

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**DETERMINACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LA
RIVINA HUMILIS L. (Flor Blanca) SOBRE EL CRECIMIENTO DE
Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Pseudomona aeruginosa**

TESIS PRESENTADO POR LA

BACHILLER:

RODRIGUEZ LIRA, GIANINA

PARA OPTAR EL TÍTULO

PROFESIONAL DE QUÍMICO

FARMACÉUTICO

ASESOR:

DR. FERNANDO TORRES VELA

AREQUIPA - PERU

2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer este primer paso a Dios por darme la fuerza y la fortaleza necesaria para salir siempre adelante y por hacer realidad este sueño.

A mi mamá por su apoyo incondicional por brindarme los recursos necesarios y por estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre.

A mis hermanos porque siempre he contado con ellos para todo, por estar conmigo y apoyarme siempre.

A Oscar Mollesaca Fernández por el apoyo y motivación que necesite en todo momento y estar siempre presente con cada detalle.

A mi amigo Q.F. Jorge Luis Santos Delgado por su paciencia, su conocimiento y guía en este proyecto.

A todos mis amigos de la Facultad que hicieron que la carrera, además de apasionante, fuera también divertida.

A la memoria de mi padre

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	5
HIPOTESIS.....	6
OBJETIVOS.....	7
CAPITULO I	
MARCO TEORICO	
1. <i>RIVINA HUMILIS L.</i> (FLOR BLANCA).....	8
1.1. Generalidades.....	8
1.2. Descripción botánica.....	8
1.3. Clasificación taxonómica.....	11
1.4. Distribución geográfica.....	11
1.5. Antecedentes terapéuticos medicinales.....	11
1.6. Marcha fotoquímica.....	12
1.7. Terpeno.....	12
1.8. Flavonoides.....	13

1.9. Taninos.....	14
2. METODO DE EXTRACION.....	15
2.1. Extracción por Maceración:.....	15
2.1.1. Fundamento.....	15
2.1.1.1. Maceración en frío.....	15
2.1.1.2. Maceración en calor.....	16
3. IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA.....	17
3.1. Cromatografía de Capa Fina.....	17
4. TWEEN 80.....	18
4.1. Características del Tween 80.....	18
4.1.1. Sinónimo.....	18
4.1.2. Formula empírica y peso molecular.....	18
4.1.3. Descripción.....	18
4.1.4. Propiedades físicas.....	18
4.1.5. Aplicación de Tween 80.....	19

5. DESCRIPCION DE MICROORGANISMOS EN ESTUDIO.....19

5.1. Bacterias.....19

5.1.1. Bacterias Gram Positivas.....20

5.1.1.1. Staphylococcus aureus.....22

5.1.2. Bacterias Gram Negativa.....28

5.1.2.1. Escherichia coli.....29

5.1.2.2. Pseudomona Aeruginosa.....34

CAPITULO II MATERIALES Y METODOS

1. LUGAR DE REALIZACION.....40

2. MATERIALES.....40

2.1 Material Biológico.....40

2.2 Material de laboratorio, equipo y reactivos.....41

2.2.1 Material de vidrio.....41

2.2.2 Equipos de Laboratorio.....41

2.2.3 Otros.....42

2.2.4 Reactivos.....43

2.2.5 Medios de Cultivo.....	43
3. METODOS.....	44
3.1 Recolección y acondicionamiento de la planta.....	44
3.1.1 Recolección.....	44
3.1.2 Secado.....	44
3.1.3 Embalaje.....	44
3.1.4 Molienda.....	44
3.2 Obtención de los extractos.....	45
3.2.1 Método de Maceración.....	46
3.2.1.1 Procedimiento.....	46
3.3 Determinación del rendimiento de la extracción.....	46
3.4 Procesamiento de las cepas en estudio.....	47
3.4.1 Identificación de Staphylococcus aureus.....	47
3.4.2 Identificación de Escherichia Coli.....	51
3.4.3 Pseudomona aeruginosa.....	59

3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro.....	61
3.5.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	61
3.5.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	63
3.6 Análisis Fitoquímico en Cromatografía de Capa Fina (CCF).....	63
3.6.1 Preparación de la fase móvil.....	63
3.6.2 Preparación de la placa cromatografía.....	64
3.6.3 Desarrollo cromatográfico.....	64
3.6.4 Revelado.....	64
3.6.5 Interpretación.....	64
3.6.6 Identificación de Componentes.....	65
3.6.7 Factor de Referencia (Rf).....	66
3.7 Análisis Estadístico.....	66
3.7.1 Medida de Tendencia Central:.....	67
3.7.2 Media de dispersión.....	67
3.7.3 ANOVA (Análisis de Varianza).....	67
3.7.4 Prueba de especificidad: Test de Tukey.....	68

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

1. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES.....	70
2. DETERMINACION DEL EFECTO ANTIMICROBIANO CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Rivina Humilis</i> L. (Flor Blanca) EN LAS DIFERENTES CEPAS ESTUDIADAS.....	72
2.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de <i>Rivina humilis</i> l. (Flor blanca) frente a <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	72
2.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de <i>Rivina humilis</i> l. (Flor blanca) frente a <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	75
2.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de <i>Rivina humilis</i> l. (Flor blanca) frente a la <i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i>	77
2.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el Tween 80 como el blanco.....	81
3. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Rivina Humilis</i> L. (Flor blanca)	82
3.1 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	82
3.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	84
3.3 Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) frente a la <i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i>	86

4. CROMATOGRFIA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE RIVINA HUMILIS L. (FLOR BLANCA).....	91
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CONCENTRACIONES BACTERICIDAS MÍNIMAS ENTRE LAS CEPAS PATÓGENAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI Y PSEUDOMONA AERUGINOSA.....	98
CONCLUSIONES.....	100
SUGERENCIA.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	102
ANEXOS.....	107
ANEXO 1: TINCION GRAM.....	108
ANEXO 2: PRUEBA DE LA CATALASA.....	111
ANEXO 3: PRUEBA DE LA COAGULASA.....	112
ANEXO 4: AGAR MANITOL SALADO.....	114
ANEXO 5: AGAR MAC CONKEY.....	116
ANEXO 6: AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI).....	118
ANEXO 7: AGAR LISINA HIERRO (LIA).....	120
ANEXO 8: CALDO PEPTONADO (INDOL).....	123
ANEXO 9: ROJO METILO – VOGES PROSKAUER (RM – VP).....	125

ANEXO 10: CITRATO DE SIMMONS.....	128
ANEXO 11: CALDO PEPTONADO.....	130
ANEXO 12: AGAR MULLER HINTON.....	131
ANEXO 13: ESCALA DE MC. FARLAND.....	132
ANEXO 14: IMÁGENES DE RESULTADOS.....	134
ANEXO 15: MATRIZ EN DAMERO PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS.....	138
ANEXO 16: IDENTIFICACION DE LAS ENTEROBACTERIAS MEDIANTE DIAGRAMA DE RAMIFICACION.....	139
ANEXO 17: CARACTERISTICAS DE IDENTIFICACION DE SIETE GENEROS DE BACILOS NO FERMENTADORES.....	140
ANEXO 18: EQUIPOS DE LABORATORIO.....	141

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto antimicrobiano del flores de *Rivina Humilis L. (Flor Blanca)* frente a los microorganismo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

Primero, se obtuvieron varios extractos con diferentes solventes orgánicos que presentaban diferentes polaridades, evaluando así el extracto que presentara el mayor porcentaje de rendimiento; de los cuales el extracto etanólico tuvo un rendimiento de 28.10%, el acetato de etilo de 15% y el hexánico de 8.7%. El extracto con mayor rendimiento fue el extracto etanólico por lo que fue elegido para realizar las pruebas antimicrobianas.

Luego de elegir el extracto etanólico por poseer el mayor porcentaje de rendimiento se procedió a realizar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de dilución en tubo, por cada bacteria estudiada se realizó una repetición de tres veces (bacterias de diferentes procedencias); donde se obtuvo los siguientes resultados: para el caso de las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se halló una CIM de 8mg/mL y para al *Pseudomona aeruginosa* una CIM de 30 mg/ml.

Posteriormente se determinó la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, por el método de dilución en tubo. Para determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se utilizó el método de dilución en tubo sembrando las diluciones después por 24 horas de incubación en placas con agar Mueller Hinton, donde se obtuvo los siguientes resultados: para el caso de las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se halló un CBM de 9mg/mL y para la *Pseudomona aeruginosa* una CBM de 35 mg/ML.

Finalmente se realizó la Cromatografía de Capa Fina (CCF) al extracto etanólico de *Rivina Humilis L. (Flor Blanca)* observándose que este presentaba terpenos, flavonoides y taninos.

ABSTRACT

In the current research work the anti-microbial effect of the *Rivina Humilis L. (Flor Blanca)* leaves was determined in presence of the microorganism *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

First, different extracts were obtained with different organic solvents which present different polarities, evaluating in that way the extract which presents the highest output; where the extract based en ethane had an output of 28.10%, the one based on ethyl acetate de 15% and the one based on hexane 8.7 %. The extract with the highest output was the one based on ethane. So it was chosen to antimicrobial testing.

Then choose Extract ethanol by having the highest percentage of performance proceeded to perform the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the method of dilution in tube, a repetition of three times was conducted by each studied bacteria (bacteria of different origins); where the following results were obtained: in the case of the pathogenic strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is 8 mg/mL MIC and the *Pseudomona aeruginosa* a MIC 30 mg/ml.

Afterward, the Minimum Bactericide Concentration (MBC) was determined with pathogen strain of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa*, through the diluting in tube method. To determine the Minimum Bactericide Concentration (MBC), the diluting in tube method was used, scattering the different diluting after 24 hours of incubation in Mueller Hinton agar plates; where the following results were gotten: for the pathogens strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* an MBC of 9mg/ml was found and for *Pseudomona aeruginosa* a MBC of 35 mg/ml.

Finally after, a Thin Layer Chromatography (TLC) was performed to the extract based on ethane of *Rivina Humilis L. (Flor Blanca)* observing that this presented terpenes, flavonoides and tannins.

INTRODUCCION

En los últimos años la medicina natural está tomando un mayor auge, debido a que el estudio de plantas medicinales se está intensificando con el deseo de descubrir y crear nuevos antibióticos y terapias alternativas a las ya existentes, basándose en el uso tradicional que le dan los pobladores a diversas plantas.

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la mayor parte de nuestro organismo. A pesar de que el efecto protector del sistema inmune hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas. En los últimos años hay una mayor resistencia de los microorganismo a antibióticos ocasionando que el arsenal terapéutico que tenemos cada vez sea mas menos efectivo.

La planta *Rivina Humilis L. (Flor Blanca)* es utilizada actualmente por los pobladores en infecciones urinarias de forma tradicional, es por eso que con el deseo de saber el porqué se le atribuye estas cualidades terapéuticas realizamos el presente trabajo de investigación; además porque hoy en día las infecciones son enfermedades muy comunes, por lo cual se probó sus efectos frente a los principales agentes patógenos de estas infecciones, entre ellos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y a la vez contribuir en datos científicos sobre esta planta ya que se le usa empíricamente.

HIPOTESIS

Dado que en la medicina tradicional existen antecedentes terapéuticos que reportan la acción antibacteriana de la ***Rivina humilis L.***(Flor blanca) es probable que el extracto con mayor porcentaje de rendimiento obtenido de dicha especie vegetal tengan efecto antibacteriano frente a las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.



OBJETIVOS

1. Obtener el extracto de ***Rivina humilis L.*** (Flor blanca) utilizando como solventes Etanol, Acetato de Etilo y Hexano, a su vez determinar los rendimientos de cada uno de los extractos para elegir el de mayor rendimiento.
2. Determinar con el extracto de mayor rendimiento de la ***Rivina humilis L.*** (Flor blanca) el efecto antibacteriano in vitro frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. mediante las pruebas:
 - o Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del ***Rivina humilis L.*** (Flor blanca) frente a estos tres microorganismos.
 - o Concentración Bactericida Mínima (CBM) del ***Rivina humilis L.*** (Flor blanca) frente a estos tres microorganismos.
3. Realizar la prueba cromatográfica de capa fina al extracto con mayor efecto terapéutico para determinar los principales componentes de ***Rivina humilis L.*** (Flor blanca).

CAPITULO I MARCO TEORICO

1. *Rivina humilis* L. (Flor blanca)

1.1. Generalidades

La *Rivina humilis* L. (Flor blanca) pertenece a la familia de la Phytolaccaceae, comprende cerca de dieciocho géneros, totalizando una centena de especies, ampliamente distribuidas, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales de América. ⁽⁵⁾

Rivina es un género con 53 especies de plantas fanerógamas, entre estas, *Rivinaacuminata*, *Rivinaaffinis*, *Rivinaapetala*, *Rivinaaurantiaca*, *Rivinabrasiliensis*, etc. ^{(44) (42)}

1.2. Descripción botánica

La Flor Blanca o la Rivina humilis L. es una hierba arbustiva hasta de 1.5m, con tallos rectos.

Hojas alternas y en espiral. Laminas ovadas, de elíptico-ovadas a lanceoladas, de 2.5 a 13 por 1.3 a 7cm, con el ápice agudo o acumunado.

Inflorescencias en racimo terminales o axilares, de 4.5 a 9.5, flores blancas, pediculadas, con 4 partes del perianto en 2 verticilos. Sépalos de casi 2mm. Presenta 4 estambres. Ovario monolocular y un estigma.

Frutos en drupas de 4 a 6 mm, globosas, lisas, rojas o rojo-anaranjadas.

Se distingue por sus flores con solo 4 partes del perianto y por sus drupas con una sola semilla y sus frutos rojos. (Ver Fig. N°1 y N°2) ⁽⁴³⁾



FiguraN°1: *Rivina humilis* L. (Flor blanca)



FiguraN°2: *Rivina humilis* L. (Flor blanca)

Fuente: http://www.yinyangperu.com/flor_blanca.htm

1.3. Clasificación taxonómica:

Rivina humilis L. (Flor blanca) presenta la siguiente clasificación taxonómica de acuerdo al sistema de A Cronquist 1981:

CLASIFICACION TAXONOMICA⁽¹⁸⁾

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

CLASE: Masnoliopsida

ORDEN: Caryophyllales

FAMILIA: Phytolaccaceae

GENERO: Rivina

EPITELIO ESPECÍFICO: humilis

NOMBRE CIENTIFICO: Rivina humilis L.

TABLA N°1 Clasificación taxonómica de la *Rivina humilis* L. (Flor blanca)

NOMBRE VULGAR: Flor Blanca, Coral, Carmin, Sangre de toro, Hierba mora

1.4. Distribución geográfica

Esta selva crece en los bosques tropicales y la encontramos en los departamentos de Madre de Dios y Ucayali. También crece en Costa Rica.

1.5. Antecedentes terapéuticos medicinales

En la actualidad, su uso etnomedicinal es múltiple y variado siendo empleado sus hojas como purgantes, antirreumáticos y también para tratar el vomito. Las raíces se emplean en infusión, extracto o tintura.

Se recomienda en los problemas estomacales como las infecciones estomacales leves provocadas por bacterias pues es purgante de acción intermedia.

Se prepara una infusión de 1 litro de agua, con un puñado de hojas y flores. Se deja enfriar y se toma un vaso (250 ml), tres veces al día para las infecciones urinarias también su extracto fluido, mezclado en agua se usa para lavados femeninos, en casos de descensos vaginales bacterianas.

En forma de tintura se usa para enfermedades de la piel, hemorroides, úlceras y heridas como antiséptico y cicatrizante.⁽⁴³⁾

1.6. Marcha fotoquímica

Llamado también tamizado fitoquímica o “Screening fitoquímica”, es una de las etapas de la investigación fitoquímica, que ayuda a la micro química para evidenciar estos grupos de compuestos mediante la formación de precipitados, coloraciones, etc.

Es el proceso por el cual se va a lograr identificar de manera cualitativa la presencia de determinados grupos de constituyentes químicos de la planta, llamados metabolitos secundarios.⁽¹⁴⁾

1.7. Terpeno

Son moléculas muy abundantes en los vegetales; es el metabolito secundario que forma una amplia y diversa familia de sustancias naturales, estos compuesto, proceden de la condensación, en número variable, de unidad isoprenicas (isopreno = 2-metil-butadieno) (Ver Figura N°3); pero reamente los terpenos no derivan del isopreno ya que este nunca se ha encontrado como producto natural; siendo el verdadero precursor de los terpenos el Acido Mevalónico, el cual proviene de Acetil CoA. En cualquier caso la división de la estructura de los terpenos en unidad de isopreno es útil y pragmática y se emplea con mucha frecuencia. Los terpenos pueden contener desde una hasta ocho unidades isoprenicas y su clasificación se determina por el número de isoprenos que contiene: monoterpenos (2isoprenos),

diterpenos (4 isoprenos), triterpenos (6isoprenos), tetraterpenos (8isoprenos), politerpenos (macromoléculas compuestas por un gran número de unidades de isopreno).

Estos compuestos se encuentran en todas partes: semillas, flores, hojas, raíces, madera de las plantas superiores, así como musgo, algas y líquenes.⁽²⁾

Dan coloración a los órganos vegetales y participan en la síntesis de las vitaminas A, K y E. Por ejemplo el color anaranjado de la zanahoria.

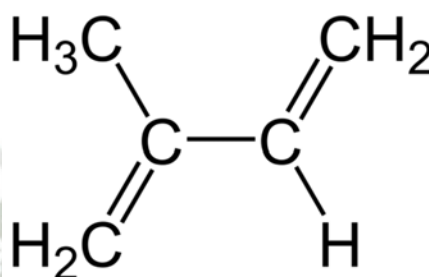


Figura N°3. Estructura Química del Isopreno

1.8. Flavonoides

Es el termino con que se identifica a compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura química basada en un esqueleto C6-C3-C6, esto es un anillo bencénico unido a una cadena propánica y esta a su vez a otro anillo bencénico, dependiendo el grado de saturación y patrón de sustitución de grupos funcionales en la estructura base se da lugar a flavonoides, flaonas, charconas, flavononas, isoflavonoides, etc. (Ver Fig. N°4) Los flavonoides son una clase de pigmentos vegetales hidrosolubles.⁽³³⁾

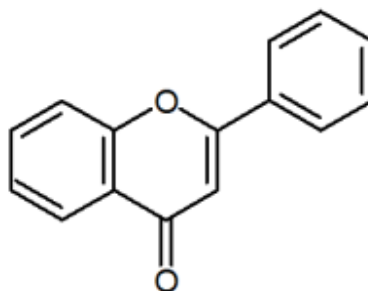


Figura N°4: Estructura Química de los Flavonoides

1.9. Taninos

Los taninos son sustancias polifenólicas presentes en gran número de plantas producto del metabolismo secundario. Su carácter hidrosoluble permite que sea de fácil extracción y de utilidad en diversos usos en la industria química y farmacéutica. Sus propiedades son⁽¹²⁾

- Astringente.
- Hemostático local y cicatrizante
- Antiséptico local
- Antiinflamatorio y favorecedor del retorno venoso
- Antioxidante

Cabe recordar que no son sólo los taninos, es el efecto sinérgico de toda la planta o alimento. Por esto se producen casos contradictorios entre sí, preparados ricos en taninos que poseen una acción vasoconstrictora, como los hechos con hammamelis, y otros como el vino tinto, que poseen la capacidad de bloquear la vasoconstricción. (Ver Fig. N°5)⁽⁴⁵⁾

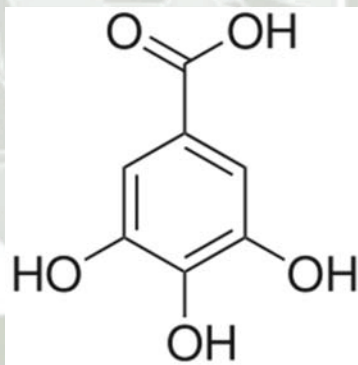


Figura N°5: Estructura Química de los Taninos

2. METODO DE EXTRACION

La extracción es una de las operaciones farmacéuticas por medio de la cual se obtienen los principios activos de una manera más concentrada; los componentes solubles contenidos en un material vegetal debidamente preparado se disuelven en uno o más solventes o líquidos extractores formando así un extracto crudo o total el cual va a tener la mayor cantidad de principio activos, pigmentos vegetales y metabolitos primarios. Dentro de los procedimientos de extracción tenemos:⁽¹²⁾

- ✓ Infusión
- ✓ Decocción o Cocimiento
- ✓ Maceración
- ✓ Digestión
- ✓ Lixiviación o Percolación
- ✓ Soxhlet

2.1. Extracción por Maceración:

2.1.1. Fundamento:

Es un método de extracción sólido – líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Ver Fig. N°6). Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, caliente y frío.

2.1.1.1. Maceración en frío

Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efecto de temperatura. Sin embargo se necesitan periodos de tiempo mucho más extensos para lograr una extracción adecuada.

2.1.1.2. Maceración con calor

El proceso consiste en el contacto entre las fases, el producto a macerar y el solvente; con la diferencia de la variación en la temperatura, en este caso pueden variar las condiciones de la maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso. La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto, ya que regularmente destruye algunas propiedades, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles que se ven afectados por la temperatura, además de que requiere equipos más sofisticados que permitan el control de temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica. No obstante, los periodos de tiempo de extracción se reducen favorablemente.⁽¹³⁾



Figura N°6: Extracción por Maceración

3. IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA

La cromatografía es un proceso fisicoquímico que va a permitir la separación de los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por adsorción de estos sobre una superficie estacionaria móvil.⁽²⁷⁾

3.1. Cromatografía de Capa Fina

La cromatografía en capa fina o más comúnmente llamado TLC (thin layer chromatography), es una técnica cromatografía utilizada, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla.⁽²⁷⁾

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. Lográndose eluir primero a los componentes que tiene mayor afinidad por la fase móvil y posteriormente eluirán los componentes con mayor afinidad por la fase estacionaria.⁽³⁷⁾

Se emplea una cuba cromatografía usando láminas de aluminio con silicagel los cuales fueron cortados en un tamaño de 10 x 5 cm. Se traza una línea de 1cm del borde de la placa con un lápiz para hacer aplicaciones de muestras ya sea en forma de punto o barra. Las aplicaciones deben realizarse en carriles de 1cm de ancho y debe existir un espacio de 1cm del borde inferior de la placa el cual es el punto de origen y se aplica el sembrado con capilares.⁽¹⁴⁾

4. TWEEN 80⁽³²⁾

4.1. Características del Tween 80⁽³⁴⁾

4.1.1. Sinónimo

- ✓ Polisorbato 80
- ✓ Polioxietilen-20 sorbital mono oleato
- ✓ E-433

4.1.2. Formula empírica y peso molecular

- ✓ Fórmula empírica: $C_{64}H_{125}O_{26}$
- ✓ Peso Molecular: Aprox. 1309 UMA

4.1.3. Descripción

Es un líquido viscoso de color amarillo ámbar, muy ligeramente opalescente, con ligero olor característico.⁽³²⁾

4.1.4. Propiedades físicas

- ✓ **Densidad:** 1.060-1.090 g/mL
- ✓ **Índice de refracción:** 1.4705-1.4740
- ✓ **pH: solución acuosa al 5%:** 5.5-7.5
- ✓ **Índice de acidez:** Menor de 2
- ✓ **Índice de saponificación:** 45-55
- ✓ **Humedad:** Menos del 3%

Estabilidad y condiciones de almacenamiento: Conservar en envases bien herméticos y proteger de la luz.⁽³²⁾

4.1.5. Aplicación de Tween 80

En general los polisorbatos son agentes emulgentes del tipo surfactante no iónico que originan emulsiones de fase externa acuosa, estable y de textura fina poco afectables por altas concentraciones de electrolitos o por cambios de pH.⁽³²⁾⁽²⁴⁾

Se utilizan en la industria farmacéutica para la preparación de cremas, pomadas lavables y base de supositorios, y para emulsificar aceites de hígado de pescado vegetal y minerales; también son utilizados como solubilizantes de una gran variedad de sustancias, incluyendo aceites esenciales, perfumes, vitaminas liposolubles y fenobarbital.

Además se emplean como humectantes en la formulación de suspensiones orales y parenterales.⁽²⁴⁾

5. DESCRIPCION DE MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

5.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5µm, por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices.

Las bacterias son procariotas, generalmente poseen una pared celular compuestas de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

Existen 4 morfologías para las bacterias, células esféricas o cocos, en forma de bastón, espiraladas y en forma de coma llamadas vibriones.⁽²¹⁾

Además de su tamaño, forma y disposición celular, otro criterio de diferenciación de las bacterias se basa sobre sus características de tinción con la tinción de Gram con esta técnica de tinción la mayor parte de las bacterias pueden ser clasificadas como Gram positivas o Gram negativas,

El componente rígido de la pared celular de todas las bacterias, está constituido por peptidoglicano o mureína. El peptidoglicano se encuentran en todas las especies de bacterias excepto en los *ureoplasmas* y *micoplasmas*, ya que carecen de pared celular.⁽²⁹⁾

5.1.1. Bacterias Gram Positivas

Se denominan Gram positivas a aquellas bacterias que se tiñen por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura

celular. La envoltura celular de las bacterias Gram positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior.

La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico; la capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram (Ver Fig. N°7). A diferencia de las Gram negativas, estas bacterias no presentan una segunda membrana lipídica externa.⁽³³⁾

Las siguientes características están presentes generalmente en una bacteria Gram positiva:⁽²¹⁾

- ✓ **Membrana citoplasmática:** Es una fina estructura que rodea completamente a la célula; la estructura general es una capa lipídica, los fosfolípidos poseen tanto unidades altamente hidrofílicas (ácidos grasos) como unidades hidrofílicas (glicerol).
- ✓ **Capa gruesa de peptidoglicano:** Está constituido por N- Acetil murámico y N- Acetil glucosamida unidos por compuestos peptídicos es el responsable de que la capa este muy polarizada y que la bacteria tenga una gruesa superficie hidrofílica.
- ✓ **Ácidos teicoicos y lipoteicoicos:** Los ácidos teicoicos son polisacáridos ácidos que contienen glicerol fosfato o residuos de ribitol, que estabilizan la pared celular. Los ácidos lipoteicoicos son aquellos ácidos teicoicos que están unidos a los lípidos de la membrana.

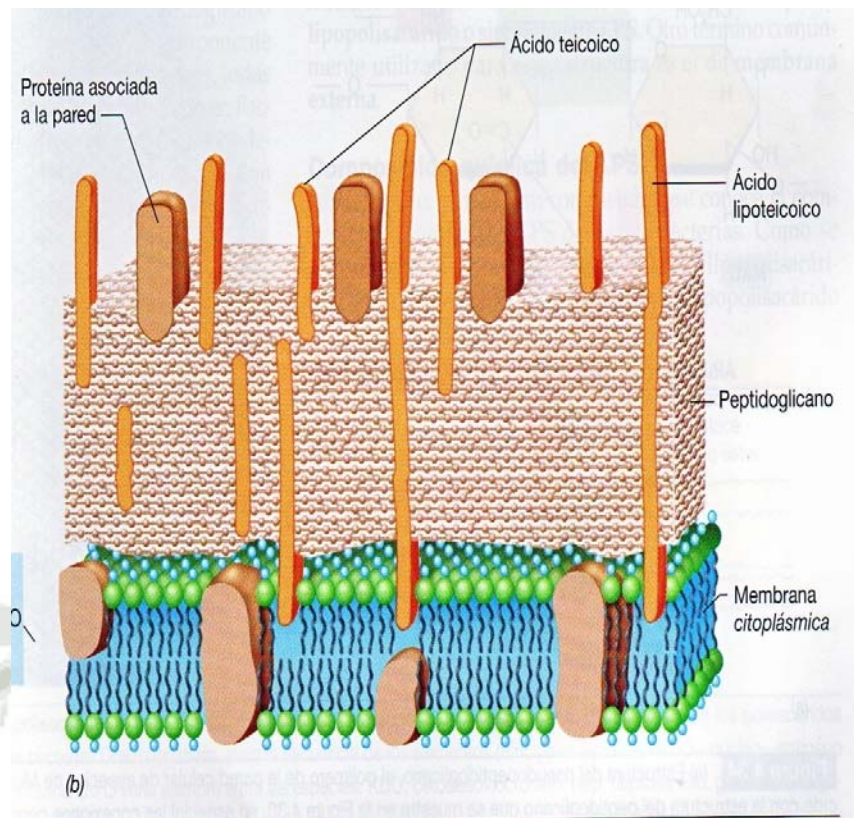


Figura N°7: Estructura de la pared celular Gram positiva

Fuente: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>⁽³⁹⁾

5.1.1.1. *Staphylococcus aureus*

a) Morfología

Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos cuyo diámetro varía de 0.8 a 1.0 μm . En cultivo sólidos, se desarrollan formados racimos, sin embargo, en medios líquidos forman a menudo cadenas cortas.⁽²¹⁾

Las colonias de *Staphylococcus* son circulares de 2 a 8mm de diámetro, convexas, desde traslucidas a opacas grises blanquecinas, amarillas.⁽¹¹⁾

b) Enzimas

Staphylococcus aureus produce varias enzimas que pueden contribuir a su virulencias.⁽³³⁾

- ✓ **Catalasa:** La producción de catalasa por parte de estos microorganismos puede actuar para inactivar el peróxido de hidrogeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de la células fagocitas después de la ingestión de estos microorganismos.
- ✓ **Coagulasa:** Tanto la coagulasa libre como la unida (también denominada factor de agregación) pueden recubrir las células bacterianas con fibrina y tonarlas resistentes a la opzonizacion y la fagocitosis.
- ✓ **Fibrinolisin:** (Estafiloquinasa) Estas pueden degradar coágulos de fibrina y permitir la diseminación de la infección a los tejidos contiguos.
- ✓ **Hialuronidasa:** Hidroliza la matriz intercelular de mucopolisacaridos en los tejidos y por lo tanto puede actuar diseminando los microorganismos a zonas adyacentes.
- ✓ **Lipasa:** Las cuales son activas sobre una variedad de sustratos incluyendo plasma, grasas y aceites que se acumulan en la superficie del cuerpo, lo cual explica la intensa colonización del *Staphylococcus* por las aéreas sebáceas de mayor actividad.
- ✓ **Nucleasas:** La elaboración de una nucleasa resistente al calor parece estar asociada con cepas *Staphylococcus aureus*. Se halla en la célula o en la superficie de ella.⁽⁷⁾

- ✓ **Otros:** Los estudios inmunológicos y de especificidad indican que *Staphylococcus aureus* producen por lo menos tres tipos diferentes β -Lactamasas. La producción de estas enzimas pueden ser inducibles es decir se producen solo en presencia de antibióticos β -Lactámicos o constitutiva es decir se producen continuamente y hace que estos microorganismos sean resistentes a la penicilina y la ampicilina.⁽³⁾

c) **Toxinas:**

- ✓ **Toxinas Citolíticas:** Existen varias toxinas.⁽²¹⁾
 - **Alfa hemolisina:** Es una proteína que puede producir lisis de los eritrocitos y lesionar las plaquetas.
 - **Beta hemolisina:** Esta degrada la hemolisina y es toxica para muchas clases de células, incluso los eritrocitos.
 - **Leucosidinas:** Toxina que puede matar a los leucocitos expuestos de muchos animales.
- ✓ **Enterotoxinas:** Hay por lo menos seis toxinas solubles designadas de la A-F producidas por el *Staphylococcus aureus*, estas son termoestables resistentes a ebullición por 30 minutos y a la acción de las enzimas intestinales; son causas importantes del envenenamiento con alimentos.
- ✓ **Toxina exfoliativa o epidermolítica:** Esta toxina está constituida por lo menos por dos proteínas que producen la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada.⁽³⁰⁾

d) **Patogenicidad**

Staphylococcus aureus puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.⁽¹⁾

- ✓ **Síndrome de la piel escaldada por estafilococo:** Es un síndrome caracterizado por la descamación diseminada del epitelio de recién nacidos y lactantes; No se encuentran microorganismos o leucocitos en las ampollas.
- ✓ **Intoxicación alimentaria:** Sucede después de haber ingerido alimentos con la toxina termoestable. Se caracteriza por la presencia de vómitos intensos, diarrea y cólicos que inician entre 2 y 6 horas después de la ingesta. La resolución es rápida (menos de 24 h).
- ✓ **Absceso cutáneo:** Es una acumulación de pus que puede darse en piel y mucosas. También puede darse en diferentes órganos (pulmón, hígado, riñón y cerebro) mediante la diseminación bacteriémica.
- ✓ **Impétigo:** Infección cutánea localizada caracterizada por la presencia de vesículas purulentas sobre base eritematosa. Se da preferentemente en niños y en zonas expuestas, en especial la cara.
- ✓ **Foliculitis:** Es una infección restringida a los orificios de los folículos pilosos y se acompaña por la presencia de lesiones dolorosas, rojizas y pequeñas sin síntomas sistémicos.
- ✓ **Forunculosis y Antrax:** Son piodermas profundos que se presentan como lesiones elevadas, firmes, dolorosas y con centros necróticos que contienen material purulento.

- ✓ **Hidradenitis supurada:** Es la infección de las glándulas sudoríparas apócrinas bloqueadas. Se da en las áreas intertriginosas (axila, ingle, áreas perineales). Existe dolor, edema y eritema, usualmente sin fiebre.
- ✓ **Endocarditis:** Es la principal complicación de la bacteriemia. Daños hacia el revestimiento endotelial del corazón. También afecta a las válvulas cardíacas. Pueden auscultarse soplos.
- ✓ **Osteomielitis:** Infección y destrucción ósea, en especial en la metáfisis de los huesos largos de los niños y la columna vertebral en adultos mayores.
- ✓ **Meningitis:** Infección del sistema nervioso, se presenta en pacientes con antecedentes de traumatismos, cirugías, inmunodeficiencia, neoplasias malignas e hidrocefalia.
- ✓ **Peritonitis:** Infección del peritoneo, el grupo de riesgo son los pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria.
- ✓ **Pericarditis:** Infección del pericardio. Sucede como complicación de la endocarditis estafilocócica o por trauma penetrante en el tórax.⁽¹⁹⁾⁽³⁸⁾

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

Como agente secundario interviene en la angina séptica, escarlatina, tuberculosis y neumonía.

La adquisición puede ser exógena o endógena. Es un agente de gran relevancia intrahospitalaria, donde ha adquirido resistencia a la Oxacilina. La contaminación intrahospitalaria se lleva a cabo a través de las manos del personal a cargo.⁽²²⁾

e) Pruebas diagnosticas de laboratorio

- ✓ **Muestras:** Material aspirado de la tráquea, liquido cefalorraquídeo para cultivo, frotis superficiales, pus, sangre, todos estos según la localización del proceso.
- ✓ **Cultivo:** Las muestras sembradas a 37°C en placas de agar sangre producen colonias típicas en 18 horas pero no pueden presentar hemolisis y producción de pigmento sino hasta después de varios días. En agar sangre las colonias observadas son de color blanco y dorado rodeadas de un halo de β -Hemolisis.

El *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de fermentar el manitol, las muestras contaminadas con una flora mixta pueden cultivarse en medios selectivos como Vogel Jhonson manitol salado, agar telurito sangre que contienen 7.5% de ClNa que ha de servir de selección o de especificidad para el mismo.⁽¹⁶⁾
- ✓ **Tinción Gram:** Al observarse al microscopio van a presentar una coloración violeta el cual nos indica que es positivo a la tinción de Gram: teniendo una disposición de racimo.
- ✓ **Prueba de la coagulasa en porta objeto:** El fibrinógeno presente en el plasma al entrar en contacto con la enzima coagulasa del *Staphylococcus aureus* provoca su aglutinación. Dando así coagulasa positiva.
- ✓ **Prueba de la coagulasa en tubo:** La enzima coagulasa que presenta la bacteria al entrar en contacto con el plasma va a activar los factores de coagulación produciéndose así un coagulo visible en el medio. Dando coagulasa positiva.

- ✓ **Fermentación del manitol:** El consumo de manitol por *Staphylococcus aureus* hace virar el color del indicador presente del medio a amarillo lo que se interpreta como manitol positivo.
- ✓ **Prueba de la catalasa:** Al entrar en contacto el H₂O₂ con la enzima catalasa va descomponer al mismo, ocasionando la aparición de burbujas de gas que indica que la reacción es positiva.

f) Tratamiento

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son causada por cepas productoras de β - Lactamasas y por tanto resistentes a las penicilinas, el tratamiento de elección es la administración de una Penicilina resistente a la penicilinas. Como medicamento de primera elección se utiliza la Cloxacilina también se puede utilizar Cefalosporinas, Quinolonas, Amoxicilina asociadas a inhibidores de Betalactamasa, Macrolidos y Clindamicina. Si el *Staphylococcus aureus* es resistente a la Meticilina el antibiótico de elección es la Vancomicina.⁽⁴⁾

5.1.2. Bacterias Gram Negativa

En microbiología, se denomina bacterias Gram Negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular.

La envoltura celular de las bacterias Gram-negativas está compuesta por una membrana citoplasmática(membrana interna), una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática

interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias.

La membrana externa contiene diversas proteínas, siendo una de ellas las porinas o canales proteícos que permiten el paso de ciertas sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular. (Ver Fig. N°8).

También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS), formadas por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina).

Si presentan flagelos, estos tienen cuatro anillos de apoyo en lugar de los dos de las bacterias Gram-positivas porque tienen dos membranas. No presentan ácidos teicoicos ni ácidos lipoteicoicos, típicos de las bacterias Gram-positivas. Las lipoproteínas se unen al núcleo de polisacáridos, mientras que en las bacterias Gram-positivas estos no presentan lipoproteínas. La mayoría no forma endosporas (*Coxiellaburnetti*, que produce estructuras similares a las endosporas, es una notable excepción).⁽²⁰⁾

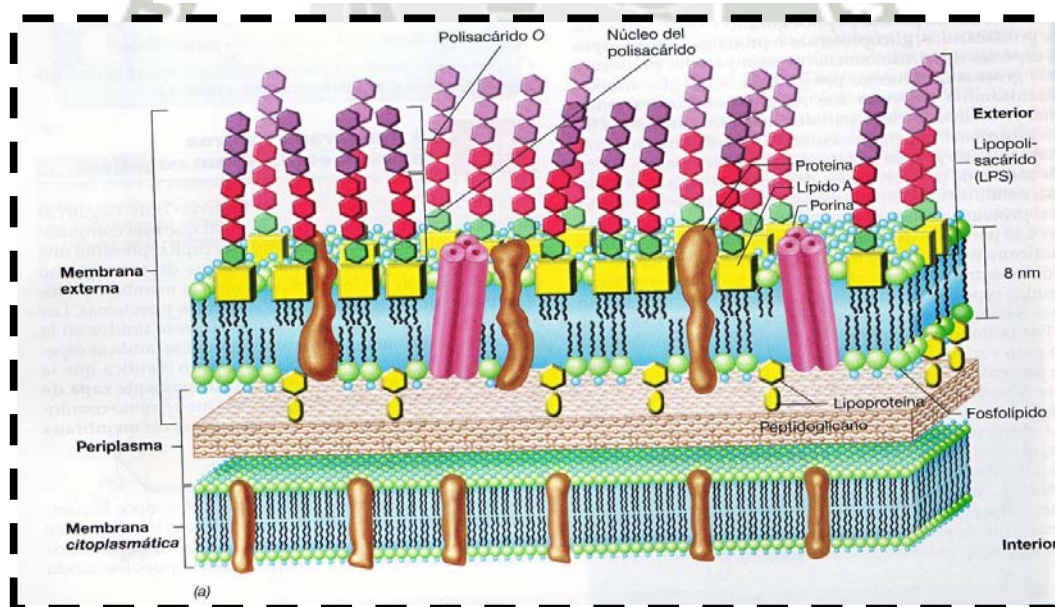


Figura N°8: Estructura de la pared celular Gram Negativa

Fuente: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>⁽³⁹⁾

5.1.2.1. *Escherichia coli*:

a) **Morfología**

Se presenta como un bacilo corto de extremos redondeados anaerobio facultativo, Gram negativo, no forma esporas; presenta movilidad y flagelos peritricos, no delicado, capaz de tolerar la bilis. Crece a 44°C en medios de gran simplicidad, por lo que son poco exigentes en sus necesidades nutritivas y realmente resistentes a los agentes externos; forma colonias redondas, convexas y lisas con bordes definidos.⁽²¹⁾⁽⁶⁾

b) **Patogenicidad**

Escherichia coli causa diversas infecciones en el ser humano, las más frecuentes son:

Las infecciones urinarias que son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm, o bien 1 a 2 pulgadas) en comparación con los hombres (unos 15 cm, o unas 7 pulgadas). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción entre hombres y mujeres. Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra (una infección ascendente), los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el evento iniciante de la infección es desconocido. Aunque las infecciones ascendentes son las causantes de infecciones del tracto urinario bajo y cistitis, no es necesariamente esta la causa de infecciones superiores como lapielonefritis, que puede tener origen hematógeno.⁽⁴¹⁾

Produce frecuentemente lo que se conoce como “diarrea del viajero”, que se manifiesta por fiebre y deposiciones acuosas, suele curar

espontáneamente en unos 3-5 días y el tratamiento es básicamente con reposición de líquidos.

También pueden causar infecciones de las vías biliares, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal gastroenteritis y abscesos en cualquiera localización a nivel del tejido celular subcutáneo secundarios a las infecciones de las heridas operatorias.⁽¹¹⁾

El efecto en pacientes hospitalizados con enfermedades graves *Escherichia coli* forma parte de la flora faríngea ya sea por instrumentación o espontáneamente, puede alcanzar los alveolos originando una neumonía específica.

Se distingue ocho cepas según su poder patógeno, también se les puede llamar *virotipos*:⁽²¹⁾

✓ ***Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP)**

Escherichia coli enteropatogénica es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vía de desarrollo. ECEO interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia/desnutrición” o lesión A/E (attaching and effacing).

✓ ***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se van afectados.

✓ ***Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)**

Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libero el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis.

✓ ***Escherichia coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH)**

Produce verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primeros colitis hemorrágicas, luego síndrome hemolítico ureico (lo anterior mas infecciones del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, purpura trombocito penicatrombotica (lo de antes mas infección del sistema nervioso central).

✓ ***Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA)**

La capacidad de las cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas.

✓ ***Escherichia coli* Adherencia difusa (ECAD)**

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o mal nutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad ni en adulto.⁽⁸⁾

c) Pruebas diagnosticas de laboratorio:

✓ **Muestras:** Orina, secreción, heces.

✓ **Tinción de Gram:** Al observar al microscopio va a presentar una coloración roja o rosada el cual nos indica que es negativo a la tinción de Gram; se van a observar bacilos cortos de color rojo o rosado.

✓ **Sensibilidad en medios de cultivo:**

- **Agar Mac Conkey:** Se van a presentar colonias pequeñas de un color rosado ya que la bacteria fermenta la lactosa y produce ácido haciendo que el indicador del medio vire a un color rosado.
- **Agar Eosina Azul de Metileno:** Se observará colonias de color verdoso con brillo metálico debido a la fermentación de la lactosa.

✓ **Pruebas de diferenciación Bioquímica:**

- **Triple azúcar Hierro (TSI):** Al haber el consumo de los tres azúcares presentes en este medio va ocasionar el viraje del indicador rojo neutro a una coloración amarilla (pico y fondo) (A/A) con o sin producción de CO₂.
- **Agar lisina Hierro (LIA):** *Escherichia coli* va a presentar una coloración morada del medio (K/K) por lo que indica la descarboxilación de la lisina.
- **Prueba de Indol:** La formación de un anillo de color rojo grosella después de haber agregado el reactivo de Kovacs nos dará una prueba de indol positiva para *Escherichia coli* lo que quiere decir que dicha bacteria posee la enzima triptófano.
- **Rojo de metilo – Voges Proskauer:** La prueba de rojo de metilo es positiva ya que se desarrolla un color rojo estable esto indica que el microorganismo fermenta la glucosa por la vía de los ácidos mixtos. Mientras que la prueba de Voges Proskauer es negativa ya que se observa una coloración amarilla lo cual nos indica que no hay presencia de diacetilo.

- **Citrato de Simmons:** Se observara una coloración verde lo que indica que no hay consumo o utilización de citrato como fuente de carbono por lo tanto la prueba es negativa.

d) Tratamiento

El tratamiento de las gastroenteritis por *Escherichia coli* se basa en la hidratación, en cuanto a la profilaxis la doxiciclina es útil. En las infecciones urinarias bajas sin sepsis como cistitis o bacteriemia asintomática basta la administración de cotrimoxazol.

Las sulfonamidas y los antisépticos urinarios como la nitrofurantoina (100mg cada 6 horas), el ácido nalidixico (0.5 a 1 g cada 6 horas), o el norfloxacin que es una quinolona con cierta penetración tisular son suficientes; la duración del tratamiento convencional es de 5 días.

Por lo contrario en las infecciones que se acompaña con fiebre y alteraciones del estado general (todas las cuales cursan en un momento u otro de su evolución con bacteriemia) y por definición, en la sepsis o bacteriemia con dicho patógeno hay que administrar antibióticos de preferencias bactericidas.⁽⁴⁾

5.1.2.2. *Pseudomona aeruginosa*

a) Morfología

Bacilos gramnegativo de 4-3 μm de longitud y de 0.5-1 μm de grosor. Pueden estar rodeados por una capa de naturaleza polisacárido, llamada limo.

La mayoría de las células presentan un flagelo polar, pero algunas pueden tener 2 a 3. Las cepas clínicas recién aisladas poseen fimbrias, que actúan como adhesinas o pilis sexuales.

Se produce una capa de mucus extracelular, similar a una cápsula. Esta capa se denomina glicocalix o sustancia mucoides y está compuesta por

alginato, y un polímero aniónico. La estructura y la composición de la pared celular de *P. aeruginosa* se asemejan a los microorganismos gramnegativos de la familia Enterobacteriaceae. El lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de la *P. aeruginosa* está compuesto por polisacáridos centrales que son comunes a todas las cepas y polisacáridos de cadena lateral que son específicos de cepa.⁽³³⁾

b) Patogenicidad

Causa infecciones en distintos sitios anatómicos: órganos y sistemas. Puede causar infecciones de vías aéreas superiores, como por ejemplo otitis; infecciones de las válvulas cardiacas (endocarditis bacteriana), infecciones de vías urinarias, infecciones de herida quirúrgica en pacientes postoperados, infecciones pulmonares (neumonía) en pacientes que utilizan ventilación mecánica. Este tipo de infecciones suelen presentarse en pacientes susceptibles con defensas disminuidas incluyendo pacientes con cáncer. Las infecciones nosocomiales generalmente incluyen neumonías, bacteremias, infección de herida quirúrgica e infecciones de vías urinarias.⁽³⁵⁾

Tiene como hábitat el agua. Produce enfermedad por sus propiedades invasivas y toxigénicas, ya que puede producir una exotoxina termolábil. Es muy resistente a los antibióticos. Presentan una gran susceptibilidad a las infecciones por este microorganismo los lactantes y prematuros, pacientes quemados, y los que han sufrido intervenciones quirúrgicas o diagnósticas. La *P. aeruginosa* causa infecciones de heridas (donde origina un pus verde - azulado de donde proviene su nombre común bacilo piocianico), meningitis, septicemia, infecciones urinarias, otitis, conjuntivitis, etc.⁽¹⁷⁾

c) Estructura antigénica

El lipopolisacárido de *P. aeruginosa*, consta del polisacárido O (antígeno somático), unido por el oligosacárido del centro común al lípido A. En su composición destaca un alto contenido en fósforo, y la presencia en la cadena lateral O de fucosamina, quinovosamina y en determinados serotipos, bacilosamina.

Además de los antígenos O, la mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* si no todas, poseen un antígeno poliaglutinable (PA). La capa de moco de la *P. aeruginosa* también es inmunogénica y puede desempeñar un papel en la protección del microorganismo contra la fagocitosis.⁽¹⁰⁾

d) Enzimas y Toxinas

La personalidad patogénica refleja las características de una bacteria que la capacitan para causar una enfermedad infecciosa, en la *P. aeruginosa* corresponden a la exotoxina A y la elastasa.

Si recordamos que un patógeno oportunista debe cumplir cuatro etapas: 1. Acceder al huésped; 2. Encontrar un nicho; 3. Evitar los mecanismos defensivos y 4. Infectar establemente al huésped, es evidente que el bacilo piciánico tiene dos defectos de personalidad que afectan a las etapas 1,2 y 3. Pese a estas limitaciones, una vez que *P. aeruginosa* logra desarrollar su oportunismo, dispone de un arsenal de estructuras celulares y productos extracelulares que contribuyen a su virulencia. De este modo las potentes toxinas y las enzimas destructoras dañan los tejidos del huésped y destruyen sus mecanismos defensivos.⁽¹⁰⁾

✓ Endotoxina

La lisis de las Pseudomonas da lugar a la liberación de la endotoxina, y de su mediador biológico, el lípido A. La endotoxina de las Pseudomonas interviene tanto en el establecimiento de la infección, como en los síndromes asociados al cuadro de septicemia. En cuanto al antígeno O,

es crítico para la virulencia sistémica porque crea una barrera que impide la lisis de la bacteria por el complemento.

✓ **Citotoxina**

Es una proteína formadora de poros. Su órgano diana son las membranas de la mayoría de las células eucarióticas, causa lesiones microvasculares pulmonares, e induce la síntesis de mediadores, contribuyendo al desarrollo del DRA que se asocia a la sepsis.

✓ **Hemolisinas**

Las dos hemolisinas que produce el bacilo piocianico actúan sinérgicamente, escindiendo lípidos y lecitinas. De modo análogo a las proteasas pueden contribuir por su citotoxicidad a la invasión tisular. La fosfolipasa C también puede contribuir a la invasividad del microorganismo por medio de la destrucción del surfactante pulmonar y el ataque a los tejidos pulmonares para producir atelectasia y necrosis.

✓ **Exotoxina A**

Es la más tóxica, bloquea la síntesis proteica; necrosis tisular, citotóxica, invasividad, leucocitosis, induce formación ácido anti-toxina A. Tiene actividad de ADP-ribosil transferasa, la cual inactiva al factor de elongación de las células eucarióticas, lo que conduce a la detención de la síntesis proteica y a la muerte celular. Se une con receptores en la superficie celular y luego ingresa en las fosas recubiertas en las células, conocidas como vesículas endocíticas. Estas vesículas se acidifican con rapidez y exponen los residuos hidrófobos que probablemente ayuden a las toxinas a insertarse en las membranas. Desde este sitio las toxinas ingresan en el citoplasma como fragmentos con actividad enzimática que inactivan al EF-2. El órgano blanco de la exotoxina A es el hígado. Es sintetizada de forma intracelular.

✓ **Elastasa**

Esta enzima puede ser responsable de las lesiones cutáneas hemorrágicas que se ven en algunos pacientes, también desempeña un papel importante en las infecciones corneales aumenta los efectos de la exotoxina A en las infecciones pulmonares.

✓ **Exoenzima S**

Es una segunda ADP-ribosil transferasa y el blanco de la exoenzima S no es el factor de elongación sino más bien una o más proteínas en las células eucarióticas; está situada en la superficie de la bacteria y actúa como una adhesina para los glicoesfingolípidos. Produce necrosis pulmonar, invasividad, y diseminación hemática.

e) **Prueba diagnóstica de laboratorio⁽⁹⁾**

✓ **Muestras:** Orina, secreción.

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

✓ **Sensibilidad en medios de cultivo:**

- **Agar Mac Conkey:** Se van a presentar colonias redondas, incoloras por no utilización de la lactosa.
- **Agar Cetrimide:** Se observara colonias redondas, lisas, de bordes regulares, producción de pigmentos verdes (pioverdina)

✓ **Pruebas de diferenciación Bioquímica:**

- **Oxidasa:** La prueba de oxidasa es positiva para la *Pseudomona aeruginosa*.
- **Triple azúcar Hierro (TSI):** Al haber el consumo de los tres azúcares presentes en este medio va ocasionar Pico alcalino/fondo alcalina, no hay fermentación de azúcares (K/K).
- **Citrato de Simmons:** Se observara una coloración verde lo que indica que no hay consumo o utilización de citrato como fuente de carbono por lo tanto la prueba es negativa.

f) Tratamiento

P. aeruginosa es naturalmente resistente a una gran cantidad de diferentes familias de antibióticos. Los antibióticos que han mostrado actividad contra *P. aeruginosa* incluyen aminoglicósidos, Quinolonas, Cefalosporinas, ureidopenicilinas, carbapenem, polimixinas y monobactams.

Estos antibióticos deben aplicarse siempre por inyección, con la excepción de las fluoroquinolonas. Por esta razón, en algunos hospitales, la fluoroquinolona está severamente restringida para evitar el desarrollo de cepas resistentes de *P. aeruginosa*. El monitoreo terapéutico (TDM por sus siglas en inglés: TherapeuticDrugMonitoring) de los aminoglucósidos (por ej. amikacina y gentamicina) puede ser una herramienta importante para individualizar, y así optimizar, los tratamientos farmacológicos.⁽⁴⁾

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

4. LUGAR DE REALIZACION

La parte experimental del presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Análisis Clínico de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

5. MATERIALES

5.1 Material Biológico:

A. *Rivina humilis* L. (Flor blanca)

En el presente trabajo se empleó 4Kg de flor seca de *Rivina humilis* L. (Flor blanca) recolectadas durante los meses de Enero y Febrero en la provincia de Puerto Maldonado, del departamento de Madre de Dios, y desecada en un lugar seco y oscuro.

B. Cepas Utilizadas

Las cepas aisladas en estudio *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron adquiridas del laboratorio de análisis clínico “SERSALUD” de la ciudad de Cusco y del laboratorio de Análisis Clínico de la Universidad Católica de Santa María.

5.2 MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPO Y REACTIVOS

5.2.1 Material de vidrio

- ✓ Baguetas
- ✓ Balón de base plana de 250mL
- ✓ Cubeta de vidrio para cromatografía
- ✓ Embudo
- ✓ Frascos de color ámbar 100mL
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 100 y 250mL
- ✓ Laminas cubre objetivos
- ✓ Laminas porta objetos
- ✓ Pipeta de 0.1mL, 1mL, 2mL, 5mL, 10mL.
- ✓ Pipeta Pasteur
- ✓ Placas petri 60 x 15 mm y 100 x 15 mm
- ✓ Probetas de 50mL y 100mL
- ✓ Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- ✓ Vasos de precipitado 50mL, 100mL y 250mL.

5.2.2 Equipos de Laboratorio

- ✓ Autoclave J.P.Selecta
- ✓ Baño María modelo Masson
- ✓ Bomba de aire Cimatec S.A.C
- ✓ Cocina eléctrica J.P.Selecta
- ✓ Estufa J.P.Selecta
- ✓ Horno J.P.Selecta
- ✓ Lámpara de luz Ultravioleta
- ✓ Mechero
- ✓ Micropipeta 1000, 50 y 10 μ l transferpette
- ✓ Microscopio binocular Primo Star Zeiss
- ✓ Refrigeradora Philips
- ✓ Balanza Pioneer

5.2.3 Otros

- ✓ Agujas Hipodérmicas
- ✓ Algodón
- ✓ Asa de Kolle
- ✓ Barbijo
- ✓ Campos estériles
- ✓ Capilares
- ✓ Espátula
- ✓ Gasa
- ✓ Gradilla para tubos de ensayo
- ✓ Guantes quirúrgicos
- ✓ Jeringas de 5ml
- ✓ Mortero
- ✓ Papel filtro
- ✓ Papel Kraft
- ✓ Pinzas metálicas
- ✓ Pita
- ✓ Potes de plástico
- ✓ Puntas para micropipeta
- ✓ Trípode

5.2.4 Reactivos

- ✓ Acetato de etilo
- ✓ Acido acético
- ✓ Acido Sulfúrico al 5%
- ✓ Agua destilada
- ✓ Cloruro Férrico al 5%
- ✓ Etanol 96%
- ✓ Hexano
- ✓ Metanol
- ✓ Peróxido de hidrogeno

- ✓ Reactivo de Kovacs
- ✓ Tolueno
- ✓ Tween 80
- ✓ Vainillina

Batería para coloración de Gram

- ✓ Alcohol acetona
- ✓ Cristal violeta
- ✓ Lugol
- ✓ Safranina

5.2.5 Medios de Cultivo

- ✓ Agar Citrato de Simmons
- ✓ Agar Mac Conkey
- ✓ Agar Manitol Salado
- ✓ Agar Lisina Hierro (LIA)
- ✓ Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)
- ✓ Caldo Peptonado
- ✓ Agar Mueller Hinton

6. METODOS

6.1 Recolección y acondicionamiento de la planta

6.1.1 Recolección

La especie en estudio fue recolectada en el mes de Enero y Febrero en la provincia de Puerto Maldonado, departamento de Madre de Dios en el año 2012. Se identifica la planta, se selecciona y se separan las impurezas (ramas secas, tierra, otras plantas, etc).

6.1.2 Secado

Una vez recolectadas las flores fueron trasladadas a un ambiente ventilado y sin luz directa para su desecación por un espacio de 4 semanas.

6.1.3 Embalaje

Posteriormente se procedió al embalaje del material vegetal para su transporte a la ciudad de Arequipa se acondicionaron cajas de cartón forradas interiormente con tecknoport.

6.1.4 Molienda

Las flores secas se pulverizaron en un mortero (previamente lavado y desinfectado con alcohol) hasta la obtención de partículas uniformes precediéndose luego a guardar el producto obtenido en un frasco seco bien rotulado y cerrado hasta su posterior uso.

6.2 Obtención de los extractos

Fundamento

En el presente estudio se aplicó el método extractivo a partir de la droga, utilizando el método de extracción por maceración en el cual se sumerge el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar.

Se utilizan de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efecto la

temperatura. Sin embargo se necesitan periodos de tiempo extensos (12 – 16 días) para lograr una extracción adecuada.

Procedimiento

Los extractos se obtuvieron con los siguientes solventes: Hexano, acetato de etilo y etanol, dicho solvente se seleccionaron por sus polaridades variables teniendo así al hexano como no polar, acetato de etilo medianamente polar y etanol como el más polar.

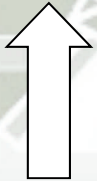
SOLVENTE	POLARIDAD	CONSTANTE DIELECTRICA
Etanol		24.3
Acetato de Etilo		6.0
Hexano		1.9

TABLA N°1 Solventes utilizados para las diferentes extracciones de acuerdo a su polaridad.

FUENTE: Lab. Tools. Tables for laboratory use Merck. ⁽¹⁵⁾

6.2.1 Método de Maceración

3.2.1.1 Procedimiento

Se procedió a pesar 22g de material vegetal ya pulverizado se procedió a poner a en un recipiente de 2 litros de capacidad, se utilizo disolvente (etanol o acetato de etilo o hexano) lo suficiente para poder cubrir el materia vegetal, se dejo en

reposo la muestra durante 15 días, se recupero el extracto y por último se realizo la concentración del extracto.

6.3 Determinación del rendimiento de la extracción

Método: Gravimétrico

Fundamento

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

Procedimiento

Se coloco el extracto en un vaso de precipitado previamente tarado y se llevo a Baño María hasta peso constante, para finalmente pesarlo y determinar su porcentaje de rendimiento por diferencia y usarlo en pruebas posteriores.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{(Pr - Pb)}{Pm} \times 100$$

Donde:

Pr= Peso de beaker mas extracto.

Pb= Peso del beaker.

Pm= Peso de la muestra de la planta.

6.4 Procesamiento de las cepas en estudio

El presente trabajo de investigación se desarrollo utilizando bacterias patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

6.4.1 Identificación de *Staphylococcus aureus*

Obteniendo las bacterias patógenas se procedió a verificar las cepas a través de diferentes pruebas microbiológicas específicas para dicho microorganismo.

a) Tinción Gram(Ver Anexo 1)

Procedimiento ⁽⁹⁾

- ✓ Colocar una gota de suero fisiológico y una colonia de la bacteria, disgregue suavemente sobre una lamina porta objeto limpia.
- ✓ Dejar secar a temperatura ambiente o pasando por la llama suavemente para obtener la fijación del frotis, con la finalidad que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- ✓ Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- ✓ Luego de un minuto de exposición al cristal violeta, lavar bien con agua de caño.
- ✓ Cubrir el preparado con Iodo de Gram durante un minuto. Lavar con agua de caño.
- ✓ Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas del decolorante alcohol-acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Se requiere unos diez segundos más o menos.
- ✓ Cubrir la superficie con la safranina durante un minuto. Lavar con agua de caño.

- ✓ Secar al aire, a temperatura ambiente.
- ✓ Observar al microscopio con lente de inmersión (100X) y con aceite de inmersión.

Se observa al microscopio cocos Gram positivos, se encuentran aislados en forma de racimos, pares o cadenas.(Ver Fig. N°9)

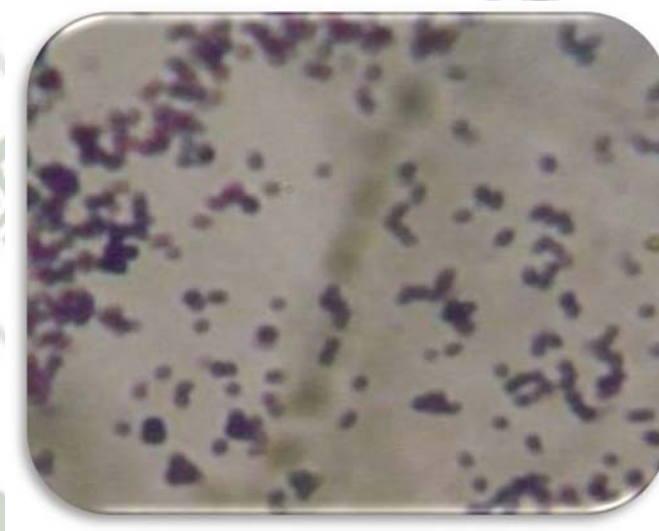


Figura N° 9: Presencia de cocos Gram positivo a 100X

b) Prueba de catalasa(Ver Anexo 2)

Procedimiento

- ✓ Con un asa de Kolle en punta colocar en el centro de la lámina porta objeto la colonia a investigar.
- ✓ Posteriormente agregar 1 a 2 gotas de peróxido de hidrogeno.

- ✓ Suspende el organismo y observa si hay la aparición de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno.

La prueba es positiva cuando hay una rápida aparición de burbujas de gas o efervescencia. (Ver Fig. N°10)



Figura N° 10: Prueba de la catalasa para *Staphylococcus aureus*

c) Prueba de la coagulasa en portaobjeto (Ver Anexo 3)

Material: Plasma humano

Procedimiento

- ✓ Con el asa de Kolle en punta colocar en el centro de la placa una colonia a investigar.
- ✓ Agregar 1 o 2 gotas de plasma.
- ✓ Suspende el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado y observar si hay la aparición de grumos.

La formación de grumos en el portaobjeto nos indica que la reacción es positiva (Ver Fig. N°11).



Figura N° 11: Prueba de la coagulasa para *Staphylococcus aureus*

d) Agar Manitol Salado(Ver Anexo 4)

Procedimiento

- ✓ Se siembra la muestra de *Staphylococcus aureus* en agar Manitol Salado por agotamiento en estría en placa.
- ✓ Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.
- ✓ Manitol positivo fermentador, se produce cambio de coloración del medio a amarillo por la producción de ácido.
Manitol negativo no fermentador, el medio permanece de color rojo.

En el caso de la bacteria estudiada nos dio manitol positivo (Ver Fig. N°12).



Figura N° 12: *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado

TABLA N°2

Resultados esperados para *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en forma de racimo
Prueba de la catalasa	Positivo
Prueba de la coagulasa	Positivo
Manitol Salado	Fermentación de manitol

Fuente: Elaboración propia

6.4.2 Identificación de *Escherichia coli*

En el medio Mac Conkey fue elegido para la conservación y selectividad de la *Escherichia coli*.

Picar una colonia aislada con la aguja de Kolle, sembrar en los medios de diferenciación bioquímica, TSI, LIA, SIM, Caldo MRVP, agar Citrato de Simmons. Incubar los tubos a 37°C durante 24 horas. Luego se procederá a interpretar y a realizar la respectiva identificación bioquímica.⁽²⁵⁾

a) Agar Mac Conkey (Ver Anexo 5)

Procedimiento

- ✓ Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida del laboratorio clínico SERSALUD del a ciudad de Cusco en agar Mac Conkey en placa y se siembra por agotamiento en zigzag.
- ✓ Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.
- ✓ Las colonias se perciben de color rosado que indican que las bacteria *Escherichia coli* es fermentadora de lactosa (Ver Fig. 13)
- ✓ Produce acido debido a que degrada la lactosa ocasionando el viraje del indicador rojo neutro a un color rosáceo.



Figura N° 13: *Escherichia coli* en agar Mac Conkey

b) Triple Azúcar Hierro (TSI)(Ver Anexo 6)

Procedimiento

✓ Se siembra la muestra de *Escherichia coli* en agar TSI (pico – fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.

✓ Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.

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

✓ **A/A + - :** Lactosa (+)
Sacarosa (+)
Glucosa (+)
CO₂ (+)
H₂S (-)



Figura N° 14: *Escherichia coli* en TSI (A/A + -)

c) Agar Lisina Hierro (LIA)(Ver Anexo 7)

Procedimiento

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

En el caso de la *Escherichia coli* encontramos que en el presente medio nos debe dar K/K-; (Ver Fig. 15). Al producir la descarboxilación de la Lisina produciéndose cadaverina el indicador Purpura de Bromocresol va a retornar a su color purpura lo que se interpreta como lisina positiva.

✓ K/K - :	Lisina	(+)
	Descarboxilación	(+)
	Desaminación	(-)
	H ₂ S	(-)



Figura N° 15: *Escherichia coli* en LIA

d) Caldo peptonado (INDOL)(Ver Anexo 8)

Procedimiento

- ✓ Se carga el asa de Kolle con la muestra de *Escherichia coli* obtenida y se le agrega al caldo peptonado agitándola.
- ✓ Se deja en la estufa a 37°C por 24 horas.
- ✓ Luego de la incubación se agrega una gota del reactivo de Kovacs.

La aparición de un anillo de color rojo nos dio INDOL positivo para todas. (Ver Fig. 16)



Figura N° 16: Prueba de INDOL para *Escherichia coli*

e) Prueba de Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM–VP)(Ver Anexo 9)

Procedimiento

- ✓ Inocular el caldo MR-VP e incubar por 48 horas a 37°C.
- ✓ Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1mL de caldo para Voges Proskauer.
- ✓ En el caldo restante revelar rojo de metilo, agregando 4 o 8 gotas del indicador rojo de metilo.
- ✓ Para revelar Voges Proskauer agregar 10 gotas de α -naftol al 5% y una gota de KOH al 5%.
- ✓ Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15min.

La prueba Voges – Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo – fucsia de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína. Que para nuestro caso fue negativo presentando una coloración amarilla. (Ver Fig. 16)

La prueba rojo de metilo es positiva si se observa un color rojo estable, esto indica que la producción de ácido es suficientemente fuerte para producir el viraje del indicador, lo que significa que el microorganismo fermenta la glucosa por la vía de ácido-mixta.

Dándonos en nuestro caso rojo de metilo positivo (Ver Fig. 17).

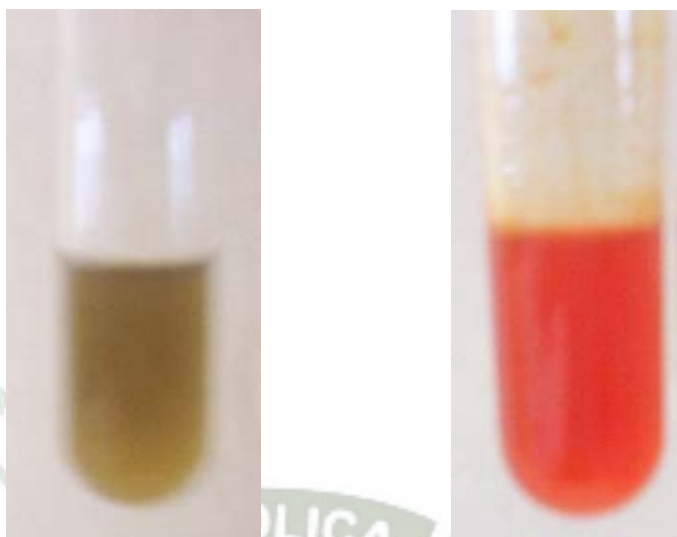


Figura N° 17: VP (-) Y RM (+) para *Escherichia coli*

f) Agar Citrato de Simmons(Ver Anexo 10)

Procedimiento

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

La prueba es positiva (+) cuando el medio cambia de un color verde a un color azul, por alcalinización del medio lo cual produjo un viraje del indicador azul de bromotimol.

En el caso de las cepas estudiadas nos dio Citrato de Simmons Negativo (Ver Fig. 18)



Figura N° 18: *Escherichia coli* en Agar Citrato de Simmons

TABLA N° 3

Resultados esperados para las cepas de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	
Coloración Gram	Bacilo Gram negativo
Agar Mac Conkey	Colonias rojas, fermentadoras de la lactosa
Triple Azúcar Hierro (TSI)	A/A + -
Agar Lisina Hierro (LIA)	K/K -
Caldo peptonado (INDOL)	Positivo
Prueba de Rojo de Metilo – VogesProskauer	RM (+) VP (-)
Agar Citrato de Simmons	Negativo

6.4.3 *Pseudomona aeruginosa*

a) Tinción Gram (Ver anexo 1)

Al observar al microscopio va a presentar una coloración roja el cual nos indica que es negativo a la tinción de Gram; se van a observar bacilos medianos y rectos. (Ver Fig. N°19)



Figura N° 19: *Pseudomona aeruginosa* bacilo Gram negativo

b) Prueba de la oxidasa (Ver Anexo 17)

Procedimiento

- ✓ Se realiza en un trocito de papel de filtro, de forma que colocamos una gota del reactivo de Kovacs en el papel.
- ✓ Se tomo una muestra de colonia de *Pseudomona aeruginosa* asa de siembra, que frotaremos sobre el papel.

El resultado será positivo se produce una reacción de color a los pocos segundos. (Ver Fig. 20)



Figura N° 20: Oxidasa para *Pseudomona aeruginosa*

c) Agar Mac Conkey (Ver Anexo 5)

Procedimiento

- ✓ Se siembra la muestra de *Pseudomona aeruginosa* obtenida del laboratorio clínico SERSALUD del a ciudad de Cusco en agar Mac Conkey en placa y se siembra por agotamiento en zigzag..
- ✓ Se deja en la estufa a 42°C por 24 – 48 horas.⁽⁴⁰⁾

- ✓ La *Pseudomona aeruginosa* no es fermentadora de lactosa (Ver Fig. 21)



Figura N° 21: *Pseudomona aeruginosa* en agar Mac Conkey

TABLA N° 4

Resultados esperados para las cepas de *Pseudomona aeruginosa*

<i>Pseudomona aeruginosa</i>	
Coloración Gram	Bacilos Gram negativo
Oxidasa	Positiva
Agar Mac Conkey	No fermentadora de lactosa, olor a uvas.

6.5 Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro

Para la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro, se procedió de la siguiente manera.

6.5.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Es definida como la menor concentración del antibiótico que inhibe el desarrollo in vitro de los microorganismos.

Método: Dilución en tubo.

Fundamento

La prueba por dilución en caldo consiste en atacar el microorganismo de interés con agentes antimicrobianos en un medio líquido (caldo de cultivo). Cada agente antimicrobiano se prueba en un rango de concentraciones, el rango de concentraciones es probado para cada antimicrobiano.

Se determinará cuál es el tubo que no se aprecia turbidez por lo tanto nos dará la concentración mínima de la sustancia que se requiere para no producir el desarrollo de microorganismo, 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 placa.

Preparación del inóculo

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

- ✓ Seleccionar 4 o 5 colonias de las bacterias en estudio.
- ✓ Tocar la superficie de cada colonia con una asa de siembra y transferir a un tubo que contenga 4 a 5 mL de caldo peptonado (Ver Anexo 11) para el caso de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ Ajustar la turbidez del inóculo con caldo peptonado hasta obtener la turbidez equivalente al tubo 0.5 de la Escala de Mac Farland la que equivale a 10^8

UFC/mL(Ver Anexo 13) Para realizar este paso correctamente se debe usar luz apropiada y colocar los tubos contra un fondo con líneas negras como contraste.

✓ Luego se procedió a diluir el inóculo hasta 10^6 UFC/mL, será con esta concentración con la que se realizó las pruebas.

Procedimiento:

✓ Una vez elegido el extracto que mostro mayor porcentaje de rendimiento, se procedió a realizar las diluciones, según el microorganismo en estudio teniendo así para:

- *Staphylococcus aureus* una dilución de 20mg/mL
- *Escherichia coli* una dilución de 20mg/mL
- *Pseudomona aeruginosa* una dilución de 20mg/mL y 100mg/mL

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

✓ A cada tubo se le agrega 1000µl de inóculo 10^6 UFC/mL.

✓ Se agrega caldo peptonado a cada tubo cada tubo los mililitros necesarios para cada concentración final.

✓ Luego se procedió a incubar por 24 horas para exponer a los microorganismos en estudio con el extracto.

6.5.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Sembrar por estría en las placas las diluciones preparadas el día anterior para poder observar si hay o no crecimiento bacteriano. Para lo cual se preparo:

✓ Agar Mueller Hinton(Ver Anexo 12)

A partir de los medios de cultivo liofilizados de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Autoclavar, dejar a enfriar y luego proceder a plaquear las respectivas placas a utilizar, una vez que el medio adquirió la consistencia adecuada se procedió a sembrar las diluciones respectivas, se dejó incubar por 24 horas para luego poder observar la inhibición o crecimiento microbiano.

6.6 Análisis Fitoquímico en Cromatografía de Capa Fina (CCF)

6.6.1 Preparación de la fase móvil

Mezclar en la cuba de cromatografía los solventes elegidos en las proporciones indicadas (para la respectiva identificación). Tapar la cuba y dejar en reposo.

6.6.2 Preparación de la placa cromatografía

La fase estacionaria (F.E) empleada consistió en cromatofolios de silica gel con base de aluminio, cortadas en un tamaño de 10 x 5 cm, se trazo una línea a 1cm del borde inferior; al que se le aplico el extracto etanólico a una concentración de 1mg/mL y se aplicaron sobre la línea en banda con capilares, se dejó una distancia de 1 cm entre cada extracto

Dejar secar y posteriormente colocar la placa en la cuba con la fase móvil.

6.6.3 Desarrollo cromatográfico

Luego se colocaron en una cámara que se preparo 30 minutos antes para obtener una buena saturación del medio; se utilizo 5mL de la fase móvil (F.M.) cubriendo el fondo hasta 0.3 cm de altura, se desarrollo el cromatograma hasta que la fase móvil llego a 1cm del extremo superior de la placa, para luego retirarlas y dejarlas secas durante 30 minutos y se observo a la luz 254 nm, delimitando las zonas donde se pudieron visualizar los componentes del extracto.⁽³⁶⁾

6.6.4 Revelado

Pulverizar la placa con sus respectivos reveladores y someterla a 100°C durante 5 minutos.

6.6.5 Interpretación

Identificación de compuesto en general: Terpenos, Flavonoides alcaloides y taninos.

6.6.6 Identificación de Componentes

a) IDENTIFICACION GENERAL

✓ **Fase Móvil:** Acetato de etilo:Metanol:Agua (70:20:10)

✓ **Reactivos Reveladores:**

- Sol A: Acido sulfúrico al 5% en etanol absoluto
- Sol B: Vainillina al 1% en etanol absoluto

✓ **Fase Estacionaria:** Placa de silica gel con marcador de de fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm.

✓ **Revelador:** Luz UV 254 nm

b) IDENTIFICACION DE TERPENOS.

✓ **Fase Móvil:** Tolueno. Acetato de Etilo (90:10)

✓ **Reactivos Reveladores:**

- Sol A: Acido sulfúrico al 5% en etanol absoluto
- Sol B: Vainillina al 1% en etanol absoluto

✓ **Revelador:** Luz UV 254 nm⁽²⁶⁾

c) **IDENTIFICACION DE TANINOS**

✓ **Fase Móvil:** Metanol:Agua (90:10)

✓ **Reactivos Reveladores:** Cloruro Férrico al 5% en agua.

d) **IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES**

✓ **Fase Móvil:** Acetato de Etilo: Acido Acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:22)

✓ **Reactivo Revelador:** Cloruro de Aluminio al 5% en etanol

✓ **Revelador:** Luz UV 254 nm

6.6.7 Factor de Referencia (Rf)

Es un número que permite identificar sustancias considerando las distancias recorridas en un cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene un Rf único y específico, por medio del cual se les identifica.

$$Rf = \frac{Ds}{Df}$$

Donde:

Ds: Distancia recorrida por la sustancia

Df: Distancia recorrida por la fase móvil

6.7 Análisis Estadístico

Para el ordenamiento, interpretaciones y análisis estadístico de los datos en estudio se utilizó el software Statgraphics y Excel, para lo cual se utilizaron los siguientes instrumentos estadísticos.

6.7.1 Medida de Tendencia Central⁽²⁸⁾

a) Promedio (X):

$$X = \frac{\sum xi}{n}$$

Donde:

$\sum xi$: Sumatoria de cada observación

N: Numero total de observaciones

6.7.2 Media de dispersión:

a) Desviación estándares (DS)

$$Ds = \sqrt{\frac{\sum xi - \frac{(\sum xi)^2}{n}}{n - 1}}$$

6.7.3 ANOVA (Análisis de Varianza)

Este es una prueba de significancia, la cual tiene como objetivo demostrar estadísticamente si el efecto hallado al aplicar los tratamientos es debido a los mismos o a causas fuera de los tratamientos.

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

F de V: Fuente de variabilidad

GL: Gr

F de V: Fuente de variabilidad

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrado medio

FC: Prueba de F

- La significancia se interpreta basándose en:

$P < 0.01$ = Diferencia altamente significativa

$P < 0.05$ = Diferencia significativa

$p > 0.05$ = Diferencia no significativa

6.7.4 Prueba de especificidad: Test de Tuckey

Prueba de especificidad, se aplica una vez obteniendo los resultados del análisis de varianza ANOVA, es decir si en el análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes tratamientos, se procederá a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente mas específico, de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA no será necesario realizar el test de Tukey.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente trabajo de investigación se estudio el efecto antibacteriano de la planta *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca), una vez obtenida la muestra se procedió a hacer extractos con diversos solventes de diferentes polaridades los cuales fueron etanol (polar), acetato de etilo (medianamente polar) y hexano (no polar).

Estas extracciones se llevaron a cabo por el método de Maceración, colocando 22g de la muestra en un recipiente de 2 litros con cada uno de los solventes extrayendo la muestra. Posteriormente los extractos obtenidos fueron llevados al rotavapor (Ver Fig. N° 22), al observarse que los extractos obtenidos después de la evaporación del solvente eran blandos, se decide terminar de evaporar los solventes a Temperatura 20°C por 10 días, así obteniendo extracto seco.

Después de obtener los extractos secos se procedió a realizar los cálculos para la determinación de sus respectivos rendimientos.



Figura: N° 22: Evaporación del extracto de *Rivina Humilis L.* por medio del Rotavapor

6. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

Para evaluar el rendimiento de los diferentes extractos se realizó la prueba por cinco repeticiones. Teniendo como resultados:

Cuadro N°1
DETERMINACION CON EL RENDIMIENTO PROMEDIO DE
EXTRACCION DE LAS FLORES DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca)
EMPLEANDO DIFERENTES SOLVENTES

Numero de extracciones	Extracto etanólico	Extracto de Acetato de etilo	Extracto Hexánico
Rep 1	2.80	1.53	0.86
Rep 2	2.81	1.52	0.89
Rep 3	2.79	1.40	0.87
Rep 4	2.82	1.53	0.85
Rep 5	2.81	1.52	0.86
Promedio	2.81	1.50	0.87

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°1 podemos observar que el extracto etanólico es el que posee mayor rendimiento frente a los otros extractos.

Cuadro N°2
DETERMINACION CON EL RENDIMIENTO PROMEDIO DE
EXTRACCION DE LAS FLORES DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca)
EMPLEANDO DIFERENTES SOLVENTES

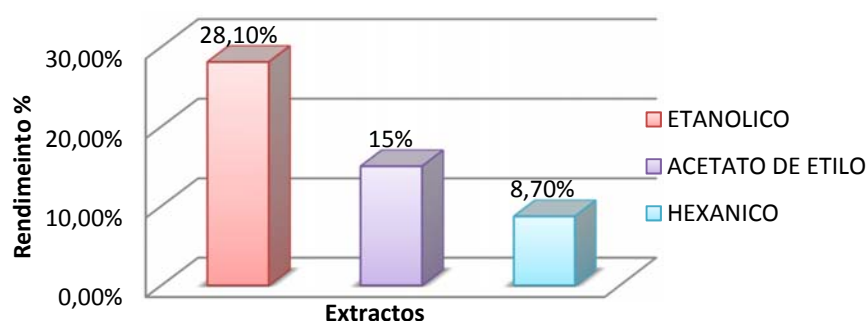
Numero de extracciones	Extracto etanólico	Extracto de Acetato de etilo	Extracto Hexánico
Rep 1	28.00	15.30	8.60
Rep 2	28.10	15.20	8.90
Rep 3	27.90	15.40	8.70
Rep 4	28.20	15.30	8.50
Rep 5	28.10	15.20	8.60
Promedio %	28.10	15.00	8.70
S	+0.11	+0.08	+0.15
DSR	0.12	0.08	0.15

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que el porcentaje de rendimiento del extracto etanólico es el más elevado teniendo así 28.10% de rendimiento, siguiéndolo el extracto de acetato de etilo con un rendimiento de 15.32 % y por último el extracto hexánico con un rendimiento de 8.63%. Estos resultados se observan en el cuadro N°2 y N°3.

Cuadro N°3

**PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION DE LAS FLORES DE
Rivina Humilis L. (Flor Blanca) EMPLEANDO DIFERENTES SOLVENTES**



Al comparar el porcentaje de rendimiento de los extractos etanolico, acetato de etilo y hexanico de la *Rivina humilis L.* (Flor Blanca) con el porcentaje de rendimiento del *Piper elongatum* (Matico Matico) le dio para etanol 69.22%, acetato de etilo 52.26% y Hexanico 48.06%⁽³³⁾ observándose que da un mayor porcentaje pero que al igual que este trabajo da un mayor rendimiento para el extracto etanolico seguido por el acetato de etilo y finalmente por el hexanico esto debe ser probablemente por la polaridad de cada solvente.

Después de haber obtenido dichos extractos, se procedió a elegir el de mayor rendimiento para dicha investigación que es el extracto etanólico con 28.10%, esto puede ser debido a que el etanol es un solvente mas polar en comparación con el acetato de etilo y hexano.⁽¹²⁾

**7. DETERMINACION DEL EFECTO ANTIMICROBIANO CON EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) EN LAS DIFERENTES
CEPAS ESTUDIADAS.**

Para la determinación del efecto antimicrobiano se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* que fueron re identificadas para mayor seguridad ya que estas fueron facilitadas por el laboratorio clínico SERSALUD

de la ciudad Cusco y del laboratorio de análisis clínicos de la Universidad Católica Santa María – Arequipa.

Para esta evaluación se empleo el método de dilución en tubo para poder observar la inhibición que va a presentar cada dilución, de esta forma se trabajo con tres bacterias de diferentes procedencias para cada una de ellas.

7.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de *Rivina humilis* L. (Flor blanca) frente a *Staphylococcus aureus*.

Se trabajo con tres cepas de diferentes procedencia de *Staphylococcus aureus*, empleando mismas concentraciones para las tres cepas. Se empezó con una concentración de 100 mg/mL teniendo como resultado un inhibición total del microorganismo, se decidió entonces disminuir la concentración a 20 mg/mL obteniendo los siguientes resultados que se muestra en el cuadro N°4.

También se trabajo con soluciones blanco con Tween 80 para comprobar que este no inhiba el crecimiento bacteriano, además se sembró el inóculo equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland equivalente a 10^8 UFC/mL en el mismo medio de cultivo en las que fueron sembradas las diluciones para comprobar que el inóculo con los microorganismos estaban en optimo condiciones de crecimiento y a la vez que el medio de cultivo era adecuado para su desarrollo.

Cuadro N°4

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA
(CIM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor
Blanca) FRENTE A *Staphylococcus aureus*.**

Tubos Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 20mg/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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
S. aureus-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S. aureus-2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S. aureus-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

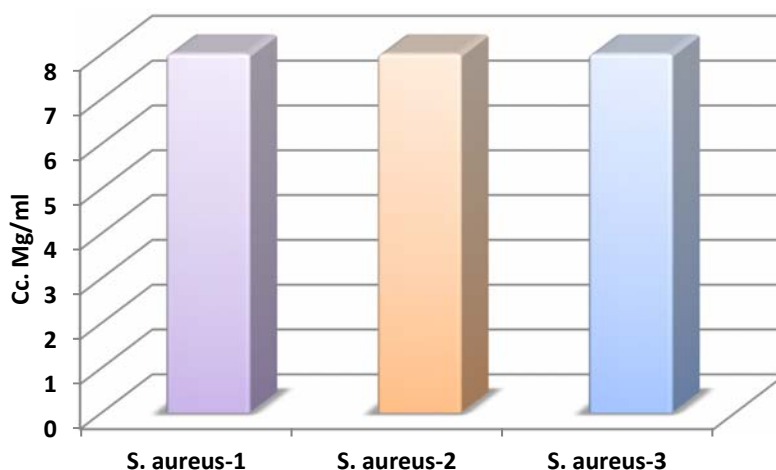
Donde:

+: Tubo con crecimiento Bacteriano

-:Tubo sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°5

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
INHIBITORIA MINIMA (CIM) CON EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) FRENTE
A *Staphylococcus aureus*.**



Al observar los tubos con las diluciones del extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) a concentración de 20mg/ml, en las tres cepas de diferentes procedencia de *Staphylococcus aureus*, presento una concentración inhibitoria mínima de 8mg/ml como se muestra en el cuadro N°4 y N°5

7.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de *Rivina humilis l.* (Flor blanca) frente a *Escherichia coli*.

Para la determinación la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de *Rivina humilis l.* (Flor blanca) se hizo diluciones de 20mg/ml frente a tres cepas de diferentes procedencias de *Escherichia coli*; para observar su crecimiento a las 24 horas.

Para dicha prueba se trabajo con cepas de *Escherichia coli* y se trabajo con el blanco de Tween 80 para demostrar que este no era el responsable de dicho efecto; además se sembró el inóculo utilizado en las diferentes diluciones para asegurarnos que

nuestro medio de cultivo era el adecuado para el crecimiento de los microorganismos en estudio y se eviten así falsos positivos en nuestros resultados.

Cuadro N°6
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA
(CIM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor
Blanca) FRENTE A *Escherichia coli*.

Tubos Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 20 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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
E. coli-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E.coli-2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E.coli-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

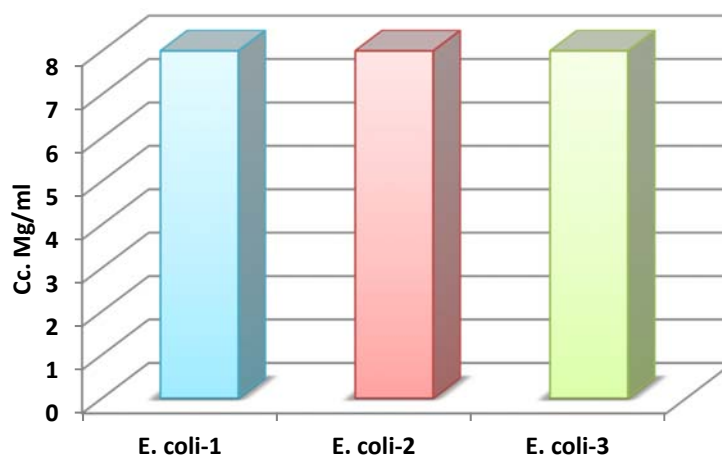
Donde:

+: Tubo con crecimiento Bacteriano

-:Tubo sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°7

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
INHIBITORIA MINIMA (CIM) CON EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca)
FRENTE A *Escherichia coli*.**



Al observar los tubos con las diluciones del extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) a concentración de 20mg/ml, en las tres cepas de diferente procedencia de la *Escherichia coli*, presento una concentración inhibitoria mínima de 8mg/ml como se muestra en el cuadro N°6 y N°7.

7.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de *Rivina humilis l.* (Flor blanca) frente a la *Pseudomona aeruginosa*.

Dicha evaluación preliminar se realizó por el método de dilución en tubo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el extracto etanólico de *Rivina humilis l.* (Flor blanca) frente a tres cepas de diferente procedencia de la *Pseudomona aeruginosa*, fueron observadas a las 24 horas de incubación.

Como en las diferentes pruebas anteriormente ya realizadas se sembró un blanco de Tween con el inóculo de la bacteria, para observar que el Tween 80 no inhibe el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*. A la vez se sembró el inóculo utilizado

en el mismo medio de las diluciones para demostrar que el caldo y el medio de cultivo empleados se encontraba en optimas condiciones para que nuestras cepas en estudio se desarrollen adecuadamente.

Cuadro N°8
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA
(CIM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO (20mg/ml) DE *Rivina Humilis L.*
(Flor Blanca) FRENTE A LA *Pseudomona aeruginosa*

Tubos Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 20 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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
P. aeruginosa-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

Donde:

+: Tubo con crecimiento Bacteriano

-:Tubo sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°9
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA
(CIM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO (100mg/ml) DE *Rivina Humilis*
L. (Flor Blanca) FRENTE A LA *Pseudomona aeruginosa*

Tubos Características	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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
P. aeruginosa-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
P. aeruginosa-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

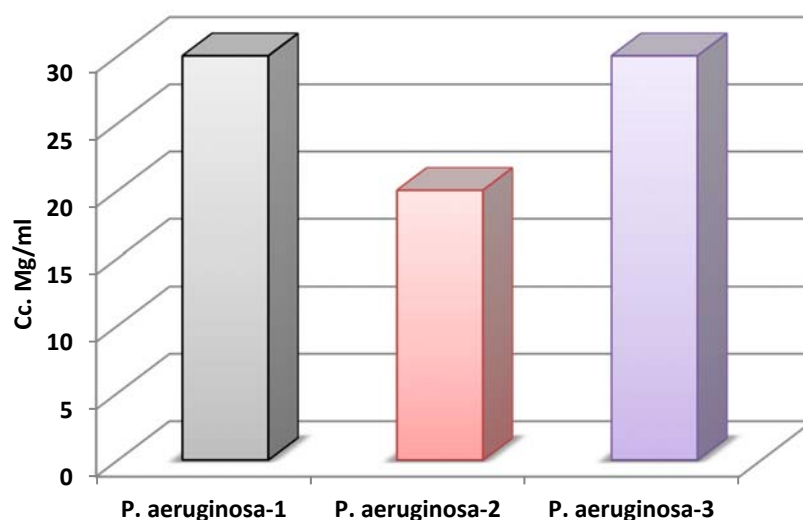
Donde:

+: Tubo con crecimiento Bacteriano

-:Tubo sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°10

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
INHIBITORIA MINIMA (CIM) CON EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Rivina Humilis* L. (Flor Blanca) FRENTE
A LA *Pseudomona aeruginosa***



Al observar los tubos con las diluciones del extracto etanólico de *Rivina Humilis* L. (Flor Blanca) a una concentración de 20 mg/ml se observó que en los 10 tubos hubo crecimiento, por lo que se tuvo que aumentar la concentración a 100mg/ml, en la P. aeruginosa 1 y P.aeruginosa 3 presentó una concentración inhibitoria mínima de 30mg/ml, mientras que el la P. aeruginosa 2 presentó una concentración inhibitoria mínima de 20mg/ml como se muestra en el cuadro N°9 y N°10.

7.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con el Tween 80 como el blanco.

Cuadro N°11

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) CON EL TWEEN 80 COMO EL BLANCO.

Tubos Características	Blanco
Extracto	0
Caldo (ml)	0.6
Inoculo 10⁶(ml)	1
Tween 80	0.4
Vol. Final (ml)	2
*Cc. Final (mg/ml)	0
Incubar a 37° C por 24 horas	
Observación de Turbidez	
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+

Para las tres cepas patógenas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* hubo turbidez en los tubos, por lo que se concluyo que el Tween 80 en ningún de las 3 bacterias tiene efecto inhibitorio. Como se muestra en el cuadro N°11.

8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Y *Pseudomona aeruginosa*.

La determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó mediante el método de dilución en tubo respectivamente utilizando como medio de cultivo caldo peptonado, pasadas las 24 horas de incubación las diluciones fueron sembradas en placas con agar Mueller Hinton por agotamiento en estría para observar su crecimiento. La CBM determinada para las cepas patógenas las cuales fueron obtenida del laboratorio clínico SERSALUD – Cusco y el laboratorio de análisis clínico de la Universidad Católica Santa María – Arequipa. A pesar de que estas cepas estén aisladas e identificadas al momento de ser obtenidas para mayor seguridad se decidió realizarles las respectivas pruebas de re identificación.

8.1 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a *Staphylococcus aureus*.

Luego de obtener el extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca), se procedió a determinar la Concentración Bactericida Mínima para las tres *Staphylococcus aureus* de diferente procedencia.

Cuadro N°12

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA
(CBM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor
Blanca) FRENTE A *Staphylococcus aureus*.**

Tubos Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 20 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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
S. aureus-1	T	T	T	T	T	T	T	T	+	-
S. aureus-2	T	T	T	T	T	T	T	T	+	-
S. aureus-3	T	T	T	T	T	T	T	T	+	-

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

Donde:

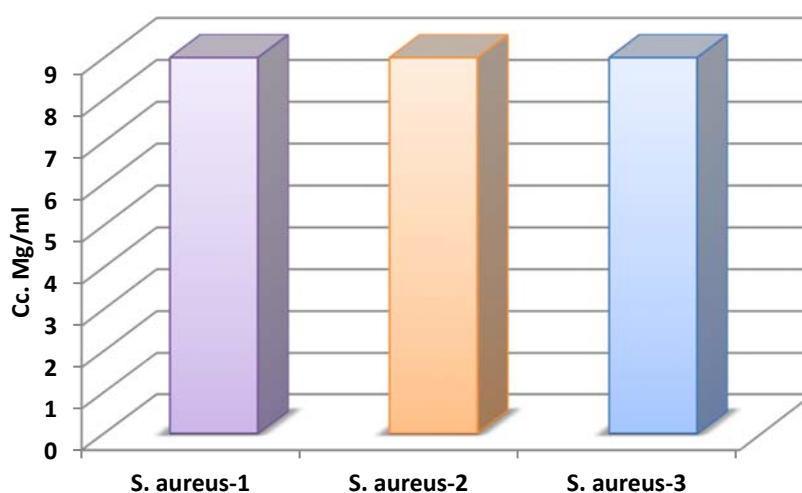
T: Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrada en placas.

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°13

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
BACTERICIDA MINIMA (CBM) CON EL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) FRENTE A
Staphylococcus aureus.**



En la tabla podemos observar que el punto de corte de la placa con crecimiento y el de no crecimiento se encuentra entre la muestra número 9 y la muestra 10; dando como CBM 9 mg/ml para la bacteria en ensayo. Como se observa en el cuadro N°12 y N°13.

8.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a *Escherichia coli*.

Luego de obtener el extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca), se procedió a determinar la Concentración Bactericida Mínima para las tres *Escherichia coli* de diferente procedencia.

Cuadro N°14
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA
(CBM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor
Blanca) FRENTE A *Escherichia coli*.

Tubos Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol 20 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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
E. coli-1	T	T	T	T	T	T	T	T	+	-
E.coli-2	T	T	T	T	T	T	T	T	+	-
E.coli-3	T	T	T	T	T	T	T	T	+	-

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

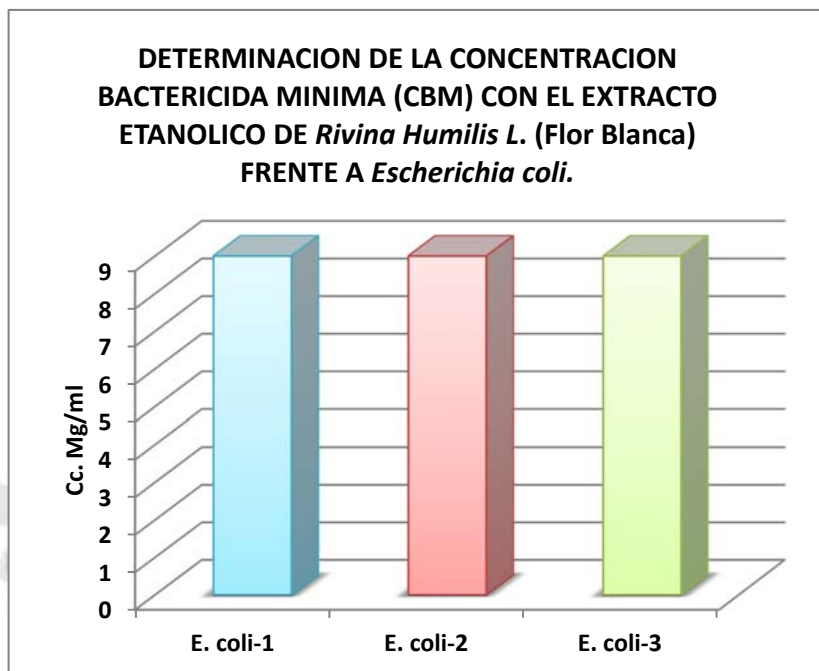
Donde:

T: Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrada en placa.

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°15



En la tabla podemos observar que el punto de corte de la placa con crecimiento y el de no crecimiento se encuentra entre la muestra número 8 y la muestra 9; dando como CBM 9 mg/ml para la bacteria en ensayo. Como se observa en el cuadro N°14 y N°15.

8.3 Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) frente a la *Pseudomona aeruginosa*.

Luego de obtener el extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca), se procedió a determinar la Concentración Bactericida Mínima para las tres *Pseudomona aeruginosa* de diferente procedencia.

Cuadro N°16
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA
(CBM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor
Blanca) FRENTE A LA *Pseudomona aeruginosa*

Tubos Características	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
Inoculo 10⁶(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
*Cc. Final (mg/ml)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Incubar a 37° C por 24 horas										
Observación de Turbidez										
P. aeruginosa-1	T	T	T	T	T	T	+	-	-	-
P. aeruginosa-2	T	T	T	T	+	-	-	-	-	-
P. aeruginosa-3	T	T	T	T	T	T	+	-	-	-

***Cc: Concentración**

Fuente: Elaboración propia

Donde:

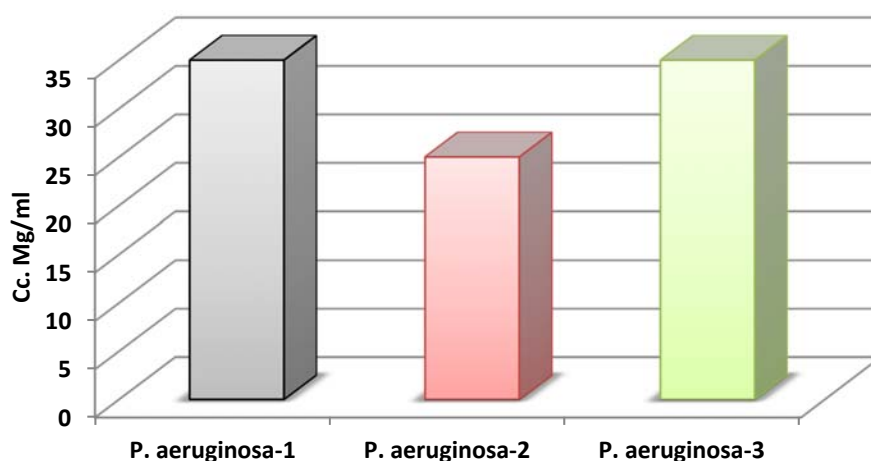
T: Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrada en placa.

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Cuadro N°17

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA
MINIMA (CBM) CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina*
Humilis L. (Flor Blanca) FRENTE A LA *Pseudomona*
*aeruginosa***



En la tabla podemos observar que el punto de corte de la placa con crecimiento y el de no crecimiento se encuentra entre la muestra número 7 y la muestra 8; dando como CBM la concentración de 35mg/ml para la P. aeruginosa 1 y 3; y para la P. aeruginosa 2 su punto de corte se encuentra en la muestra numero 5 y 6 dando como CBM 25mg/ml. Como se observa en el cuadro N° 16 y N°17. Esta diferencia de Concentración Bactericida mínima CBM en los tres tipos de *Pseudomona aeruginosa* puede ser debido a que las bacterias fueron obtenidas de diferentes procedencias y son bacterias con alta inmunidad. ⁽⁴⁶⁾

Una vez concluidos los estudios de CIM y CBM para las diferentes especies de microorganismos empleados se elaboró un cuadro resumen, el cual se presenta en la Tabla N° 18 y 19.

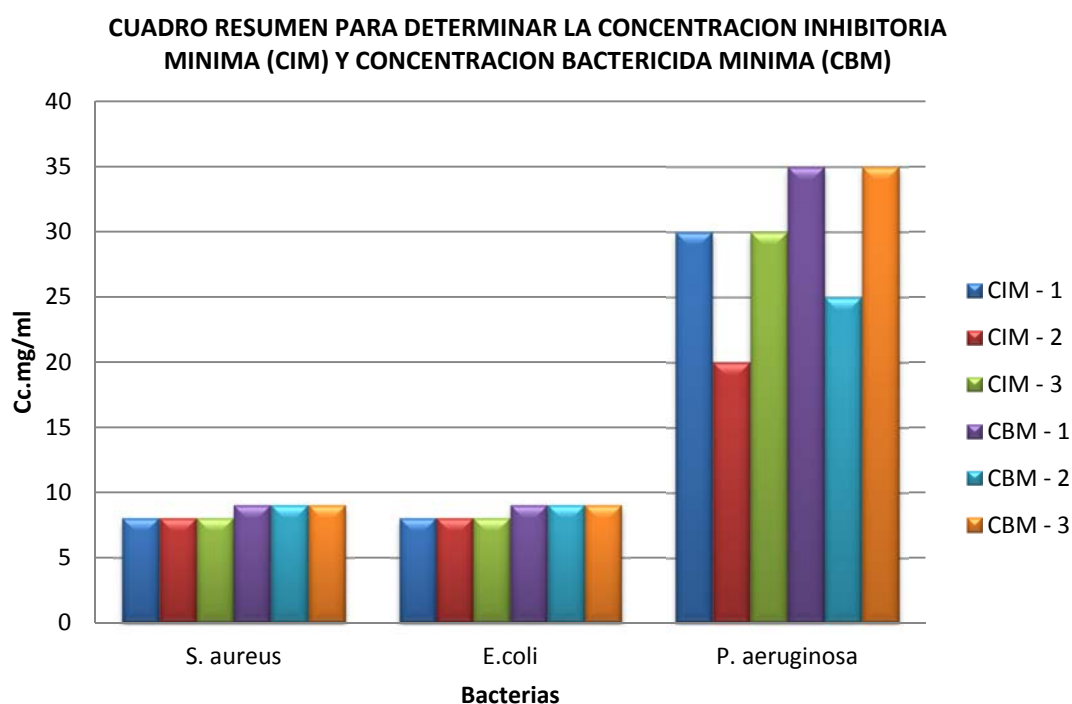
Cuadro N° 18

**CUADRO RESUMEN PARA LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
MINIMA INHIBITORIA Y MINIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO
ETANOLICO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) FRENTE LA *Staphylococcus aureus*,
Escherichia coli y *Pseudomona aeruginosa*.**

MICROORGANISMO	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>S. aureus</i> – 1	8	9
<i>S. aureus</i> – 2	8	9
<i>S. aureus</i> – 3	8	9
<i>E. coli</i> – 1	8	9
<i>E. coli</i> – 2	8	9
<i>E. coli</i> – 3	8	9
<i>P. aeruginosa</i> – 1	30	35
<i>P. aeruginosa</i> – 2	20	25
<i>P. aeruginosa</i> – 3	30	35

Cuadro N°19

**CUADRO RESUMEN PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION MINIMA
(CIM) Y CONCNETRACION BACTERICIDA MINIMA (CBM)**



La presente figura nos permite concluir que la concentración inhibitoria mínima CIM para *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* es de 9mg/ml y para *Pseudomona aeruginosa* la CIM es de 30mg/ml.

Las bacterias de mayor susceptibilidad al extracto etanólico son el *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* con una CBM de 9mg/ml, observándose que la *Pseudomona aeruginosa* posee menor susceptibilidad con una CBM de 35mg/ml esto puede ser porque estudios demuestras que la *Pseudomona aeruginosa* revela que la

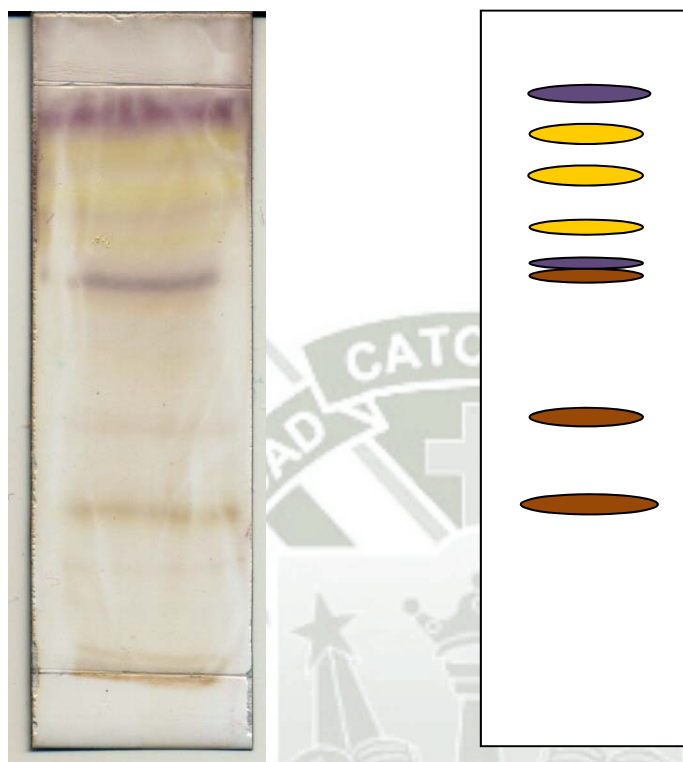
inmunidad de la bacteria es alta. Es probable también que por eso entre la *Pseudomona aeruginosa* 1 y 3 tengas diferente CBM a la *Pseudomona aeruginosa* 2 ya que son bacterias de diferentes procedencias. ⁽⁴⁶⁾

Comparando los resultados de la CBM con otros estudios realizados a este tipo de microorganismos, como el extracto de etanólico de *Bidens Pilosa* l. Var. Mino “amor seco” ⁽³¹⁾ para *Staphylococcus aureus* 125 mg/ml y para *Escherichia coli* de 125mg/ml observando que sus concentraciones son más elevadas para cada género, mientras que el extracto etanólico de *Piper Elongatum* “matico matico” presenta una CBM para *Staphylococcus aureus* 1,5 mg/ml y para *Escherichia coli* 75mg/ml, presenta en el caso del *Staphylococcus aureus* una concentración baja y para la *Escherichia coli* la concentración es alta en comparación con el extracto etanólico de la *Rivina Humilis* L. (Flor Blanca), para el caso de la *Pseudomona aeruginosa* se comparo con el extracto etanólico de *Verbesina Encelioides* “girasolcito” ⁽⁴⁸⁾ que presento CBM de 80mg/ml teniendo una mayor concentración que el extracto etanólico de *Rivina humilis* L.(Flor blanca) con de esto se puede deducir que el extracto etanólico de *Rivina humilis* L.(Flor blanca) posee efecto antibacteriano pero sus concentraciones son bajas en comparación con otros trabajos de investigación.

9. CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rivina Humilis* L. (Flor Blanca)

Esta prueba se empleo para determinar los principales constituyentes químicos presentes en dicha planta, hay que tener en cuenta que la cromatografía realizada fue sin la presencia de estándares, solo se observo la corrida Cromatografía.

Para la identificación general se utilizo como fase móvil acetato de etilo: metano: agua (97:20:10) teniendo como revelador acido sulfúrico al 5% y vainillina al 1% en etanol absoluto.



**Figura N° 23: Análisis cromatográfico general del extracto etanólico de
Rivina Humilis L. (Flor Blanca)**

Fase móvil: Acetato de etilo: Metanol: Agua (97:20:10)

Reactivos reveladores:

- **Sol A:** Acido sulfúrico al 5% en etanol absoluto
- **Sol B:** Vainillina al 1% en etanol absoluto

Fase estacionaria: Placa de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda de 254nm.

Revelador: Luz UV 254 nm.

Como se observa en la cromatografía de capa fina general el extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) presenta terpenos que son los que le podrían dar el efecto antibacteriano, a la vez se observó la presencia de flavonoides. Los resultados se aprecian en el cuadro N° 19.

Cuadro N°20
RESULTADOS OBSERVADOS PARA LA CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA GENERAL CON EL EXTRACTO DE *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca)

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Morado	0.95	Terpeno
2	Amarillo	0.9	Flavonoide
3	Amarillo	0.85	Flavonoide
4	Amarillo	0.76	Flavonoide
5	Morado	0.68	Terpeno
6	Marrón	0.63	Sesquiterpenlactonas
7	Marrón	0.4	Sesquiterpenlactonas
8	Marrón	0.28	Sesquiterpenlactonas

- Para la identificación de terpenos se utilizó como fase móvil tolueno: acetato de etilo (95:5) teniendo como revelador ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 1% en etanol absoluto.

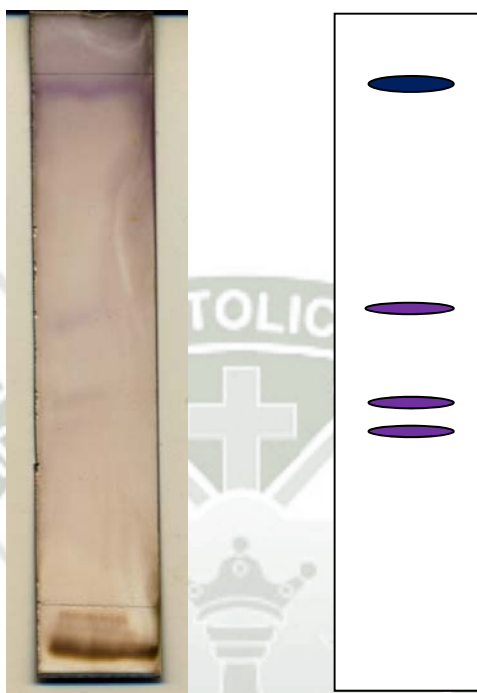


Figura N°24: Análisis cromatográfico para terpenos del extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca).

Fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo (95:5)

Reactivos reveladores:

- **Sol A:** Ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto
- **Sol B:** Vainillina al 1% en etanol absoluto

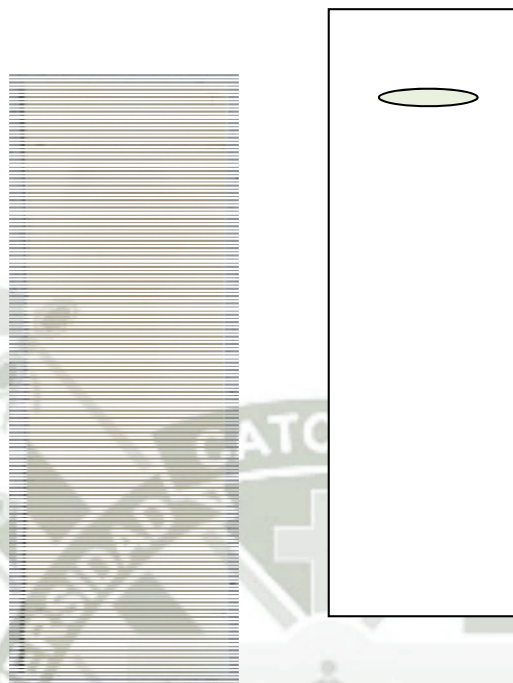
Revelador: Luz UV 254 nm.

En el cuadro N°20 se puede apreciar los resultados obtenidos de la cromatográfica específica para terpenos en donde se observa coloraciones que van desde lila al azul (Ver Fig. N° 24) que demuestran que la planta posee buena cantidad de terpenos ya que estas coloraciones son características de los mismos.

Cuadro N°21

**RESULTADOS OBSERVADOS PARA LA CROMATOGRAFIA DE CAPA
FINA EN EL ANALISIS DE TERPENOS CON EL EXTRACTO DE *Rivina*
Humilis L. (Flor Blanca)**

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Azul oscuro	0.95	Terpeno
2	Morado	0.55	Terpeno
3	Morado	0.4	Terpeno
4	Morado	0.35	Terpeno



- Para la identificación de taninos se utilizó como fase móvil metanol: agua: (90:10) teniendo como reveladores cloruro férrico al 5% en agua.

Figura N°25: Análisis cromatográfico para taninos del extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca).

Fase móvil: Metanol: Agua (90:10)

Reactivos reveladores: Cloruro Férrico al 5%

La aparición de la coloración verde claro en el silica gel de la cromatografía de capa fina para taninos nos indica que hay poca presentación de taninos. (Ver Fig. N°25).

Cuadro N°22
RESULTADOS OBSERVADOS PARA LA CROMATOGRAFIA DE CAPA
FINA EN EL ANALISIS DE TANINOS CON EL EXTRACTO DE *Rivina*
Humilis L. (Flor Blanca)

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Verde claro	0.94	Tanino

Fuente: Elaboración propia

- Para la identificación de flavonoides se utilizo como fase móvil Acetato de etilo:
Acido acético: Acido fórmico: Agua (100:11:11:22) teniendo como revelador
al Cloruro de Aluminio al 5% en etanol.

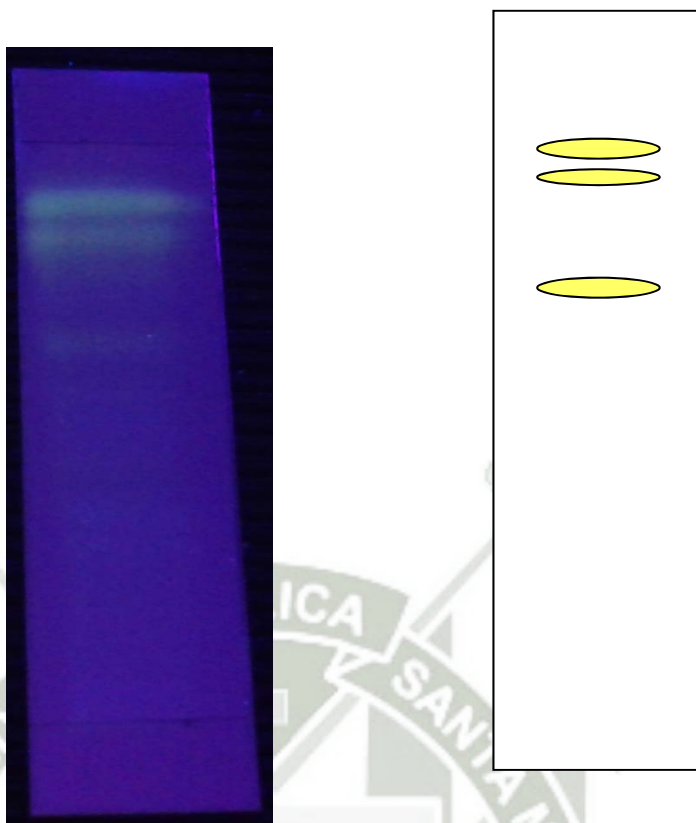


Figura N°26: Análisis cromatográfico para flavonoides del extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca).

Fase móvil: Acetato de etilo: Acido acético: Acido fórmico: Agua (100:11:11:22)

Reactivos reveladores: Cloruro de Aluminio al 5% en etanol.

Revelador: Luz UV 254 nm.

La presencia de metabolitos secundarios como terpenos, taninos y flavonoides podrían ser los responsables del efecto antibacteriano de la planta *Rivina humilis L.* (Flor blanca)

(47)

Cuadro N°23

RESULTADOS OBSERVADOS PARA LA CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA EN EL ANALISIS DE FLAVONOIDES CON EL EXTRACTO DE *Rivina* *Humilis L. (Flor Blanca)*

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Amarillo	0.9	Flavones
2	Amarillo	0.85	Flavones
3	Amarillo	0.65	Flavones

10. Análisis estadístico de las Concentraciones Bactericidas Mínimas entre las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

Luego de halladas las Concentraciones Bactericidas Mínima de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* se aplico el análisis de varianza para determinar si estas mostraban diferencia significativa en cuanto a sus concentraciones, comprobándose así que si existe diferencia significativa entre estas, Como se puede apreciar en el cuadro N° 24.

Cuadro N° 24
ANOVA PARA CONCENTRACION POR CEPAS

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Inter grupos	747.556	2	373.778	33.640	0.001
Intra grupos	66.667	6	11.111		
Total (Corr.)	814.222	8			

Basándonos en:

Variable dependiente: Concentración (mg/mL)

Factor: Cepa

Numero de observaciones:9

Numero de niveles:3

Al encontrarse diferencia significativa se realizo el Test de Tuckey en donde nos dio lo observado en el cuadro N°25.

Cuadro N°25
RESULTADOS PARA EL TEST DE TUCKEY

Cepa	Casos	Media	Grupo Homogéneos
CBM <i>Staphylococcus aureus</i>	3	9.0	X
CBM <i>Escherichia coli</i>	3	9.0	X
CBM <i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	28.33	X

Observamos que existe diferencia significativa entre las concentraciones, por lo que podemos decir que el *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* son más sensibles al extracto de ***Rivina Humilis L. (Flor Blanca)***

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo diferentes extracto de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) dándonos extractos secos para los tres solventes. los rendimientos obtenidos fueron para el extracto etanólico de 28.10 %, para el extracto de acetato de etilo de 15.0% y finalmente el extracto de hexano presento un rendimiento de 8.7% Concluyéndose que el extracto con mayor porcentaje de rendimiento fue el etanólico.
2. La Concentración Inhibitoria Mínima hallada con el extracto etanólico de la de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) es para *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* de 8mg/mL y para la *Pseudomona aeruginosa* es de 30 mg/mL y La Concentración Bactericida Mínima hallada para *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* es de 9mg/mL y para la *Pseudomona aeruginosa* es de 35 mg/mL.
3. Al realizarse la cromatografía de capa fina al extracto etanólico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) se encontró la presencia de sustancia térpenicas, flavonoides y taninos.

SUGERENCIA

1. Efectuar pruebas de identificación y cuantificación de los componentes presentes en el extracto de las flores de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca).
2. Diseñar una forma farmacéutica tópica del extracto etanólico de las flores de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) con efecto antibacteriano frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
3. Evaluar los otros efectos terapéuticos atribuibles en la medicina tradicional de las flores y otras partes de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca).
4. Evaluar el efecto de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca) frente a otros tipos de microorganismos.
5. Evaluar el efecto toxicológico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca).
6. Realizar un análisis costo efectividad con antibióticos tópicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABARCA Katia, GARCÍA Patricia y VIAL Pablo A. *Microbiología Clínica*. 1ra edición. Editorial Ediciones Universidad Católica de Chile. 2011
2. BRUNETON, Jean. *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Editorial Acribia España, 2001
3. ELMER Koneman y STEPHEN Allen. *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Edición Médica Panamericana, 2008.
4. FARRERAS, Rozman. *Medicina Interna*. 14 ed. Edit. HarcourtBrace. España 2001.
5. FURNANI G. Tala de Botánica Sistemática. Centro Universitario para la Tutela y la Gestión del Ambiente y del Aro-Ecosistema Universidad de Catania Departamento de Botánica Catania: 2004
6. GARCÍA Rodríguez, José Ángel; PICAZO Juan, *Microbiología Medica General*. Tomo 1, Editorial Brace de España. S.A 1998.
7. HILA Cano, Anthony Angelio; LAZO Fuentes Fanny Karelia. *Determinación del efecto antibacteriano de la Ambrosia peruviana L, "Altamisa" in vitro frente a Staphylococcusaureus, Staphylococcusepidermidis, Streptococcuspyogenes y Klebsiellapnellmoniae*. Arequipa 2006.
8. IBAÑEZ Soto, Jessica Jesús; SOSA Vilca Leila Joana. *Determinación del efecto antibacteriano invitro del Xanthiumspinosun L. sobre Staphylococcusaureus, Staphylococcuspyogenes, Klebsiellapnellmoniae, Escherichia coli*. Arequipa 2005.
9. JAVE Márquez Mercedes *Microbiología Farmacéutica 1 Cocos Gram Positivos, Staphylococcus y Micrococcus*" Arequipa, Perú, 2009
10. JAWETZ, E. *Microbiología Médica*. 15ava Edición. Editorial el Manual Moderno S.A. México 1995.

11. KONEMAN, Elmer W; y colaboradores. *Diagnostico Microbiológico*. Quinta Edición. Editorial Medica Panamericana. Pag.780-799. Argentina 1999.
12. KUKLINSKI, Claudia. *Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega S.A. Barcelona -España 2000.
13. KUKLINSKI, Claudia. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega S.A. España. 2003.
14. LOCK DE UGAZ, O. *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima 1988.
15. LR Snyder, Merck, *Lab tools table for laboratory use*, *Journal of cromatography*, Merck.
16. MENDO Rubio M. *Lecciones de Microbiología Y Medios de cultivo*. IV Edición. Servicios Gráficos y Afines RpM. Lima Perú 1995
17. MILLA Cavera, Magaly Elizabeth. *Efecto antibacteriano In Vitro del ZingiberofficinaleRoscoe (jengibre) frente a Staphylococcusaureus, Streptococcuspyogenes, Klebsiellapneumoniae, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa*, provenientes del HNCASE Essalud Arequipa 2007.
18. MOSTACERO León José, MELLACoico Freddy, GAMARRA Torres Oscar, *"Taxonomía de las Fanorogamicas útiles del Perú "*.Editorial Normas Legales S.A.C. Trujillo, Perú, 2002
19. PAHISSA Albert. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Edición Marge Medica Books, 2009.
20. PERALTA Lopez, Katisa Consuelo. *Efecto antimicrobiano invitro de la "Caléndula oficinales" sobre Staphylococcusaureus, Staphylococcusepidermidis, Proteusvulgaris, Proteusmirabilis, Pseudomona aeruginosa, Escherichiacoliy Cándida albicans*. Arequipa 2005,
21. PRESCOTI, LANSING M .*Microbiología V*, Edición, editorial Me Graw Hill 2002

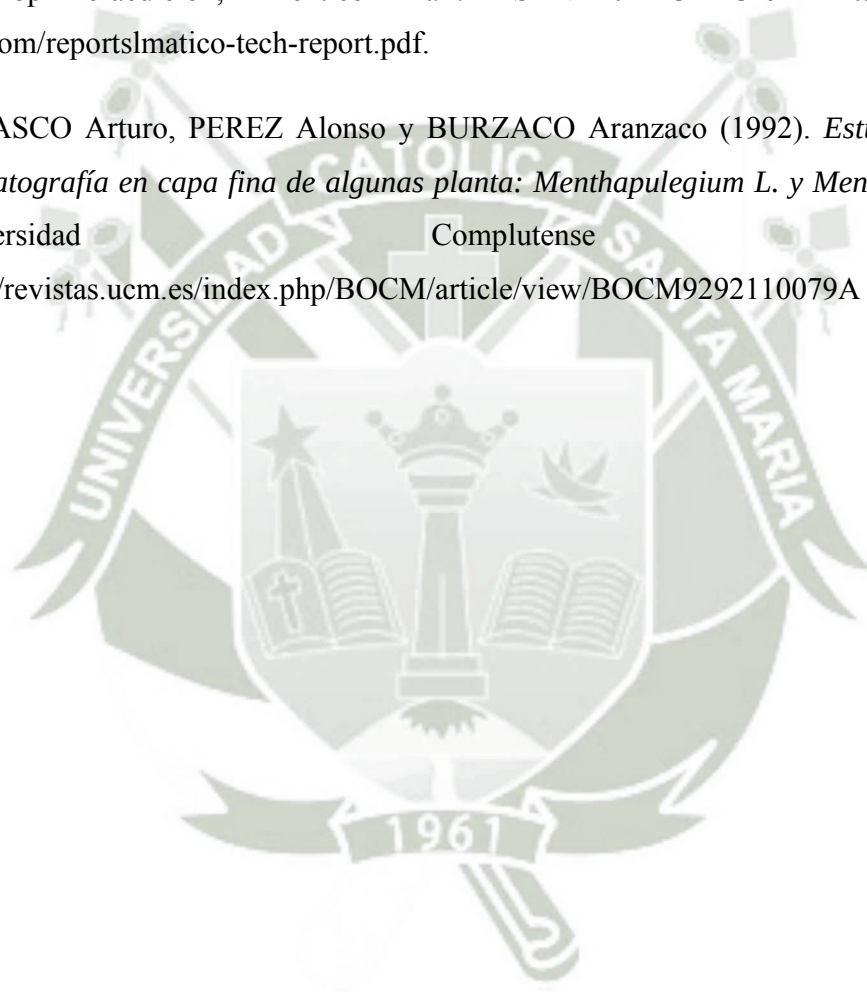
22. PUMAROLA A., Rodríguez Torres A., GARCÍA Rodríguez A. "*Microbiología y Parasitología Médica*". 2da edición. Editorial MASSON S.A. 1999.
23. RANULFO Gutiérrez, WillmanMadani. *Efecto in vitro del Eucaliptos globuluslabill (eucalipto) sobre Staphylococusaureus, Escherichiacoli, Klebsiellapneumoniae, Proteusvulgaris y Pseudomona aeruginosa*"
24. REMINGTON, Gennaro Alfonso., *Farmacología*, 20ava edición, 2 Tomo 11 Buenos Aires, Argentina, Editorial Medica Panamericana S.A.; 2000
25. ROMERO Caballero Romero. *Microbiología y Parasitología Humana*. Edición Médica Panamericana, 2007.
26. RUBINSSON Kenneth A., *Analysis instrumental*. Editorial Pretinse Hall 2001 ,España.
27. SKOOG Douglass A., LEARY James L. *Análisis instrumental*, 4ta. Edición. MC GRA W -HILL 1994
28. STREINER y NORMAN. "*Bioestadística*" ISBN. Editorial HarcourtBrace. España 1998
29. TORTORA Gerard J. *Introducción a la microbiología*, Editorial Acribia, S.A. España 1993.
30. TORTORA Gerard, FUNKE Berdell. Y CASE Christine. *Introducción a la microbiología*. 9na Edición. Editorial Medica Panamericana 2007.
31. VILLENA Vargas Giovanna; *Efecto antibacteriano in vitro del extracto de Bidens Pilosa L. Var. Minor*. Arequipa 2010
32. VILA JATO José Luis. *Tecnología Farmacéutica, Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Volumen II*. Editorial Sintesis. S.A.
33. VIRRUETA Gómez Cecilia Marcia; ZEGARRA Manrique YeseniaGiuliana. *Determinación del efecto antimicótico y antibacteriano in vitro PiperElongatum "Matico Matico" frente a las cepas de Cándida albicans, Staphylococcusaureus y Escherichia coli*.

Arequipa 2008

34. WADE Ainley and WELLER Paul J." *Handboof Pharmaceutical Excipients* ", Editorial Copyright 1986, 1994 by the American Pharmaceutical Association.

ARTICULO

35. MADIGAN M; MartinkoJ (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, Decimoprimeraedición, Prentice Hall. ISBN 0 131443291 <http://www.rain-tree.com/reportslmatco-tech-report.pdf>.
36. VELASCO Arturo, PEREZ Alonso y BURZACO Aranzaco (1992). *Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas planta: Menthapulegium L. y Mentha cervina L.* Universidad Complutense Madrid.
<http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/view/BOCM9292110079A>



INTERNET

37. http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_en_capa_fina
38. http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/2006/11/patogenia_07.htm
39. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>
40. http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa#Patog.C3.A9nesis
41. www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ecoliinfections.html
42. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn>
43. http://www.yinyangperu.com/flor_blanca.htm
44. <http://es.wikipedia.org/wiki/Rivina>
45. http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol17_4_12/pla04412.htm
46. <http://enlacenacional.com/2009/02/19/pseudomona-aeruginosa-un-problema-de-salud-publica/>
47. http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIPA/CAPITULO%20N%BA%2011.pdf
48. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S166834982005000100005&script=sci_arttext



ANEXO 1

TINCION GRAM

FUNDAMENTO

La tinción Gram, se usa principalmente para el examen microscópico directo de muestra y subcultivos.

El cristal violeta sirve como colorante primario, y se une a la pared celular bacteriana luego de un tratamiento con una solución débil de yodo, que sirve como mordiente para la unión del colorante.

Algunas especies de bacterias, debido a la naturaleza química de sus paredes celulares tienen la capacidad de retener el cristal violeta incluso luego del tratamiento con un decolorante orgánico. Las bacterias que retienen el colorante se ven de color violeta cuando se observan al microscopio, y se denominan entonces Gram positivas.

Algunas bacterias pierden la coloración primaria con cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante, presumiblemente debido al alto contenido de líquido de su pared celular. Estas bacterias decoloradas toman el colorante de contraste, la safranina, y se ven rojas cuando se observa al microscopio, denominándose Gram negativas.

TECNICA

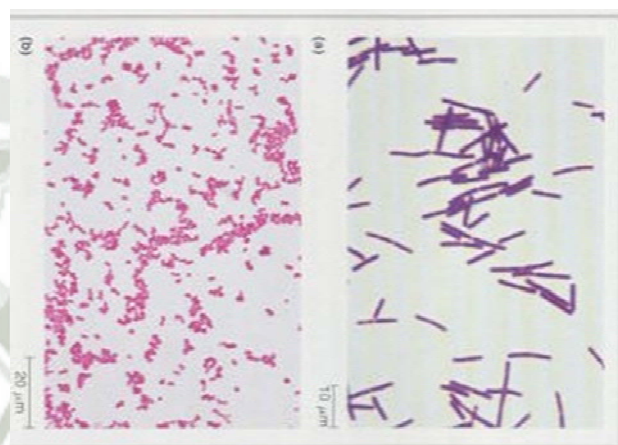
1. Hacer un delgado extendido del material para estudio y permitir que se seque al aire.
2. Fijar el material al porta objeto, pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero Bunsen, de modo que el material no se lave durante el procedimiento de tinción.

3. Colocar el extendido en una bandeja para teñido y cubrir la superficie con solución de cristal violeta, después de un minuto de exposición lavar cuidadosamente con agua destilada.
4. Cubrir el extendido con la solución de yodo – lugol para Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.
5. Cubrir la preparación con unas pocas gotas del decolorante alcohol – acetona, hasta que no se arrastre mas violeta. Eso lleva usualmente 10 segundos o menos.
6. Lavar suavemente con agua y colocar sobre la superficie safranina de contraste durante un minuto, lavar con agua corriente, secar y observar en 100x (con aceite de Inmersión).



INTERPRETACION

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



Gram (-)

Gram (+)

ANEXO 2

PRUEBA DE LA CATALASA

FUNDAMENTO

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la de la Hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado (Fe +3). El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono. Se emplea para diferenciar el género *Staphylococcus* (Catalasa positivo) del genero *Streptococcus* (Catalasa negativa).



TECNICA

1. Con el asa de Kolle en punta colocar en el centro de la placa una colonia a investigar.
2. Agregar una o dos gotas de peróxido de hidrogeno al 30% sobre el microorganismo.
3. Suspender el organismo y observar si hay la aparición de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno.



Catalasa negativa Catalasa positiva

INTERPRETACION

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

ANEXO 3

PRUEBA DE LA COAGULASA

FUNDAMENTO

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida, de actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, lo que da como resultado la formación de un coagulo visible.

La prueba de la coagulasa se utiliza para identificar *Staphylococcus Aureus* y diferenciarlo de *S. Saprophyticus* y *S. Epidermidis*.

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

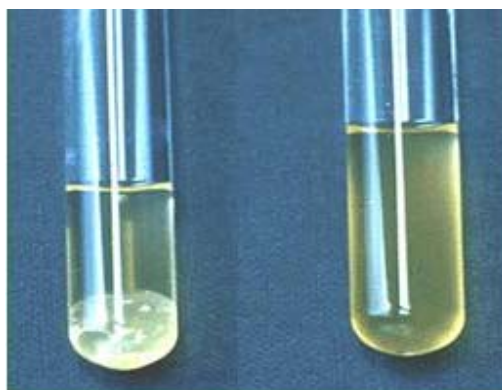
La coagulasa fija (portaobjetos): Conocida como factor de aglutinación está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivo. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas en el plasma ((fibrinógeno) provocan su aglutinación; la cual se indica por la aparición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

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

TRECNICA

Método en Tubo (Coagulasa Libre):

Emulsificar una pequeña cantidad de la colonia del microorganismo en un tubo que contengan 0.5 mL de plasma para pruebas de coagulasa. Incubar el tubo a 35°C durante 4 y 24 horas luego observar si se forma un coagulo inclinado ligeramente el tubo.



Positivo

Negativo

Método en Portaobjetos (Coagulasa Fija):

Con el asa de Kolle en punta colocar en el centro de la placa una colonia a investigar. Agregar 1 o 2 gotas de plasma. Suspender el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otros y observar si hay la aparición de grumos.



Negativo

Positivo

Todas las cepas coagulasa positivas deben informarse como *S. aureus*, todas las pruebas negativas deben considerarse como otra especie de *Staphylococcus*.

ANEXO 4

AGAR MANITOL SALADO

FUNDAMENTO

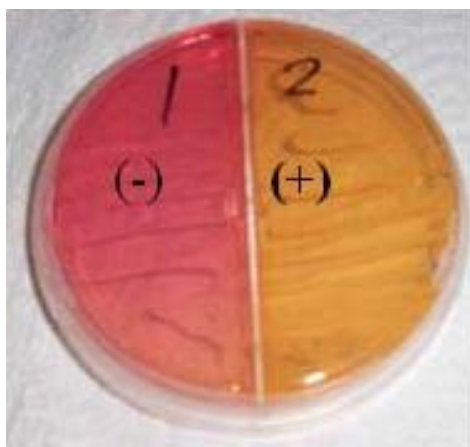
Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas, se repicarán en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles, posteriormente, la prueba de la coagulasa.

COMPOSICION

Extracto de carne	1.0
Pluripeptona	10.0
d-Manitol	10.0
Cloruro de sodio	75.0
Agar	15.0
Rojo de fenol	0.025
Agua Destila	1000.0 mL

PREPARACION

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



INTERPRETACION

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

ANEXO 5

AGAR MAC CONKEY

FUNDAMENTO

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

COMPOSICION

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

PREPARACION

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

INTERPRETACION

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



ANEXO 6

AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI)

FUNDAMENTO

Este medio como su nombre lo indica está compuesto de tres azúcares glucosa, lactosa y sacarosa. El color del medio recién preparado es rojo ladrillo (pH 7.4) contiene rojo fenol como indicador de pH y hierro para revelar a producción de hidrógeno sulfurado (H_2S).

La acidez se manifiesta por el cambio al color amarillo y la alcalinidad al color rojo, simbolizándose la acidez (A) y la alcalinidad (K). Ácides en el fondo del tubo (A) y alcalinidad en la parte inclinada (K) K/A significa que la bacteria fermenta la glucosa (K indica lactosa negativa).

En cambio, la fermentación de lactosa y/o sacarosa cambia todo el medio a amarillo A/A, la bacteria fermenta la glucosa y la lactosa.

La presencia de gas (resquebrajamiento del medio) y la producción de H_2S (precipitado de dolor negro) en el medio se simbolizan de acuerdo a la intensidad de unas cuatro cruces.

COMPOSICION

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

PREPARACION

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

INTERPRETACION

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

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

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

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



A/A

K/A - +

K/A ++

K/N - -

ANEXO 7

AGAR LISINA HIERRO (LIA)

FUNDAMENTO

Enterobacteriaceae pueden utilizar la lisina del medio LIA, por los mecanismos de descarboxilación, desanimación o bien ser negativos frente a este aminoácido. Para diferenciar estas reacciones el medio tiene en su composición glucosa y el indicador púrpura de bromocresol. El color del medio es ligeramente azulado (pH 6.7).

La descarboxilación de la lisina produce alcalinidad en todo el medio. Por lo tanto, el color azulado se intensifica, simbolizándose K/K. Este tipo de reacción se considera como lisina positiva.

La desanimación empieza en la parte inclinada, que cambia al color rojo ladrillo. El fondo del medio aparece amarillo, se interpreta por motivos prácticos como lisina negativa simbolizándose R/A.

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

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

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

COMPOSICION

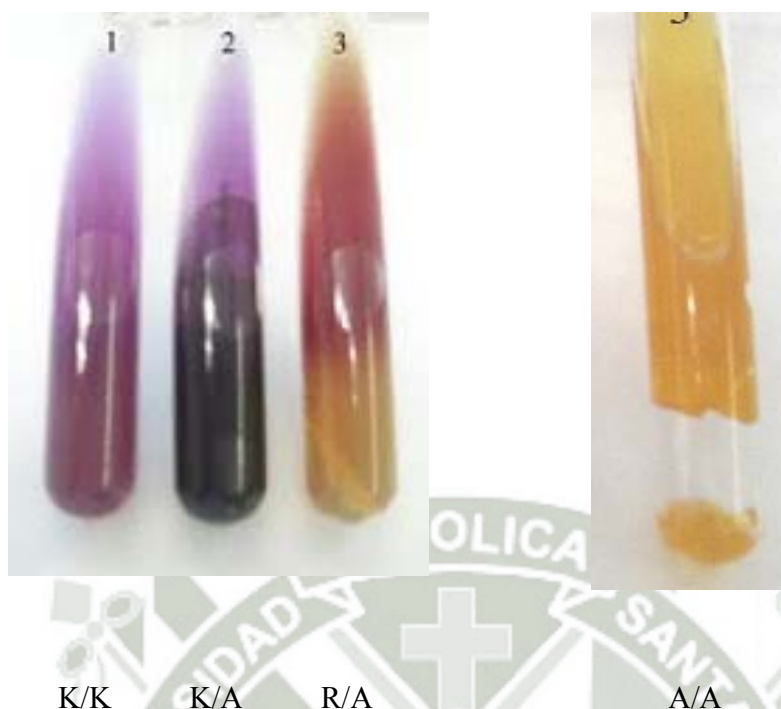
Peptona de carne	5.0
Extracto de levadura	3.0
Glucosa	1.0
L-Lisinamonoclorhidrato	10.0
Citrato amoniacó férrico	0.5
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	15.0

PREPARACION

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

INTERPRETACION

El desarrollo de un color amarillo en el fondo del tubo indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha disminuido lo suficiente para activar la descarboxilación. El retorno y es una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación (Se ha formado la cadaverina). Se lee como K/K y se interpreta lisina positiva.



La desanimación empieza en la pared en la parte inclinada, variando esta porción al color rojo vino. El fondo se tornara amarillo. Se lee como R/A y es lisina negativa. Se puede observa ennegrecimiento la producción de H_2S .

ANEXO 8

CALDO PEPTONADO (INDOL)

FUNDAMENTO

El indol es uno de los productos de degradación metabólico del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptófano son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos. La prueba del indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs.

La producción de indol es útil para diferenciar *Escherichia coli* (positiva) de miembros del grupo *Klebsiella – Enterobacter* (la mayoría negativos).

COMPOSICION

Peptona	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1000 mL.

PREPARACION

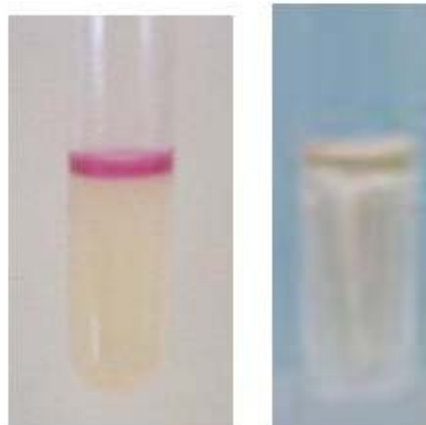
Pesar 25 g del medio de cultivo y diluir en 1000 mL de agua destilada, llevar a ebullición, esterilizar en la autoclave y repartir 2mL por cada tubo de ensayo.

COMPOSICION DEL REACTIVO DE KOVACS

Alcohol amílico o isoamilico	150.0 mL
P- dimetilaminobenzaldehído	10.0 g
Acido clorhídrico cc	50.0 mL

INTERPRETACION

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



Positivo

Negativo

ANEXO 9

ROJO METILO – VOGES PROSKAUER (RM – VP)

FUNDAMENTO

Una de las características taxonómicas que se utiliza para identificar los diferentes géneros de enteobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa.

Se conocen dos tipos generales la fermentación ácido – mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol.

En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido acetona y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H_2 Y CO_2 .

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

COMPOSICION

Caldo MRVP

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

Indicador de pH rojo de metilo

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

Revelador VogesProskauer

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

PREPARACION

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

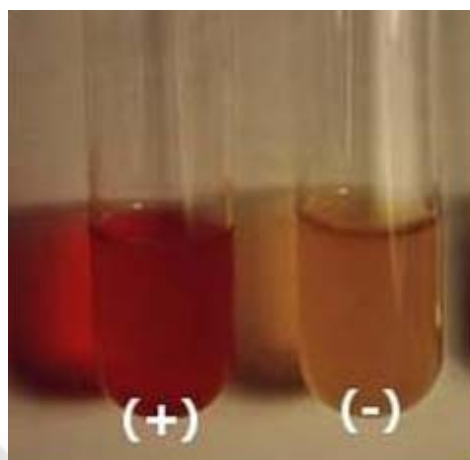
PROCEDIMIENTO

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

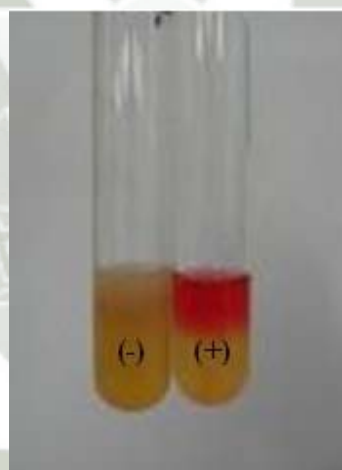
INTERPRETACION

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

ROJO DE METILO



VOGES PROSKAUER



ANEXO 10

CITRATO DE SIMMONS

FUNDAMENTO

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

COMPOSICION

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

PREPARACION

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

PROCEDIMIENTO

Se inocula la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico. Utilizar un cultivo de 24 horas con un medio sólido y cuidando no arrastrando un medio de cultivo ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 37°C durante 48 horas.

INTERPRETACION

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañando o no de un viraje del indicador al azul.

pH neutro verde

pH ácido amarillo

pH básico azul.



ANEXO 11

CALDO PEPTONADO

FUNDAMENTO

Es un medio altamente enriquecido que permite el crecimiento de la mayoría de bacterias.

COMPOSICION

Peptona	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1000 mL

PREPARACION

Disolver los ingredientes a Baño María. Autoclavar por 15 minutos.



ANEXO 12

AGAR MUELLER HINTON

FUNDAMENTO

Bauer, Kirby, Sherris y Tuck recomendaron el Agar de MuellerHinton para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad a antibióticos, utilizando un solo disco impregnado con una alta concentración de un antimicrobiano. El Agar MuellerHinton cumple con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud y está especificado en la FDA. Este medio es el seleccionado por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) para realizar las pruebas de susceptibilidad, por su alta reproducibilidad, subajo contenido de sustancias inhibidoras y el crecimiento satisfactorio que presentan la mayoría de los patógenos no fastidiosos. Con este medio se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobresusceptibilidad antimicrobiana.

En este medio la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. El almidón es agregado para absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante.

COMPOSICION

Infusión de carne	300.0 g
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	15.0 g

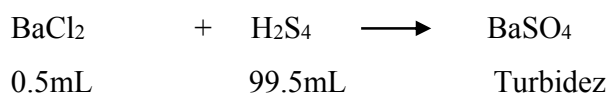
PREPARACION

Suspender 38 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C.

ANEXO 13

ESCALA DE MC. FARLAND

COMPOSICIÓN



PREPARACIÓN

Para preparar el estándar se agrega 0.5mL de BaCl₂ 0.048M a 99.5mL de H₂SO₄ 0.36N

CÁLCULOS

1. Para preparar 100ml de Cloruro de Bario 0.048M

$$\frac{0.048\text{mol}}{1000\text{ml}} \times \frac{(100\text{ml}) 208.3\text{g BaCl}_2}{1\text{mol}} = 0.99984\text{g Cl}_2\text{Ba en } 100\text{ml}$$

2. Para preparar 1000ml de Acido sulfúrico 0.36N

$$\frac{0.36\text{Equ}}{1000\text{ml}} \times \frac{(1000\text{ml}) 98.08\text{g}/2}{1\text{Equ}} \times \frac{1\text{ml}}{1.84\text{g}} = 9.59478 \text{ ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ al } 96\%$$

Para llevarlo al 100%

$$\begin{array}{rcl} 9.59478 & \text{-----} & 96\% \\ X & \text{-----} & 100\% \end{array}$$

X= 9.99ml de H₂SO₄ en 10000ml.

PREPARACION

Seguir los siguientes pasos:

- ✓ A 99.5 mL de una solución de H_2SO_4 0.18M (0.36) (1% V/V) agregar 0.5 mL de solución de BaCl_2 0.048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ AL 1.175% P/V) en constante movimiento.
- ✓ Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro o espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625nm es 0.08 a 0.10 para el estándar 0.5 de Mac Farland.
- ✓ Distribuir aproximadamente 6 a 8mL en tubos con tapa rosca y anotar la fecha de preparación.
- ✓ Ajustar bien la tapa y conservarlo en la oscuridad a temperatura ambiente.
- ✓ Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar.
- ✓ Verificar y reemplazarlo cuando sea necesario.

ANEXO 14
IMÁGENES DE RESULTADOS



Figura N°26: Extracto etanolico de *Rivina Humilis L.* (Flor Blanca)



Figura N°27: Concentracion Inhibitoria Minima (CIM) de *Staphylococcus aureus*



Figura N°28: Concentracion Inhibitoria Minima (CIM) de *Escherichia coli*



Figura N°29: Concentracion Inhibitoria Minima (CIM) de *Pseudomonas aeruginosa*



Figura N°30: Concentracion Bactericida Minima (CBM) de *Staphylococcus aureus* de 9mg/ml.



Figura N°31: Concentracion Bactericida Minima (CBM) de *Escherichia coli* de 9mg/ml.



Figura N°32: Concentración Bactericida Mínima (CBM)) de *Pseudomonas aeruginosa* de 25 mg/ml.

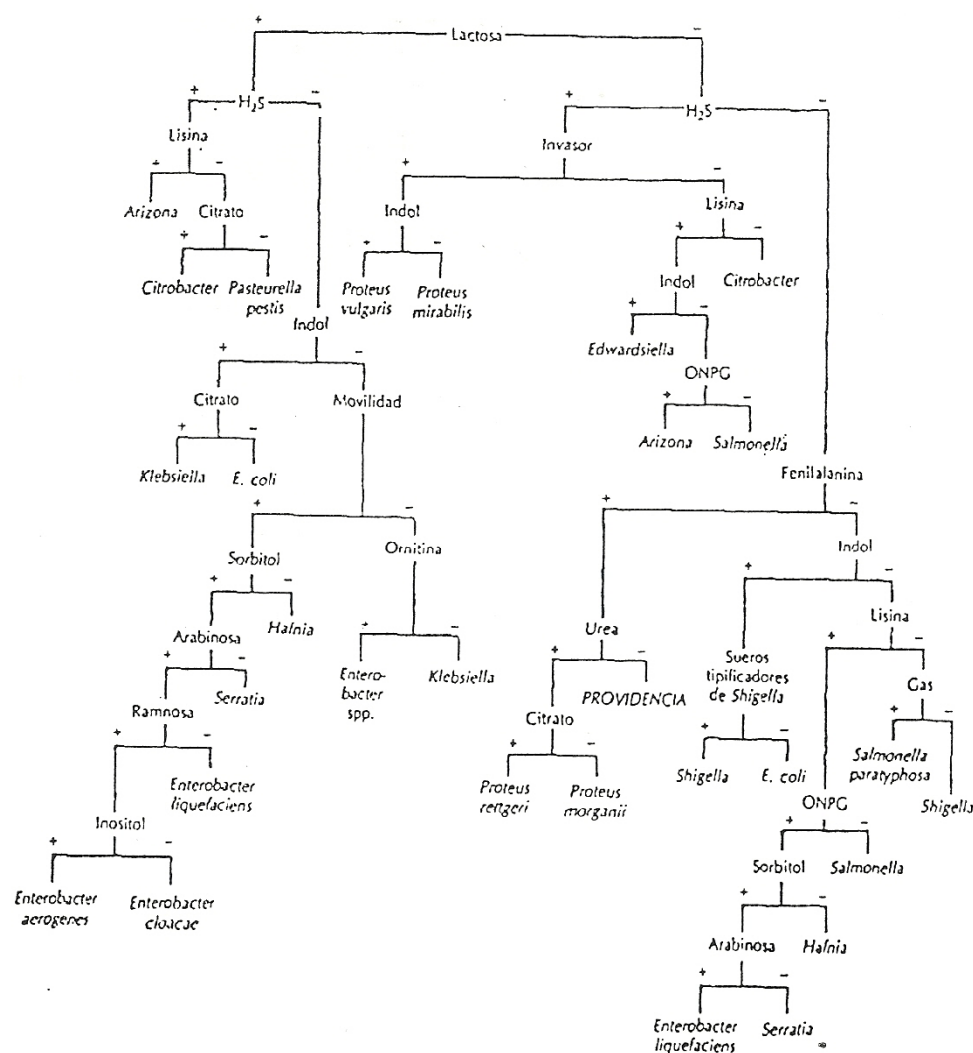
[illegible]

+ : aislamiento positivo
- : aislamiento negativo
d : positiva tardía

w : reacción débil
+/- : mayoría positiva
-/+ : mayoría negativa

ANEXO 16

IDENTIFICACION DE LAS ENTEROBACTERIAS MEDIANTE DIAGRAMA DE RAMIFICACION



ANEXO 17 CARACTERISTICAS DE IDENTIFICACION DE SIETE GENEROS DE BACILOS NO FERMENTADORES

Género	Metabolismo	Movilidad	Oxidasa	Desarrollo en MacConkey	Características adicionales
<i>Pseudomonas</i>	Oxidativo	Positiva. Flagelos polares	+	Positivo	Flagelos polares monotricos y multitricos. No requiere factores de desarrollo especiales. Algunas especies producen pirocianina y fluorescencia. La mayoría de las especies desnitrifican nitratos a gas nitrógeno
<i>Acinetobacter</i> (Herellea y Mima)	Oxidativo o no sacaro-lítico	Negativa	-	Positivo	No requiere factores de desarrollo especiales. Producción de ácido a partir de glucosa débil (var. <i>calcoaceticus</i>) o ausente (var. <i>lwoffii</i>). Las células aparecen como diplococos en la tinción de Gram. Todas las cepas son resistentes a la penicilina
<i>Flavobacterium</i>	Oxidativo (algunas cepas fermentadoras cuestionables)	Variable. Algunas especies tienen flagelos peritricos	+	Pobre o negativo	Muchas cepas requieren para su desarrollo nitrógeno suplementario y vitaminas del complejo B. Frecuente producción de pigmentos amarillos. No desnitrifican nitratos. Desarrollo óptimo a 30° C. Todas las especies son resistentes a la polimixina B. Algunas especies son débilmente indol positivas
<i>Bordetella</i>	Oxidativo	Variable. Algunas cepas tienen flagelos laterales politricos	+	Variable; pobre o negativo	Algunas cepas requieren para su desarrollo ácido nicotínico, cistina y metionina. La <i>B. pertussis</i> requiere agar sangre glicerol papa (Bordet-Gengou). La <i>B. bronchiseptica</i> degrada rápidamente la urea
<i>Moraxella</i>	Oxidativo y no sacaro-lítico	Negativa	+	Escaso o negativo	La mayoría de las cepas son exigentes y algunas requieren para su desarrollo un suplemento de suero. Aerobios estrictos. En la tinción de Gram pueden aparecer como cocobacilos. Altamente sensibles a la penicilina
<i>Xanthomonas</i>	Oxidativo	Positiva. Un solo flagelo polar	-/+ débil	Negativo	Algunas cepas requieren para su desarrollo metionina, ácido glutámico y ácido nicotínico. Producción de pigmento amarillo. Catalasa positivos. No reducen nitratos a nitritos. Principalmente fitopatógenos
<i>Alcaligenes</i>	Oxidativo y no sacaro-lítico	Positiva.	+	Negativo	Aerobios estrictos, si bien algunas cepas utilizan nitrato en lugar de oxígeno como aceptor final de electrones. Requieren para su desarrollo sustancias nitrogenadas simples

ANEXO 18
EQUIPOS DE LABORATORIO



Baño María modelo Masson



Autoclave J.P. SELECTA



Refrigeradora Philips



Estufa J.P. SELECTA



Micro pipeta transferpette



Microscopio Primo Star Zeiss