

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE
LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara* “JHANUKARA”
SOBRE CEPAS ATCC DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y
Pseudomona aeruginosa - AREQUIPA, 2014”**

Tesis presentada la Bachiller

HUARICALLO QUISPE, LEONARDA LUISA

**Para optar el título profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

Asesor: Q.F. Fernando Torres Vela

AREQUIPA – PERÚ

2015

AGRADECIMIENTOS

Darle gracias a Dios por estar conmigo en todo momento iluminando mi mente y haber puesto en mi camino a todas aquellas personas a quienes agradezco hoy.

A todos mis maestros que en el transcurso de toda la carrera nos brindaron todas sus enseñanzas y consejos.

Mi agradecimiento sincero al QF. Fernando Torres Vela y a los Dres. José Villanueva Salas, Yenny López Valencia, Carlos Medina Pomareda, quienes me brindaron sus conocimientos y orientaciones para la elaboración de la tesis.

A mis amigas y a todas aquellas persona que fui conociendo gracias por su apoyo, afecto y sus consejos.

DEDICATORIAS

*A Dios por darme por darme la oportunidad de vivir y
dándome la fuerza necesaria para seguir adelante y no
caer cuando se me presentaban obstáculos.*

*A mis padres Timoteo y Nolasca y hermano Henry
gracias por su cariño y apoyo incondicional dándome
palabras de aliento, su comprensión y en todo
momento acompañándome.*

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	
RESUMEN.....	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS.....	
HIPÓTESIS	

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. <i>Lepidium chichicara</i>	02
1.1.1. NOMBRES COMUNES	02
1.1.2. TAXONOMÍA	02
1.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	03
1.1.4. USOS MEDICINALES	03
1.1.5. DISTRIBUCIÓN	03
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	03
1.2.1. CARACTERÍSTICAS	03
1.2.2. CULTIVO	03
1.2.3. INFECCIÓN	04
1.2.4. ENZIMAS Y TOXINAS.....	04
1.2.5. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.....	04
1.3. <i>Escherichia coli</i>.....	05
1.3.1. CARACTERÍSTICAS	05
1.3.2. CULTIVO	06
1.3.3. INFECCIÓN	06
1.3.4. ADHESINAS Y TOXINAS.....	06
1.3.5. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.....	07
1.4. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	07
1.4.1. CARACTERÍSTICAS	07

1.4.2. CULTIVO	07
1.4.3. INFECCIÓN	08
1.4.4. ENZIMAS Y PATOGENIA	08
1.4.5. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.....	08
1.5. METODOS DE EXTRACCIÓN DE DROGAS	09
1.5.1. MÉTODOS QUE ESTABLECEN CONCENTRACIÓN DE EQUILIBRIO.	09
1.5.1.1 MACERACIÓN	09
1.5.1.2 BIMACERACIÓN	09
1.5.1.3 DIGESTIÓN.....	10
1.5.1.4 EXTRACCIÓN ULTRASÓNICA	10
1.5.1.5 EXTRACCIÓN CON ENERGÍA ELÉCTRICA	10
1.5.1.6 TURBOEXTRACCIÓN.....	10
1.5.2. MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN EXHAUSTIVA DE DROGAS	11
1.5.2.1 PERCOLACIÓN SIMPLE.....	11
1.5.2.2 REPERCOLACIÓN	11
1.5.2.2.1 REPERCOLACIÓN FRACCIONADA	11
1.5.2.2.2 REPERCOLACIÓN EN SERIE CON VARIAS EXTRACCIONES	11
1.5.2.2.3 EXTRACCIÓN A CONTRACORRIENTE.....	12
1.5.2.2.4 PERCOLACIÓN A PRESIÓN.....	12
1.5.2.2.5 PERCOLACIÓN AL VACÍO	12
1.5.2.3 EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON GASES.....	12
1.5.2.4 EXTRACCIÓN POR SOXHLET	13

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO	15
2.2. MATERIAL BIOLÓGICO	15
2.2.1. MATERIAL VEGETAL	15
2.2.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO	15
2.3. MATERIALES DE LABORATORIO.....	15
2.3.1. MATERIAL DE VIDRIO.....	15

2.3.2. EQUIPOS	16
2.3.3. MEDIOS DE CULTIVO	16
2.3.4. REACTIVOS	16
2.3.5. OTROS MATERIALES	17
2.4. MÉTODOS	18
2.4.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	18
2.4.1.1. RECOLECCIÓN	18
2.4.1.2. SELECCIÓN Y ESTABILIZACIÓN	18
2.4.1.3. DESECACIÓN.....	19
2.4.1.4. MOLIENDA.....	19
2.4.1.5. EXTRACCIÓN	19
2.4.1.6. CONCENTRACIÓN.....	21
2.4.2. TÉCNICA EN IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	22
2.4.2.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	22
2.4.2.1.1. FASE ESTACIONARIA	22
2.4.2.1.2. FASE MÓVIL	22
2.4.2.1.2.1. DESARROLLO CROMATOGRÁFICO.....	23
2.4.2.1.2.2. REVELADORES EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	24
2.4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS.....	25
2.4.3.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	25
2.4.3.2. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL EXTRACTO	26
2.4.3.3. SIEMBRA DE LAS DILUCIONES	27
2.4.4. METODO PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	28
2.4.4.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	29
2.4.4.2 PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL EXTRACTO	29
2.4.5. METODO PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA	31
2.4.5.1 SIEMBRA DE LOS EXTRACTOS POST CMI	31

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	33
3.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	36
3.2.1. IDENTIFICACIÓN GENERAL (TERPENOS).....	36
3.2.2. IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS TRITERPÉNICAS Y ESTEROIDICAS	37
3.2.3. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS.....	38
3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO	38
3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE <i>Lepidium chichicara</i> (JHANUKARA).	41
3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Lepidium chichicara</i> (JHANUKARA). 48	
3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Lepidium chichicara</i> (JHANUKARA).. 53	

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

4.1. CONCLUSIONES.....	63
4.2. SUGERENCIAS.....	65

BIBLIOGRAFÍA.....	66
--------------------------	-----------

ANEXOS	70
---------------------	-----------

ANEXO 1: MEDIOS MICROBIOLÓGICOS UTILIZADOS

ANEXO 2: PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE LA ESCALA MC FARLAND

ANEXO 3: CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DE *Lepidium chichicara*

ANEXO 4: CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE CEPAS BACTERIANAS

RESUMEN

El presente estudio de investigación científica se ejecutó en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, con la finalidad de evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

La primera etapa de la investigación comprendió el tratamiento de las hojas del material vegetal, que se inició desde la recolección en la zona denominada Chilina perteneciente al distrito de Cayma, provincia Arequipa, departamento Arequipa; luego se estabilizó y desecó ambos procedimientos se realizaron en la estufa de desecación. Finalmente la droga fue triturada para iniciar los procesos de extracción, que dan inicio a la segunda etapa.

La extracción fue mediante el equipo extractor Soxhlet, con el uso de dos disolventes (alcohol etílico y cloroformo) que permitieron obtener un extracto etanólico y clorofórmico las mismas que fueron concentrados hasta sequedad, luego de realizar los cálculos para hallar el porcentaje de rendimiento donde se consideró el peso de droga seca inicial y el peso del extracto seco; se estableció que el extracto

etanólico presentó mayor porcentaje de rendimiento con un 18.13% frente al extracto clorofórmico que solo presentó un 2.2% de rendimiento.

Ambos extractos fueron sometidos al método de análisis como es cromatografía en capa fina (CCF) estando presentes en ambos extractos; compuestos terpénicos como saponinas triterpénicas y esteroídicas además de taninos, sin embargo, el número de manchas fue mayor para el extracto etanólico y la reacción fue negativa para flavonoides y alcaloides.

Finalmente en la tercera etapa del estudio se valoraron la actividad antimicrobiana de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) evaluando la presencia de los halos de inhibición mediante el método microbiológico hoyo-placa-cultivo dando como resultado:

Primero; para *Staphylococcus aureus*, frente al extracto etanólico la mínima concentración a la que presenta halos de inhibición fue 15.63 mg/mL, y frente al extracto clorofórmico no presenta halos de inhibición; segundo, para *Escherichia coli* la mínima concentración del extracto etanólico a la que presenta halos inhibición fue de 31.25 mg/mL y sin presencia de halos de inhibición al extracto clorofórmico; tercero, frente a *Pseudomona aeruginosa* no presentó halos de inhibición a ninguno de los 2 extractos (clorofórmico y etanólico).

Posteriormente mediante el método de dilución en tubo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y por el método de dilución en agar se determina la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico, cuyo resultado final frente a *Staphylococcus aureus* fue de 12.5mg/mL para ambos métodos y frente a *Escherichia coli* la CMI=25mg/mL y CBM=31.25 mg/mL.

ABSTRACT

This research study was carried out in the laboratories of the Professional School of Pharmacy and Biochemistry at the Catholic University of Santa María, in order to evaluate the *in vitro* antimicrobial effect of extracts of *Lepidium chichicara* (jhanukara) on strains ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The first stage of the research involved treating the leaves of the plant material, which started from gathering in the area called Chilina belonging to the district of Cayma, Arequipa province, Arequipa department; then he leveled off and dried both procedures were performed in the drying cabinet. Eventually the drug was crushed to start the extraction process, kicking off the second stage.

The extraction was using the equipment exhaust Soxhlet, with the use of two solvents (ethyl alcohol and chloroform) that allowed us to obtain an ethanol and chloroform extract them that were concentrated to dryness, after performing the calculations to find the percentage yield where he considered the initial dry weight of drug and weight of the dry matter; it was established that the ethanol extract showed higher percentage yield with 18.13% against chloroform extract only showed a 2.2% yield.

Both extracts were subjected to analysis method is as thin layer chromatography (TLC) being present in both extracts terpene compounds as triterpene

saponins and steroidal addition tannin, however, the number of spots was higher for the ethanolic extract and the reaction was negative for flavonoids and alkaloids.

Finally in the third stage of the study the antimicrobial activity of extracts of *Lepidium chichicara* (jhanukara) were assessed by evaluating the presence of halos of inhibition by microbiological method hole-plate-culture resulting in:

First; for *Staphylococcus aureus*, compared with ethanolic extract the minimum concentration at which presents inhibition halos was 15.63mg/mL, and against the chloroform extract no inhibition halos; second, for *Escherichia coli* the minimum concentration of ethanol extract which presents inhibition halos was 31.25mg/mL and without the presence of halos of inhibition chloroform extract; third, against *Pseudomonas aeruginosa* he did not show any inhibition halos of the two extracts (chloroform and ethanol).

Then through the tube dilution method the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined and the agar dilution method the minimum bactericidal concentration (MBC) of ethanol extract is determined, the final result against *Staphylococcus aureus* was 12.5mg/mL for both methods and *Escherichia coli* against MIC=25mg/mL and MBC=31.25mg/mL.

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana es un problema frecuente en salud y se presenta en muchos ámbitos, generando problemas médicos en la salud de la población que repercute en el gasto sanitario. Ciertamente en el ámbito hospitalario y ambulatorio o doméstico, la contaminación respectiva de heridas quirúrgicas y heridas domésticas es frecuente en la población, la piel sana contiene muchas bacterias comensales, estas y otras adquiridas son causa frecuente de contaminación de estas retrasando e incluso impidiendo el proceso de cicatrización. Ante este problema la población recurre a medidas de todo tipo tendientes a “limpiar” o “proteger” la lesión con la finalidad de evitar su contaminación, uno de estos recursos es la planta medicinal conocida como “jhanukara” cuyo binomio científico (señalado por el *Herbarium arequipense* de la UNSA) es *Lepidium chichicara*. Especie a la que recurre la población en casos de que las heridas presenten “pus”, aplicando directamente sobre la herida, compresas de las hojas frescas y molidas de esta especie.

La revisión bibliográfica en la biblioteca de nuestra universidad así como en la internet, no señalan ningún estudio relacionado a la actividad antimicrobiana de esta especie, sin embargo las referencias sobre los usos comunes que hace la población si están presentes. La investigación que se presenta a continuación evalúa esta especie medicinal a través de dos extractos obtenidos mediante extracción con equipo Soxhlet con dos disolventes; cloroformo y alcohol etílico, frente a tres tipos de bacterias ATCC: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, se trata de un estudio *in vitro* preclínico en donde no solo se determinó la presencia de halos de inhibición de los extractos, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CMB), sino además se determinaron la presencia de metabolitos secundarios por el método de cromatografía en capa fina (CCF). Sin duda los resultados contribuyen en el conocimiento de nuestra flora local y en el uso fitoterapéutico de las hierbas medicinales de nuestra región.

OBJETIVOS

GENERAL

- ◆ Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

ESPECÍFICOS

- ◆ Obtener extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) para su evaluación de la actividad antimicrobiana, mediante el método de extracción Soxhlet.
- ◆ Señalar a los componentes del metabolismo secundario presentes en los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) detectados mediante cromatografía en capa fina (CCF).
- ◆ Determinar la concentración mínima a la cual los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) presentan los halos de inhibición sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*
- ◆ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.
- ◆ Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) *in vitro* de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

HIPÓTESIS

Tradicionalmente se utilizan las hojas de *Lepidium chichicara* conocida como “jhanukara” como antiséptico de heridas; es probable que sus extractos muestren actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.



1.1. *Lepidium chichicara*

1.1.1. Nombres comunes

k'ta anís (anís silvestre), mablaza, chichiaccara, jhanukara. ^(1, 34, 35, 43)

1.1.2. Taxonomía

Lepidium chichicara fue descrito por Nicaise Augustin Desvaux y publicado por Chroris Chilensis. ^(34, 35)

- Reino: Plantae
- Tipo: Fanerógama
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Capparales
- Familia: Brasicáceas
- Género: *Lepidium* ^(UNSA)
- Nombre Científico: *Lepidium chichicara* Desv.



Figura N°1: *Lepidium chichicara* Desv. (jhanukara)

1.1.3. Descripción botánica

Es una hierba anual, erguida de hojas simétricas y opuestas de borde dentada y con escasa pilosidad, de inflorescencia en racimos con pequeñas flores blancas, hermafroditas y fruto con una silícula. ^(1, 33,34, 43)

1.1.4. Usos medicinales

- Se utiliza la planta estrujada en agua fría frente una especie de disentería.
- Se lavan las heridas con una decocción de las hojas de la planta
- Se utilizan las hojas secas trituradas u hojas frescas machacadas directamente sobre las heridas para curar las úlceras. ^(24,34)

1.1.5. Distribución

Se desarrolla en las estaciones de primavera y verano. Crece en lugares pedregosos y rocosos, entre 2400-4000 msnm. ^(24,33)

1.2. *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Características

Son cocos anaerobios facultativos Gram-positivos, dispuestos en racimos, intracelular y oportunista. ^(26, 27)

1.2.2. Cultivo

Las cepas crecen bien en medios habituales de laboratorio (p. ej., agar sangre), a las 18-24 horas de incubación en atmósfera de aire y a 37°C, se observa un buen crecimiento. Las colonias de *Staphylococcus aureus* son grandes y a menudo presentan una coloración amarillo-anaranjada en el aislamiento primario, debido a la producción de pigmentos carotenoides pero con la incubación continuada, las colonias

pueden perder esta coloración y volverse translúcidas. El pigmento se desarrolla mejor a temperatura ambiente (20-25°C) que a 37°C, aunque el crecimiento es más rápido a esta última temperatura. ^(26, 27)

1.2.3. Infección

Staphylococcus aureus provoca con más frecuencia infecciones de piel y partes blandas como: impétigo, foliculitis, forúnculos, celulitis, mastitis, erisipela, abscesos cutáneos y orzuelo, que se limitan de una pequeña área de la piel de la persona.

También es causante de infecciones de material protésico, infección de heridas quirúrgicas, endocarditis, meningitis; también pueden liberar sustancias tóxicas que producen enfermedades tales como intoxicación por alimentos. ^(26, 27)

1.2.4. Enzimas y toxinas

Staphylococcus aureus produce y secreta enzimas y toxinas que son consideradas como potenciales factores de patogenicidad. Dentro de estas enzimas que produce *Staphylococcus aureus* se encuentra: catalasa, coagulasa, lipasas, hialuronidasa y nucleasa. También elabora productos extracelulares llamadas toxinas donde se han definido 3 grupos principales y son; toxinas citolíticas, enterotoxinas y toxina exfoliativa o epidermolítica. Produce además una serie de toxinas implicadas en el síndrome de shock tóxico. Aproximadamente la mitad de las cepas de *Staphylococcus aureus* producen enterotoxinas y se trata de toxinas termoestables (resisten hirviendo 30 minutos) y resistentes a la acción del tubo digestivo. Son responsables de un número importante de intoxicaciones alimentarias y se producen cuando crece en alimentos ricos en carbohidratos y proteínas. ^(26, 27)

1.2.5. Tratamiento, prevención y control

Los *Staphylococcus* desarrollaron una rápida resistencia a los antibióticos después de la introducción de la penicilina y en la actualidad una proporción inferior al 10% de las cepas es sensible a este antibiótico. Esta resistencia está mediada por la enzima penicilinasasa (β -lactamasa específica para las penicilinas), la cual hidroliza el

anillo β -lactámico de la penicilina. La información genética que codifica la producción de esta enzima se encuentra en un plásmido transmisible, lo que facilita la rápida diseminación de resistencias entre los *Staphylococcus*.^(26, 27)

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina se engloban bajo el acrónimo MRSA. Las penicilinas y otros antibióticos β -lactámicos destruyen las bacterias por su capacidad de unirse a las proteínas de unión a la penicilina, las cuales constituyen las enzimas responsables de la construcción de la pared de peptidoglucano.^(26, 27)

Hasta hace poco tiempo, las cepas MRSA se restringían únicamente a los entornos hospitalarios; no obstante, a lo largo de los últimos años se han descrito algunos brotes comunitarios por MRSA, a pesar de la diversidad geográfica de los brotes, las cepas parecen presentar una relación clonal y difieren de las cepas de MRSA aisladas en los hospitales.^(26, 27)

Los *Staphylococcus* son microorganismos ubicuos de la piel y las mucosas, y es frecuente su introducción a través de interrupciones de la continuidad de la piel.

Sin embargo, el número de microorganismos necesarios para que se produzca una infección (dosis infecciosa) es generalmente elevado, a no ser que exista un cuerpo extraño en la herida (p. ej., suciedad, astillas, grapas). Una limpieza correcta de la herida y la aplicación de un desinfectante (solución de yodo) permite evitar la mayoría de las infecciones en individuos sanos.^(26, 27)

1.3. *Escherichia coli*

1.3.1. Características

Es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo, móviles, colonias generalmente fermentadoras de glucosa y lactosa con producción de gas, de color rosa intenso, algo planas, secas, con reflejo iridiscente.^(16, 19, 31)

1.3.2.Cultivo

Se puede seleccionar un medio general no selectivo como agar sangre y luego un medio selectivo para enterobacterias como agar Mc Conkey, este medio permite la diferenciación entre fermentadores de lactosa y no fermentadores, e inhibe el crecimiento de organismos Gram-positivos. ^(16, 19, 31)

1.3.3.Infección

Las infecciones causadas por este tipo de bacteria son:

- Infección del tracto urinario (ITU), es una de las causas bacterianas más frecuentes.
 - ✓ Si es limitada a la vejiga, el resultando es cistitis
 - ✓ Si se extiende hasta los riñones provoca una pielonefritis
 - ✓ Si se extiende a la próstata provoca la prostatitis. ^(16, 19, 31)
- Enfermedades diarreicas, presentan diferentes factores de virulencia que pueden producir gastroenteritis y una de estas causas puede ser la presencia de *Escherichia coli*.
- Infecciones intra-abdominales asociadas a perforación intestinal. ^(16, 19, 31)

1.3.4.Adhesinas y toxinas

Adhesinas: por la presencia de fimbrias *Escherichia coli* es capaz de permanecer en el aparato urinario o en el aparato digestivo, como consecuencia de su capacidad de adherencia a las células en estas localizaciones para evitar ser eliminadas por el efecto de arrastre de la orina que se expulsa con la micción o por la motilidad intestinal. ^(16, 19, 31)

Se han identificado algunos factores de virulencia asociados a la enfermedad diarreica como: endotoxinas, adhesinas y enterotoxinas como son: ECEI, ECET y ECEH que son una causa importante de colitis hemorrágica; además de la producción de enterotoxina termolábil y termoestable. ^(16, 19, 31)

1.3.5. Tratamiento, prevención y control

El tratamiento de la infección por patógenos entéricos es sintomático, excepto en la enfermedad diseminada, el tratamiento con antibióticos es guiado por antibiogramas. La antibioterapia se controla con medidas adecuadas de control de infecciones para reducir el riesgo de infecciones nosocomiales (p. ej., restringir el uso de antibióticos, evitando así la utilización innecesaria de sondas urinarias y demás. ^(16, 19, 31)

El mantenimiento de las buenas condiciones de higiene es importante para reducir el riesgo de la exposición a cepas que producen gastroenteritis. ^(16, 19, 31)

1.4. *Pseudomona aeruginosa*

1.4.1. Características

Bacilo Gram-negativo aerobio, capaces de utilizar fuentes de carbono y energía para su crecimiento. ^(13, 16)

1.4.2. Cultivo

El medio para aislamiento selectivo de *Pseudomona aeruginosa* es agar cetrimide y crece bien en la mayor parte de los medios habituales de laboratorio, entre ellos agar Mc Conkey y agar eosina azul de metileno donde no fermenta ningún carbohidrato y es capaz de crecer a 42°C. ^(13, 16)

Pseudomona aeruginosa elabora pigmentos hidrosolubles que colorean el agar: piocianina (azul), pioverdina (verde), piorrubina (rojo) y piomelanina (negro). La cantidad relativa de cada uno de estos pigmentos determina la coloración final del cultivo. ^(13, 16)

Pseudomona aeruginosa es la única especie que produce piocianina (metabolito secundario capaz de matar a otros microorganismos), siendo una característica que se puede utilizar para su diferenciación. ^(13, 16)

1.4.3. Infección

Es un patógeno oportunista distribuida ampliamente en la naturaleza donde puede infectar cualquier parte del organismo siempre que existan las condiciones predisponentes causando:

Infecciones de la piel, conjuntivitis, úlceras corneales, paroniquia (síndrome de las uñas verdes), infección de espacios interdigitales de los pies. En general infecciones nosocomiales como: infecciones urinarias, pulmonares, bacteriemia asociada a catéteres, meningitis, sepsis, infecciones asociadas a exploraciones endoscópicas, endocarditis, infección osteoarticular. ^(13, 16)

1.4.4. Enzimas y patogenicidad

Pseudomonas aeruginosa posee un gran número de factores de virulencia que se encuentran implicados en los mecanismos de patogenicidad del microorganismo.

- Fimbrias, que permiten su adherencia a células epiteliales.
- Cápsula polisacárida, que la protegen de la fagocitosis.
- Capacidad de sobrevivir en medios con bajo contenido de nutrientes, especialmente en ambientes húmedos.
- Las proteasas y elastasas extracelulares contribuyen a la destrucción del tejido en los lugares de infección.

Es así se ha logrado aislar de agua destilada y de soluciones desinfectantes. ^(13, 16)

1.4.5. Tratamiento, prevención y control

El tratamiento antimicrobiano de las infecciones por *Pseudomonas* es frustrante, debido a que las bacterias suelen presentar resistencia a la mayoría de los antibióticos, incluso microorganismos sensibles se pueden volver resistentes durante el tratamiento al inducir la formación de enzimas que inactivan los antibióticos (p. ej., β -lactamasas)

o la mutación de genes que codifican la porinas de la membrana externa. Se necesita generalmente una combinación de antibióticos para el éxito en el tratamiento de los pacientes con infecciones graves. La administración de gammaglobulina hiperinmune y de transfusiones de neutrófilos para aumentar la función inmunitaria alterada en algunos pacientes. ^(13, 16)

Las prácticas eficaces para el control de la infección se deben centrar en prevenir la contaminación de los equipos estériles, como los de terapia respiratoria o las máquinas de diálisis y la contaminación cruzada de los pacientes por el personal sanitario. También se debe evitar el uso inadecuado de los antibióticos de amplio espectro, debido a que este uso puede suprimir la flora microbiana normal y permitir de esa manera el crecimiento excesivo de *Pseudomonas*. ^(13, 16)

1.5. METODOS DE EXTRACCIÓN DE DROGAS

1.5.1. Métodos que establecen una concentración de equilibrio

Los métodos que establecen la concentración de equilibrio son la maceración y la turboextracción ⁽³²⁾

1.5.1.1 Maceración

Es la operación en la cual la extracción de la materia prima vegetal es realizada en un recipiente cerrado a temperatura constante durante horas o días, siendo agitado sin renovación del líquido extractor. Por su naturaleza, no conduce al agotamiento de la droga vegetal debido a la saturación del líquido extractante y el establecimiento de un equilibrio entre el medio extractor y el interior de la célula. Éste método es solo utilizable para la producción de tintura. ⁽³²⁾

1.5.1.2 Bimaceración

Es el caso donde la droga es extraída por segunda vez con solvente fresco.

⁽³²⁾

1.5.1.3 Digestión

Es una maceración a elevada temperatura entre los 40 a 50°C. ⁽³²⁾

1.5.1.4 Extracción ultrasónica

Tratamiento de la droga y el solvente con ondas ultrasónicas. ⁽³²⁾

1.5.1.5 Extracción con energía eléctrica

Proceso donde se utiliza un campo electromagnético para incrementar la extracción. ⁽³²⁾

1.5.1.6 Turboextracción

Es una técnica basada en la extracción con reducción simultánea del tamaño de la partícula como resultado de las elevadas fuerzas de cizallamiento. La reducción drástica del tamaño de la partícula y la consiguiente ruptura de la célula, favorece la rápida disolución de las sustancias activas, en esas circunstancias la difusión de las sustancias disueltas a través de una membrana celular es relegada a un plano secundario, resultado el tiempo de extracción del orden de los minutos para el agotamiento de la droga. A ese incremento de la eficiencia se suma la simplicidad, la rapidez y la versatilidad de la técnica, que permite una fácil utilización de ésta técnica en el procesamiento de drogas en pequeña y mediana escala. ⁽³²⁾

Entre los inconvenientes que se señalan a la turboextracción cabe mencionar:

- ◆ La difícil separación de la solución extractiva por filtración.
- ◆ La generación de calor durante el procedimiento que obliga a controlar la temperatura, restringiendo su empleo en líquidos volátiles.
- ◆ Limitaciones técnicas cuando se trabaja con cortezas, raíces y materiales de elevada dureza. ⁽³²⁾

1.5.2. Métodos para la extracción exhaustiva de drogas

Entre los métodos de extracción exhaustiva de droga están:

1.5.2.1 Percolación simple

Se procede de la siguiente forma: consiste en hacer pasar a través de una droga seca colocada en un percolador, previamente macerada, la solución hidroalcohólica de selección (en el caso de esa droga específica), obteniendo un extracto fluido o una tintura según la forma farmacéutica a elaborar con esta. ⁽³²⁾

1.5.2.2 Re percolación

Es una percolación en la que el extracto obtenido de un percolador sirve como solución hidroalcohólica del siguiente, y así sucesivamente. Esta puede ser realizada de varias formas y las más utilizadas son: ⁽³²⁾

1.5.2.2.1 Re percolación fraccionada

Este método se basa en la división de la droga en 3 fracciones: una que contiene el 50%, otra el 30% y otra el 20% respectivamente, macerándose en 3 percoladores diferentes, utilizando como menstuo del siguiente percolador el extracto obtenido del anterior, o sea, en el percolador donde se ha macerado el 50% de la droga se obtienen el 20% del extracto total a obtener, del segundo percolador que contiene el 30% del total de la droga se obtiene el 30% del extracto total y, en el tercer percolador, que contiene el 20% de la droga, se obtienen el 50% del extracto total a obtener. Se unen las tres fracciones, las cuales deben corresponder en unidades de volumen al total de la droga utilizada. ⁽³²⁾

1.5.2.2.2 Re percolación en serie con varias extracciones

Este método se basa en el principio de enriquecimiento del menstuo hidroalcohólico, por paso forzado de la droga a la solución, al recircular tantas veces

como extracciones a realizar. (p.ej., en caso de re percolación con cuatro extracciones el menstro hidroalcohólico pasa 4 veces por el mismo percolador).⁽³²⁾

1.5.2.2.3 Extracción a contracorriente

La extracción a contracorriente es un proceso continuo en la cual la droga seca se mueve contrariamente al solvente.⁽³²⁾

1.5.2.2.4 Percolación a presión

La extracción en este caso se basa en el uso de la fuerza de la presión para empujar el solvente a través del percolador.⁽³²⁾

1.5.2.2.5 Percolación a vacío

El uso de vacío para agilizar el paso del solvente a través de la droga.⁽³²⁾

1.5.2.3 Extracción supercrítica con gases

En los últimos años los gases han sido objeto de estudio y aplicaciones como solventes, ya que su empleo permite obtener productos libres de contaminantes químicos. La capacidad extractora de los gases para materiales sólidos volátiles y poco volátiles resulta muy elevada en muchos casos y está influenciada por la densidad del gas. En las cercanías de la temperatura y la presión crítica la densidad alcanza valores comparables a densidades de líquidos. En dicho estado comienza a incrementarse el poder solvente y cada gas presenta una zona de temperatura y presiones por encima del punto crítico en la cual la densidad variada.⁽³²⁾

En particular, el CO₂ es de interés especial para las industrias de alimentos, farmacéuticas y bioquímicas; es asimilable para humanos y su temperatura crítica de 31.1°C permite el procesamiento de sustancias termolábiles sin descomposición o desnaturalización. La selectividad y poder solvente del CO₂ pueden ser modificadas con la adición de un cosolvente.⁽³²⁾

1.5.2.4 Extracción por Soxhlet

Es una extracción sólido-líquida, el cual se usa para extraer un producto natural de su fuente primaria, se selecciona el disolvente y el proceso aprovecha el alto gradiente de concentración generada durante el proceso de evaporación-condensación-difusión. ⁽³²⁾

El extractor Soxhlet original fue desarrollado por un químico agrícola alemán llamado Franz Von Soxhlet, a inicios del siglo XX. Este equipo consta de un refrigerante o condensador, extractor Soxhlet propiamente y matraz.

Por el condensador circula un líquido frío el cual a su vez tiene 2 conexiones las cuales permiten que se conecten mangueras tanto para el ingreso y salida del líquido refrigerante. El extractor está dividido en 2 secciones, en una de ella se coloca la muestra y en la otra sección donde se almacena el extracto; tiene 2 brazos de vidrio uno de ellos une las 2 secciones y es por donde asciende el solvente el cual luego de que llega al tubo refrigerante cae sobre la muestra y el segundo brazo es un tubo delgado un sistema de sifón que evacúa el líquido extractivo cuando se llena el extractor cayendo al matraz o frasco de recuperación. En un inicio de la extracción el líquido extractivo es oscuro y posteriormente este líquido (solvente) empieza a aclarar, lo que nos indicarnos que el material vegetal fue agotado y proceder a culminar el proceso (Figura N° 2). ⁽²³⁾

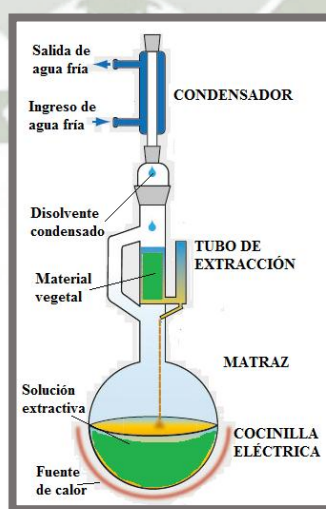
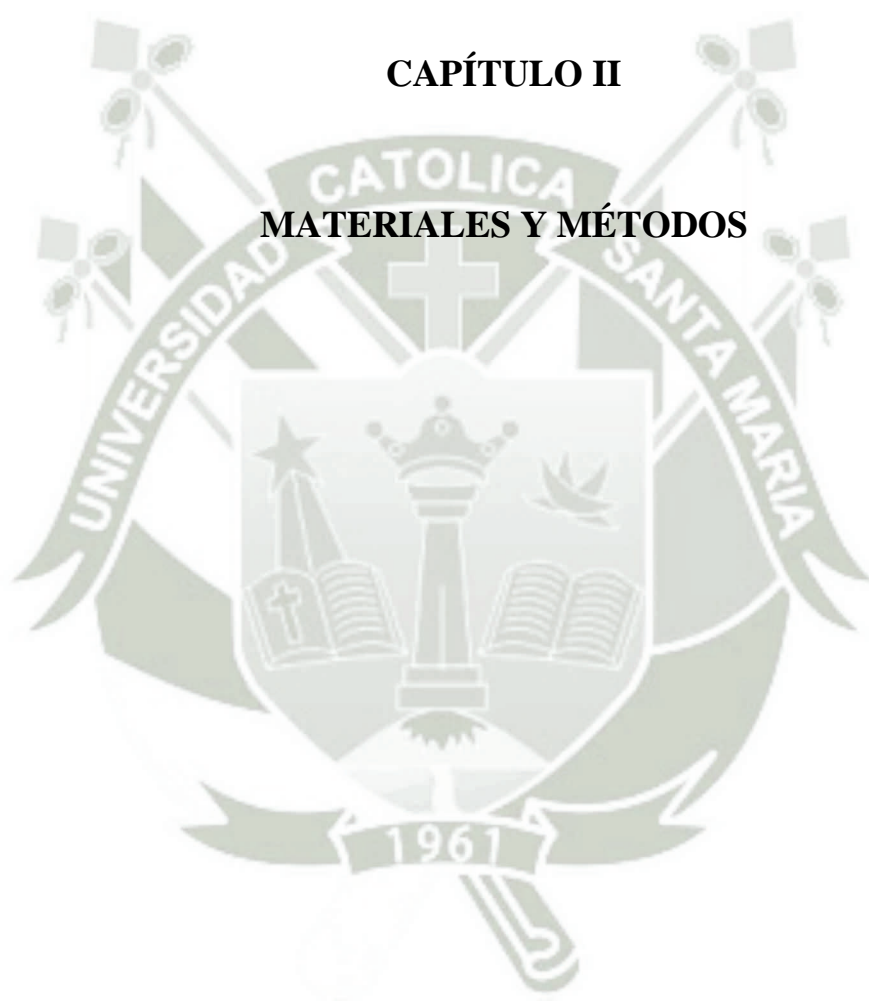


Figura N° 2: Extractor Soxhlet

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS



2.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO

El trabajo de campo del presente estudio microbiológico se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, durante los meses de abril a junio del 2015.

2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1. Material vegetal

Se utilizó las partes aéreas (hojas) *Lepidium chichicara* conocida comúnmente como (jhanukara), la cual fue identificada botánicamente por el *Herbarium arequipense* de la UNSA (Ver Anexo 3)

2.2.2. Material microbiológico

Se utilizaron las siguientes cepas pertenecientes al reino monera, las cuales fueron obtenidas de Consorcio Industrial de Arequipa y son:

- ◆ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 JUN 2015
- ◆ *Escherichia coli* ATCC 8739 MAR 2016
- ◆ *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 JUN 201. (Ver Anexo 4)

2.3. MATERIALES DE LABORATORIO

2.3.1. Material de vidrio

- ◆ Cuba cromatográfica
- ◆ Balón
- ◆ Matraz Erlenmeyer
- ◆ Pipetas
- ◆ Placas Petri de 10x1.5 cm

- ◆ Tubos de ensayo
- ◆ Vasos de precipitados
- ◆ Luna de reloj

2.3.2. Equipos

- ◆ Autoclave BUCHI, Modelo: R-114
- ◆ Balanza DAKOTA
- ◆ Cocina eléctrica GALLENHAMP
- ◆ Horno MEMMERT, Modelo: U15
- ◆ Estufa J.P.SELECTA
- ◆ Estufa de secado y esterilización FANEM, Modelo: 315 SE
- ◆ Lámpara ultravioleta CAMAG, Modelo: CA004
- ◆ Refrigerador BOSCH, Modelo: KDN43
- ◆ Micropipeta
- ◆ Mechero Bunsen

2.3.3. Medios de cultivo

- ◆ Agar tripticasa-soja Merck
- ◆ Agar Müeller Hinton Merck
- ◆ Caldo peptonado Merck

2.3.4. Reactivos

- ◆ Acetato de etilo (Merck; P.A.)
- ◆ Ácido acético (JT Baker; P.A.)
- ◆ Ácido fórmico (JT Baker; P.A.)

- ◆ Ácido sulfúrico concentrado (Merck; Q.P.)
- ◆ Alcohol etílico (JT Baker; P.A.)
- ◆ Cloroformo (JT Baker; P.A.)
- ◆ Tolueno (Merck; QP)
- ◆ Lauril sulfato de sodio (Merck; P.A.)
- ◆ Metanol (JT Baker; P.A.)
- ◆ Reactivo de Liebermann Burchard (UCSM; H-102)
- ◆ Reactivo de Dragendorft A y B (UCSM; H-102)
- ◆ Vainilla (UCSM; H-102)
- ◆ Reactivo de cloruro de aluminio (UCSM; H-102)
- ◆ Reactivo de cloruro férrico (UCSM; H-102)

2.3.5. Otros materiales

- ◆ Algodón
- ◆ Mascarilla y gorro de laboratorio
- ◆ Espátulas de acero inoxidable
- ◆ Gasa estéril
- ◆ Gradilla para tubos de ensayo
- ◆ Guantes estériles de látex talla 6 1/2
- ◆ Lápiz marcador
- ◆ Manta de asbesto
- ◆ Mortero de porcelana
- ◆ Papel Kraft
- ◆ Plumón marcador indeleble

- ◆ Trípode
- ◆ Soporte metálico y pinzas

2.4. MÉTODOS

2.4.1. Obtención y tratamiento del material vegetal

2.4.1.1 Recolección

Para la recolección de los especímenes de *Lepidium chichicara* (jhanukara), se realizó en la localidad de Chilina, perteneciente al distrito de Cayma, Arequipa; entre las 6 y 8 de la mañana. Enseguida fue llevada al laboratorio para su posterior estabilización del material vegetal.

2.4.1.2 Selección y estabilización

Para la estabilización en primer lugar se procedió a seleccionar las hojas del material vegetal a estabilizar, retirando cualquier material que no corresponde a la especie *Lepidium chichicara* (jhanukara).

Posteriormente la estufa fue previamente atemperada a 50°C, alcanzada esta temperatura se introdujo el material vegetal y permaneció dentro de la estufa 4 minutos (Figura 3).



Figura N°3. Hojas de *Lepidium chichicara* Desv. (jhanukara)

2.4.1.3 Deseccación

Después de la estabilización del material vegetal se procedió a desecación y se realizó mediante el método conocido como calor artificial, utilizando la estufa de desecación. El proceso fue a una temperatura de 38°C, durante 24 horas, para un lote de 40 gramos de material estabilizado.

2.4.1.4 Molienda

Para aumentar la superficie de contacto droga-disolvente se trituró el material vegetal utilizando un mortero y pistilo de porcelana. La trituración hecha fue a un grado moderado, y se realizó inmediatamente antes del proceso de extracción por el método Soxhlet. (Figura 4)



Figura 4. Hojas trituradas de *Lepidium chichicara* Desv. (jhanukara)
Grado moderado

2.4.1.5 Extracción

La extracción se realizó mediante equipo extractor Soxhlet, que es un método de extracción continua para materias sólidas. Los disolventes utilizados para la extracción de las partes aéreas de *Lepidium chichicara* (jhanukara), fue un disolvente de naturaleza polar como el alcohol etílico y otro apolar el cual es cloroformo.

Procedimiento

La extracción de *Lepidium chichicara* (jhanukara) se realizó con equipo Soxhlet utilizándose 2 disolventes (alcohol etílico y cloroformo) ejecutándose de manera paralela; y se procedió a pesar 10 gramos de material vegetal estabilizado, seco y triturado, éste fue acondicionado en un papel filtro y atado con un pabilo el cual se depositó en el recipiente, luego se añadió al balón del equipo 150ml de disolvente (alcohol etílico o cloroformo).

Posteriormente se procedió a la extracción etanólica y clorofórmica la cual fue realizada a una temperatura de 60°C y 50°C respectivamente, ejecutándose 16 ciclos para cada uno y entonces los solventes ascienden por el brazo que conectan las 2 cámaras del equipo Soxhlet, hasta que llega al refrigerante el cual cae sobre la muestra y se almacena en la cámara de extracción y cuando de llena la cámara llega a un punto en que cae por el sifón hasta el frasco de recuperación; representando esto 1 ciclo.

Cabe resaltar que la extracción con cloroformo fue rápida pues cada ciclo duró alrededor de 10 a 15 min, a diferencia de la extracción con alcohol etílico los ciclos de extracción tuvieron una duración aproximada de 20 minutos. Culminado este procedimiento se retira la fuente de calor y el balón con el contenido se trasvasa a otro balón el cual será posteriormente concentrado. (Figura 5)



Figura 5. Extracción etanólica y clorofórmica de *Lepidium chichicara* Desv. (jhanukara) con equipo Soxhlet.

2.4.1.6 Concentración

La concentración tuvo como finalidad eliminar el disolvente y con ello incrementar la relación entre el complejo activo disuelto y el disolvente, producto de la concentración es el extracto clorofórmico y etanólico. Este procedimiento se realizó mediante el uso de un rotavapor que permite la eliminación del disolvente al vacío.

Procedimiento

Cuando se concluye la extracción de los componentes de las hojas de *Lepidium chichicara* (jhanukara) provenientes de la extracción con el equipo Soxhlet las cuales fueron arrastradas por los solventes utilizados (etanol y cloroformo), se vertieron los extractos en el balón del equipo rota vapor, ajustándose a una velocidad de rotación de 60 rpm y a una temperatura de 60°C y 50°C respectivamente, esto con la finalidad de no llegar a una temperatura igual al punto de ebullición de los solventes ya que podría haber deterioro de la muestra (extracto).

Se procede con la concentración propiamente en el equipo rota vapor y antes de que el extracto llegue a sequedad se retiró el balón del baño María y se reduce la velocidad de giro hasta detener la agitación, finalmente se retiró el balón del equipo para luego traspasar a un beacker debidamente tarado. (Figura 6)



Figura 6. Concentración del extracto de *Lepidium chichicara* Desv. en equipo rota-vapor

2.4.2. Técnica de identificación de metabolitos secundarios

2.4.2.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina es una de las técnicas más importantes del laboratorio químico utilizadas para la separación e identificación de los componentes de una mezcla compleja basándose en la distribución de la muestra entre las 2 fases, denominadas *fase estacionaria*, y la otra, *fase móvil*; y el principio de separación es la diferencia de afinidad de cada especie por cada una de las fases y la mayor ventaja es la gran capacidad de separación y la rapidez del proceso en general

2.4.2.1.1 Fase estacionaria

La fase estacionaria está conformada por placa de sílica gel, de 20 x 15 cm, las que fueron cortadas en pequeños cromatofolios de 10 x 3 cm, luego de recortarlos se procedió a delimitar la placa mediante el uso de un lápiz, señalando la línea de sembrado y se procede al sembrado de la muestra propiamente en cada uno de los cromatofolios previamente delimitados luego de ello se poner en contacto con la fase móvil.

2.4.2.1.2 Fase móvil

Con el fin de identificar a los metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) se realizaron las siguientes mezclas de disolventes empleados para la construcción de la fase móvil y son como se muestra a continuación.

❖ Identificación general (terpenos)

- Acetato de etilo: metanol: agua.
- Relación → 97: 20: 10

❖ Identificación de triterpenoides y esteroides

- Tolueno: acetato de etilo.
- Relación → 95: 5

❖ Identificación de taninos

- Metanol: agua.
- Relación → 70: 30

❖ Identificación de flavonoides

- Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua.
- Relación → 100: 11: 11: 26

❖ Identificación de alcaloides

- Ácido acético: metanol: agua.
- Relación → 70: 10: 20.

2.4.2.1.2.1 Desarrollo cromatográfico

Para el desarrollo cromatográfico en primer lugar se procedió al sembrado de los extractos (etanólico y clorofórmico) en placas de sílica gel, mediante el uso de un capilar procurando la distribución uniforme del extracto sobre la línea del sembrado y luego se dejaron secar a temperatura ambiente.

Los extractos sembrados sobre la placa de sílica gel se introducen en la cámara de revelado, la cual se encontraba previamente saturada con la fase móvil. Se taparon herméticamente las cubas de desarrollo y se observa como la fase móvil disuelve la muestra y asciende sobre las placas cromatográficas las cuales van arrastrando los componentes de la muestra que tienen mayor afinidad por ésta fase y se evidencia por la presencia de diferentes colores que aparecen mientras asciende la fase móvil. Cuando el disolvente alcanza la línea del frente, éste se retira y se da por concluido el desarrollo cromatográfico. Como se muestra en Figura 7.



Figura 7: Desarrollo cromatográfico de *Lepidium chichicara* Desv. (jhanukara)

2.4.2.1.2.2 Reveladores en cromatografía en capa fina

Al término del desarrollo cromatográfico se retiran los cromatofolios de la cuba de desarrollo y esperamos unos minutos a que sequen las placas cromatográficas y se continúa con el revelado de los mismos para luego ser visualizados en una lámpara UV, utilizándose los siguientes reveladores:

❖ Identificación general (terpenos)

- Solución A: ácido sulfúrico al 5% en etanol.
- Solución B: vainillina al 1% en etanol.

❖ Identificación de triterpenoides y esteroides

- Reactivo de Liebermann Burchard

❖ Identificación de taninos

- Cloruro férrico al 1% en etanol.

❖ Identificación de flavonoides

- Cloruro de aluminio al 5% en etanol.

❖ Identificación de alcaloides

- Reactivo de Dragendorff

2.4.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos

La acción antimicrobiana es la capacidad que tiene la sustancia antibiótica para inhibir el crecimiento de determinado microorganismo, por lo que en primera instancia el objetivo de esta evaluación es determinar si los extractos (etanólico y cloroformico) de *Lepidium chichicara* (jhanukara) tienen algún efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

El método utilizado para realizar esta evaluación fue **excavación-placa-cultivo**, que consiste en depositar la sustancia a investigar con potencial antimicrobiano en un hoyo realizado en una placa de agar Muller Hinton ya solidificado, de modo tal que esa difundirá hacia el medio circundante hasta un punto en el que la concentración de la sustancia antibiótica ya no difunde y por lo tanto ocurre una inhibición del crecimiento microbiano y ésta se define formando alrededor del hoyo un halo de inhibición. ^(12, 18)

El tamaño del halo de inhibición proporciona indicios de la presencia o ausencia de una relativa actividad inhibitoria de los extractos (etanólico y cloroformico) de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a una cepa en particular.

2.4.3.1 Preparación del inóculo

Se tomaron 4 a 5 colonias de las cepas en particular (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*) de manera independiente con un asa de siembra y se depositaron cada una en un tubo de ensayo estéril conteniendo 5mL de caldo peptonado también estéril.

La turbidez del inóculo se ajustó conforme al tubo N° 5 de la escala de Mc Farland, que equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL y para ello se compararon la turbidez de ambos tubos.

Luego se realizó una dilución de 0.1 mL de este inóculo en 9.9 mL de caldo peptonado estéril, dándonos una concentración final para el inóculo de 10^6 UFC/mL, el cual será utilizado en la construcción de un cuadro de diluciones y su posterior preparación. A continuación se muestran la igualación del inóculo 10^6 UFC/mL frente al tubo N° 5 de la escala de Mc Farland, mostrados en la siguiente Figura 8.



Figura 8: Comparación de la turbidez del inóculo 10^8 UFC/mL frente al tubo N° 5 de la escala de Mc Farland

2.4.3.2 Preparación de las diluciones del extracto

- Para la preparación de las diluciones de la muestra se consideró como peso inicial del extracto el de 0.5g o 500mg, que fueron disueltos en 2ml de una solución de lauril sulfato de sodio al 1%; teniendo como concentración final 250mg/mL del extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara).
- Se toma 1mL de caldo peptonado estéril y se deposita en los 6 tubos
- Luego se añade 1mL de las diluciones que contienen como concentración final 250mg/mL al primer tubo, se mezcla bien y se saca 1mL de esta disolución al 2do tubo y así sucesivamente hasta el tubo N°5 descartándose esta última disolución.
- El volumen final hasta el momento es de 1mL para cada tubo

- Luego se añade 1mL del inóculo de 10^6 UFC/mL a cada tubo incluyendo al tubo N°6 el cual solo contiene al diluyente (lauril sulfato de sodio al 1% y caldo peptonado)
- El segundo volumen es de 2 mL y estas son las concentraciones a las que se trabajarán posteriormente.

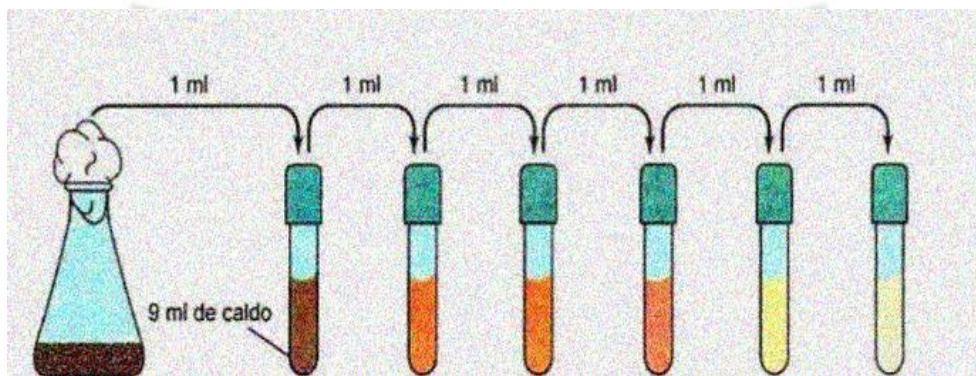


Figura 9: Diluciones de la muestra para la construcción de un cuadro de diluciones

2.4.3.3 Siembra de las diluciones

- Para iniciar la inoculación del agar Mueller Hinton, previamente se preparó el medio y cuando se solidifican, se procedió a inocular el medio con la ayuda de un hisopo de mango largo estéril, introduciendo al tubo de ensayo el cual contiene el líquido inoculante y al retirar del tubo de ensayo se realiza una ligera presión contra la pared del tubo con la finalidad de agotar el líquido excedente
- Luego la placa fue dividida en cuatro porciones y con la ayuda de un lápiz marcador y en cada porción se realizó un hoyo de más o menos de 8mm de diámetro.

- Luego de inocular la superficie del agar Muller Hinton preparado se deja secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Y se procede con el sembrado de cada uno de los tubos en una placa de agar Mueller Hinton depositándose en cada hoyo 100µL de cada concentración final, se dejó secar aproximadamente durante 15 minutos y luego se procedió a incubar a 37°C durante 24 horas en posición invertida (los sembrados se realizaron por triplicado para cada cepa y extracto ensayado) utilizándose el cuarto hoyo como control del proceso de sembrado.
- Transcurrido este periodo se efectuó la medición de los halos de inhibición.

2.4.4. Método para determinación la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración mínima eficaz de un agente con potencial antibiótico para detener el crecimiento de un microorganismo, utilizándose el método de **dilución en tubo**; para ello se somete al microorganismo en particular a distintas concentraciones de la sustancia activa que se encuentra disuelta en los tubos de ensayo con medios de desarrollo bacteriano. Luego de la incubación se debe observar el mayor o menor crecimiento del microorganismo según el grado de turbidez (velo blanquecino) presente en el tubo, como es de esperar este método permite observar la detención del crecimiento sin diferenciar el carácter microbicida o microbiostático. ^(12, 18).

En la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) se tuvo que considerar las concentraciones a la que los microorganismos presentan algún halo de inhibición y a partir de esta concentración se realizan nuevas concentraciones decrecientes con el fin de determinar la concentración mínima bactericida (CMI) y posteriormente la determinación de la concentración bactericida mínima (CMB) e identificar si presentan efecto bactericida o bacteriostático.

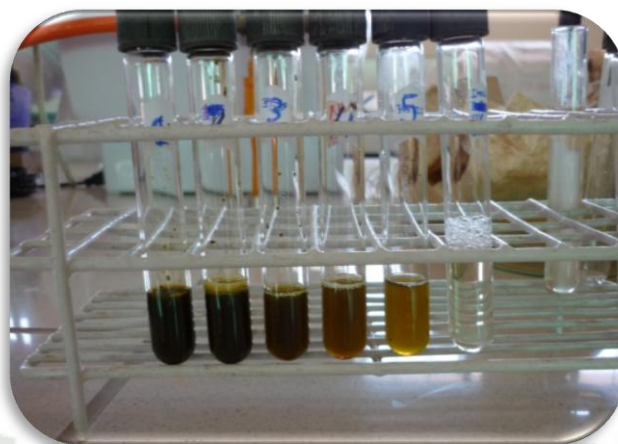


Figura 10: Diluciones para la determinación de la CMI de *Lepidium chichicara*. (jhanukara)

2.4.4.1 Preparación del inóculo

- Se tomaron 4 a 5 colonias con un asa de siembra de las cepas en particular y se depositaron cada una en un tubo de ensayo estéril conteniendo 5mL de caldo peptonado también estéril se ajustó conforme al tubo N°5 de la escala de Mc Farland, que equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL.
- Luego se realizó una dilución de 0.1ml de este inóculo 10^8 UFC/mL en 9.9mL de caldo peptonado estéril, dándonos una concentración final para el inóculo de 10^6 UFC/mL.

2.4.4.2 Preparación de las diluciones del extracto

Se calculan nuevas concentraciones decrecientes y para ello, la presencia o ausencia del halo de inhibición fue importante tomándose la concentración máxima y mínima para determinar a partir de que concentración se debía de recalcular y así determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se utilizan las cepas que en la prueba para la determinación de la actividad antimicrobiana mostraron halos de inhibición positivos al extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) es decir se trabaja con las cepas de *Staphylococcus aureus* y

Escherichia coli pero no con *Pseudomona aeruginosa* ya que los extractos no muestran ninguna actividad inhibitoria.

El procedimiento en cuanto a la preparación de las diluciones en los tubos de ensayo para la determinación de la (CMI) es como sigue a continuación:

- En un matraz se prepara una solución estéril de caldo peptonado y se reparte a los diferentes tubos estériles.
- Luego agregar 1mL del extracto a las concentraciones decrecientes calculadas y homogenizar.
- Enseguida se añade 1mL del inóculo previamente preparado a los tubos de ensayo conteniendo la solución estéril de caldo peptonado y el extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) a las diferentes concentraciones recalculadas.
- Finalmente se homogeniza la solución y se incuban los tubos a 37°C durante 24 horas.



Figura N° 11: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) extracto etanólico

2.4.5. Método para determinación la concentración mínima bactericida (CMB)

Este es el tercer método utilizado en la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (janukara)

Se emplea el mismo método de dilución en agar y tiene como objetivo determinar la concentración mínima bactericida de una sustancia problema con potencial antimicrobiano que sea capaz de inducir la muerte celular de un 99.9% de microorganismos patógenos y además determinar si el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (janukara) pudiera tener un efecto bactericida o bacteriostático frente a la cepa en particular de la cual se esté evaluando su actividad antimicrobiana.

Se trata de una prueba post CMI, es decir se realiza un subcultivo de cada uno de los tubos en los que no presentaron turbidez “sin velo”

2.4.5.1 Siembra de los extractos post CMI

- Se prepara en un matraz el agar Muller Hinton, una vez autoclavado se reparten en placas petri estériles y se incuba para verificar que esté libre de patógenos pues es el agar en donde se hace el resembrado.
- Después de la incubación en la prueba de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se toman los tubos los cuales resultaron sin crecimiento bacteriano “sin velo” para el resembrado
- Y se procede con el sembrado por el método siembra de los 4 cuadrantes en cada placa.
- El subcultivo se hizo por triplicado por cada tubo que no presenta “velos blanquecinos” y por cada cepa en particular.
- Luego se incuban las placas sembradas de manera invertida a 37°C por un periodo de 24 horas y se realiza esto, con la finalidad de detectar cepas viables.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



A continuación se presenta los resultados del presente trabajo, donde se evalúa la actividad antimicrobiana de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) que parte desde la adquisición del vegetal el cual es motivo de investigación, posteriormente se realiza la extracción del material vegetal, siendo el extracto etanólico quien presentó mayor rendimiento y mayor “riqueza” en cuanto a la composición fitoquímica luego observándose la presencia de halos de inhibición del extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre las 3 cepas en estudio, para luego determinar la CMI y CMB de las mismas.

3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la obtención de los extractos se utilizó el equipo de extracción Soxhlet posteriormente se utilizó el rotavapor para concentrar el extracto y eliminar el solvente extractor; observándose que el extracto obtenido con cloroformo da una coloración verdosa probablemente se deba a la presencia del pigmento clorofila y sustancias resinosa y a diferencia de éste el extracto etanólico presenta una coloración pardo rojiza lo que estaría indicando la presencia no solo de clorofila a y b sino también otros pigmentos como los carotenos y xantofilas las cuales dan coloraciones naranja a rojizo; y estas características organolépticas se presentan en el Cuadro 1 y Figura 12.

CUADRO N° 1
CARACTERES ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS DE
***Lepidium chichicara* (jhanukara)**

CARACTERÍSTICAS	TIPO DE EXTRACTO	
	Etanólico	Clorofórmico
Olor	Característico	Característico
Color	Pardo rojizo	Verde oscuro
Aspecto	Turbio	Ligeramente turbio

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

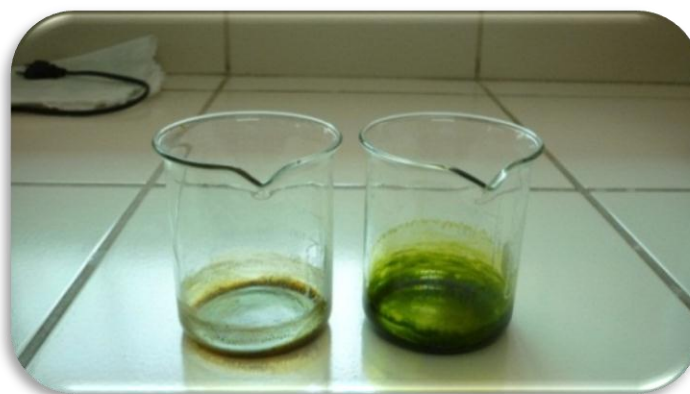


Figura 12: Extracto etanólico y clorofórmico de *Lepidium chichicara* (jhanukara)

El extracto obtenido después de la concentración en el equipo de rotavapor se traspasó a beakers debidamente tarados para obtener el peso real de cada uno de los extractos y poder calcular el porcentaje de rendimiento de los extractos de *Lepidium Chichicara* (jhanukara).

El porcentaje de rendimiento se calculó utilizando la siguiente fórmula:

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

Para garantizar la obtención de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) en cantidad suficiente se realizaron las extracciones por triplicado obteniéndose como promedio final los porcentajes de rendimiento para cada uno de los dos extractos realizados mediante el equipo extractor Soxhlet, los disolventes utilizados son alcohol etílico y cloroformo, y es el alcohol etílico quien posee mayor porcentaje de rendimiento con un 18.13%, sin embargo para el extracto clorofórmico el porcentaje de rendimiento fue solo un 2.2%, lo que permitió hallar el rendimiento del método utilizado, como lo observamos en el Cuadro 2.

CUADRO 2

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) POR EQUIPO EXTRACTOR SOXHLET

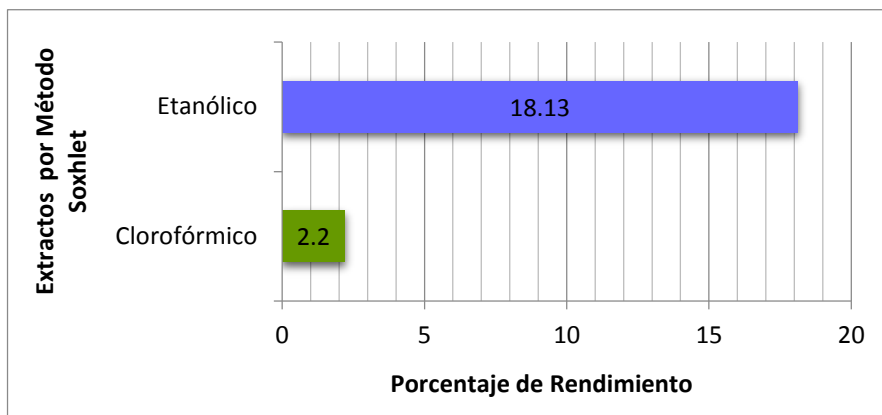
Tipo extracto	Descripción	1ª Extracción	2ª Extracción	3ª Extracción
Extracto etanólico	Droga (g)	10	10	10
	Extracto seco(g)	1.82	1.75	1.87
	Rendimiento	18.2%	17.5%	18.7%
	Promedio	18.13%		
Medidas de dispersión	Desviación estándar	0.06		
	Coefficiente de variación	3%		
Extracto clorofórmico	Droga (g)	10	10	10
	Extracto seco(g)	0.2	0.25	0.21
	Rendimiento	2%	2.5%	2.1%
	Promedio	2.2%		
Medidas de dispersión	Desviación estándar	0.02		
	Coefficiente de variación	12		

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura 13, se observa los resultados de los porcentajes de rendimiento de ambos extractos por tal motivo se procede a elegir el extracto de mayor rendimiento siendo este el extracto etanólico con 18.13%, probablemente debido a que el etanol por su polaridad arrastre y/o extraiga compuestos del material vegetal y que estos mismos permitan que los solventes de acuerdo a su naturaleza polar o apolar puedan ser extraídos o no.

Al comparar el porcentaje de rendimiento del extracto etanólico y clorofórmico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) por el método de extracción Soxhlet frente al porcentaje de rendimiento de *Rivina Humilis* (flor blanca) donde se evaluó el rendimiento del mismo método de extracción también se observa que es el extracto etanólico quien presentó mayor rendimiento, lo cual coincide también con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, además de indicar que esta planta también es poco aromática. ⁽³⁸⁾

FIGURA N° 13

**PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE
EXTRACCIÓN SOXHLET DE *Lepidium chichicara* (jhanukara)**

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

3.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (CCF) fue la técnica utilizada en este trabajo para identificar la composición de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana presentes en los dos extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara).

3.2.1. Identificación general (terpenos).

Esta cromatografía busca poder separar compuestos tipo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos con grupos funcionales polares; para ello se utilizó como fase móvil una mezcla de acetato de etilo, metanol y agua; cuyas proporciones se describieron en el capítulo anterior.

Luego de retirar los cromatofolios sembrados de la cuba de desarrollo, se pulverizan con el revelador A (ácido sulfúrico al 5% en alcohol etílico), se dejan secar unos minutos y enseguida pulverizó con el revelador B (Vainillina al 1% en etanol absoluto), sometiéndolas enseguida a la estufa de desecación a 110°C x 8 min. Luego se observan las cromatoplas en una lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm y se observan manchas rosas y moradas en ambas placas aunque en mayor número en

el caso del cromatofólio sembrado con el extracto etanólico y esto se puede ver en la Figura 14.

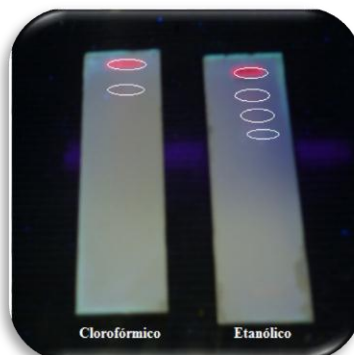


Figura N° 14: Cromatoplaca para identificación general (terpenos)

3.2.2. Identificación de saponinas esteroidicas y triterpenicas

Para el caso de esta segunda cromatografía se busca la separación e identificación de terpenos, saponinas terpenoidales y aceites esenciales. Después del desarrollo de los cromatofolios, estas fueron pulverizadas con el reactivo revelador de Liebermann-Burchard; las cuales fueron llevadas a una estufa de desecación a 110 °C x 10 min, y se observaron manchas en ambos cromatofolios pero la presencia de un mayor número de manchas se evidencia con el extracto etanólico.

De esta manera se pudo determinar la presencia de compuestos tipo esteroides debido a las manchas azules (saponinas esteroidicas) y la presencia de manchas rosas (saponinas triterpénicas) (Bruneton 2001), (Carbajal 2009) ^(6, 42), tal como se observa en la siguiente Figura 15.

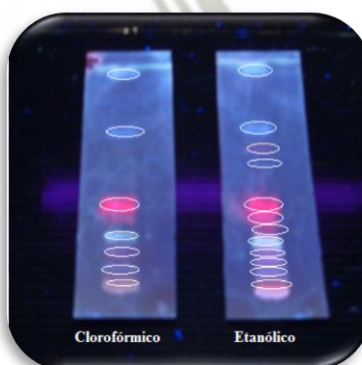


Figura N° 15: Cromatoplaca para identificación de saponinas esteroidicas y triterpenicas

3.2.3. Identificación de taninos

En esta cromatografía se busca separar e identificar compuestos polifenólicos (taninos). Finalizando el desarrollo cromatográfico en la cuba de desarrollo se deja secar la placa sobre una luna de reloj enseguida se pulveriza con el revelador para finalmente ser secado en una estufa de desecación a 110°C x 10 min, observándose manchas marrones en ambas siembras pero con mayor presencia en la realizada con extracto etanólico, este resultado es similar al que presenta; el extracto etanólico de semillas *Carica papaya L* (papaya)⁽⁹⁾ donde también se realizó CCF, observándose las mismas manchas; probablemente en el extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) estén presentes los taninos condensados como uno de los representantes de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Llanos 2010), (Domingo D., 2003)^(36, 41, 42) de esta manera observamos la presencia de taninos en la siguiente Figura 16.



Figura N° 16: Cromatoplaca para Taninos

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

Para la evaluación del efecto antimicrobiano de *Lepidium chichicara* (jhanukara) se realiza un cuadro a diferentes concentraciones para la preparación de las diluciones las cuales son utilizadas en la determinaron los halos de inhibición del extracto etanólico frente a las 3 cepas en estudio.

CUADRO N° 3

DILUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

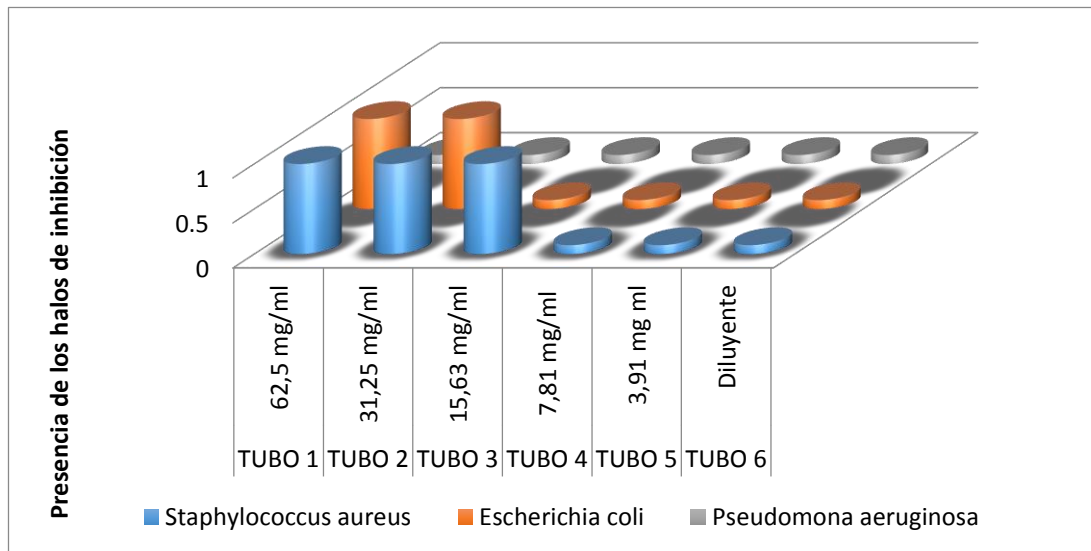
DESCRIPCIÓN	NUMERO DE TUBOS					
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Caldo peptonado (mL)	1	1	1	1	1	1
Extracto seco 250 mg/mL	1	1	1	1	1	Diluy
Volumen inicial (mL)	1	1	1	1	1	1
Concentración (mg/mL)	125	62.5	31.25	15.63	7.81	---
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1
Volumen final (mL)	2	2	2	2	2	2
Concentración final mg/mL	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	---
Resultados						
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>	<i>SH</i>

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

H:..... *Halo*
SH:..... *Sin halo*

En el cuadro N° 3 se muestran los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto *Lepidium chichicara* (jhanukara) por la presencia de los halos de inhibición positivos para algunas concentraciones realizándose con 5 tubos a diferentes concentraciones decrecientes, además de un sexto tubo que en lugar de incluir al extracto disuelto en una solución de lauril sulfato de sodio 1% en caldo peptonado presentaba solo a este diluyente (lauril sulfato de sodio 1%). Además destacar que el extracto clorofórmico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) no muestra resultados positivos de inhibición sobre el crecimiento bacteriano de las cepas en estudio.

FIGURA N° 17
DILUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

<i>H:</i>	<i>Halo</i>	= 1
<i>SH:</i>	<i>Sin halo</i>	= 0

La figura N° 17 nos indica que el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) presentan halos de inhibición a concentraciones de 62.5mg/mL y 31.25mg/mL, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* además de 15.63 mg/ml para *Staphylococcus aureus* pero frente a *Pseudomona aeruginosa* no presenta halos de inhibición, es decir que el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* no tiene efecto inhibitorio frente a esta bacteria.

Además el 6° tubo que contenía solo al solvente de lauril sulfato de sodio 1% el cual es utilizado como solvente de los extractos de *Lepidium chichicara*, tampoco presentó halos de inhibición frente a ninguna de las cepas en estudio por lo tanto podemos decir que no tiene efecto inhibitorio y si puede ser utilizado como disolvente del extracto.

3.3.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara).

El método utilizado para la evaluación de la actividad antimicrobiana fue: difusión hoyo placa, ya que el extracto exhibe mejor su actividad a diferencia del método de una difusión en disco y esto concuerda con lo indicado por (Vlachos *et al.* 1997; 1996) publicado en un artículo (Cruz, 2010) donde señala que “la adición de los extractos en pozos realizados en agar concentra y difunde la mayor cantidad del extracto, facilitando de esta manera la evaluación de su potencial antibacteriano”⁽³⁷⁾.

CUADRO N° 4

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

DESCRIPCIÓN		NUMERO DE TUBOS					
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Concentración final mg/mL		62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	Diluy
Extracto clorofórmico	Repetición 1 (mm)	Sℋ	4	Sℋ	Sℋ	Sℋ	Sℋ
	Repetición 2 (mm)	6	Sℋ	Sℋ	Sℋ	Sℋ	Sℋ
	Repetición 3 (mm)	4	Sℋ	Sℋ	Sℋ	Sℋ	Sℋ
Extracto etanólico	Repetición 1 (mm)	16	17	14	5	Sℋ	Sℋ
	Repetición 2 (mm)	17	14	11	Sℋ	Sℋ	Sℋ
	Repetición 3 (mm)	11	10	10	Sℋ	Sℋ	Sℋ

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Sℋ:.....Sin halo

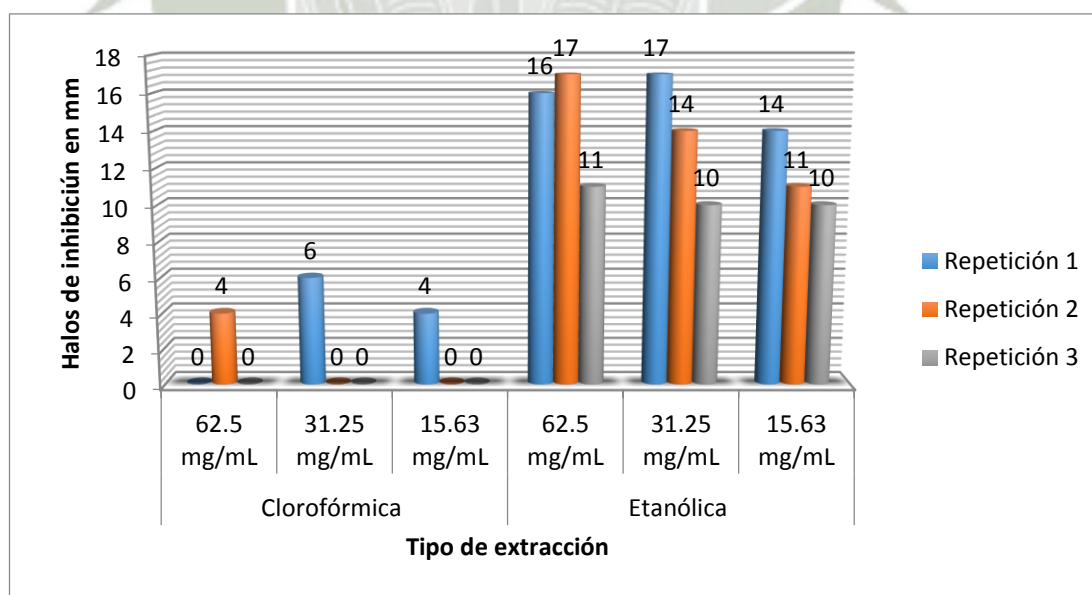
En el cuadro N° 4 se observan los resultados referidos a los halos de inhibición que resultaron tras la exposición a distintas concentraciones de los extractos (clorofórmico y etanólico) frente a *Staphylococcus aureus*; y el resultado para el extracto clorofórmico es que solo hubieron halos de inhibición de 6 y 4 mm a

concentraciones de 62.5 y 31.25mg/mL correspondientemente a dos repeticiones, sin embargo frente a el extracto etanólico presentaron halos de inhibición desde la concentración de 62.5 mg/mL con 16, 17 y 11 mm de diámetro, para 31.25 mg/mL resultaron halos de 17, 14 y 10 mm de diámetro y finalmente para 15.63 mg/mL 14, 11 y 10 mm, salvo en la concentración de 7.81 mg/mL donde en un hoyo se observó un halo de solo 5mm, la cual no fue considerada. Cabe resaltar que se hicieron 3 repeticiones por cada concentración.

En base a estos resultados podemos decir que extracto etanólico a una concentración mínima de 15.63 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* presenta algún efecto inhibitorio, sin embargo el extracto clorofórmico no presenta actividad inhibitoria apreciable ya que sus halos de inhibición presentes no fueron representativos en comparación con los halos que se observaron con el extracto etanólico, pues algunos estudios señalan que el mejor solvente para la extracción del compuestos con actividad antimicrobiana sea: alcohol etílico. (37,39,40)

FIGURA N° 18

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus*



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura N° 18 se observa la representación de los halos de inhibición del extracto clorofórmico y etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus*, obteniéndose diámetros de los halos de inhibición de 17, 16, 14, 11 y 10 mm, a diferencia de los pequeños halos de inhibición de 4 y 6 mm que presentó frente al extracto clorofórmico; por esta razón no se consideró este extracto y se procede a trabajar solo con el extracto etanólico.

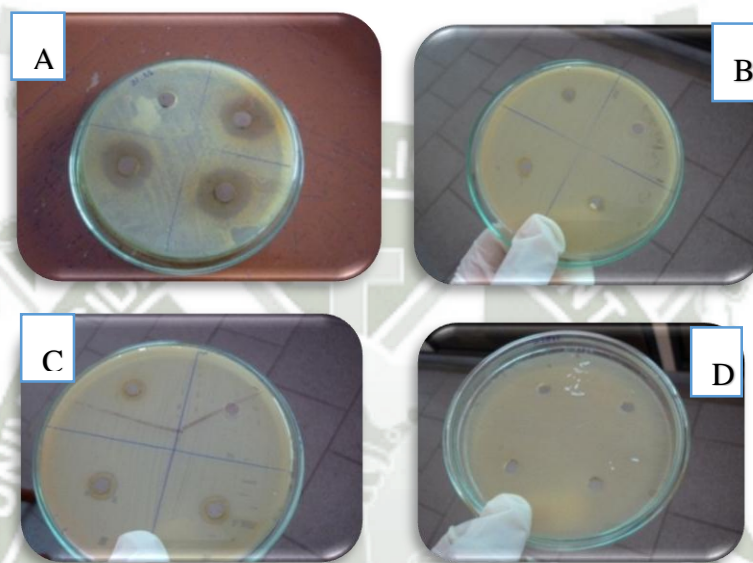


Figura N° 19: Halos de inhibición del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara).

El método de difusión placa hoyo cultivo se basa en que el extracto etanólico difundirá en el medio preparado (agar Muller Hinton) produciendo un gradiente de concentración y si el compuesto antimicrobiano es efectivo contra las cepas en estudio, se formarán halos de inhibición alrededor del hoyo conteniendo al extracto. Por lo tanto el tamaño del halo de inhibición nos da indicios de que *Lepidium chichicara* (jhanukara) tenga algún efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus*.

En la figura N° 19 se pueden observar 4 placas petri con agar Muller Hinton, las cuales son inoculadas y divididas en 4 partes y en 3 de ellas (A-B-C) se añadieron 100µL del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* a las diferentes concentraciones apreciándose los halos de inhibición traslucidos alrededor de los hoyos siendo el $\frac{1}{4}$ hoyo un control y en la placa (D) se añade 100uL de la solución de

la lauril sulfato de sodio 1% donde luego de la incubación respectiva se observa que no presenta halos de inhibición, por lo tanto la solución de lauril sulfato de sodio 1% que se utilizó en la reconstitución del extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara), por lo que se puede indicar que no posee ningún efecto inhibitorio frente a esta cepa, como además se presentó en el Cuadro 3.

CUADRO N° 5

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Extracto etanólico	Halos de inhibición (mm)		
	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL	15.63mg/mL
1° repetición	16 mm	17 mm	14 mm
2° repetición	17 mm	14 mm	11 mm
3° repetición	11 mm	10 mm	10 mm
Media	14.7	13.7	11.7
Desviación estándar	3.21	3.51	2.08
Coefficiente de variación	22%	26%	18%

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el cuadro N°5, se muestra la desviación estándar así como al coeficiente de variación para las concentraciones de 62.5, 31.25 mg/mL a las cuales presentaron halos de inhibición, con cada una de 3 repeticiones realizadas se observa que en el estudio la variabilidad no hay mucha diferencia entre el tamaño de los halos de inhibición y siendo aún menor la variación del tamaño de los halos inhibición para la concentración de 15.63 mg/mL.

CUADRO N° 6

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara*
(jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli*

DESCRIPCIÓN		NUMERO DE TUBOS					
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Concentración final mg/mL		62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	<i>Diluy</i>
Extracto clorofórmico	Repetición 1 (mm)	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>
	Repetición 2 (mm)	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>
	Repetición 3 (mm)	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>
Extracto etanólico	Repetición 1 (mm)	8	9	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>
	Repetición 2 (mm)	11	10	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>
	Repetición 3 (mm)	10	7	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>	<i>Sℋ</i>

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

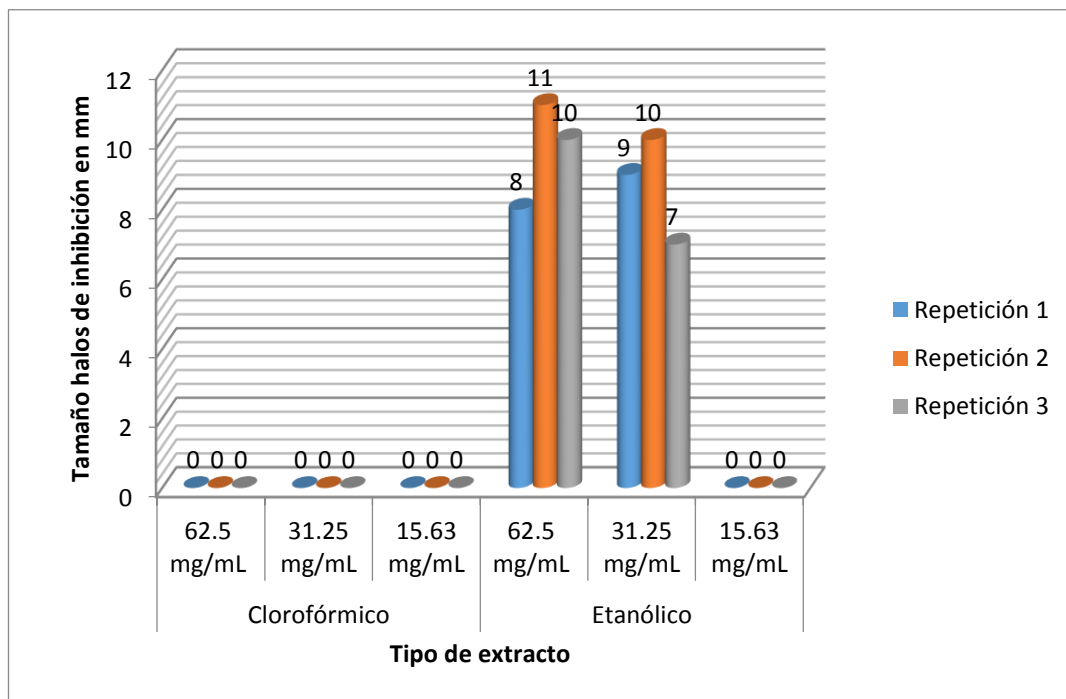
Sℋ:.....*Sin halo*

En el cuadro N° 6 se puede observar los resultados referidos a los halos de inhibición que resultaron de exponer a *Escherichia coli* a distintas concentraciones de los extractos (clorofórmico y etanólico). Para el extracto clorofórmico no se observaron halos de inhibición a ninguna de las concentraciones decrecientes del extracto y para el extracto etanólico en cambio hubo halos de inhibición a las concentraciones de 62.5 mg/mL y 31.25 mg/mL con diámetros de 8, 9, 11, 10 mm y 9, 10 y 7 mm respectivamente.

En base a estos resultados el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara), puede tener también alguna actividad inhibitoria sobre a *Escherichia coli* a una concentración mínima de 31.25mg/mL y es demostrado por la presencia de los halos de inhibición.

FIGURA N° 20

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara*
(jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli*



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura N° 20 se muestran la representación de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre *Escherichia coli*, a 2 concentraciones de 62.5 y 31.25mg/mL aunque el tamaño de los halos de inhibición son pequeños comparando con los resultados que se obtuvieron frente a *Staphylococcus aureus*.

Pero para el caso del extracto clorofórmico no muestra dicha inhibición ya que tampoco presenta halos de inhibición a ninguna de las tres concentraciones ni en las 3 repeticiones que se realizaron.

CUADRO N° 7

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara*
(jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli*

Extracto etanólico	Halos de inhibición (mm)	
	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL
1° repetición	8 mm	9 mm
2° repetición	11 mm	10 mm
3° repetición	10 mm	7 mm
Media	9.67	8.67
Desviación estándar	1.53	1.53
Coefficiente de variación	16%	18%

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el cuadro N°7, se observa una media diferente y la desviación estándar es de 1.53 para ambas concentraciones, y el coeficiente de variación porcentual nos indica que si hay una diferencia de tamaño de halos de inhibición entre cada concentración.

CUADRO N° 8

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Lepidium chichicara*
(jhanukara) FRENTE A *Pseudomona aeruginosa*

DESCRIPCIÓN		NUMERO DE TUBOS					
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Concentración final mg/mL		62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	Diluy
Extracto clorofórmico	Repetición 1 (mm)	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}
	Repetición 2 (mm)	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}
	Repetición 3 (mm)	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}
Extracto etanólico	Repetición 1 (mm)	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}
	Repetición 2 (mm)	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}
	Repetición 3 (mm)	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}	S \mathcal{H}

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

S \mathcal{H} :.....Sin halo

En el cuadro N° 8 se puede observar los resultados referidos a los halos de inhibición que resultó de exponer distintas concentraciones de ambos extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Pseudomona aeruginosa*.

Tanto para el extracto clorofórmico y etanólico no se observaron halos de inhibición a ninguna de las concentraciones decrecientes, probablemente ambos extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) obtenidos mediante equipo de extracción Soxhlet no presenta ningún efecto inhibitorio sobre *Pseudomona aeruginosa*, ya que esta bacteria es naturalmente resistente a una gran cantidad de familias de antibióticos.

3.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara).

Después de haber identificado la concentración mínima a la que los extractos (clorofórmico y etanólico) presentan halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se procede con la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) el cual se aplica para determinar la menor concentración a la que cada uno de los extractos inhibe el crecimiento de las bacterias en estudio el cual será evidenciado por la ausencia de la formación de “velos blanquecinos” y la presencia de dicha formación “velo blanco” lo que significa que no hay inhibición bacteriana, como se muestra en la Figura 21.

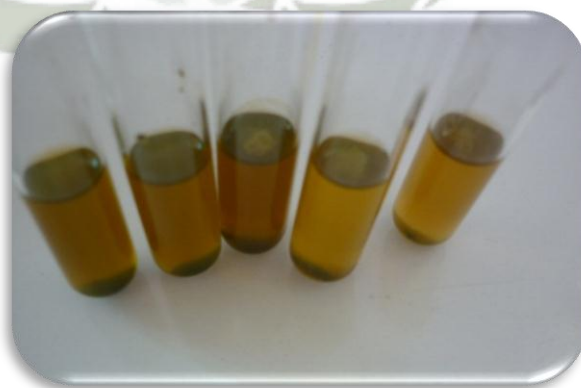


Figura N° 21: Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) por el método de dilución en tubo

CUADRO N° 9

DILUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA SOBRE *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*

DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE TUBOS						
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Caldo peptonado (mL)	0.75	0.8	0.85	0.90	0.92	0.95	0.97
Extracto seco 250 mg/mL	0.25	0.2	0.15	0.1	0.08	0.05	0.03
Volumen inicial (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Concentración (mg/mL)	62.5	50	37.5	25	20	12.5	7.5
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1
Volumen final (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Concentración final mg/mL	31.25	25	18.75	12.5	10	6.25	3.75

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el cuadro N° 9, observamos un segundo cuadro de diluciones el cual es elaborado y utilizado para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico frente a las 2 cepas en estudio. Teniendo en cuenta que, cada uno de estos tubos fue preparado e incubado por triplicado para cada concentración.

Para los cálculos se toman como referencia las concentraciones máximas y mínimas (31.25 y 7.81 mg/mL) a las cuales presentaron halos de inhibición tanto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* pues si se realizaban las nuevas diluciones por encima de 31.25 mg/mL los resultados serían negativos en cuanto a crecimiento bacteriano y si por el contrario se tomaban concentraciones por debajo 7.81 mg/mL los resultados serían positivos con respecto a desarrollo bacteriano.

CUADRO N° 10

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Lepidium chichicara (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

DESCRIPCIÓN	NUMERO DE TUBOS							
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	
Caldo peptonado (mL)	0.75	0.8	0.85	0.90	0.92	0.95	0.97	
Extracto seco 250 mg/mL	0.25	0.2	0.15	0.1	0.08	0.05	0.03	
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1	
Volumen final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	
Concentración final mg/mL	31.25	25	18.75	12.5	10	6.25	3.75	
Resultados	Repetición 1	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 2	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 3	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 4	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 5	-	-	-	-	+	+	+
CMI para <i>Staphylococcus aureus</i> : 12.5 mg/mL								

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

- :.....No Crecimiento Bacteriano
- + :..... Crecimiento Bacteriano

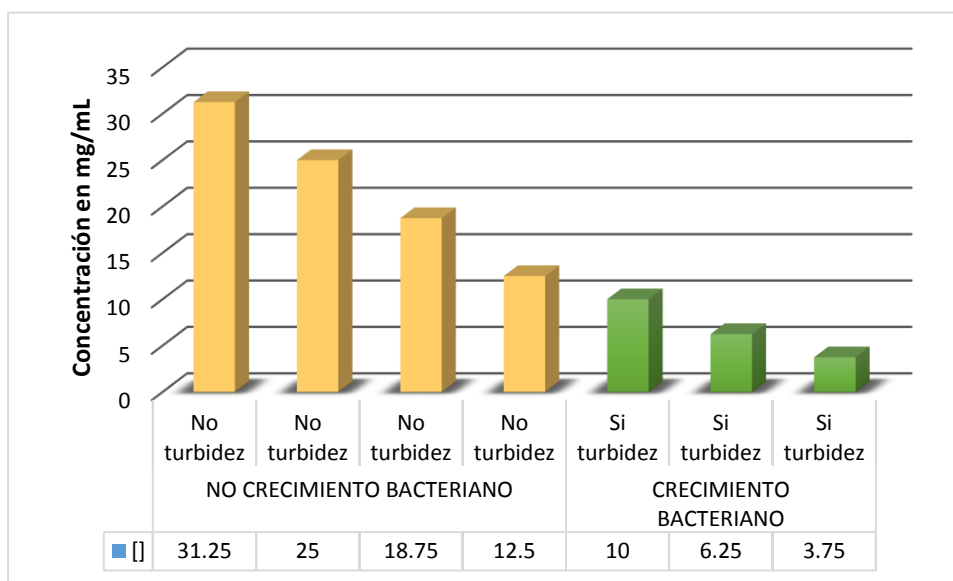
En el cuadro N° 10, se puede observar los resultados referidos a la concentración mínima inhibitoria (CMI) que resultó de exponer el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) a distintas concentraciones por el método dilución en tubo frente a *Staphylococcus aureus*, y se observa que del tubo 1 al 4 correspondientes a concentraciones de 31.25, 25, 18.75 y 12.5mg/mL respectivamente, no hay crecimiento bacteriano “sin velo” y los demás tubos si hay crecimiento bacteriano.

En base a estos resultados referidos es probable que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara)

frente a *Staphylococcus aureus* sea de 12.5mg/mL pues es posible que el microorganismo se encuentra inhibido a esta concentración.

FIGURA N° 22

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus*



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura N° 22 observamos las concentraciones decrecientes del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus* y también se observa el punto de ruptura (tubo donde no hay presencia de velo blanquecino – tubos con formación de velo blanquecino) el cual sucede entre las concentraciones de 12.5 y 10mg/mL, lo que significaría que a las concentraciones de 31.25, 25, 18.75 y 12.5 mg/mL, son suficientes para la inhibición de *Staphylococcus aureus* y en el resto de los tubos cuyas concentraciones fueron menores no tienen efecto inhibitorio frente a esta cepa, pues si hubo crecimiento bacteriano “velo blanquecino”.

CUADRO N° 11

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Lepidium chichicara (jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli*

Descripción	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Caldo peptonado (mL)	0.75	0.8	0.85	0.90	0.92	0.95	0.97
Extracto seco 250 mg/mL	0.25	0.2	0.15	0.1	0.08	0.05	0.03
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1
Volumen final (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Concentración final mg/mL	31.25	25	18.75	12.5	10	6.25	3.75
Resultados	Repetición 1	-	-	+	+	+	+
	Repetición 2	-	-	+	+	+	+
	Repetición 3	-	-	+	+	+	+
	Repetición 4	-	+	+	+	+	+
	Repetición 5	-	-	+	+	+	+
CMI para <i>Escherichia coli</i> : 25mg/mL							

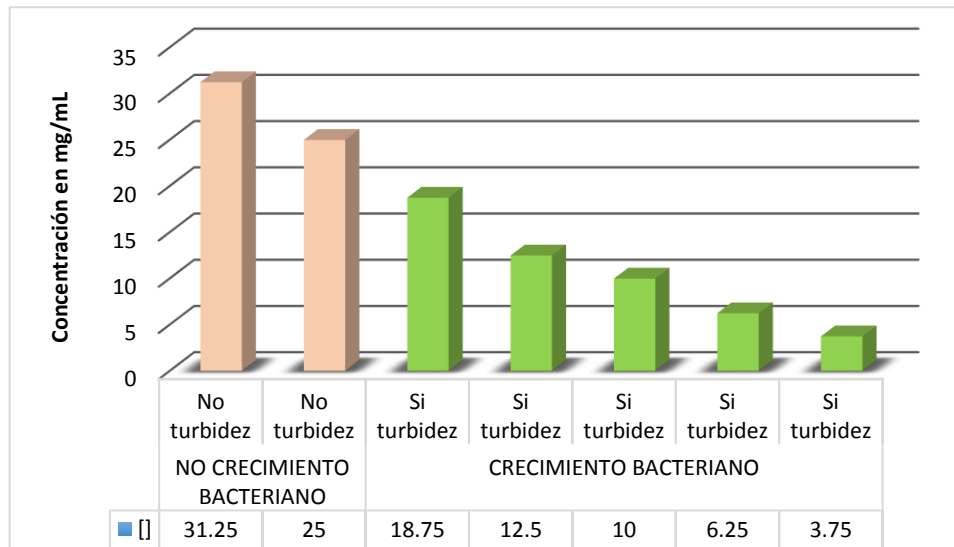
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

- :..... No Crecimiento Bacteriano
+ :..... Crecimiento Bacteriano

En el cuadro N° 11 se puede observar los resultados referidos a la concentración mínima inhibitoria (CMI) que resultaron de exponer distintas concentraciones del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) por el método dilución en tubo frente a *Escherichia coli*. Y se observa que a las concentraciones de 31.25 y 25 mg/mL no hay crecimiento bacteriano por la falta de turbidez “sin velo”.por lo tanto es posible que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Escherichia coli* sea de 25 mg/mL.

FIGURA N° 23

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli*



En la figura N° 23 observamos el punto de ruptura (tubo sin velo – tubo donde sí se aprecia la presencia de un velo) y se dan entre los tubos 1 y 2 correspondientes a concentraciones de 31.25 y 25 mg/mL.

Esto demostraría que las concentraciones de 31.25 y 25 mg/mL son suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* y las concentraciones menores a estas no tienen ningún efecto inhibitorio frente a esta cepa, por lo tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) probablemente frente a *Escherichia coli* sería de 25mg/mL.

3.3.3. Determinación de la concentración bactericida mínima (CMB) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara)

A continuación mediante la concentración bactericida mínima (CMB) se determinará si el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) tiene actividad bactericida o bacteriostático frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Y esto se evidencia si la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima coinciden se habla de que el extracto etanólico estaría actuando como bactericida y si no es así se entiende que actuaría como bacteriostático.

CUADRO N° 12

**CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Lepidium chichicara (jhanukara) FRENTE a *Staphylococcus aureus***

Descripción		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Caldo peptonado (mL)		0.75	0.8	0.85	0.90	0.92	0.95	0.97
Extracto seco 250 mg/mL		0.25	0.2	0.15	0.1	0.08	0.05	0.03
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL		1	1	1	1	1	1	1
Volumen final (mL)		2	2	2	2	2	2	2
Concentración final mg/mL		31.25	25	18.75	12.5	10	6.25	3.75
Resultados	Repetición 1	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 2	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 3	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 4	-	-	-	-	+	+	+
	Repetición 5	-	-	-	-	+	+	+
Sembrado post-CMI		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6	Placa 7
CBM para <i>Staphylococcus aureus</i>: 12.5mg/mL								

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

..... - :	No Crecimiento Bacteriano
..... + :	Crecimiento Bacteriano

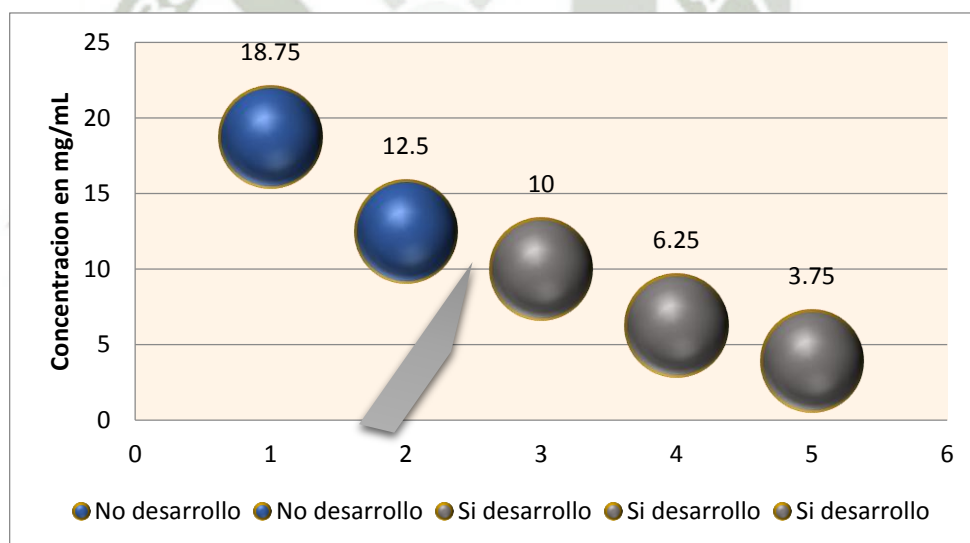
El cuadro N° 12 observamos los resultados referidos a la concentración bactericida mínima (CBM) que resultó de ser expuesto a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus* por el método dilución en agar y se observa que hasta la placa N° 4 correspondiente a

una concentración de 12.5 mg/mL no hay desarrollo bacteriano por la ausencia de colonias en el agar donde se hizo un resembrado post CMI.

Por lo tanto la concentración bactericida mínima (CMB) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus* sea de 12.5mg/mL, lo cual es coincidente con la concentración mínima inhibitoria (CMI) de esta cepa, y es probable que el extracto etanólico esté actuando como bactericida ya que no hubo crecimiento bacteriano en las placas con agar nutritivo de los tubos de donde se hizo el resembrado.

FIGURA N° 24

CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus*



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura N° 24 se observan las concentraciones a las cuales se hizo el nuevo resembrado a partir de los tubos los cuales fueron resultado de la CMI, además se distingue el punto de ruptura, que sucede entre las concentraciones de 12.5 y 10mg/mL, en donde se determina que la CMB que es de 12.5mg/mL, esta concentración es similar a la CMI por ello es probable que el extracto etanólico de

Lepidium chichicara esté actuando como bactericida frente a esta cepa; ya que a 12.5mg/mL hay una inhibición completa por parte del extracto frente a esta cepa.

Similares resultados se obtuvieron en el artículo científico (Cruz, 2010), en donde indican que la CMB fue de 38, 28, 22 y 12 mg/mL para *Silybum marianum*, *pilosa*, *Lantana*, *Schinus molle* y *Bidens pilosa* respectivamente; siendo esta última quien presenta alta actividad frente a *Staphylococcus aureus*, indicado según este artículo por ((Avellaneda *et al.*2005) (CMB=<20 mg/mL)). Lo cual coincide con los resultados referidos relacionados con la CMB frente a esta cepa en el presente trabajo de investigación.

CUADRO N° 13

**CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Lepidium chichicara (jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli***

Descripción	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Caldo peptonado (mL)	0.75	0.8	0.85	0.90	0.92	0.95	0.97
Extracto seco 250 mg/mL	0.25	0.2	0.15	0.1	0.08	0.05	0.03
Inóculo 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1	1	1
Volumen final (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Concentración final mg/mL	31.25	25	18.75	12.5	10	6.25	3.75
Resultados	Repeticón 1	-	+	+	+	+	+
	Repeticón 2	-	+	+	+	+	+
	Repeticón 3	-	+	+	+	+	+
	Repeticón 4	-	+	+	+	+	+
	Repeticón 5	-	+	+	+	+	+
Sembrado post-CMI	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 5	Placa 7
CBM para <i>Escherichia coli</i>: 31.25mg/mL							

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

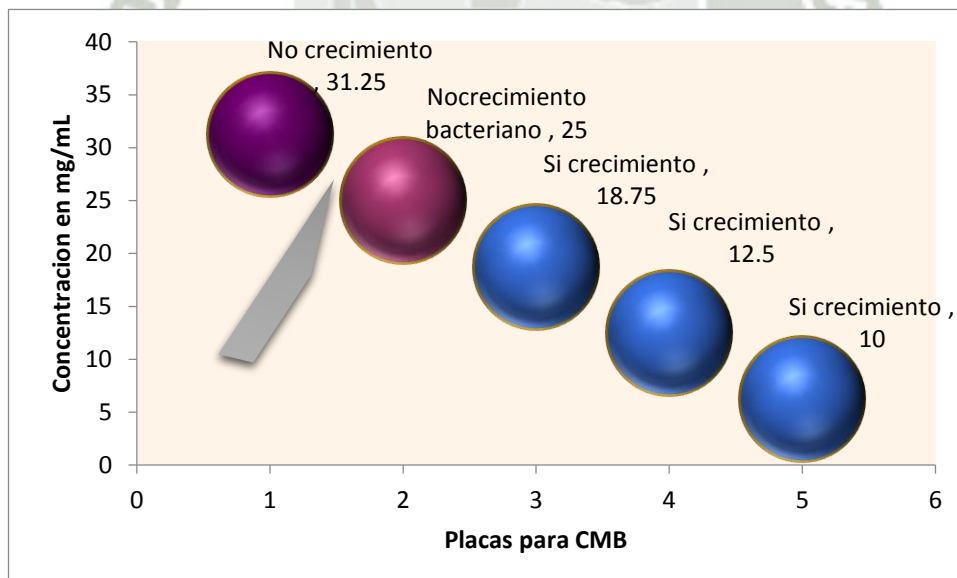
-	:..... No Crecimiento Bacteriano
+	:..... Crecimiento Bacteriano

En el cuadro N°13, se puede observar los resultados referidos a la concentración bactericida mínima (CMB) que resultó de exponer el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) a distintas concentraciones por el método dilución en agar frente a *Escherichia coli*, y se observa que solo en la placa 1 correspondiente a la concentración de 31.25 mg/mL no hay desarrollo bacteriano y esto se evidencia por la ausencia de colonias en las placas con agar nutritivo donde se hizo el resembrado.

Por lo tanto la concentración bactericida mínima (CMB) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Escherichia coli* es de 31.25mg/mL, la cual difiere con la concentración mínima inhibitoria (CMI) que fue de 25mg/mL, lo que significa que el extracto frente a *Escherichia coli* estaría actuando como bactericida pero a una concentración mayor.

FIGURA N° 25

CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Escherichia coli*

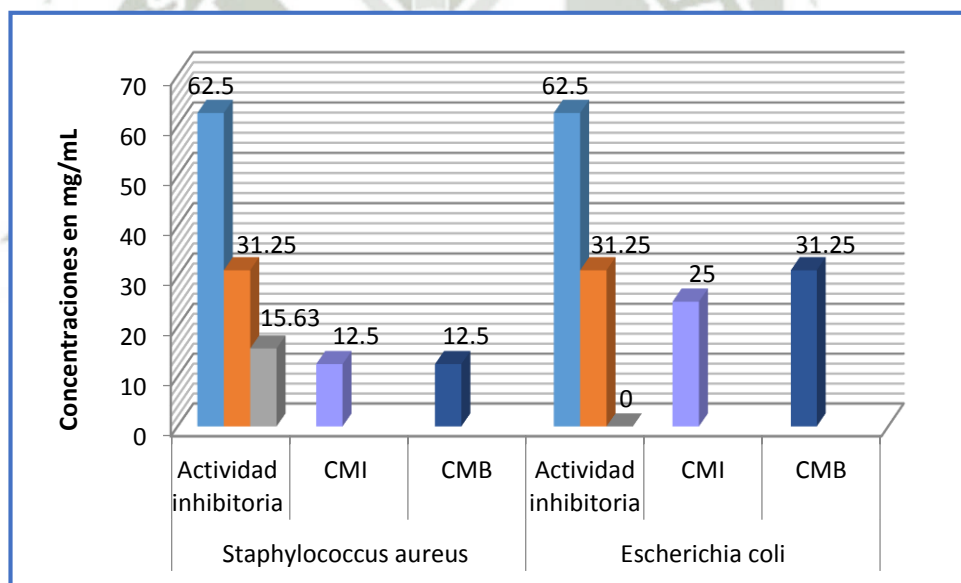


FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura N° 25 se observan las diferentes concentraciones a las cuales se hizo el resembrado en placa de agar Muller Hinton, de los tubos los cuales fueron resultado negativo de la CMI, además se distingue el punto de ruptura (no crecimiento - crecimiento bacteriano) que sucede entre las concentraciones de 31.25 y 25mg/mL y según estos resultados se puede indicar que la CBM es de 31.25 mg/mL, pues necesita una concentración mayor a 25 mg/mL (CMI) para que ocurra una inhibición completa por parte del extracto frente a *Escherichia coli*.

FIGURA N° 26

RESUMEN DE LOS METODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lepidium chichicara* (jhanukara) FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Figura N° 26: Actividad inhibitoria, CMI y CBM del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

En la Figura N° 26, se muestra las diferencias acerca de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a las 2 cepas en estudio observándose; frente a *Staphylococcus aureus* la actividad inhibitoria está representada por la presencia de 3 halos de inhibición a

concentraciones de 62.5, 31.25 y 15.63 mg/mL de 17, 16, 14, 13, 11 y 10 mm de diámetro, CMI=12.5ml/mL, CBM=12.5ml/mL y frente a *Escherichia coli* la actividad inhibitoria está representada por la presencia de 2 halos de inhibición a concentraciones de 62.5 y 31.25mg/mL con diámetros de los halos de inhibición de 11, 10, 9, 8 y 7 mm, CMI=25mg/mL, CBM=31.25ml/mL.

Por lo tanto según los 3 métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) muestra una mejor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y con menor actividad contra *Escherichia coli*, pues los tamaños de halos de inhibición son mayores para *Staphylococcus aureus* y la CMI, CBM son menores con respecto a los resultados mostrados frente a *Escherichia coli*.

Una vez realizada la medición de los halos de inhibición y haber determinado la concentración mínima inhibitoria y bactericida sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, se plasmaron en tablas y figuras, las cuales fueron descritas detalladamente y de esa manera establecer si el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) tiene algún efecto antimicrobiano frente a estas 2 cepas excepto para *Pseudomona aureginosa*.

El extracto etanólico de las hojas de *Lepidium chichicara* (jhanukara) mostró actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y es evidenciado por los 3 métodos aplicados en este trabajo de investigación como es la determinación de la actividad antimicrobiana mediante la presencia de los halos de inhibición, CMI y CMB, en otros artículos de investigación relacionados al tema (evaluación antimicrobiana) como: (Cruz., 2010) y (Gualtieri *et al.* 2008) señalan que los extractos etanólicos de materiales vegetales tienen una buena actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, pero poseen una baja actividad o no muestra actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, y comparado con el resultado del presente trabajo de investigación el extracto etanólico muestra una baja actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*.^(37, 39)

La actividad antimicrobiana del extracto de algunas especies vegetales frente a cepas de *Staphylococcus aureus* a concentraciones más bajas con relación a la

obtenidas frente a *Escherichia coli* son similares resultados lo publicados en los artículos científicos de; (Cruz., 2010), (Magallanes 2003) además se indica que “los extractos clorofórmicos no tienen efectividad ante *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”, lo cual también coincide con los resultados con el extracto clorofórmico de *Lepidium chichicara* (jhanukara), que no muestra actividad antimicrobiana a ninguna de las 3 cepas antes mencionadas en este trabajo.⁽⁴⁰⁾

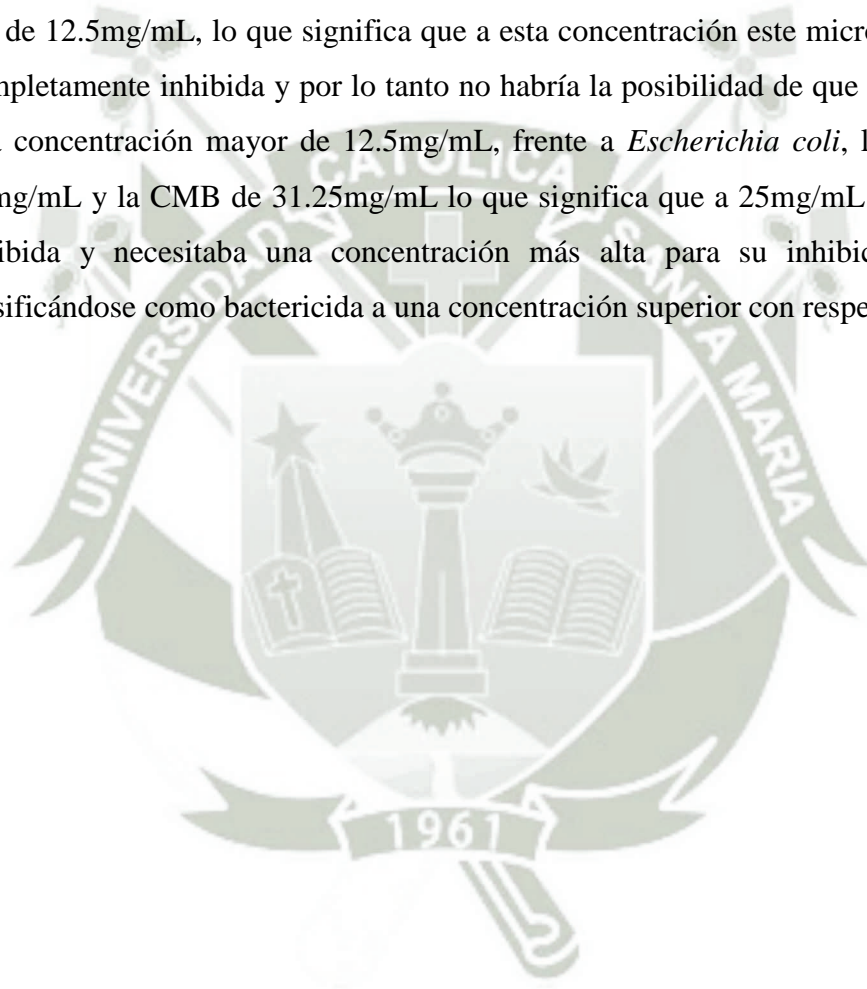
La prueba de actividad antimicrobiana realizada en este estudio fue por el método de difusión en pozo quien mostró una buena definición de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, este resultado concuerda con lo publicado en este artículo (Cruz., 2010) donde se señala que: “hubo diferencias significativas entre los 2 métodos utilizados en ese estudio, donde se muestra que los promedios de los halos de inhibición de los extractos de las 4 especies vegetales frente a *Staphylococcus aureus* son mayores con la técnica de difusión en pozo que frente a la técnica de difusión en disco donde se señalan halos de menor diámetro”.⁽³⁷⁾

Al determinar la CMI con el método de dilución en caldo se pudo observar que el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* a una concentración de 12.5mg/mL y frente a *Escherichia coli* 25mg/mL respectivamente; según el artículo (Cruz. 2010) y descrito por (Struthers E Westran, 2005) señala: “La CMI en tubo (dilución en caldo) se considera como parámetro fundamental para comprobar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibacteriano”, por esta razón en este trabajo de investigación se utilizó este método y de acuerdo a lo descrito por (Avellaneda *et al.* 2005) publicado también en el artículo científico mencionado anteriormente donde señala lo siguiente: “Una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia presenta una CMI inferior a 12.5 mg/mL, de mediana sensibilidad, entre 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 a 100 mg/mL”.

Según esta escala y descrito por (Avellaneda *et al.* 2005) se categorizaría que: *Staphylococcus aureus* demostró ser muy sensible y *Escherichia coli* es medianamente sensible frente al extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara).

Y se deduce que el resultado negativo frente a *Pseudomona aureginosa* se debería a que esta bacteria es naturalmente resistente a diferentes antimicrobianos o que la concentración del extracto etanólico fue muy baja a los cuales *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* resultaron positivos.

La CMB fue de 12.5 y 31.25mg/mL para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente, y según estos resultados obtenidos se puede decir que el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus*, se clasificó como bactericida, ya que la CMB es coincidente con la CMI que fue de 12.5mg/mL, lo que significa que a esta concentración este microorganismo es completamente inhibida y por lo tanto no habría la posibilidad de que sobreviviese a una concentración mayor de 12.5mg/mL, frente a *Escherichia coli*, la CMI fue de 25mg/mL y la CMB de 31.25mg/mL lo que significa que a 25mg/mL se encontraba inhibida y necesitaba una concentración más alta para su inhibición completa clasificándose como bactericida a una concentración superior con respecto a la CMI.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS



4.1. CONCLUSIONES

PRIMERA

Mediante el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, determinándose el tamaño de los halos de inhibición, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CMB)

SEGUNDA

A través del equipo extractor Soxhlet se obtuvieron dos extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) (clorofórmico y etanólico), siendo el extracto etanólico el que presentó mayor porcentaje de rendimiento con 18.13% frente a el extracto clorofórmico que solo presentó un porcentaje de rendimiento de 2.2%, motivo por el cual elige al extracto etanólico para continuar con el trabajo de investigación.

TERCERA

La técnica de cromatografía en capa fina (CCF) permitió señalar a componentes del metabolismo secundario en los extractos de *Lepidium chichicara* (jhanukara) como son: compuestos terpénicos tipo saponinas esteoídicas y triterpénicas y taninos, sin embargo, el número de manchas fue mayor para el extracto etanólico con respecto al (clorofórmico) y la reacción fue negativa para flavonoides y alcaloides.

CUARTA

Mediante el método microbiológico hoyo-placa-cultivo, se determinó la concentración mínima a la cual el extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) presenta halos de inhibición, siendo 15.63mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y de 31.25mg/mL contra *Escherichia coli*, pero frente a *Pseudomona aeruginosa* no presentó halos de inhibición a ninguno de los 2 extractos.

QUINTA

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus* fue de 12.5mg/mL y frente a *Escherichia coli* fue de 25mg/mL.

SEXTA

La concentración bactericida mínima (CMB) del extracto etanólico de *Lepidium chichicara* (jhanukara) frente a *Staphylococcus aureus* fue de 12.5mg/mL y frente a *Escherichia coli* fue de 31.25mg/mL con lo cual se indica que el extracto etanólico posee actividad bactericida pero a diferentes concentraciones

4.2. SUGERENCIAS

PRIMERA

Se sugiere determinar la naturaleza química de los responsables de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

SEGUNDA

Se propone realizar estudios para evaluar la actividad antibacteriana vía tópica *in vivo* del extracto de *Lepidium chichicara* (jhanukara) sobre *Staphylococcus aureus*.

TERCERA

Efectuar estudios complementarios a fin de evaluar los otros usos medicinales que la población le atribuye a la planta medicinal *Lepidium chichicara* (jhanukara).

BIBLIOGRAFÍA

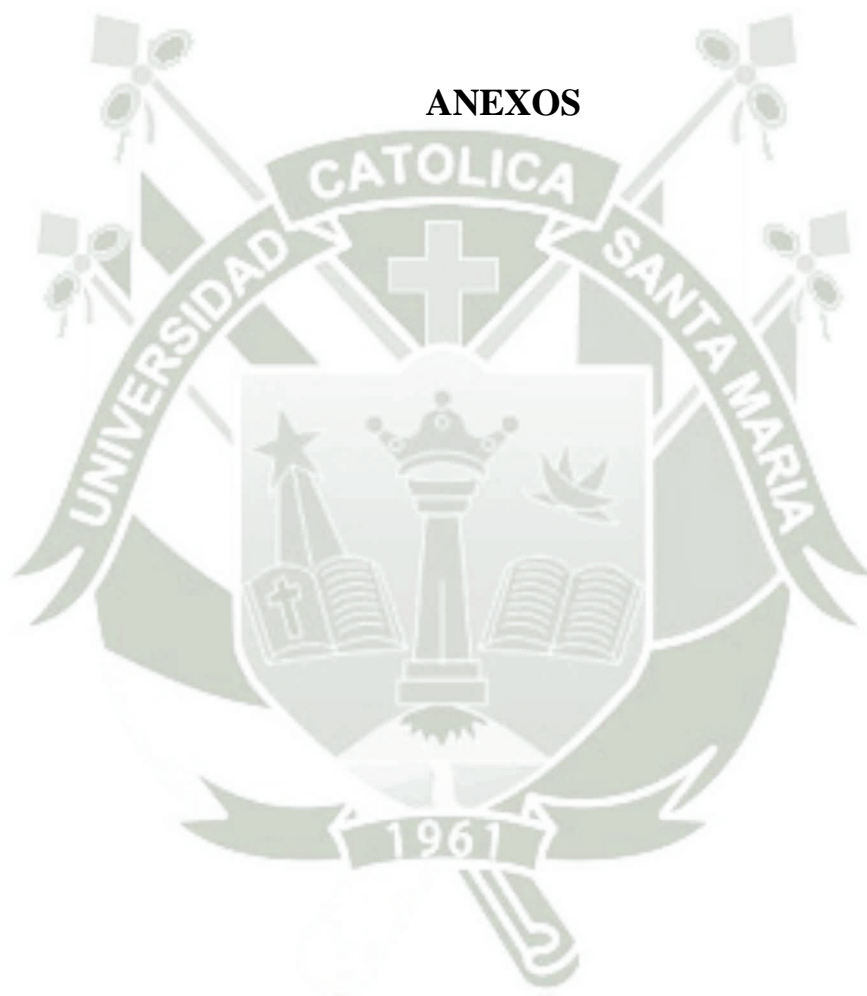
1. Aldave Pajares Augusto; Mostacero León José: Botánica Farmacéutica. 1ª edición. Lima: editorial Libertad.1988.
2. Añanca-Cotrado E.: Efecto Antibacteriano *In vitro* del extracto de vainas de *Caesalpinia Spinosa* “Tara” en cepas de *Staphylococcus Aureus* y *Streptococcus Pyogenes* [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2009.
3. Ashutosh Kar: Pharmaceutical Microbiology.1ª Edition. Published by New Age International, 2008.
4. Barnes Joanne, Anderson Linda y Phillipson David: Herbal Medicines. 3ª Edición, Pharmaceutical Press, 2007.
5. Brack Egg Antonio: Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. 1ª Edición, 1999.
6. Bruneton J.: Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª Edición. Editorial Acribia S.A., 2001.
7. Carrasco Díaz S.; METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, 1ª Edición. Editorial San Marcos. Lima, 2005.
8. Collins C. H. & Lyne P.: MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS. 5ª Edición, Editorial Acribia, SA. España, 1989.
9. Córdova-Callo L.:Determinación de la actividad antimicrobiana de las semillas de *Carica papaya* L “papaya” *in vitro* frente a las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013.
10. Cuba V., Saavedra M.:Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de *Larrea divaricata* cav “jarilla” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2012.

11. Delgado-Iribarren Alberto y otros: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 1ª Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. España, 1994.
12. Diaz R. & Gamazo C. & López-Goñi I.: MANUAL PRÁCTICO DE MICROBIOLOGÍA. 2ª Edición. Editorial Masson, 1999.
13. Engelkirk P., Duben-Engelkirk J.: Microbiology for the Health Sciences. 10ª Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2015.
14. Falabella R., Victoria J., Barona M., Domínguez L: DERMATOLOGÍA, 6ª Edición. Fondo Editorial CIB. Colombia, 2004.
15. Fuentes Escarcena A., Gutiérrez Carpio B.: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO E IN VIVO DEL EXTRACTO DE *Schinus molle* (MOLLE) [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2007.
16. García Martos P.: Microbiología Clínica Aplicada, 3ª Edición. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid, 1997.
17. García-Rodríguez J.A. & Picazo J.J.: COMPENDIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA. 1ª Edición. Editorial Harcourt Brace, 2006.
18. Gonzáles Alfaro José: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 1ª Edición. Editorial Ciencias Médicas. La Habana-Cuba, 2004.
19. Kayser Fritz & col: MEDICAL MICROBIOLOGY. 10ª Edition. Editorial Thieme, 2005.
20. Kukllinski C: FARMACOGNOSIA, ESTUDIO DE LAS DROGAS Y SUSTANCIAS MEDICAMENTOSAS DE ORIGEN NATURAL, 1ª Edición. Ediciones Omega S.A, 2000.
21. Lamarque Alicia (Coord.): FUNDAMENTOS TEÓRICO PRÁCTICOS DE QUÍMICA ORGÁNICA. 1ª Edición. Editorial Brujas. 2008.
22. Lock de Ugaz O.: INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA MÉTODOS EN EL ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES. 1ª Edición. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú, 1988.

23. Marcano Deanna y Hasegawa Masahisa: Fitoquímica Orgánica. 2ª Edición. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, 2002.
24. Mostacero J., Mejia F., Gamarra O.: Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. 1ª Edición. Editorial Normas Legales S.A.C. Perú, 2002.
25. Paredes Loayza A.; Salas Grandes E.: EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA RESINA DE *Azorella compacta* “YARETA” SOBRE MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE PRODUCIR INFECCIÓN DE HERIDAS [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2004.
26. Park K., Chess B.: Foundations in Microbiology. 8ª Edition. Mc Graw Hill. United States. 2012
27. Romero Cabello R.: Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias, 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2007
28. Skoog D.; Leary J.: Análisis Instrumental. 6ª Edición. Editorial Latinoamericana. 2008
29. Stuart Walker: MICROBIOLOGÍA. 1ª Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. España, 1999.
30. Tortora, Funke, Case: Introducción a la Microbiología, 9ª Edición. Editorial. 2007.
31. Willey J., Sherwood L., Woolverton C.: Microbiology. 7ª Edition, Mc Graw Hill. 2008.
32. Bagué A., Alvarez N., TECNOLOGIA FARMACÉUTICA. Editorial Club Universitario. España, 2012.
33. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332003000100003
34. <http://www.chlorischile.cl/Linares/apend1.htm>
35. <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Lepidium+chichicara>
36. Domingo D., López-Brea M, Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. Vol. 16 (4); 385-393, 2003.

37. Cruz A. Rodríguez N. Rodríguez CE., IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF *Bidens pilosa*, *Lantana cámara*, *Schinus molle* AND *Silybum marianum*. Vol. 12 (2); 117-124, 2010.
38. Rodríguez-Lira G. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LA RIVINA HUMILIS L. “Flor Blanca” SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Peudomona aureginosa* [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013.
39. Gualtieri MJ. González MC. Contreras KP. Noguera MC. Uzcátegui EC. Villasmil S. Villalta C., Evaluation of the antimicrobial activity of *Azadirachta indica* ethanolic extract. Vol. 39, 2008.
40. Magallanes C. Cordova C. Orozco R., Antibacterial activity of ethanolic extracts of marine algae from central coast of Peru, 2003.
41. García-Llanos H G. Aislamiento, modificación estructural y evaluación biológica de metabolitos secundarios de *Witania aristata* (Solanaceae), endemismo carario [Tesis para optar el grado de Doctor]. Universidad de la Laguna; 2010.
42. Carbajal L. Hata Y. Sierra N. Rueda D., ANALISIS FITOQUIMIO PRELIMINAR DE HOJAS, TALLOS Y SEMILLAS DE CUPATÁ (*STRYCHNOS SCHULTESIANA* KRUKOFF). Rev. Colombia Forestal. Vol. 12 161-170. 2009.
43. Monsalve C. Cano A., The Brassicaceae Family in Huaylas Province, Ancash. Rev. peru biol. Vol.10 n1. 2003.

ANEXOS



MEDIOS MICROBIOLÓGICOS UTILIZADOS

AGAR SOYA TRIPTICASA

Es un medio de uso general, el cual permite el crecimiento microbiano tanto aerobias y anaerobias. Es un medio recomendado para la detección y recuento de una gran cantidad de microorganismos.

Fundamento:

La presencia de caseína, peptonas y aminoácidos presentes en el agar hacen que sea un medio muy nutritivo, sobre todo la presencia de peptonas permite el crecimiento rápido de bacterias aerobias y anaerobias como los del genero de *Candida*, *streptococcus*, *pseudomonas* y corinebacterias.

Composición:

- | | |
|---------------------|---------|
| ○ Polisorbato 80 | 5 g/L |
| ○ Histidina | 1 g/L |
| ○ Peptona de soja | 5 g/L |
| ○ Sodio tiosulfato | 0.5 g/L |
| ○ Lecitina | 0.7 g/L |
| ○ Peptona de casina | 15 g/L |
| ○ Sodio cloruro | 5 g/L |
| ○ Agar | 15 g/L |

Preparación:

- Disolver los ingredientes en B.M. autoclavar 15 minutos a 121°C.
- Repartir en placas petri
- Dejar incubando por 24 horas a 37°C.

CALDO PEPTONADO

Medio usado como diluyente y enriquecimiento bacteriano para diversas muestras, pues a partir de este medio se preparan medios sólidos.

Fundamento:

Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento. Es utilizado como un medio base para la fermentación de hidratos de carbono.

Composición:

- | | |
|---------------------|---------|
| ▪ Peptona de carne | 10.0 g |
| ▪ Extracto de carne | 3.0 g |
| ▪ Cloruro de sodio | 5.0 g |
| ▪ Agua destilada | 1000 mL |

Preparación:

- Colocar 15 g del medio en un matraz, añadir 1 litro de agua destilada,
- Disolver con ayuda del mechero bunsen hasta completa transparencia.
- Esterilizar el medio en la autoclave por 15 minutos a 121°C.

AGAR MUELLER HINTON

El agar Müller Hinton es un medio de cultivo recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos y tiene la ventaja de que si se le agrega sangre al medio de cultivo se puede aislar a microorganismos que son nutricionalmente exigentes.

Fundamento

La presencia del aminoácido, sustancias nitrogenadas, vitaminas y otros nutrientes, favorecen el crecimiento de los microorganismos, además el almidón actúa como coloide protegiendo al medio de sustancias tóxicas presentes, y la hidrólisis de almidón justo en el proceso del auto clavado proporciona una pequeña cantidad de dextrosa, la que constituye una fuente de energía.

Composición:

◆ Infusión de carne	2.0 g
◆ Peptona ácida de caseína	17.5 g
◆ Almidón	1.5 g
◆ Agar	15.0 g
◆ C.S.P. agua destilada	1000 mL

Preparación:

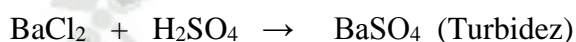
- ◆ Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- ◆ Calentar y agitar frecuente y hervir durante 1 minuto.
- ◆ Esterilizar a 121C° durante 15 minutos, enfriar a 45- 50 C°.
- ◆ Repartir en placas Petri estériles.

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

Composición:

- ✓ Cloruro de bario 0.5mL
- ✓ Ácido sulfúrico 99.5mL

Reacción:



Procedimiento:

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

Cálculos

- Para 100 mL de cloruro de bario 0.048 M

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

- Para 1000 mL de ácido sulfúrico 0.36N

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

Para llevar al 100%

$$9.49478\text{-----}96\%$$

$$X\text{-----}100\%$$

$$X=9.99\text{mL de } H_2SO_4 \text{ en } 1000\text{mL}$$

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Lepidium chihicara*



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



CONSTANCIA Nº 22 -2014-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca de la planta, procedente del huerto de Mariano Melgar, presentada por la Bachiller Leonarda Luisa Huaricallo Quispe del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Católica de Santa María, para realizar su Proyecto de investigación titulada "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de janukara". La muestra fue traída para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) corresponden a la siguiente especie:

Especie: *Lepidium chihicara* Desv

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen conveniente.

Arequipa 07 de Octubre del 2014

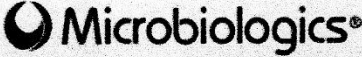
Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



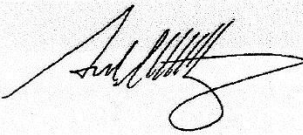
Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

CERTIFICADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE CEPAS BACTERIANAS

Staphylococcus aureus

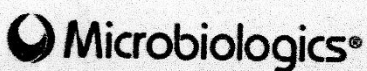


Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-194 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2015/06 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2013/8/5																																																																																							
Performance																																																																																									
Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.		Medium: SBAP																																																																																							
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.		Method: Gram Stain (1)																																																																																							
Vitek GP (1) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: center; padding: 2px;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-XULOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 1</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Pyrolidonyl-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCURONIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>POLYMXIN B RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PULLULAN</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-RAFFINOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>O/128 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>SALICIN</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 2</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>OPTOCHIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	D-AMYGDALIN	-	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	D-XULOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE 1	+	BETA-GALACTOSIDASE	-	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	CYCLODEXTRIN	-	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-	ALPHA-MANNOSIDASE	-	PHOSPHATASE	+	Leucine ARYLAMIDASE	-	L-Proline ARYLAMIDASE	-	BETA GLUCURONIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	L-Pyrolidonyl-ARYLAMIDASE	+	BETA-GLUCURONIDASE	-	Alanine ARYLAMIDASE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	D-SORBITOL	-	UREASE	-	POLYMXIN B RESISTANCE	+	D-GALACTOSE	+	D-RIBOSE	+	L-LACTATE alkalization	+	LACTOSE	+	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	D-MALTOSE	+	BACITRACIN RESISTANCE	-	NOVOBIOCIN RESISTANCE	-	GROWTH IN 6.5% NaCl	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	-	PULLULAN	-	D-RAFFINOSE	-	O/128 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	SALICIN	+	SACCHAROSE/SUCROSE	+	D-TREHALOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE 2	-	OPTOCHIN RESISTANCE	+	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma-tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE </div>
Phenotypic Features	Results																																																																																								
D-AMYGDALIN	-																																																																																								
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-																																																																																								
D-XULOSE	-																																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 1	+																																																																																								
BETA-GALACTOSIDASE	-																																																																																								
ALPHA-GLUCOSIDASE	-																																																																																								
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																								
CYCLODEXTRIN	-																																																																																								
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-																																																																																								
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-																																																																																								
ALPHA-MANNOSIDASE	-																																																																																								
PHOSPHATASE	+																																																																																								
Leucine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																																								
BETA GLUCURONIDASE	-																																																																																								
ALPHA-GALACTOSIDASE	-																																																																																								
L-Pyrolidonyl-ARYLAMIDASE	+																																																																																								
BETA-GLUCURONIDASE	-																																																																																								
Alanine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
D-SORBITOL	-																																																																																								
UREASE	-																																																																																								
POLYMXIN B RESISTANCE	+																																																																																								
D-GALACTOSE	+																																																																																								
D-RIBOSE	+																																																																																								
L-LACTATE alkalization	+																																																																																								
LACTOSE	+																																																																																								
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+																																																																																								
D-MALTOSE	+																																																																																								
BACITRACIN RESISTANCE	-																																																																																								
NOVOBIOCIN RESISTANCE	-																																																																																								
GROWTH IN 6.5% NaCl	+																																																																																								
D-MANNITOL	+																																																																																								
D-MANNOSE	+																																																																																								
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	-																																																																																								
PULLULAN	-																																																																																								
D-RAFFINOSE	-																																																																																								
O/128 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+																																																																																								
SALICIN	+																																																																																								
SACCHAROSE/SUCROSE	+																																																																																								
D-TREHALOSE	-																																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 2	-																																																																																								
OPTOCHIN RESISTANCE	+																																																																																								


© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303
Page 1 of 2
DOC.286

Pseudomona aeruginosa



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications		Expiration Date: 2015/06
Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-381 Reference Number: ATCC® 9027™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2013/7/25
Performance		
Macroscopic Features: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen. A second colony type may also be present as small, round, shiny colonies.		Medium: SBAP
Microscopic Features: Straight or slightly curved gram negative rod.		Method: Gram Stain (1)
Vitek GN (1)		Other Features/ Challenges: Results
Phenotypic Features		(1) Oxidase(Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive Pseudomonas P Agar: positive (blue-green color diffusing into the agar) Growth at 42 C: positive
	Results	
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	
ADONITOL	-	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	
L-ARABITOL	-	
D-CELLOBIOSE	-	
BETA-GALACTOSIDASE	-	
H2S PRODUCTION	-	
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	
Glutamyl Arylamidase pNA	-	
D-GLUCOSE	+	
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+	
FERMENTATION/GLUCOSE	-	
BETA-GLUCOSIDASE	-	
D-MALTOSE	-	
D-MANNITOL	-	
D-MANNOSE	+	
BETA-XYLOSIDASE	-	
BETA-Alanine arylamidase pNA	+	
L-Proline ARYLAMIDASE	+	
LIPASE	+	
PALATINOSE	+	
Tyrosine ARYLAMIDASE	+	
UREASE	-	
D-SORBITOL	-	
SACCHAROSE/SUCROSE	-	
D-TAGATOSE	-	
D-TREHALOSE	-	
CITRATE (SODIUM)	+	
MALONATE	+	
5-KETO-D-GLUCONATE	+	
L-LACTATE alkalinization	+	
ALPHA-GLUCOSIDASE	-	
SUCCINATE alkalinization	+	
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	
ALPHA-GALACTOSIDASE	-	
PHOSPHATASE	-	
Glycine ARYLAMIDASE	-	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	
LYSINE DECARBOXYLASE	-	
L-HISTIDINE assimilation	-	
COURMARATE	+	
BETA-GLUCORONIDASE	-	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	
L-MALATE assimilation	+	
ELLMAN	-	
L-LACTATE assimilation	+	


 Brad Goskowicz, President
 AUTHORIZED SIGNATURE