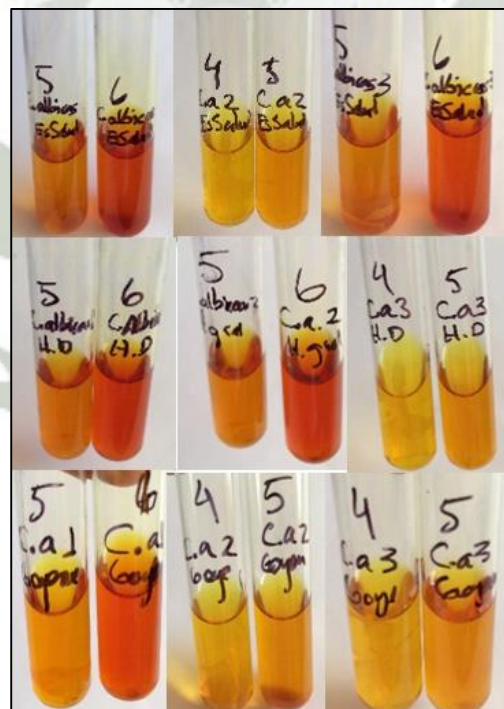


Figura N° 4.12: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas clínicas de *Candida albicans*.



Figura N° 4.13: Concentración bactericida mínima (CBM) y concentración fungicida mínima (CFM)

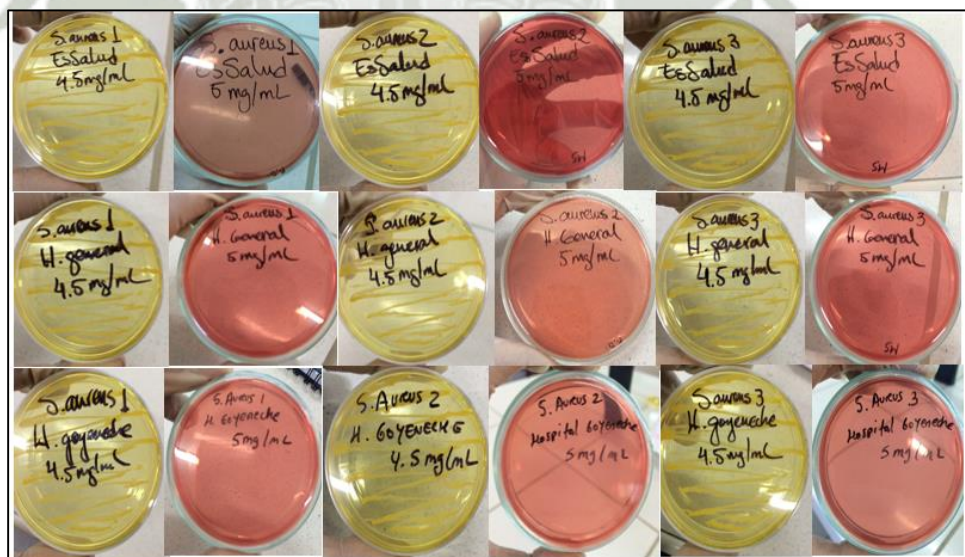


Figura N° 4.14: Concentración bactericida mínima (CBM) en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

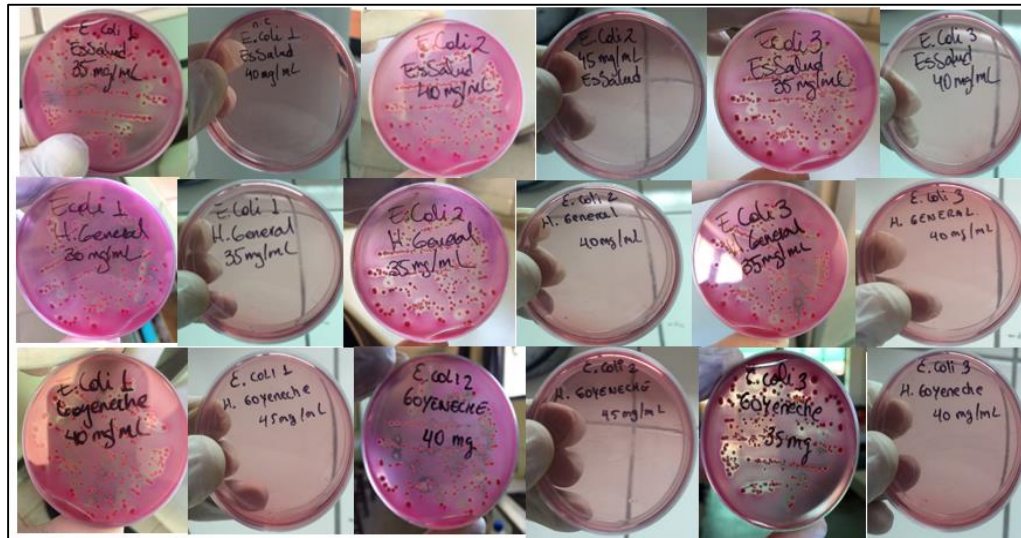


Figura N° 4.15: Concentración bactericida mínima (CBM) en cepas clínicas de *Escherichia coli*.

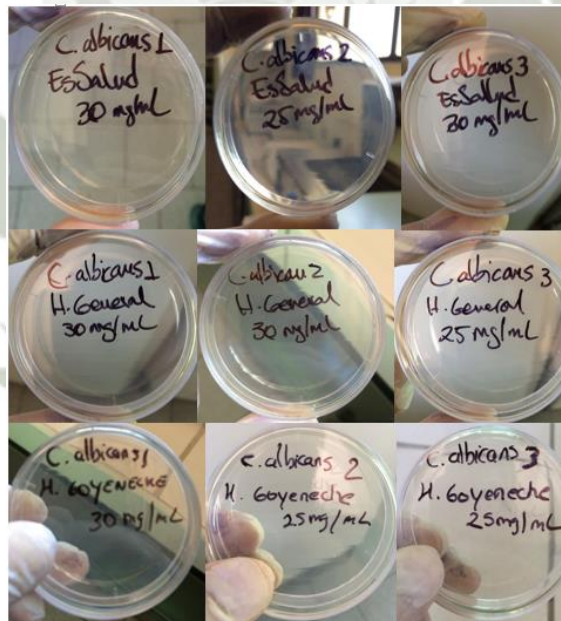


Figura N° 4.15: Concentración fungicida mínima (CFM) en cepas clínicas de *Candida albicans*.

Anexo 5.**FICHAS DE INFORMACIÓN****ALCOHOL ETÍLICO**

Sinónimos: Etanol. INCI: Alcohol.

Formula Molecular: C₂H₆O

Peso Molecular: 46,07

Descripción: Hay 3 clases de alcohol etílico:

- Alcohol desnaturalizado: tiene un 96% de riqueza, y lleva un indicador o marcador que le confiere mal sabor y olor para evitar la fabricación de bebidas.
- Alcohol rectificado u oficial: tiene un 96% de riqueza y no lleva indicador.
- Alcohol absoluto: tiene >99,5% de riqueza y no lleva indicador. En Acofarma, el alcohol destinado a la fabricación de fórmulas magistrales de uso tópico u oral es el que cumple la farmacopea europea (lleva la indicación "CODEX" o "PhEur" en su etiquetado).

En concreto tenemos 2 calidades de alcohol etílico:

- Alcohol etílico 96% v/v PhEur: para uso farmacéutico.
- Alcohol etílico absoluto v/v PhEur: para uso farmacéutico.

Datos Físico-Químicos: Líquido incoloro, límpido, volátil, inflamable, higroscópico. Miscible con agua y con cloruro de metileno. Arde con llama azul, sin producir humo.

- Densidad: 0,812 – 0,816 g/ml.
- Punto de ebullición: aprox. 78 °C.

Propiedades y usos: Se trata de un antiséptico con acción bactericida y desinfectante contra las formas vegetativas de los microorganismos cuando está al 60 – 96 %, pero su actividad frente a esporas es muy pequeña. Generalmente para este fin se usa al 70 %, que es cuando presenta su máxima acción. Se usa para desinfectar la piel ante heridas y llagas, antes de una inyección, antes de una intervención quirúrgica, o simplemente para desinfectar manos y superficies. Es compatible con los demás conservantes e incluso les potencia su acción. Es un excelente disolvente, el más usado

para la preparación de soluciones en formulación magistral en forma de solución hidroalcohólica. La proporción de agua y de alcohol dependerán de la solubilidad de las materias primas a vehicular. Así, para sustancias iónicas suele usarse un 30 – 60 % de alcohol, y para las no-iónicas un 60 – 96 %, siendo lo más habitual un 70 %.

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA También presenta propiedades antihidrólicas, rubefacientes, astringentes, antiinflamatorias, y hemostáticas, utilizándose por vía tópica para estos fines.

Efectos secundarios: La aplicación frecuente de alcohol sobre la piel origina irritación y sequedad cutáneas. Por vía oral y administrada en exceso puede causar depresión medular y cortical sobre el sistema nervioso.

Interacciones: El alcohol incrementa los efectos de los principios activos que deprimen el SNC, como hipnóticos, antihistamínicos, analgésicos opiáceos, antiepilépticos, antidepresivos, neurolépticos, y sedantes. Puede producir reacción antabús con disulfiram, clorpropamida, metronidazol, y algunas cefalosporinas. Puede ocasionar hipoglucemia en pacientes tratados con insulina o sulfonilureas. Puede causar hipotensión ortostática en pacientes que tomen fármacos vasodilatadores. Puede aumentar el riesgo de sangrado digestivo en pacientes que tomes AINEs y mostrar efectos variables con los anticoagulantes.

Incompatibilidades: Sustancias oxidantes, enzimas, disoluciones gomosas y albuminosas, y numerosas sales. **Observaciones:** NO apto uso alimentario. Es inflamable. Es un excipiente de declaración obligatoria. En preparaciones orales indicar el contenido de alcohol etílico. Además, dar siempre indicaciones precisas de los posibles peligros para el paciente.

Conservación: En envases bien cerrados. **PROTEGER DE LA LUZ.**

Anexo 6.**BUTANOL****1. Identificación del Producto****Sinónimos:** 1-Butanol, Alcohol butílico; n-Butanol**Peso Molecular:** 74.12**Fórmula Química:** CH₃(CH₂)₂CH₂OH**Propiedades físicas y químicas.**

- Estado físico: líquido
- Olor: característico
- Color: claro Valor pH: 7 (70 g/l, 20 °C)
- Punto de solidificación: -89 °C (1 ATM)
- Temperatura de ebullición: 116 - 118 °C (1,013 mbar) (DIN 53171)
- Presión de vapor: 7 mmHg (20 °C)
- Densidad relativa: 0.811 (20 °C)
- Coeficiente de dispersión n-octanol/agua (log Pow): aprox. 0.8
- Viscosidad, dinámica: 2.9 mPa.s (20 °C)
- Solubilidad en agua: 77 g/l (20 °C)
- Solubilidad (cualitativo): soluble disolvente(s): disolventes orgánicos.
- Identificación de los peligros
- Indicaciones - Urgencia

PELIGRO: LÍQUIDO INFLAMABLE. PUEDE CAUSAR IRRITACIÓN OCULAR, EN LA PIEL Y EN EL TRACTO RESPIRATORIO Utilización con ventilación de salida local. Lleve gafas para productos químicos certificadas por el NIOSH (Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional). Usar indumentaria de protección. Los lavaojos y regaderas de seguridad deben ser fáciles de acceder Si existe peligro de salpicadura, utilice protección que cubra toda la cara. Lleve respirador de vapor certificado por el NIOSH (Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional).

Anexo 7.

ÉTER DE PETRÓLEO

Composición/Información de los componentes

Mezcla de hidrocarburos compuesta principalmente por: 3-metilpentano. N-hexano.

Denominación: Éter de Petróleo 60-80°C

Identificación de los riesgos

Extremadamente inflamable. Irrita la piel. Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación. Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. Posible riesgo de perjudicar la fertilidad.

Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar. La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigo.

Propiedades físicas y químicas.

- Aspecto: Líquido transparente e incoloro.
- Olor: Característico.
- Punto de ebullición: 30-65°C
- Punto de inflamación: -40°C
- Temperatura de auto ignición: 250°C
- Límites de explosión (inferior/superior): 0,6-8 Vol. %
- Presión de vapor: (20°C) 350 hPa
- Densidad (20/4): 0,64
- Solubilidad: Insoluble en agua

Información toxicológica.

Toxicidad aguda:

- Efectos peligrosos para la salud:

Por inhalación de vapores: Irritaciones en vías respiratorias.

Por ingestión: náuseas.

Riesgo de aspiración al vomitar. Neumonía.

Anexo 8.



FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

TWEEN

Descripción:	Los Tween® o polisorbatos son ésteres del polioxietilen sorbitano (sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con 4, 5, o 20 moles de óxido de etileno) parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores.
Datos Físico-Químicos:	<p>Tween-20:</p> <p>Sinónimos: Polisorbato 20. Polioxietilen 20 sorbitan monolaurato. Sorbimacrogol laurato 300. E-432.</p> <p>INCI: Polysorbate - 20.</p> <p>Descripción: Líquido oleoso, amarillo o amarillo pardusco, límpido o ligeramente opalescente. Soluble en agua etanol anhidro, acetato de etilo y metanol. Prácticamente insoluble en aceites grasos y en parafina líquida. Densidad: aprox. 1,10 g/ml. HLB: 16,7.</p> <p>Fórmula Molecular: $C_{58}H_{114}O_{26}$</p> <p>Peso Molecular: 1227,5</p>
Propiedades y usos:	<p>Los polisorbatos con 20 unidades de óxido de etileno son surfactantes no-iónicos hidrofílicos. Son agentes emulgentes no iónicos, con amplio e intenso poder emulgente y suspensor, que originan emulsiones de fase externa acuosa (O/W), estables y de textura fina, poco afectables por altas concentraciones de electrolitos o por cambios de pH ligeros, observándose en la práctica que se obtienen mejores resultados con la asociación de dos o más emulgentes que con el empleo de sólo uno.</p> <p>Se utilizan en farmacia para la preparación de cremas, pomadas lavables, y bases de supositorios, así como para emulsificar aceites, esencias, y vitaminas liposolubles, y como humectantes en suspensiones orales o parenterales.</p> <p>También se utilizan para incrementar la absorción de la dieta grasa en casos de esteatorrea, debida a trastornos celíacos y esprue.</p> <p>Se usan como surfactantes en sprays insecticidas y pesticidas, así como emulgentes en cremas cosméticas e industria alimentaria.</p> <p>Se pueden adicionar a vaselina filante y pomadas para aumentar su capacidad de retención de agua y facilitar su lavado.</p>
Dosificación:	<p>Como emulsificantes y solubilizantes: 1 – 15 %.</p> <p>Como humectantes: 0,1 – 3 %.</p>
Efectos secundarios:	<p>Los polisorbatos pueden incrementar la absorción de parafina líquida y otras sustancias liposolubles.</p> <p>Ocasionalmente se han observado reacciones de hipersensibilidad tras la aplicación tópica de preparaciones que contenían polisorbatos.</p> <p>Los polisorbatos se han asociado con graves efectos adversos, incluyendo la muerte, en neonatos de bajo peso a los que se administró preparados parenterales con polisorbatos.</p>
Incompatibilidades:	<p>Ácidos y bases fuertes, sales de metales pesados, taninos, fenoles, alquitranes, y breas.</p> <p>La actividad antimicrobiana de los parabenos se reduce en presencia de polisorbatos.</p>
Observaciones:	Todos los polisorbatos son fotosensibles e higroscópicos.
Conservación:	En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.

Anexo 9.

Mac Conkey Agar.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos.

TABLA N° 9.1. Preparación de agar Mac Conkey

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	17.0	Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	3.0	
Lactosa	10.0	
Mezcla de sales biliares	1.5	
Cloruro de sodio	5.0	
Agar	13.5	
Rojo neutro	0.03	
Cristal violeta	0.001	
pH final: 7.1 ± 0.2		

Fuente: Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. (1996).

Microbiología. 4ª ed. Reverté. España.

Siembra

- Sembrar en superficie.
- Utilizando la técnica de Pour Plate: sembrar 1 ml de muestra y agregar aproximadamente 15 ml de medio de cultivo fundido y enfriado a 45-50 °C.

Incubación

Durante 18-48 horas, a 35-37 °C, en atmósfera aeróbica

TABLA N° 9.2. Resultados

Microorganismos	Colonias
Escherichia coli ATCC 25922	Rojas con halo turbio
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Rosadas mucosas
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Incoloras, transparentes
Shigella flexneri ATCC 12022	Incoloras, transparentes
Proteus mirabilis ATCC 43071	Incoloras, transparentes
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Diminutas, incoloras, opacas

Fuente: Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. (1996).

Microbiología. 4ª ed. Reverté. España.

Características del medio

Medio preparado: rojo púrpura

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

Anexo 10.

Manitol Salado Agar.

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.

Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria.

También, este medio puede utilizarse para el cultivo de especies halófilas de Vibrio, si no se dispone de medios apropiados (TCBS Medio, Medio Marino, etc.), aunque algunas especies pueden no desarrollar.

TABLA N° 10.1. Preparación del Agar Manitol Salado

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	1.0	Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final: 7.4 ± 0.2		

Fuente: Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. (1996).

Microbiología. 4ª ed. Reverté. España.

Siembra

Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra.

Incubación

De rutina: durante 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

La American Public Health Association (A.P.H.A) recomienda la incubación durante 3 días a 32 °C, en aerobiosis.

TABLA N° 10.2. Resultados

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Excelente	Amarilla
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990	Bueno	Roja
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibido	Inhibido
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Inhibido	Inhibido

Fuente: Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. (1996). Microbiología. 4ª ed. Reverté. España.

Características del medio

Medio preparado: rojo

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

5-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Características del medio.

Medio preparado: rojo

Almacenamiento.

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Anexo 11.

Sabouraud Glucosado Agar

Fórmula (en gramos por litro)		a. Instrucciones Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético
Pluripeptona	10.0	
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

Siembra

Depende del uso, puede ser tanto en tubo como en placa. Consultar referencias de métodos recomendados.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bueno
<i>Aspergillus niger</i>	Bueno
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Bueno

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro, ligeramente opalescente sin ningún precipitado.