

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL
EXTRACTO DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti” FRENTE A LA CEPA
Propionibacterium acnes” – AREQUIPA 2018**

Tesis presentada por las Bachilleres:

Berrios Calderón, Yahanira Liz

Oliden Doménique, Luisa Fernanda

Para optar el Título Profesional de:

Química Farmacéutica

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime Dante

Arequipa – Perú

2020

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000041365

N° Trámite en Fac. 1714-2017
Fecha 04-09-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **BERRIOS CALDERON, Yahanira Liz**
OLIDEN DOMENIQUE, Luisa Fernanda

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"FORMULACION Y ELABORACION DE JABON LIQUIDO A BASE DE EXTRACTO ACUOSO DE Notholaena nivea "Cutí - cutí" POR EL METODO DE MACERACION Y EVALUACION DE SU EFECTO FRENTE A LA CEPA Propionibacterium acnes"

DICTAMINADORES: 1) Q. F. Fernando Torres Vela 2) Mgter. Maria Elena Guillén Núñez

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: **"EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE Notholaena nivea "Cutí - cutí" FRENTE A LA CEPA Propionibacterium acnes". AREQUIPA 2018**, y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha

ASESOR: **Dr. Jaime Cárdenas García**

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesor en el presente Trabajo de Investigación, cumpla con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

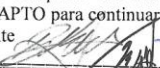
Firma  Fecha 12/6/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Q. F. Fernando Torres Vela
- 2) Mgter. Maria Elena Guillén Núñez
- 3) Dra. Rita Nieto Montesinos

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE Notholaena nivea "cutí cutí" FRENTE A LA CEPA Propionibacterium acnes -AREQUIPA 2018"**, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firmas

 (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 17-12-2019

JURADOS: Presidente **DRA. YENKY LOPEZ VALENCIA**
Vocal **Q.F. FERNANDO TORRES VELA**
Secretario **MAG. MARIA ELENA GUILLÉN NÚÑEZ**

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 6/01/20 Hora: 16:00 Local: C- 402 (SUM)

DECANO



DEDICATORIA

A Dios Padre Celestial quien me acompaña en cada momento de mi vida
A mi querida abuelita Elvira quien me dio su inmenso amor y ejemplo, que siempre me
cuida y me protege
A mis padres por haberme acompañado y apoyado durante todo mi proceso de desarrollo
profesional.
A mi hermana Lucero agradecerle el apoyo, la confianza, las palabras de aliento y por estar
en los momentos más importantes de mi vida.
A mis queridos tíos por darme sus buenos consejos y palabras de aliento.

Luisa Fernanda Oliden Doménique

A Dios, por siempre mantenerme fuerte y guiar mi camino en todo momento y darme la
perseverancia para proponerme metas nuevas y perseguirlas.
A mis queridos abuelos Asunto, Manuela y a mi primo Edwin que siempre me iluminan y
me protegen desde el cielo
A mis padres Pedro y Martina, por el amor incondicional, por su confianza, el apoyo
durante mi crecimiento profesional y el ejemplo que me brindaron para conseguir mis
propósitos y superarme.
A mi hermano Ebert, por su apoyo incondicional en cada momento y ejemplo de
resiliencia y dedicación.
Y en especial a dos seres muy queridos bruno y hacki responsables de mis alegrías

Yahanira Liz Berrios Calderón

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por siempre mantenernos fuertes y guiarnos en nuestro camino en todo momento y darnos la perseverancia para proponernos y continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados

A nuestro asesor de tesis el PhD. Jaime Cárdenas García, que, con toda su voluntad, aliento, apoyo incondicional en los momentos más difíciles, amistad y que, con sus admirables conocimientos, nos brindó para llevar acabo nuestra investigación realizada

Al Q.F Ricardo Abril, Ing. Rodrigo Ramos y Q.F. Tiffany Trujillo, por permitirnos realizar nuestro proyecto de tesis en el laboratorio de control de calidad, brindarnos sus conocimientos y su confianza

A la Lic. Química Elvira Doménique de Rospigliosi y al Biólogo Geancarlo Yzaziga Chávez por apoyarnos en la obtención de nuestro material biológico durante nuestro proceso de investigación, por lo cual nos fue posible culminar nuestro proyecto

A las personas que estuvieron con nosotras apoyándonos en todo momento, dándonos consejos y conocimientos, a pesar de las dificultades y situaciones difíciles que se presentaron en el camino

Al Q.F. Fernando Torres Vela; Mgter. María Elena Guillen Núñez y PhD. Rita Nieto Montesinos, Dra. Yenny López Valencia nuestro especial agradecimiento por su valioso tiempo y asesoramiento y en especial por su comprensión en los momentos más difíciles que nos tocó vivir dándonos su apoyo para poder culminar la tesis

Luisa Fernanda Oriden Doménique y Yahanira Liz Berrios Calderón

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de hojas y tallos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” frente al bacilo gram positivo *Propionibacterium acnes* obtenido de la expresión de pústulas de pacientes del servicio de dermatología del Hospital III Goyeneche - Arequipa.

La primera fase de esta investigación consistió en la recolección del material vegetal de estudio en el departamento de Cusco, provincia de Calca, distrito de Lanata, la cual fue procesada en el laboratorio H-104 de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa donde se dejó desecar la muestra en sombra a temperatura ambiente.

En la segunda fase se obtuvieron tres extractos por el método de Soxhlet con solventes de diferente polaridad: Etanol polar, éter de petróleo medianamente polar y hexano apolar. El extracto que obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento fue el de etanol con un 10.8%, luego éter de petróleo con un 3.6% y finalmente hexano con un 2.2% cada uno en promedio.

Posteriormente se realizó una prueba piloto con los extractos por el método difusión de discos a una concentración de 1 mg para poder determinar el de mayor actividad antibacteriana, siendo el de mayor diámetro de halo de inhibición el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

La tercera fase se realizó en el laboratorio de microbiología H-402 donde se aisló e identificó la cepa obtenida de los pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital III Goyeneche

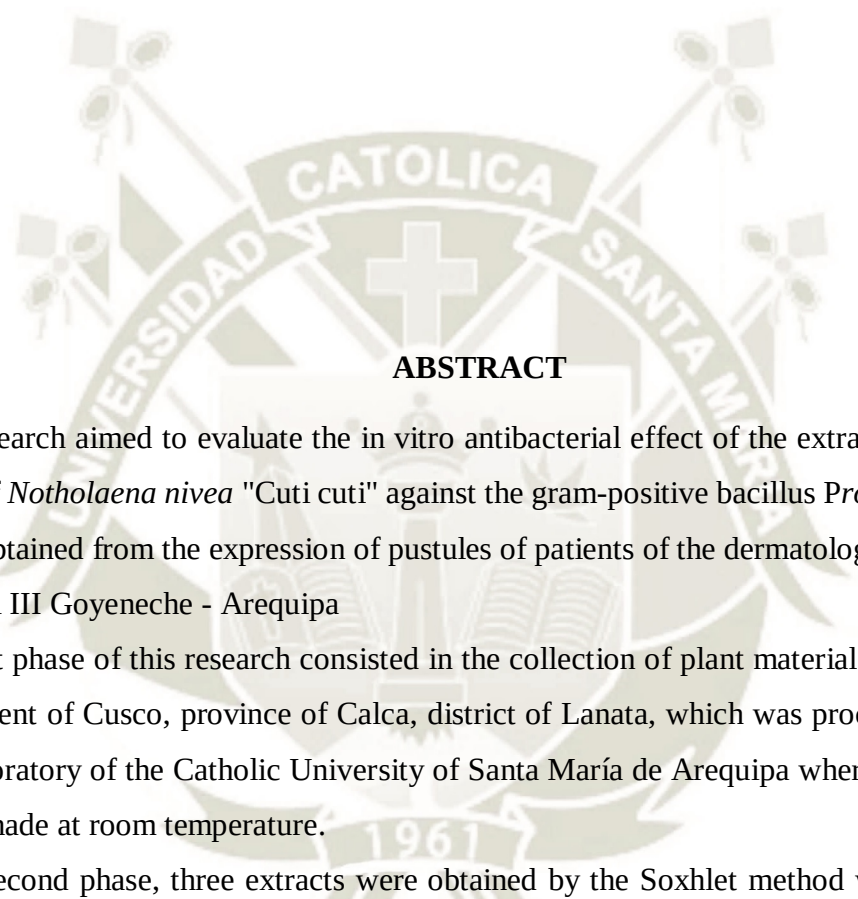
mediante tinción de gram y pruebas bioquímicas. Se obtuvieron 37 muestras de las cuales 26 fueron positivas para *Propionibacterium acnes*.

Seguidamente para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, se realizó el método de dilución en tubo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) la cual fue de 5.5 mg/ml, a partir de esta se calculó la concentración bactericida mínima (CBM) por método de siembra en agar que fue de 5.5 mg/ml para la cepa *Propionibacterium acnes*.

Por último, para observar una lectura directa de los métodos anteriores se realizó el método de difusión de discos a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, obteniendo 0.055 mg como mínima concentración a la cual se observó la formación de halos de inhibición con un diámetro en promedio de 7.2 mm indicando que a esta concentración es sensible la cepa *Propionibacterium acnes*. Sin embargo, en el Hospital III Goyeneche, se trata este tipo de acné con Tetraciclina y Doxiciclina para acné moderado-severo y Clindamicina para acné leve-moderado, que también demostraron ser efectivos para *Propionibacterium acnes*. Se realizó un antibiograma como control positivo con dichos medicamentos dando los siguientes resultados en promedio según su halo de inhibición: Clindamicina (2µg) 24 mm, Tetraciclina (30µg) 32 mm y Doxiciclina (30µg) 31 mm.

En la cuarta fase se identificaron los grupos de metabolitos secundarios de la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, los cuales fueron: taninos, terpenos, alcaloides y flavonoides por el método de cromatografía en capa fina (CCF).

PALABRAS CLAVE: *Propionibacterium acnes*, *Notholaena nivea*, “Cuti cuti”, actividad antibacteriana, sensibilidad, antibiograma, extracto etanólico.



ABSTRACT

This research aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial effect of the extract of leaves and stems of *Notholaena nivea* "Cuti cuti" against the gram-positive bacillus *Propionibacterium acnes* obtained from the expression of pustules of patients of the dermatology service of the Hospital III Goyeneche - Arequipa

The first phase of this research consisted in the collection of plant material for study in the department of Cusco, province of Calca, district of Lanata, which was processed in the H-104 laboratory of the Catholic University of Santa María de Arequipa where let the sample dry in shade at room temperature.

In the second phase, three extracts were obtained by the Soxhlet method with solvents of different polarity: Polar ethanol, moderately polar petroleum ether and apolar hexane. The extract that obtained the highest percentage of yield was ethanol with 10.8%, later petroleum ether 3.6% and finally hexane 2.2% each on average.

Subsequently, a pilot test was carried out with the extracts by the method of diffusion of discs at a concentration of 1 mg to be able to determine the one with the highest antibacterial activity, the one with the largest diameter of inhibition halo being the ethanol extract of *Notholaena nivea* "Cuti cuti".

The third phase was carried out in the H-403 microbiology laboratory where the strain obtained from the patients of the Dermatology Service of the Goyeneche Hospital III was isolated and identified by gram staining and biochemical tests. 37 samples were obtained of

which 26 were positive for *Propionibacterium acnes*. Then, to evaluate the antibacterial activity of the ethanol extract of *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, the tube dilution method was performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) which was 5.5 mg/ml, from which the minimum bactericidal concentration (CBM) per agar seeding method that was 5.5 mg/ml for the *Propionibacterium acnes* strain.

Finally, to observe a direct reading of the above methods, the method of diffusion of discs at different concentrations of the ethanol extract *Notholaena nivea* “Cuti cuti” was performed, obtaining 0.055 mg as a minimum concentration at which the formation of inhibition halos was observed with an average diameter of 7.2 mm indicating that at this concentration the *Propionibacterium acnes* strain is sensitive. However, at Goyeneche Hospital III, this type of acne is treated with Tetracycline and Doxycycline for moderate-severe acne and Clindamycin for mild-moderate acne, which also proved effective for *Propionibacterium acnes*. An antibiogram was performed as a positive control with these medications giving the following results on average according to their halo of inhibition: Clindamycin (2µg) 24mm, Tetracycline (30µg) 32mm and Doxycycline (30µg) 31mm.

In the fourth phase, the secondary metabolite groups of the *Notholaena nivea* “Cuti cuti” plant were identified, which were: tannins, terpenes, alkaloids and flavonoids by the thin layer chromatography (CCF) method.

KEYWORDS: *Propionibacterium acnes*, *Notholaena nivea*, “Cuti cuti”, antibacterial activity, sensitivity, antibiogram, ethanolic extract.

INTRODUCCIÓN

El acné vulgaris es considerado un problema de gran impacto físico como psicológico en la sociedad, ya que es una patología recurrente en el servicio de dermatología. Es un proceso crónico inflamatorio de la piel que se caracteriza por presentar comedones, pústulas y posteriormente puede haber abscesos, quistes y cicatrices; estas lesiones se observan en áreas de la piel, siendo su agente causal el *Propionibacterium acnes*.

Actualmente en la investigación de plantas medicinales ha tenido un gran auge en su utilización para la cura de enfermedades, muchas aún desconocidas y en otras no se ha encontrado explicación a sus propiedades curativas en el campo de la salud cuyo objetivo es mejorar el nivel y la calidad de vida de las personas.

En nuestro país tenemos gran diversidad de plantas medicinales que constituyen uno de los pilares de la farmacología y la medicina tradicional, siendo empleadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud.

Es de importancia conocer la eficacia y la seguridad de las plantas y sus propiedades curativas naturales, como es la especie *Notholaena nivea*, más conocida como “Cuti cuti”. Es considerado un helecho propio del altiplano, se encuentra en montañas rocosas y en valles semiáridos del este y oeste de la cordillera andina. Según el uso tradicional y las recientes investigaciones han demostrado que posee efecto hipoglicemiante, antiinflamatorio y antibacteriano, de forma natural es usada en infusiones para aliviar la tos, dolor de estómago y cabeza, ya que también muestra uso farmacológico en extracto orgánico contra el *Tripanosoma cruzi* (mal de chagas), asimismo regula y reduce los niveles de glucosa en sangre y restablece la secreción de insulina.

Previamente se realizó la revisión bibliográfica en la biblioteca de la Universidad Católica de Santa María y de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

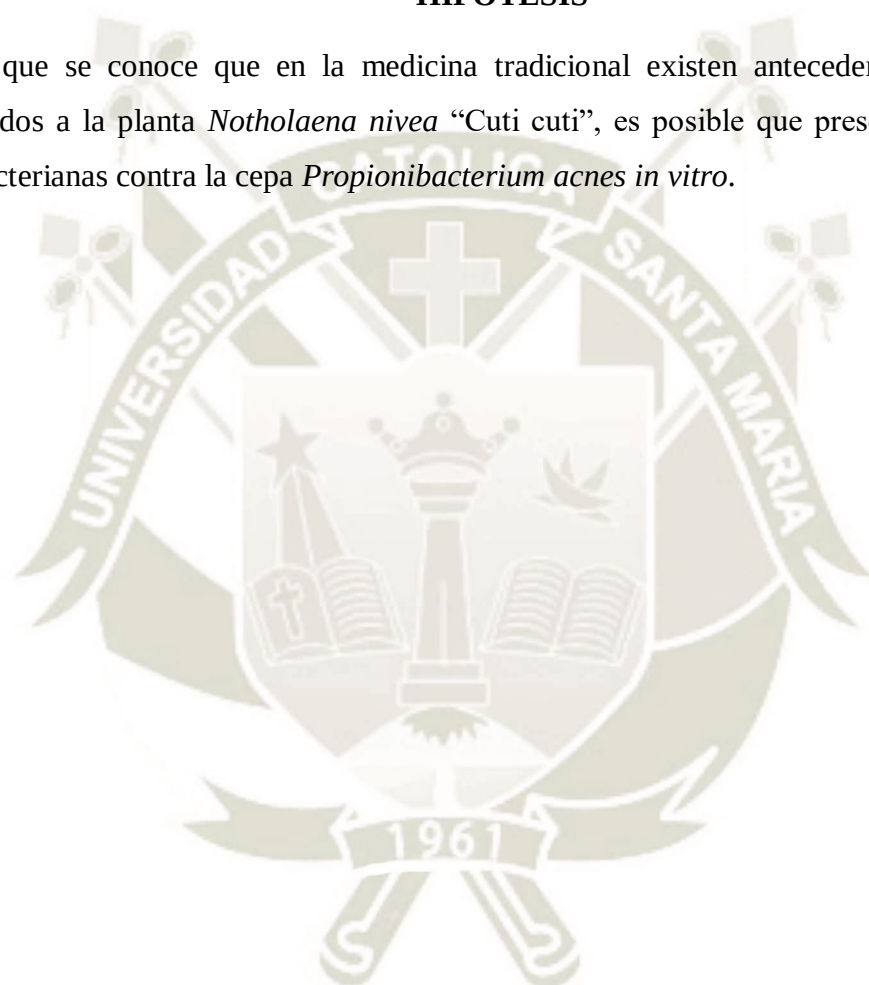
De la misma forma se revisaron base de datos, sobre estudios relacionados a la actividad antibacteriana de la especie *Notholaena nivea* “Cuti cuti” frente a *Propionibacterium acnes*. No se encontró ningún trabajo de investigación referente a las propiedades farmacológicas frente a la enfermedad del acné vulgaris de la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti”. Por lo que se decide realizar esta investigación para evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” frente a la cepa aislada del *Propionibacterium acnes*, extraída de las pústulas de los pacientes del servicio de dermatología del Hospital III Goyeneche, Arequipa.

Por consiguiente, se tratará de un estudio *in vitro* para poder determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración bactericida mínima (CBM) y su sensibilidad mediante halos de inhibición del extracto, ya que se busca dar un nuevo enfoque terapéutico para el acné y así poder dar un aporte a la sociedad con esta presente investigación.



HIPÓTESIS

Dado que se conoce que en la medicina tradicional existen antecedentes terapéuticos atribuidos a la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, es posible que presente propiedades antibacterianas contra la cepa *Propionibacterium acnes in vitro*.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener un extracto de la especie botánica *Notholaena nivea* “Cutí cutí”, a partir del método de Soxhlet y evaluar sus propiedades antibacterianas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtener el extracto de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” por el método de Soxhlet utilizando solventes como: Etanol, hexano y éter de petróleo, a su vez determinar el rendimiento de cada uno de ellos.
2. Obtener la cepa *Propionibacterium acnes* de los pacientes del departamento de medicina, servicio de dermatología del hospital III Goyeneche - Arequipa.
3. Evaluar por medio de halo de inhibición, a una concentración determinada, los extractos etanólico, hexánico y etéreo frente a la cepa *Propionibacterium acnes*, para elegir el extracto de mayor efecto antibacteriano.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) *in vitro*, a partir del extracto seleccionado de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” frente a la cepa *Propionibacterium acnes*.
5. Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto de mayor rendimiento de hojas y tallos de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” mediante la técnica de cromatografía de capa fina (CCF).
6. Determinar mediante discos de sensibilidad la actividad antibacteriana según tratamiento del acné con tetraciclina, doxiclina y clindamicina del servicio de dermatología del Hospital III Goyeneche – Arequipa

INDICE GENERAL

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	ix
HIPÓTESIS	xi
OBJETIVOS	xii
OBJETIVO GENERAL	xii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	xii
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	1
1. ACNE VULGARIS	1
1.1. CONCEPTO	1
1.2. LA PIEL Y SUS PARTES	1
1.2.1. DERMIS	2
1.2.2. EPIDERMIS	2
1.2.3. ACCESORIOS DE LA PIEL	4
1.2.3.1. FOLÍCULO PILO SEBÁCEO	4
1.3. EPIDEMIOLOGIA	6
1.4. ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS	7
1.5. CLASIFICACIÓN	9
1.5.1. CLASIFICACIÓN DEL ACNÉ	9
1.5.2. OTROS TIPOS DE LESIONES ESPECIALES	12
1.6. MICROBIOLOGÍA	14
1.6.1. MICROORGANISMOS DE ÁREAS SEBÁCEAS DE LA PIEL	14
1.7. DIAGNÓSTICO	16
1.8. TRATAMIENTO	16
1.8.1. TRATAMIENTOS DIRIGIDOS A EVITAR LA PROLIFERACIÓN DEL <i>Propionibacterium acnes</i>	17
1.8.2. TRATAMIENTOS DIRIGIDO A REDUCIR LA PRODUCCIÓN DE SEBO	20
1.9. PRINCIPAL AGENTE BACTERIANO IMPLICADO EN EL ACNÉ VULGARIS	21
1.9.1. GENERO <i>Propionibacterium</i>	21
1.9.1.1. <i>Propionibacterium acnes</i>	21
1.9.1.1.1. GENERALIDADES	21

1.9.1.1.2.MORFOLOGÍA	22
1.9.1.1.3.PATOGENICIDAD	23
1.9.1.1.4.FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO PROPIÓNICO	23
1.9.1.1.5.PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	25
1.10. ANTIMICROBIANOS	25
1.10.1. ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN .25	
1.10.1.1.LINCOSAMIDAS.....	25
1.10.1.1.1.MECANISMO DE ACCIÓN.....	26
1.10.1.1.2.CLINDAMICINA	26
1.10.1.2.TETRACICLINAS	26
1.10.1.2.1.MECANISMO DE ACCIÓN.....	26
1.10.1.2.2.TETRACICLINA.....	26
1.10.1.2.3.DOXICICLINA.....	27
1.11. CUTI CUTI (<i>Notholaena nivea</i>).....	27
1.11.1. CLASIFICACION TAXONOMICA.....	27
1.11.2. DESCRIPCIÓN.....	27
1.11.2.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS:	27
1.11.2.2. USOS DE LA ESPECIE	28
1.11.2.3. SINONIMIA	28
1.11.2.4. NOMBRE COMUN.....	28
1.11.2.5. PREFERENCIAS DE HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA ..28	
1.11.3. REFERENCIAS TOXICOLÓGICAS	29
1.11.4. REFERENCIAS DE SU EFECTO HIPOGLICEMIANTE.....	29
1.12. EXTRACTOS.....	29
1.12.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	30
1.12.1.1. EXTRACCIÓN POR SOXHLET	30
1.13. TIPOS DE EXTRACTOS.....	31
1.13.1. EXTRACTOS BLANDOS	32
1.13.2. EXTRACTOS SECOS.....	32
1.14. TEMPERATURA.....	32
1.15. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	32
1.16. FACTOR DE REFERENCIA (RF)	33
1.17. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	34
1.17.1. TERPENOS.....	34

1.17.2. FLAVONOIDES	35
1.17.3. TANINOS	37
1.17.4. ALCALOIDES	38
1.18. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL <i>Propionibacterium acnes</i>	39
1.18.1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS	39
1.18.2. AISLAMIENTO DEL <i>Propionibacterium acnes</i>	40
1.19. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA LAS BACTERIAS ANAEROBIAS	41
1.19.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO.....	41
1.19.2. MÉTODO MICROBIOLÓGICO: EXCAVACIÓN-PLACA-CULTIVO	43
1.19.3. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN	43
1.19.4. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	44
1.19.5. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	44
1.20. ANTIBIOGRAMA	45
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. TIPO DE ESTUDIO	47
1.1. MATERIAL	47
1.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	47
1.1.2. CEPA DE <i>Propionibacterium acnes</i>	47
1.2. MATERIALES DE LABORATORIO, REACTIVOS Y EQUIPO	47
1.2.1. MATERIALES.....	47
1.2.1.1. MATERIALES DE VIDRIO.....	47
1.2.1.2. EQUIPOS Y APARATOS	48
1.2.1.3. MATERIAL ANEXO	48
1.2.1.4. REACTIVOS	49
1.2.1.5. MEDIOS DE CULTIVO.....	50
1.2.2. MÉTODOS.....	50
1.2.2.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	50
1.2.2.1.1.MOLIENDA	51
1.2.2.1.2.EXTRACCIÓN DE LA PLANTA <i>Notholaena nivea</i> “Cutí cutí”	52
1.2.2.1.2.1.PROCEDIMIENTO	52
1.2.2.1.3.CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cutí cutí”	53
1.2.2.1.3.1.PROCEDIMIENTO	53

1.3.	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	54
1.4.	TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO DE LA PLANTA <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	54
1.4.1.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	54
1.4.2.	PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL	55
1.5.	PROCESAMIENTO DE LA BACTERIA EN ESTUDIO	56
1.5.1.	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	56
1.5.2.	TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	57
1.5.3.	COLORACION DE GRAM	58
1.5.4.	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	59
1.5.4.1.	PRUEBA DE LA CATALASA	59
1.5.4.2.	CULTIVO EN CALDO TRIPTICASA	60
1.5.4.3.	CULTIVO EN CALDO NITRATOS	61
1.5.4.4.	PRUEBA DE LA LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA.....	61
1.5.4.5.	CULTIVO EN CALDO MRVP (ROJO DE METILO / VOGUES-PROSKAUER).....	62
1.5.4.6.	CULTIVO EN AGAR ALMIDÓN.....	63
1.5.4.7.	CULTIVO EN AGAR BILIS ESCULINA	64
1.5.4.8.	CULTIVO EN AGAR TSI (TRIPLE SUGER IRON).....	64
1.5.4.8.1.	INTERPRETACIÓN	64
1.6.	DETERMINACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, HEXÁNICO Y ETÉREO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	65
1.6.1.	PREPARACIÓN DEL EXTRACTO MADRE.....	65
1.6.2.	PRUEBA PILOTO	66
1.6.3.	PREPARACIÓN DEL INOCULO.....	66
1.6.4.	PREPARACION DE LOS DISCOS	66
1.6.5.	METODO HOYO-PLACA-CULTIVO.....	66
1.6.6.	METODO DE DIFUSION DE DISCOS	67
1.7.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	68
1.7.1.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)	68

1.7.1.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO DEL EXTRACTO MADRE DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	68
1.7.1.1.1.PREPARACIÓN DEL INOCULO	68
1.7.1.1.2.PREPARACION DE LAS DILUCIONES.....	68
1.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	70
1.7.3. CÁLCULO DE NUEVAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI).....	70
1.7.4. DETERMINACIÓN DE LA NUEVA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MINIMA (CBM) A PARTIR DE LAS NUEVAS CONCENTRACIONES.....	72
1.7.5. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA POR EL METODO DE DIFUSION DE DISCOS	73
1.7.5.1. PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD DEL EXTRACTO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	73
1.7.5.2. MEDIO DE CULTIVO	74
1.7.5.3. LECTURA.....	74
1.8. ANTIBIOGRAMA CON LOS MEDICAMENTOS DOXICICLINA (30 mcg), TETRACICLINA (30 mcg) Y CLINDAMICINA (2 mcg)	74
1.8.1. DISCOS DE SENSIBILIDAD	74
1.8.2. LECTURA	74
1.9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	74
1.9.1. MEDIA Y DESVIACION ESTÁNDAR.....	75
1.9.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	75
1.9.3. PRUEBA TUKEY	76
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIONES	77
1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	77
1.1. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL	77
1.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	77
1.3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	78
1.4. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	78
1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	80

1.6.	PROCESAMIENTO DE LA CEPA EN ESTUDIO.....	81
1.6.1.	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS	85
1.7.	EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” FRENTE A LA CEPA <i>Propionibacterium acnes</i>	87
1.8.	ANÁLISIS FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	89
1.8.1.	IDENTIFICACIÓN GENERAL	89
1.8.2.	IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS.....	90
1.8.3.	IDENTIFICACIÓN DE TANINOS	91
1.8.4.	IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	92
1.8.5.	IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	94
1.9.	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	96
1.10.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena Nivea</i> “Cuti cuti”	97
1.11.	DETERMINACIÓN DE LA NUEVA CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A PARTIR DE LAS NUEVAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena Nivea</i> “Cuti cuti”	98
1.12.	DETERMINACIÓN DE LA NUEVA CONCENTRACION BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) A PARTIR DE LAS NUEVAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	100
1.13.	DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena Nivea</i> “Cuti cuti”	101
1.13.1.	ACCIÓN ANTIBACTERIANA FRENTE A <i>Propionibacterium acnes</i>	101
1.13.1.1.	MÉTODO HOYO-PLACA-CULTIVO	101
1.13.2.	ELECCIÓN DEL MÉTODO A USAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	103
1.13.2.1.	MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	103
1.14.	MÉTODO DIFUSIÓN POR DISCO (KIRBY-BAUER)	108
	CONCLUSIONES	112
	SUGERENCIAS	114

BIBLIOGRAFIA	115
ANEXOS.....	118



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: Estratos de piel.....	4
FIGURA N°2: Esquema Folículo pilosebáceo; 1. Epidermis;2. Infundíbulo; 3. Pelo velloso; 4. Lobulillos de las glándulas sebáceas.....	5
FIGURA N°3: Corte esquemático de la piel	6
FIGURA N°4: Patogenia del acné.....	8
FIGURA N°5: Comedón cerrado.....	11
FIGURA N°6: Comedón abierto.....	11
FIGURA N°7: Pápula inflamatoria	12
FIGURA N°8 : Nódulo.....	12
FIGURA N°9 : Estructura química de Peróxido de Benzoilo	17
FIGURA N°10 : Estructura química de Eritromicina.....	17
FIGURA N°11 : Estructura química de Clindamicina.....	18
FIGURA N°12 : Estructura química de Ácido azelaico.....	18
FIGURA N°13 : Estructura química de Nadifloxacino	18
FIGURA N°14 : Estructura química de Doxiciclina	19
FIGURA N°15 : Estructura química de Minociclina.....	19
FIGURA N°16 : Estructura química de Trimetoprima	19
FIGURA N°17 : Estructura química de Sulfametoxazol	20
FIGURA N°18 : Estructura química de Tetraciclina	20
FIGURA N°19 : Estructura química de Ácido Retinoico	21
FIGURA N°20 : <i>Propionibacterium acnes</i> en forma de barra izquierda visto a través de microscopía electrónica de barrido. Las líneas representan 1µm de longitud. Derecha <i>Propionibacterium acnes</i> cultivan en medio tioglicolato, se tiñeron con cristal violeta. Se utilizó un objetivo de 100x.	23
FIGURA N°21 : Fermentación del ácido propiónico por <i>Propionibacterium</i>	24
FIGURA N°22 : <i>Notholaena nivea</i> (Poir.) Desv Cuesta Puquios, Provincia del Loa, Región de Antofagasta – 17/09/2012 – Andrea Ugarte.....	27
FIGURA N°23 : Equipo soxhlet.....	31
FIGURA N°24 : Cuba cromatografía	33
FIGURA N°25 : Estructura Química del Isopreno	35
FIGURA N°26 : Estructura Química de los Flavonoides (Flavano).....	36
FIGURA N°27 : Estructura química de los taninos (tanino gálico).....	38
FIGURA N°28 : Principio de la difusión del antibiótico en agar: su concentración disminuye a medida que se incrementa la distancia desde el disco.	43
FIGURA N°29 : Placa de susceptibilidad con un disco de antibiótico que puede observarse un borde neto. .	43
FIGURA N°30 : <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	51
FIGURA N°31 : Molienda <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	51
FIGURA N°32 : Muestra empaquetada con papel filtro.....	52
FIGURA N°33 : Extracción de la muestra por equipo Soxhlet con diferentes solventes.....	53
FIGURA N°34 : Extracto seco de <i>notholaena nivea</i> “cuti cuti” obtenido por baño maría	53
FIGURA N°35 : Desarrollo cromatográfico	55
FIGURA N°36 : Esterilización del material de extracción	57
FIGURA N°37 : Material de extracción para el <i>Propionibacterium acnes</i>	57
FIGURA N°38 : Pacientes con diagnostico Acné Vulgaris	57
FIGURA N°39 : Muestra de extracción de pústula en caldo tioglicolato y procesamiento.....	58
FIGURA N°40 : Tinción Gram	59
FIGURA N°41 : Reacción de Catalasa.....	60
FIGURA N°42 : Reacción de Indol.....	60
FIGURA N°43 : Reacción de reducción de Nitratos	61
FIGURA N°44 : Reacción de licuefacción de la Gelatina	62
FIGURA N°45 : Reacción Rojo de Metilo	62
FIGURA N°46 : Reacción Vogues – Proskauer.....	63

FIGURA N°47 : Reacción del Almidón	63
FIGURA N°48 : Reacción Agar Bilis Esculina.....	64
FIGURA N°49 : Reacción Triple Sugar Iron	65
FIGURA N°50 : Esquema de la preparación de pozos en placa con agar Müller Hinton	67
FIGURA N°51 : Esquema de la posición de los discos en placa con agar Müller Hinton	67
FIGURA N°52 : Diluciones de la muestra para obtener diferentes concentraciones.....	69
FIGURA N°53 : Siembra de la concentración mínima inhibitoria	70
FIGURA N°54 : Preparación de nuevas concentraciones del extracto	71
FIGURA N°55 : Siembra en agar de las nuevas concentraciones del extracto.....	73
FIGURA N°56 : Extracto Etanólico, hexánico y etéreo de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	77
FIGURA N°57 : Promedios de los rendimientos (%) de los extractos de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para cada tipo de solventes.....	81
FIGURA N°58 : (A) placa de agar sangre de cordero en base soya-tripticosa sembrada en CO ₂ ; (B) placa de agar sangre de cordero en base soya-tripticosa sin sembrar	82
FIGURA N°59 : (A) Placa Agar Sangre en Base soya– Tripticasa (<i>Propionibacterium</i>); (B) Placa Agar Manitol salado no fermenta en manitol.....	83
FIGURA N°60 : (A) Placa Agar Sangre en Base soya– Tripticasa (<i>Staphylococcus aureus</i>); (B) Placa Agar Manitol salado hay crecimiento y si fermenta en manitol.....	83
FIGURA N°61 : (A) Placa Agar Sangre en Base soya – Tripticasa (<i>Staphylococcus epidermidis</i>); (B) Placa Agar Manitol salado hay crecimiento no fermenta en manitol.....	84
FIGURA N°62 : Tinción de Gram para aislado bacteriano aumento 100x	84
FIGURA N°63 : Tinción de Gram (B1) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; (B2) <i>Staphylococcus aureus</i> . aumento 100x.....	85
FIGURA N°64 : Prueba piloto de los extractos de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	88
FIGURA N°65: Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la identificación de metabolitos secundarios.....	90
FIGURA N°66 : Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la identificación de terpenos.	91
FIGURA N°67 : Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la identificación de Taninos.....	92
FIGURA N°68 : Cromatografía de capa fina del Extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la identificación de Alcaloides.....	93
FIGURA N°69 : Cromatografía de capa fina del Extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la identificación de Alcaloides.....	93
FIGURA N°70 : Cromatografía de capa fina del Extracto Etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la identificación de Flavonoides.....	94
FIGURA N°71 : Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de <i>Notholaena Nivea</i> “Cuti cuti”	97
FIGURA N°72 : Concentración bactericida mínima del extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	98
FIGURA N°73: Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” por el método de dilución en tubo.....	100
FIGURA N°74 : Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” en siembra de placa	101
FIGURA N°75 : Formación de halos de inhibición por el método hoyo-placa-cultivo en agar Müller Hilton.....	102
FIGURA N°76 : Formación de halos de inhibición por el método de difusión de discos en agar Müller Hilton.....	104
FIGURA N°77 : Promedios de los halos de inhibición del método difusión de discos	107
FIGURA N°78 : Formación de halos de inhibición de los antibióticos por el método de difusión de discos en agar Müller Hinton	108
FIGURA N°79 : Promedios de los halos de inhibición por el método difusión de discos con antibióticos ...	111

ÍNDICE DE TABLAS

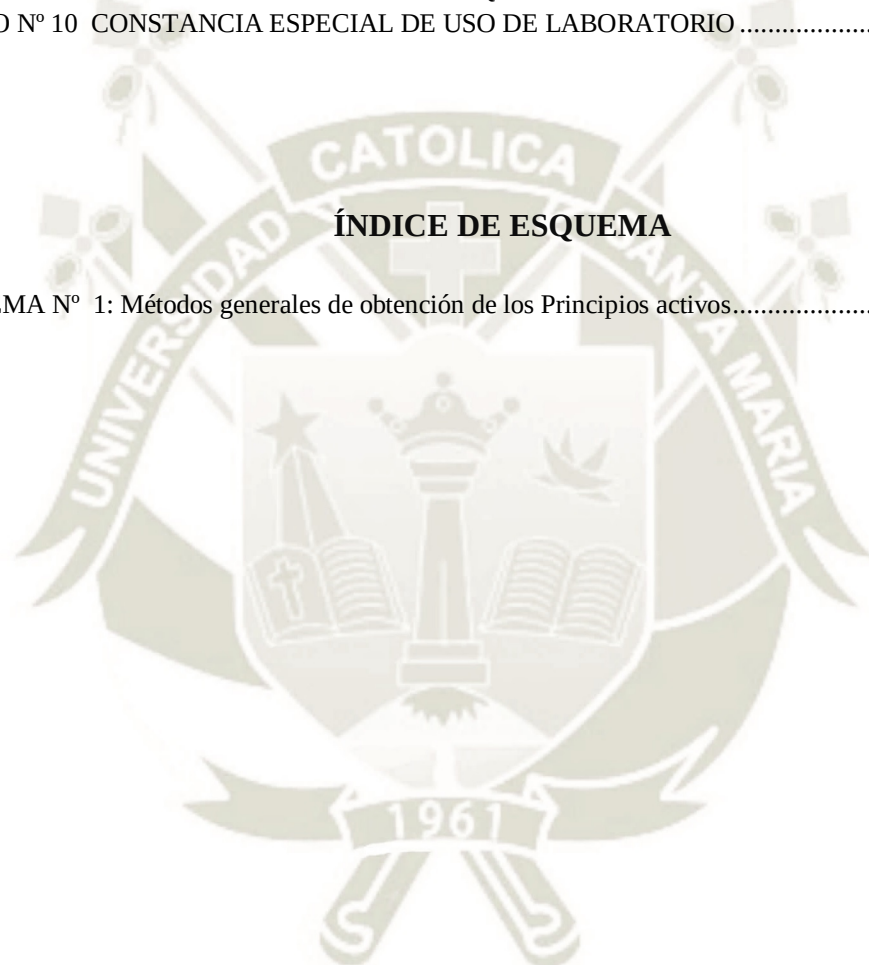
TABLA N°1: Clasificación del Acné	10
TABLA N°2: Resumen los microorganismos que colonizan las áreas ricas en sebo de la piel.....	15
TABLA N°3: Clasificación taxonómica de <i>Propionibacterium acnes</i>	22
TABLA N°4 : Fermentación, energía y organismos que la realizan.....	24
TABLA N°5 : Características para la identificación del género <i>Propionibacterium</i>	25
TABLA N°6 : Preparación de diluciones para la CMI	69
TABLA N°7: Preparación de nuevas diluciones para la CMI.....	72
TABLA N°8 : CARACTERES ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS DE <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	78
TABLA N°9 : Porcentaje de rendimiento promedio de los extractos secos de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	79
TABLA N°10 : Análisis de Varianza (Anova) de los Extractos de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	80
TABLA N°11 : Comparación de medias significativamente diferentes para el rendimiento de los extractos de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	80
TABLA N°12 : Comparaciones en parejas de Tukey HDS de los extractos de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	81
TABLA N°13 : Resultados de la identificación bioquímica	85
TABLA N°14: Resultados del análisis microbiológico en pacientes con acné vulgaris	86
TABLA N°15 : Evaluación preliminar por el método difusión de discos	88
TABLA N°16 : Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti”	95
TABLA N°17: Diluciones para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (n=5).....	96
TABLA N°18 : Diluciones del Extracto Etanólico de <i>Notholaena nivea</i> “Cuti cuti” para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria sobre <i>Propionibacterium acnes</i> (n=5).....	99
TABLA N°19 : Halos de Inhibición por el Método Hoyo-Placa-Cultivo	102
TABLA N°20 : Halos de inhibición por el método difusión de discos	103
TABLA N°21: Análisis de varianza ANOVA para el método difusión de discos.....	105
TABLA N°22 : Medias con intervalos de confianza del 95.0% - Tukey HSD para el método difusión de discos	105
TABLA N°23 : Comparación de las medias significativamente diferentes de los halos de inhibición para el método difusión de discos.....	106
TABLA N°24 : Comparaciones en parejas de Tukey HDS de los halos de inhibición del método difusión de disco	106
TABLA N°25 : Halos de inhibición por el método difusión de discos de los medicamentos	108
TABLA N°26 : Análisis de varianza ANOVA para el método difusión de discos con antibióticos	109
TABLA N°27 : Medias con intervalos de confianza del 95.0% - Tukey HSD para el método difusión de discos con antibióticos	109
TABLA N°28 : Comparación de las medias significativamente con intervalos de confianza del 95% - Tukey HSD para el método difusión de discos con antibióticos	110
TABLA N°29 : Comparaciones en parejas de Tukey HDS de los halos de inhibición del método difusión de disco con antibióticos	110

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1 CERTIFICADO DE IDENTIFICACION DE LA ESPECIE BOTANICA.....	118
ANEXO N° 2 DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN	119
ANEXO N° 3 EJEMPLO DECONSENTIMIENTO INFORMADO.....	122
ANEXO N° 4 CONSTANCIA DE TRABAJO DE INVESTIGACION.....	124
ANEXO N° 5 INSERTO AGAR SAGRE	125
ANEXO N° 6 CONTROL DE CALIDAD DISCOS DE DOXICILINA	127
ANEXO N° 7 CONTROL DE CALIDAD DISCOS DE CLINDAMICINA	128
ANEXO N° 8 CONTROL DE CALIDAD DISCOS DE TETRACICLINA.....	129
ANEXO N° 9 INFORME DEL ANALISIS FISICOQUIMICO DE LA MUESTRA VEGETAL	129
ANEXO N° 10 CONSTANCIA ESPECIAL DE USO DE LABORATORIO	129

ÍNDICE DE ESQUEMA

ESQUEMA N° 1: Métodos generales de obtención de los Principios activos.....	30
---	----



CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1. ACNE VULGARIS

1.1. CONCEPTO

Es una enfermedad en la cual intervienen varios factores que dañan la unidad pilosebácea. La función y la estructura de la unidad pilosebácea, sufre cambios, lo cual en medicina se singulariza por el crecimiento de flemones, nódulos, comedones, abscesos, pústulas, lesiones, pápulas, y quistes, lesiones que ocasionalmente podrían dejar cicatrices (1).

Se encuentra en zonas de la piel en las cuales existen la abundancia de unidades pilosebáceas y que tiene perceptibilidad singular a los andrógenos (hormonas sexuales masculinas), en la cara del hombre y algunas ocasiones en el tronco, la zona superior de la espalda y el área central del tórax anterior. Es variable su espectro clínico a partir de formas que no presentan inflamación hasta las que presentan inflamación muy grave (2).

Es un padecimiento muy complejo en el cual están inmersos variados elementos, como en la excreción, composición y secreción del sebo, el incremento de sucesos inflamatorios, la ocupación de la luz de los folículos por la microflora, asimismo de modificaciones en la queratinización epidérmica.

1.2. LA PIEL Y SUS PARTES

La piel, es un órgano compuesto por distintos tejidos, en conjunto ejecutan tareas particulares. La piel es uno de los órganos más extensos del cuerpo en términos de peso y superficie. En los individuos adultos, la piel pesa de 4.5 a 5 kg, ocupa una zona de 2 m² en el cuerpo, su grosor va desde los 0.5 mm a los 4 mm, ésta dependerá en donde se halle. La piel no solamente ocupa la extensión total del cuerpo, asimismo ejecuta diversas tareas importantes y está conformada por 2 capas o estratos esenciales:

- Una interna, compuesta por tejido conjuntivo, que es llamada dermis o corion.
- Una externa, constituida por epitelio de superficie, que se denomina epidermis (3).

1.2.1. DERMIS

Es la armadura de sostenimiento de la piel que le otorgan elasticidad y resistencia. El tejido conectivo fibroelástico es el componente principal de la piel. Posee una alta cantidad de fibras, la matriz extracelular, estas fibras no están sumamente compactadas de colágeno, es decir, con un porcentaje menor al 75%, además de reticulina y elastina. La capa Dermis es un tejido vascularizado (provisto de vasos sanguíneos) que proporciona alimentación y sostenimiento a la epidermis. Viene a ser la más grande masa de la piel y tiene un máximo grosor de 5 mm. En forma histológica, está dividido en 2 capas, que son las siguientes:

- Capa interior: Capa reticular (stratum reticulare)
- Capa exterior: Capa papilar (stratum papillare) (4).

Se la llama también “capa papilar” debido a la existencia de proyecciones hacia adentro de la epidermis, estas proyecciones se llaman papilas dérmicas, que se turnan con los procedimientos entre papilas dérmicas.

En las papilas dérmicas se ubican las asas capilares (que son parte del sistema circulatorio), que suministran nutrientes a la epidermis avascular (que no poseen vasos sanguíneos). Asimismo, tienen muchos vasos linfáticos, receptores sensoriales y terminaciones nerviosas la capa papilar dérmica.

La capa reticular tiene un grosor más amplio con respecto a la capa papilar, y es llamado así por la retícula o estructura de las fibras colágenas que crean gruesos haces de fibras elásticas con haces entrelazados. Este entramado es la cual brinda adaptabilidad y elasticidad a variaciones de volumen y desplazamientos (4).

1.2.2. EPIDERMIS

Es un epitelio plano queratinizado y poliestratificado que ocupa el total de la extensión corpórea. Capa de la piel con mayor cantidad de células y con una mecánica de sustitución sumamente enorme. Tiene un espesor que varía, en un 0.1 mm, llegando a tener en zonas como en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, un espesor que varía desde 1 hasta 2 mm.

Conformada por 4 capas o estratos distintos que, desde las más internas a las más externas son:

- Capa basal (stratum basale)

- Capa de células espinosas (stratum spinosum)
- Capa granular (stratum granulosum)
- Capa córnea (stratum corneum)

En dichas áreas donde hay presencia de mayor grosor, la epidermis presenta 5 capas, al tener una capa lúcida (stratum lucidum), que sería la capa adicional, la cual se halla situada entre la capa granular y la capa córnea.

a) Las capas de células basales y espinosas: Están compuestas por células vivas que constantemente se multiplican por división a través de mitosis. Estas células tomarán el lugar de las células desgastadas en la capa córnea y son denominadas en conjunto la capa germinativa.

b) Las otras 3 capas o estratos conforman la capa córnea y abarcan a las células muertas. En la capa granular, las células hacen síntesis de la queratohialina, la cual es una sustancia que precede a la queratina que se aglomera en gránulos dentro del citoplasma, por esta razón esta capa es llamada así.

La capa lúcida, que se sitúa habitualmente en la zona de mayor grosor de la piel, es decir en las plantas de los pies y en las palmas de las manos; esta capa no está presente en la piel delgada. Está conformado de 3 a 5 filas de células planas, claras y muertas, que tienen todavía acción enzimática.

La capa córnea está compuesta por células aplanadas y residuos de células ubicadas unas encima de otras, a manera de tejas y firmemente envueltas, que han conseguido perder sus orgánulos citoplasmáticos y su núcleo, terminando siendo conformadas casi totalmente por filamentos de queratina, aglomerados en haces llamados monofilamentos.

Está compuesto por 15 hasta 20 capas celulares, de ellos la última capa se pierde paulatinamente por el proceso de descamación. Este procedimiento de recambio y erosión continua permite la renovación total de la epidermis en un tiempo cercano a 30 días, desde que se genera la división de las células hasta que las mismas se desprendan de la extensión de la piel (Figura N° 1) (4).

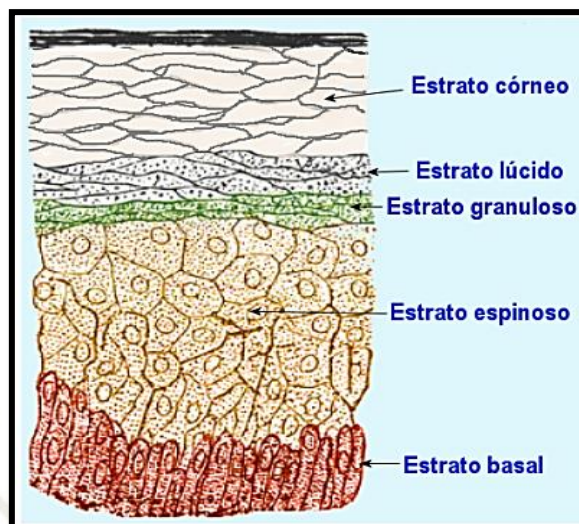


FIGURA N°1: Estratos de piel

FUENTE: Fisiología general (Garcia Gerry) (4)

1.2.3. ACCESORIOS DE LA PIEL

La membrana cutánea o piel, pertenece al sistema tegumentario, compuesto por la piel y sus derivados que son: las glándulas subcutáneas, las uñas y el pelo (3).

1.2.3.1. FOLÍCULO PILO SEBÁCEO

La glándula sebácea es una extensión del folículo piloso sebáceo, solamente en casos excepcionales están presentes las glándulas sebáceas libres, como en los genitales o en la boca, cuyo canal o conducto secretor permite el drenaje en forma lateral en el interior del folículo, que muestra desde allí la zona final del canal. La densidad y cantidad de las glándulas sebáceas foliculares está correspondido con el de los folículos pilosos sebáceos. Las plantas de los pies y las palmas de las manos son áreas que no tienen glándulas sebáceas. Se asocian las glándulas sebáceas grandes con los folículos pilosos terminales y los vellos se asocian con otros menores. Los folículos sebáceos son algunos pequeños pelos vellosos y ciertos folículos que presentan grandes glándulas sebáceas.

Se hallan en las partes superiores del cuerpo y en la cara, donde se origina la producción más frecuente del acné. (Figura N° 2)

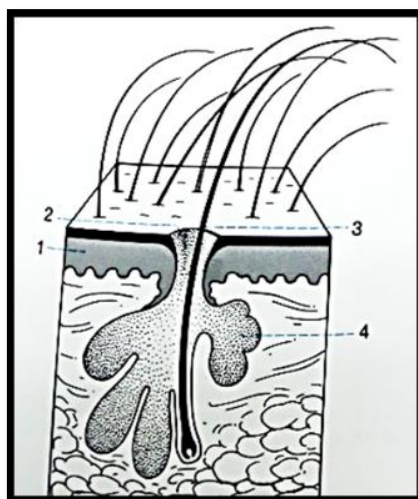


**FIGURA N°2: Esquema Folículo pilosebáceo; 1. Epidermis;
2. Infundíbulo; 3. Pelo velloso; 4. Lobulillos de las glándulas sebáceas.
FUENTE: “Dermatología” enfermedades de las glándulas sebáceas (5)**

El producto obtenido de las glándulas sebáceas holocrinas que realizan la síntesis del sebo, es una sustancia amarillenta fluida, que está conformado por ácido graso y glicéridos. Las glándulas sebáceas poseen receptores para andrógenos y realizan la metabolización de los andrógenos.

La magnitud de la producción de sebo está en dependencia de diferentes elementos:

Factores genéticos constitucionales, como edad (luego del descenso posparto, se incrementa en la pubertad con un máximo hasta los 25 años y subsiguiente descenso gradual; en regiones del cuerpo especialmente en la cara, en el medio de la espalda y del torso; elementos relacionado a las hormonas como la inhibición por estrógenos y estimulación por andrógenos; es discutido los resultados que pueden traer los elementos dietéticos.

Los folículos sebáceos presentan una flora local como: levaduras (*Pityrosporym ovale*), ácaros (*Demodex folliculorum*) y bacterias (*Staphylococcus epidermidis*, *propionibacterias*).

Función de las glándulas sebáceas: Se basa en el engrasado de los pelos; el engrasado de la piel, que se da cuando el sebo conforma conjuntamente con la grasa de la piel y el sudor la lámina exterior de la piel.

Infundíbulo: es el fragmento más exterior y se amplía desde la desembocadura en la extensión cutánea hasta el área donde surge la glándula sebácea.

Istmo: está conformado entre la inclusión del músculo erector del pelo y la desembocadura de la glándula sebácea

Zona inferior: se expande a partir de la implantación del músculo hasta el bulbo.

Canal folicular: Es un epitelio queratinizado, grande en toda su extensión, que prosigue con la epidermis superior y va surgiendo paulatinamente a partir del área inferior del conducto. Está relleno de sebo, queratina y flora bacteriana-micótica: *Pityrosporum ovale* (causa de la caspa) y *Cutibacterium acnes* (llamado anteriormente *Propionibacterium acnes*) (5). (Figura N° 3)

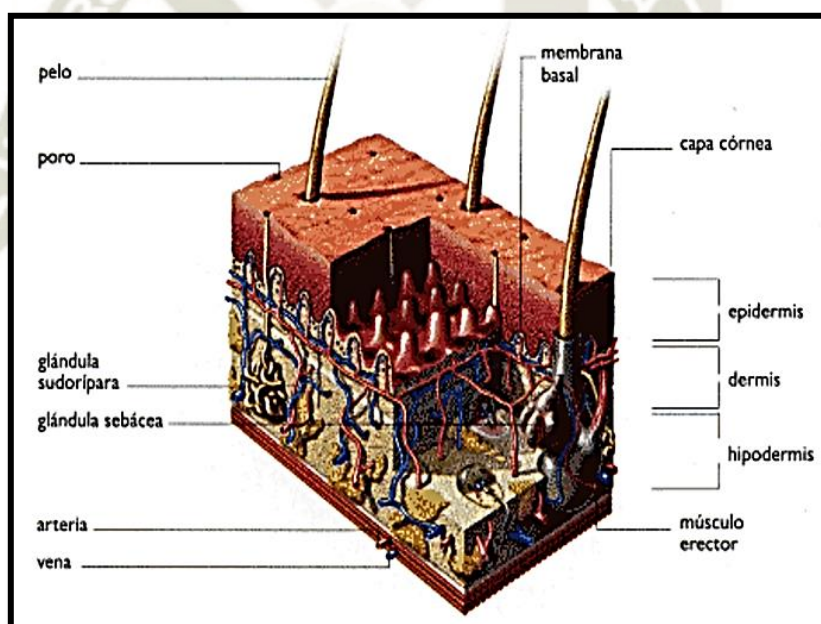


FIGURA N°3: Corte esquemático de la piel

FUENTE: Gómez Serna G. Fundamentos de medicina Biológica (6)

1.3. EPIDEMIOLOGIA

El acné es una enfermedad que se da en la mayor parte de los adolescentes y jóvenes adultos a nivel mundial; posiblemente sea el mayor motivo de consulta médica, debido a que produce un alto impacto en la calidad de vida y en la sociedad. Asimismo, se acostumbra a incluir a la familia tanto en lo económico como en lo

afectivo. El apogeo de esta enfermedad se da entre los 12 a los 24 años que es donde más prevalece.

La influencia se da en similar magnitud en enfermos de todas las razas; en personas blancas se contempló que el acné nódulo quístico del dorso es más grave que en personas negras.

Es variable la edad de inicio, desde los 13 a los 14 años en los niños, desde los 12 a los 13 años en las niñas, lo que es posible, debido a que, el comienzo de la pubertad es más prematuro en las niñas.

El punto más alto de gravedad se da desde los 19 a los 21 años en varones y desde los 17 a los 18 años en mujeres.

En la mayor parte de los perjudicados el procedimiento se soluciona a lo largo de la adolescencia; no obstante, el 3% de los varones y el 12% de las damas podrá perdurar hasta luego de cumplir los 44 años.

1.4. ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS

La patogenia del acné es polifacética, aunque se han reconocido 4 fases fundamentales. Los factores importantes son los siguientes:

- 1) Actividades y la existencia del *Propionibacterium acnes*.
- 2) La hiperproliferación epidérmica de los folículos.

Estos procedimientos están vinculados y se encuentran sometidos por la influencia inmunitaria y de las hormonas. La hiperproliferación epidérmica de los folículos nos lleva a la conformación del microcomedón. El tejido epitelial del folículo piloso superior, el infundíbulo se vuelve hiperqueratósico, con un incremento de la unión de los queratinocitos (células predominantes de 80% a 90% de la epidermis). Las células en demasía y su forma de adherirse provocan un bloqueo en el agujero (ostium u orificio corporal) de los folículos.

Este bloqueo o tapón provoca concreciones (formación sólida en los tejidos vivos) retrogradas de bacterias, queratina y sebo que se aglomeran dentro del folículo piloso. Las concreciones acumuladas amplían el folículo piloso superior, lo que genera un microcomedón (pequeña espinilla o barro).

No se conoce lo que produce el incremento de la adhesión y lo que incentiva la hiperproliferación de los queratinocitos. Sin embargo, se han planteado una variedad de elementos causantes en la hiperproliferación de los queratinocitos como: la reducción del ácido linoleico, la estimulación de los andrógenos, las consecuencias del *Propionibacterium acnes*, incremento de la actividad de la interleucina-1 (IL-1) α . (Figura N° 4)

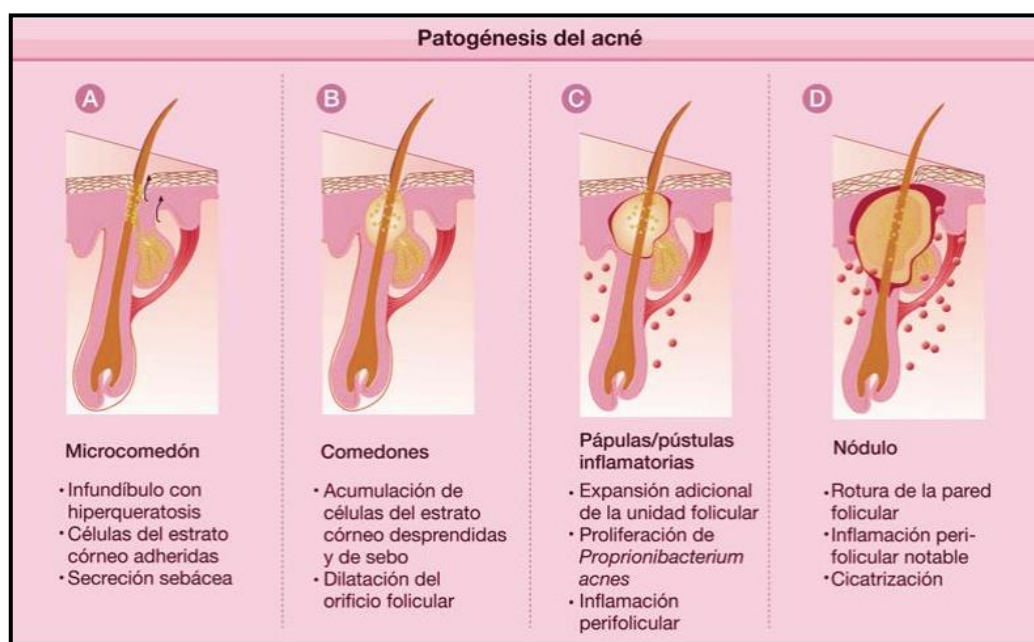


FIGURA N°4: Patogenia del acné

FUENTE: Goldsmith, et. al. “Dermatología en Medicina General”, 8ª EDICIÓN TOMO I (31)

En la patogenia del acné, la segunda cualidad más importante, es cuando se produce en abundancia sebo, acción llevada a cabo por las glándulas sebáceas.

Los sujetos que padecen de acné generan más sebo que los que no lo tienen, pero la calidad del sebo es idéntica en los 2 grupos. Los elementos del sebo son los siguientes: los lipoperóxidos y los triglicéridos, que pueden ejecutar una labor en la patogenia de la enfermedad del acné. Los triglicéridos han sufrido degradación por la bacteria *Propionibacterium acnes* (flora normal de la unidad pilosebácea) hasta llegar a ser ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos libres impulsan la adicional ocupación y la aglomeración de la bacteria *Propionibacterium acnes*, promueven la inflamación y pueden llegar a convertirse en comedogénicos (es decir que obstruyen

los poros de la piel, causando barritos, espinillas y puntos negros). Los lipoperóxidos asimismo generan citocinas proinflamatorias que incitan las vías de los Receptores Activados por el Proliferador del Peroxisoma (PPAR, por sus siglas en inglés son Peroxisome Proliferator Activated Receptors), lo que provoca el incremento del sebo. Sigue en expansión el microcomedón con sebo, bacterias y queratina, estando compactamente acumulados. Ocasionalmente, esta laxitud generará que la pared folicular se rompa. La queratina al ser expulsada, las bacterias y el sebo en dirección a la dermis generan una reacción de inflamación fuerte.

De igual manera realiza el *Propionibacterium acnes*, una tarea dinámica en el desarrollo de la inflamación, esta es una bacteria que se halla en el folículo sebáceo.

Al sufrir la enfermedad del acné, los adolescentes tienen una cantidad mayor de concentración de *Propionibacterium acnes*, comparándolos con los controles que no lo padecen. No obstante, no hay correspondencia entre el número total de *Propionibacterium acnes* que existen en el folículo sebáceo y la gravedad de la alteración. La distinción de sebocitos y las reacciones proinflamatorias de citocinas y quimiocinas son diversas, de acuerdo, a la cepa de *Propionibacterium acnes* que prevalezca en el interior del folículo.

Abarca un antígeno de clase carbohidrato, la pared celular de *Propionibacterium acnes* que incentiva el crecimiento de anticuerpos contra la bacteria *Propionibacterium acnes*, el anticuerpo posibilita la reacción inflamatoria, con accionamiento del complemento, de modo que así comienza una catarata de acontecimientos proinflamatorios. (31)

1.5. CLASIFICACIÓN

1.5.1. CLASIFICACIÓN DEL ACNÉ

- Grado I. Existencia de expansiones de folículos, asimismo de comedones pequeños ya sean negros o blancos.
- Grado II. Existencia de lesiones pustulosas exteriores, así como de comedones bien sean negros o blancos.
- Grado III. Existencia de lesiones inflamatorias más graves, comedones negros o blancos, y lesiones pustulosas externas. Dejando manchas hiperpigmentadas y cicatrices superficiales ocasionales.

- Grado IV. Existencia de lesiones quísticas que presentan cicatrización continua, infección secundaria grave y trayectos fistulosos. La existencia de cicatrices expresa la presencia de sucesos preliminares de acné crítico, y su existencia podrá explicar la aplicación de un tratamiento más fuerte para impedir su surgimiento posterior.

Además, antes de establecer un tratamiento, se debe de valorar las consecuencias psicológicas y el impacto del acné en los adolescentes (Tabla N° 1) (1).

TABLA N°1: Clasificación del Acné

CLASIFICACIÓN		
Según edad de presentación	Neonatal	0-30 días
	Del lactante	1-24 meses
	Infantil	2-7 años
	Preadolescente	8-11 años
	Adolescente	11-25 años
	Del adulto	>25 años
Según lesión predominante	Comedónico	
	Pápulo-pustuloso	
	Nodulo-quístico	
Según grado de severidad*	Leve	< de 20
	Moderado	20-50
	Severo	> de 50
Formas especiales	Fulminans	
	Conglabata	
*Número de lesiones en una hemicara		

FUENTE: Clasificación del acné: Consenso Ibero-latinoamericano, 2014 A Kaminsky, * M Florez-White, ‡ MI Arias, § E Bagatin II en nombre del Grupo Ibero Latinoamericano de Estudio del Acné (GILEA-CILAD) (32)

Tiene distensión el infundíbulo folicular, repleto de sebo y queratina, y el epitelio folicular presenta atenuación. El orificio del folículo (ostium folicular) es angosto. (Figura N° 5)



FIGURA N°5: Comedón cerrado

FUENTE: Dermatología en Medicina General”, 8ª EDICIÓN TOMO I (31)

Es parecido al comedón cerrado, excepto que posee un orificio del folículo (ostium folicular) con abertura y ampliado. (Figura N° 6)



FIGURA N°6: Comedón abierto

FUENTE: Dermatología en Medicina General”, 8ª EDICIÓN TOMO I (31)

Células inflamatorias intensas y graves, circundan y se introducen en el interior del folículo, el cual presenta hiperqueratosis dentro del infundíbulo. (Figura N° 7)

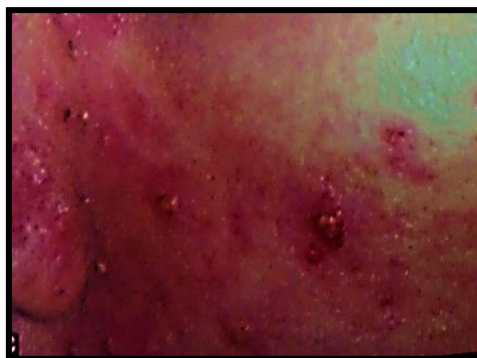


FIGURA N°7: Pápula inflamatoria

FUENTE: Dermatología en Medicina General”, 8ª EDICIÓN TOMO I (31)

Está repleto el folículo, con células inflamatorias intensas. Debido al rompimiento del folículo laxado, se genera una reacción granulomatosa contra un cuerpo raro que no forma parte del organismo. (Figura N° 8)



FIGURA N°8 : Nódulo

FUENTE: Dermatología en Medicina General”, 8ª EDICIÓN TOMO I (31)

1.5.2. OTROS TIPOS DE LESIONES ESPECIALES

- a) **El acné conglobata.** Las heridas dañan el cuello y la cara, están muy ampliadas en el tórax, en donde son más agudas; existen comedones dobles que están en comunicación bajo de la piel; los abscesos, los grandes quistes y los nódulos tienen mayor predominancia. Es una entidad grave que puede persistir hasta los 40 a 50 años.
- b) **La variedad queloidea.** Se muestra en personas que tienden a formar cicatrices queloideas o hipertróficas; dañando con mayor habitualidad la zona del esternón.

- c) **El acné fulminans.** Es un tipo de ulcera extraña de origen no conocido, es casi particular de hombres jóvenes con precedentes de acné juvenil que muestra una fulminante exacerbación; se localiza en el tórax y en la cara, existe la presencia de herida con inflamación necrótica (muerte de células o tejido) con costras y úlceras encima de lesiones del nódulo quístico. En la mitad de los pacientes existe la presencia de artralgias (intenso dolor en las articulaciones), y mialgias (dolor muscular), con anemia, disminución de peso, leucocitosis, incremento de la sedimentación de eritrocitos y fiebre; pudiendo convivir con lesiones osteolíticas, (destrucción del tejido óseo), hasta en un 40% de los enfermos, y presentando alopecia, enfermedad de Crohn con sinovitis (inflamación de las membranas sinoviales) y eritema nudoso.
- d) **Acné inverso.** Está caracterizado por la tríada o tétrada de estrechamiento del folículo que se conforma por: quiste, hidradenitis supurativa perineoglútea o axilar, folliculitis disecante de piel cabelluda y el acné conglobata.
- e) **Acné neonatal e infantil.** Es más habitual en hombres; se presenta hasta en un 20% de los neonatos y puede surgir hasta las primeras semanas de vida del niño. Está en relación con la glándula suprarrenal fetal, que no es proporcionalmente grande, genera una cantidad superior de dehidroepiandrostenediona (DHEA). Se presentan pápulas, pústulas y comedones cerrados en la nariz, frente y mejillas. No se conoce el origen del acné en los infantes; surge entre los meses 3 y 6, y se va entre los 3 y 4 años de edad.
- f) **Acné androgénico.** Es resultado de la producción en exceso de andrógenos, causado por ovarios poliquísticos (Síndrome de Stein Leventhal) o por otras alteraciones endocrinas, así como el síndrome adrenogenital o de Cushing (que está caracterizado por una excesiva producción de andrógenos y el surgimiento de una virilización en la mujer adulta); es frecuente que se represente por el síndrome SAHA: conformado por seborrea, acné, hirsutismo y alopecia.
- g) **Acné excoriado de las jóvenes.** Es provocado por neurosis (trastornos nerviosos y alteraciones emocionales sin presencia de ninguna lesión física en el sistema nervioso) y se da casi totalmente en mujeres. Existen algunas

pápulas y comedones que al ser tocados continuamente provocan cicatrices, costras y excoiaciones (lesión en la piel u originada por rozadura continua). Dermatitis acneiformes. Ocurren por contacto o inducción externa recibiendo el nombre de los productos vinculados como son: acné por pomada, acné cosmético, acné mecánico, acné por detergente, acné estival por fotoprotectores o cremas, provocados por demodectosis o demodicosis y corticosteroides, la cual es una enfermedad ocupacional originada por contacto grave con hidrocarburos aromáticos halogenados que cursa con complicaciones sistémicos (sistema nervioso, lípidos, ojos e hígado) (1).

1.6. MICROBIOLOGÍA

El elemento microbiológico con sus resultados inmunitarios es importante en el aumento de la inflamación en el acné. (32)

1.6.1. MICROORGANISMOS DE ÁREAS SEBÁCEAS DE LA PIEL

La flora de la piel o cutánea está conformada por las floras transitoria y residente. La flora transitoria se compone de microorganismos que se obtienen del medio externo como los contaminantes y que no tienen la capacidad de proliferarse.

La flora residente está compuesta por microorganismos que viven y se proliferan dentro de la piel y está conformada por hongos, como el *Malassezia furfur* y por bacterias como las bacterias aerobias *corineformes*, *Propionibacterium* y *Staphylococcus*. (Tabla N°2)

Una perspectiva universal o supervivir por una cantidad mayor de horas sobre la superficie, está conformada por *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, bacilos gramnegativos, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Bacillus*, y *Neisseria*. Cuando se tenga piel alterada, o cuando se está cerca de depósitos como la región peribucal, el perineo, entre otros. Estos organismos microscópicos pasajeros pueden convertirse en moradores por días e incluso semanas. Los iniciales organismos microscópicos que ocupan la piel son *Staphylococcus* y en todo el periodo en que se desarrolla la flora residente que finaliza en la etapa de la pubertad. (Tabla N° 2) (32).

TABLA N°2: Resumen los microorganismos que colonizan las áreas ricas en sebo de la piel

MICROORGANISMO QUE COLONIZAN ÁREAS DE PIEL RICAS EN SEBO		
MICROORGANISMO	LOCALIZACIÓN FOLICULAR	SUPERFICIE
<i>P. acnés</i>	+	+
<i>P. granulosum</i>	+	+
<i>Staphylococcus (no S. aureus)</i>	+	+
<i>Micrococcus</i>	+/-	+
<i>Corineformes aerobios</i>	+/-	+
<i>M. furfur</i>	+	+
<i>Propionibacterium bacteriófago</i>	(+)	(+)
+/- Prevalencia menor que otros microorganismos de la lista (+) se presume presentes		

FUENTE: Kaminsky, Ana; Acné: un enfoque global. - 1a ed. - Buenos Aires: Colegio Ibero-Latinoamericano de Dermatología, 2007 (32).

En esta fase final se consiguen niveles ponderables de población microbiana que pueden alcanzar hasta 107 organismos microscópicos por cm². Desde esta edad la flora es continua hasta la senectud, en que empieza a reducirse.

Tiene variados dispositivos de control la superficie de la piel, como ser capaz de adherirse, el pH, interferencia de los microbios, descamación, los lípidos de la superficie, humedad y la inmunidad superficial. Hay modificaciones en la ocupación que están supeditadas a la seborrea (origina piel roja y zonas escamosas en el cuero cabelludo), humedad, la edad, la proximidad a aberturas naturales y la zona de la piel dañada.

Es capaz de colonizar la piel, la microflora residente, debido a que las bacterias tienen paredes celulares sólidas y anchas, lo cual evita la desecación por variaciones en la presión osmótica exterior. No son organismos microscópicos que se muevan y secreten enzimas fuera de la célula, que logran la degradación de

polímeros en la superficie de la piel afectada. Un ejemplo de estos organismos es el *Propionibacterium acnes*, que predomina en los folículos sebáceos, participando activamente en la patogenia del acné.

Por consiguiente, el interés científico está centrado en el *Propionibacterium acnes*. Asimismo, es conocido este organismo, como *Propionibacterium granulosum* o tipo II y *Propionibacterium* tipo I, ocupa la piel desde de la etapa de la pubertad y se multiplica en forma rápida hasta los 18 años de edad, para después disminuir paulatinamente cerca de los 45 años de edad. La bacteria *Propionibacterium acnes* tiene una relevancia mayor y es más prevalente en las lesiones causadas por el acné. Generalmente en el folículo sebáceo vive una sola clase de *Propionibacterium*; la convivencia de las dos bacterias es extraña. (32)

1.7. DIAGNÓSTICO

En la adolescencia el diagnóstico del acné generalmente es sencillo, las lesiones existentes son pápulas, comedones cerrados o abiertos, nódulos, pústulas, y en los casos más graves fístulas y abscesos ubicados en la cara en un 99% de los casos, en la espalda en un 60% y en el pecho en un 15% de los casos. Es habitual que esté acompañado de seborrea.

Inicia por la recolección acerca de: fármacos y productos químicos, procedimiento preliminar y su eficacia, nivel de aprobación psicológica del adolescente y las alteraciones y tiempo en las lesiones.

En la diagnosis del acné, se tiene en cuenta 4 elementos esenciales como: La gravedad, elementos vinculados, duración y clase de lesión (1).

1.8. TRATAMIENTO

Es complicado el tratamiento del acné y está basado en el escogimiento de distintas disposiciones terapéuticas de manera particular e individual para cada enfermo, en relación con la gravedad del acné y las cualidades de su piel.

Por consiguiente, en tanto que las formas ligeras de la enfermedad pueden ser manejadas solamente con medicamentos de aplicación externa, las mesuradas y críticas recibirán siempre medicamentos de aplicación interna u oral y por esta razón, deberán ser tratados con especificación oral y, por lo tanto, deben ser tratados específicamente por dermatólogos (31).

1.8.1. TRATAMIENTOS DIRIGIDOS A EVITAR LA PROLIFERACIÓN DEL *Propionibacterium acnes*

Tiene sensibilidad el *Propionibacterium acnes* a diversos antibióticos *in vivo*, pero no en su totalidad pueden alcanzar la concentración necesaria en el entorno que tiene muchos en lípidos en el folículo sebáceo (6).

- **Peróxido de Benzoilo:** Está disponible en 3 concentraciones como son 2.5%, 5% y 10%. Es anticuado, pero es muy eficiente para el tratamiento de uso exterior de las lesiones inflamatorias, en especial si se vincula a un antibiótico de uso exterior como la eritromicina. Puede llegar a enrojecer a la piel si se utiliza de una manera inapropiada y decolorarse con intensidad por el roce con la ropa oscura de cama o de vestir. (Figura N° 9,10)

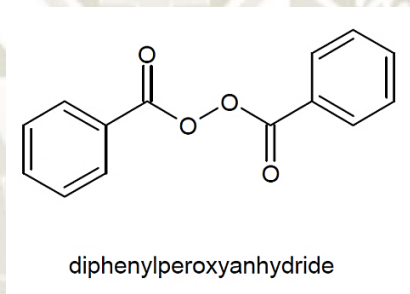


FIGURA N° 9 : Estructura química de Peróxido de Benzoilo

FUENTE: Chems sketch

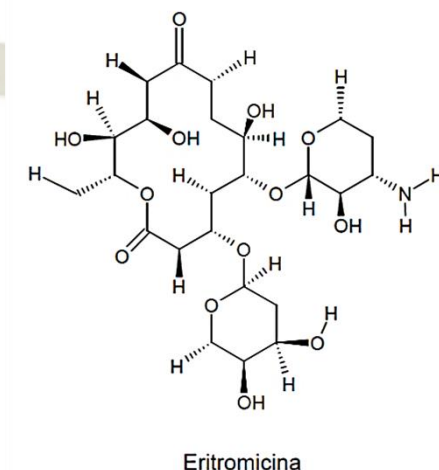
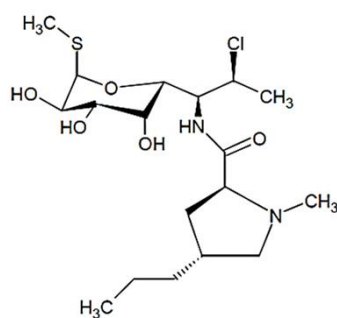


FIGURA N° 10 : Estructura química de Eritromicina

FUENTE: Chems sketch

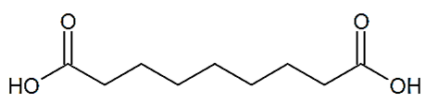
- **Eritromicina tópica, ácido azelaico ó Clindamicina tópica**, tienen la apariencia de tener una eficiencia semejante contra el *Propionibacterium acnes*, pero inferior que la del peróxido de benzoilo. El nadifloxacino, últimamente se ha indicado como una nueva quinolona de uso exterior y de eficiencia excelente (Figura N° 11,12,13)



Clindamicina

FIGURA N° 11 : Estructura química de Clindamicina

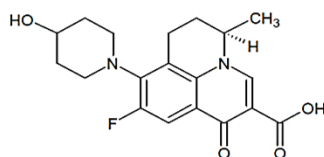
FUENTE: Chems sketch



nonanedioic acid

FIGURA N° 12 : Estructura química de Ácido azelaico

FUENTE: Chems sketch

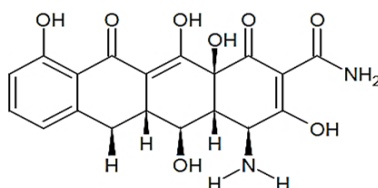


Nadifloxacina

FIGURA N° 13 : Estructura química de Nadifloxacino

FUENTE: Chems sketch

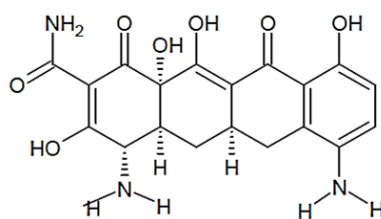
- **Tratamientos antibióticos sistémicos con trimetoprim sulfametoxazol (cotrimoxazol), minociclina o doxiciclina**, los 3 son más soluble en aceites o grasas (liposolubles) que la tetraciclina o eritromicina. La dosis de cada día de doxiciclina o minociclina es correspondiente a 100 mg diario. El tratamiento deberá prolongarse hasta que no surjan nuevas lesiones inflamatorias en alrededor de 1 a 2 meses (Figura N° 14,15,16,17,18) (6).



Doxiciclina

FIGURA N° 14 : Estructura química de Doxiciclina

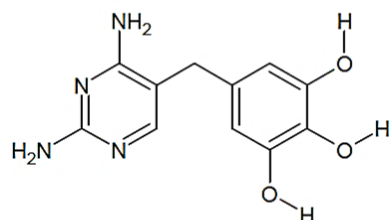
FUENTE: Chems sketch



Minociclina

FIGURA N° 15 : Estructura química de Minociclina

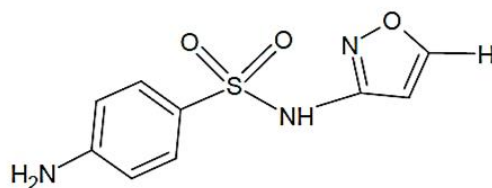
FUENTE: Chems sketch



Trimetoprima

FIGURA N° 16 : Estructura química de Trimetoprima

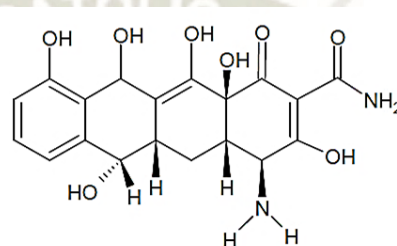
FUENTE: Chems sketch



4-amino-*N*-(1,2-oxazol-3-yl)benzenesulfonamide

FIGURA N° 17 : Estructura química de Sulfametoxazol

FUENTE: Chems sketch



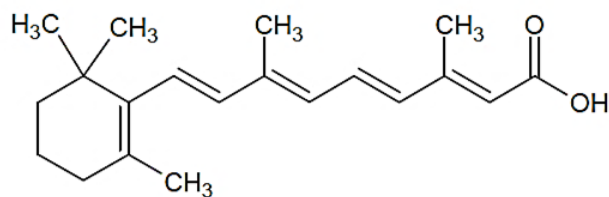
Tetraciclina

FIGURA N° 18 : Estructura química de Tetraciclina

FUENTE: Chems sketch

1.8.2. TRATAMIENTOS DIRIGIDO A REDUCIR LA PRODUCCIÓN DE SEBO

Oral (ácido 13-cis-retinoico): Es un metabolito de la familia de la vitamina A que tiene la capacidad de reducir la producción sebácea de forma que, inclusive en formas graves de acné en adolescentes, se logra obtener la desaparición o atenuación de los síntomas y signos que podrán llegar hasta los 2 o 3 años. El tratamiento tiene un tiempo de duración entre 4 o 5 meses con dosis que van desde 0.5 a 1 mg/kg diariamente, por administración oral hasta dosis completas aglomeradas desde 100 a 120 mg/kg. Es resultado del tratamiento escogido cuando existe el peligro de surgimiento de cicatrices, pero tanto la receta como el manejo deberá ser llevado a cabo por un dermatólogo con experiencia (Figura N° 19) (6).



(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid

FIGURA N° 19 : Estructura química de Ácido Retinoico

FUENTE: Chems sketch

1.9. PRINCIPAL AGENTE BACTERIANO IMPLICADO EN EL ACNÉ VULGARIS

1.9.1. GENERO *Propionibacterium*

Es un bacilo grampositivo anaerobio no esporulado más frecuente, hallado en muestras clínicas. Es parte de la cavidad oral, flora natural de la piel, tractos genitourinario y gastrointestinal y la nasofaringe. Con frecuencia es contaminante de hemocultivos. No obstante, ciertas veces provoca enfermedades procedentes del SNC, endocarditis, entre otras enfermedades.

Se hallan en extrañas veces *P. granulosum* y *P. avidum*, las células son marcadamente pleomorfas y existen en distintos tamaños y formas.

Desde bacilos hasta cocos bien definidos. Habitualmente, las células adoptan el color de Gram de manera irregular. Igualmente, que ocurre con las *corinebacterias*, estas células forman pájaros en vuelo, formas en empalizada y letras chinas, quizá se debe a una división violenta luego de la separación (21).

1.9.1.1. *Propionibacterium acnes*

1.9.1.1.1. GENERALIDADES

Integra el grupo alto GC (guanina y citocina) de bacterias grampositivas, el *Propionibacterium acnes*, además se lo puede hallar con predominancia las zonas de la piel con abundancia en glándulas sebáceas. Sin embargo, habitualmente se toma en cuenta, como un integrante relativamente no patógeno de la microbiota humano residente, una cantidad ascendente de

investigaciones ha involucrado al *Propionibacterium acnes* como el elemento encargado de variadas infecciones y enfermedades (7).

Nota: Se muestra la estructura del *Propionibacterium acnes* en taxones (Tabla N° 3)

TABLA N° 3: Clasificación taxonómica de *Propionibacterium acnes*

FILO	<i>Actinobacteria</i>
ORDEN	<i>Actinomycetales</i>
SUBORDEN	<i>Propionibacterineae</i>
FAMILIA	<i>Propionibacteriaceae</i>
GÉNERO	<i>Propionibacterium</i>
ESPECIE	<i>Propionibacterium acnes</i>

FUENTE: Pumisacho, 2015 (33)

1.9.1.1.2. MORFOLOGÍA

En un inicio son blanquecinas, esféricas y diminutas, las colonias de *Propionibacterium acnes*; conforme se van envejeciendo se vuelven de color amarillo y más enormes. Investigaciones más trabajosas en esta especie comprobaron las variedades en las formas de las colonias conforme las familias, los que a su vez, están vinculados a la piel sana, principalmente de la clase III o los procesos infecciosos, por lo general las clases I y II. Las colonias que corresponden a las clases I y II son redondas, aproximadamente de 1 a 2 mm de diámetro, además son opacas o tienen brillo y tienen forma convexa, en tanto que las de la clase III conforman colonias muy reducidas, con forma de punta de 0,5 mm de diámetro, resecos y pequeños. En medios acuosos como el caldo infusión cerebro y corazón (Brain Heart Infusion - BHI, por sus siglas en inglés), *Propionibacterium acnes* de clase IA presenta un sedimento granuloso, esto se debe a la agregación celular (las células desunidas y combinadas *in vitro* o en tubo de ensayo tienen la tendencia a asociarse con células de su misma clase) con la solución clara; las clases II y IB han evidenciado el desarrollo de un frágil sedimento con la solución turbia debido a que las células están en suspensión. Son aerotolerantes, difteromorfos, algunas cepas generan una zona de catalasa positivos, hemólisis, inmóviles y sacarolíticos, se tiene que pensar que *Propionibacterium acnes* podrá ser

identificado sin usar GLC, si las pruebas de indol y la disminución de nitratos resultan positivas (Figura N° 20) (8).

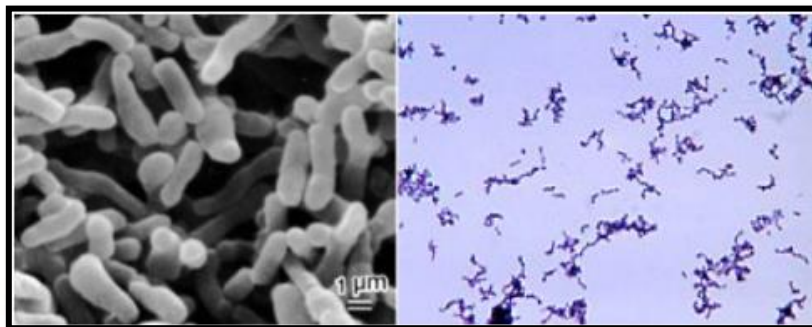


FIGURA N° 20 : *Propionibacterium acnes* en forma de barra izquierda visto a través de microscopía electrónica de barrido. Las líneas representan 1μm de longitud. Derecha *Propionibacterium acnes* cultivan en medio tioglicolato, se tiñeron con cristal violeta. Se utilizó un objetivo de 100x.

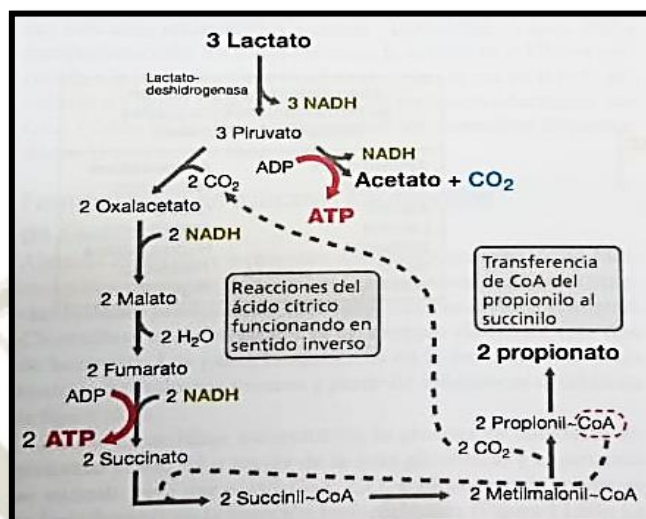
FUENTE: Abate, M. Shedding New Light on Acne: The Effects of Photodynamic Therapy on *Propionibacterium acnes* (34).

1.9.1.1.3. PATOGENICIDAD

Este organismo microscópico puede generar elementos de virulencia posibles. Estos elementos están vinculados con la expresión de proteínas de superficie inmunogénicas y la subsiguiente tarea del organismo en la reacción de inflamación. *Propionibacterium acnes* es el organismo microscópico que prevalece vinculado al acné vulgaris o acné juvenil, que daña hasta un total de 85 % de los adolescentes. Se ha notado que estas cepas generan neuraminidasas, sialidasas, endoglucoceramidasas y lipasas, elementos que participan en la conformación de poros, entre otros, dicho de otra manera, productos que están incluidos en la degeneración de las células del hospedero (8).

1.9.1.1.4. FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO PROPIÓNICO

La bacteria grampositiva *Propionibacterium* y ciertas bacterias vinculadas producen ácido propiónico como producto esencial de fermentación partiendo del lactato o de la glucosa.



FUENTE: Madigan. Biología de los microorganismos (35)

Los 4 NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) que surgen de la producción de la oxidación de 3 lactatos sufren re-oxidación en la disminución del fumarato y el oxacetato y el grupo CoA del propionil-CoA se cambia con el succinato a lo largo del desarrollo del propionato (Tabla N° 4) (35).

TABLA N° 4 : Fermentación, energía y organismos que la realizan

TIPO	REACCIÓN	RENDIMIENTO ENERGÉTICO (ΔG° , KJ/mol)	ORGANISMOS
Del Ácido Propiónico	$3 \text{ Lactato} \longrightarrow 2 \text{ } \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O}^- \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{O}^- \end{array} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 2-hydroxypropanoate acetate Dioxido de water	-170	<i>Propionibacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Propionicum</i>

FUENTE: Chems sketch

1.9.1.1.5. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

TABLA N° 5 : Características para la identificación del género *Propionibacterium*

<i>Propionibacterium</i>	Indol	Derivados. del Indol	Hidrolisis de Esculina	H ₂ S	Catalasa	Lecitina	Lipasa	Crecimiento Agar Bilis	Fermentación Glucosa	Hidrolisis Almidón	Proteólisis Leche	DNAsa	Hidrolisis Gelatina	Fermentación Manitol	Fermentación de Lactosa	Fermentación de Ramnosa
<i>P. Acnes</i>	+/-	-	-	-	+	-	-/+	V	+	-	+/-	-	-	-	-	-
<i>P. Avidum</i>	-	-	+/-	-	+	-	+/-	E	+	-	V	-	+/-	-	-	-
<i>P. Granulosum</i>	-	-	-	-	+	-	-/+	V	+	-	V	+/-	-/+	-/+	-/+	-
<i>P. Propionicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	I	V	-	-	-	-	V	V	-

FUENTE: Koneman. Diagnóstico microbiológico - Texto y Atlas en color 5^{ta} EDICIÓN
(21)

Leyenda:

(+) Reacción positiva en > 90% de las cepas, (-) reacción negativa en > 90% de las cepas,
(+/-) La mayoría de las cepas positivas con algunas cepas negativas ocasionales
(-/+) La mayoría de las cepas negativas con algunas cepas positivas ocasionales, (I)
desarrollo inhibido, (V) variable, (NC) no crece, (E) crecimiento igual al con trol sin bilis,
(E¹) crecimiento igual con alguna cepa ocasional inhibida, (I^{NC}) Crecimiento inhibido con
algunas cepas ocasionales que no crece.

1.10. ANTIMICROBIANOS

1.10.1. ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

1.10.1.1. LINCOSAMIDAS

El grupo de las lincosamidas son antibióticos semisintéticos y naturales de espectro intermedio, inicialmente bacteriostáticos, constituido por 2 antibióticos:

la clindamicina, que se deriva de la lincomicina y la lincomicina, que es el integrante primigenio del conjunto.

1.10.1.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN

En el nivel de la subunidad de 50S de los ribosomas, proceden evitando la síntesis de proteínas de las bacterias. Estos antibióticos se desempeñan como bactericidas o bacteriostáticos, que dependen de la sensibilidad del organismo microscópico infectante, de la etapa de desarrollo y de la concentración en el ambiente.

1.10.1.1.2. CLINDAMICINA

La clindamicina es activa contra la mayor parte de los cocos grampositivos aerobios, incorporando *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus*, entre otros *Streptococcus*.

Es provechoso contra algunos microorganismos gram negativos y grampositivos anaerobios como: *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Actinomyces* (9).

1.10.1.2. TETRACICLINAS

Estos antibióticos ingresan a la membrana celular, para unirse de manera variable a la unidad ribosomal 30S y así realizar la inhibición de la síntesis proteica, con un resultado bacteriostático. Proceden de forma directa sobre el *Propionibacterium acnes* al acceder en el folículo sebáceo. Se reduce la producción de prostaglandinas, se realiza la inhibición de la síntesis de óxido de nitrógeno, de igual forma la síntesis de proteínas.

1.10.1.2.1. MECANISMO DE ACCIÓN

Son bacteriostáticas, sin embargo, pueden lograr ser bactericidas a altas concentraciones. Proceden realizando la inhibición de la biosíntesis de proteínas a nivel de los ribosomas 80S y 70S, realizando la inhibición de la transcripción del mensaje genético al evitar el ingreso del ARN mensajero dentro de la célula de la subunidad 30S del ribosoma.

1.10.1.2.2. TETRACICLINA

Es uno de los antibióticos más importantes en el tratamiento del acné. Proceden en forma directa sobre el *Propionibacterium acnes* al ingresar en el interior del folículo sebáceo (10).

1.10.1.2.3. DOXICICLINA

Es un antibiótico de segundo nivel en importancia en la enfermedad del acné. Realiza la inhibición del desarrollo de los granulomas inflamatorios inhibiendo la colagenasa de la metaloproteínasa de la matriz celular del *Propionibacterium acnes*. Su absorción no sufre limitación por los alimentos (10).

1.11. CUTI CUTI (*Notholaena nivea*)

1.11.1. CLASIFICACION TAXONOMICA

División: *Pteridophyta*

Clase: *Filicopsida*

Orden: *Polypodiales*

Familia: *Adiantaceae*

Género: *Notholaena*

Especie: *Notholaena nivea* (poiret) Cav. (11) (Figura N° 22)



FIGURA N° 22 : *Notholaena nivea* (Poir.) Desv Cuesta Puquios, Provincia del Loa, Región de Antofagasta – 17/09/2012 – Andrea Ugarte

FUENTE: Cuesta D., (36)

1.11.2. DESCRIPCIÓN

1.11.2.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS:

Es un helecho con habitualidad de hierba eterna. Presenta rizoma de mucho grosor, pequeño, ciertas veces es de forma oblicua o erecto, posee cubrimiento de escamas linear - subuladas, habitualmente enroscadas, con los

bordes casi enteros. Presenta hojas acumuladas de 10 a 30 cm de longitud; tiene el pecíolo más pequeño o del mismo tamaño que la lámina, tiene un color castaño oscuro, es lampiño, de forma cilíndrica, es frágil; presenta una lámina deltoide-lanceolada, coriácea (aspecto y tacto parecidos al cuero), lanceolada (forma de punta de lanza) o bi- a tripinnada, con hasta doce pares de pinnas pecioluladas, subopuestas, lanceoladas o aovadas; fragmentos extremos suborbiculares con forma de lóbulo (lobulados), enteros o muy alargados (oblongos), con la cara inferior excesivamente recubierta de una sustancia blanca y la superior es lampiña. Los esporangios tienen la protección del borde reflejo o plano, no alterado (11).

1.11.2.2. USOS DE LA ESPECIE

Utilización farmacológica, es activo contra el *Tripanosoma cruzi*, el extracto orgánico de *Notholaena nivea*.

Utilización medicinal: calma el dolor de cabeza y de estómago, y la tos (11).

1.11.2.3. SINONIMIA

Argyrochosma nivea (Poir.) Windham var. *Nívea*; *Cincinnalis tarapacana* Phil.; *Pellaea nivea* (Poiret) Prantl; *Gymnogramma nivea* (Poiret) Mett.; *Cincinalis nivea* (Poiret) Desv.; *Pteris nivea* Poiret; *Acrostichum albidum* Sw (11).

1.11.2.4. NOMBRE COMUN

Chujchu o qusupe blanco, Rodadilla, culantrillo o doradilla (11).

1.11.2.5. PREFERENCIAS DE HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es una planta xerófila, que crece en las pendientes de las fracturas y lomas, debajo de las rocas en altitudes que van desde los 500 hasta los 4000 m.s.n.m., en nuestro país se halla localizada desde el sur de la Región de La Libertad hasta las regiones de Arequipa y Puno, distribuyéndose en el continente abarcando desde la zona sur del país hermano del Ecuador hasta la zona oeste del país de Argentina (11) (12).

En regiones de Chile se da la distribución: Región de Tarapacá, Región de Antofagasta y la Región de Arica y Parinacota (11).

1.11.3. REFERENCIAS TOXICOLÓGICAS

La DL50, del Atomizado de Cuti cuti, es de 10,971.26 mg/kg, con límites inferior (10,399.13 mg/kg) y superior (11,574.87 mg/kg) al 95 %, lo cual le da las características, a la planta, de ser no dañina, de acuerdo con los criterios de Williams. El Atomizado es casi 3 veces menos dañino que los alcaloides (12).

1.11.4. REFERENCIAS DE SU EFECTO HIPOGLICEMIANTE

Se puede valorar que mediante vía oral signifique un resultado próximo al máximo y puede ser usado para analizar el procedimiento de acción y considerar de los alcaloides de Cuti cuti su perfil farmacodinámico. Manifiesta la glicemia una alteración logrando una distancia de 40.8 mg% entre dosis, después de las 24 horas.

Manifiesta una reducción importante de los niveles de glicemia, a partir de la primera hora y a lo largo de las 24 horas de observación. Al comparar los valores iniciales y luego de las 24 horas resultará un decrecimiento de la glicemia -386.2 ± 107.33 estadísticamente esencial.

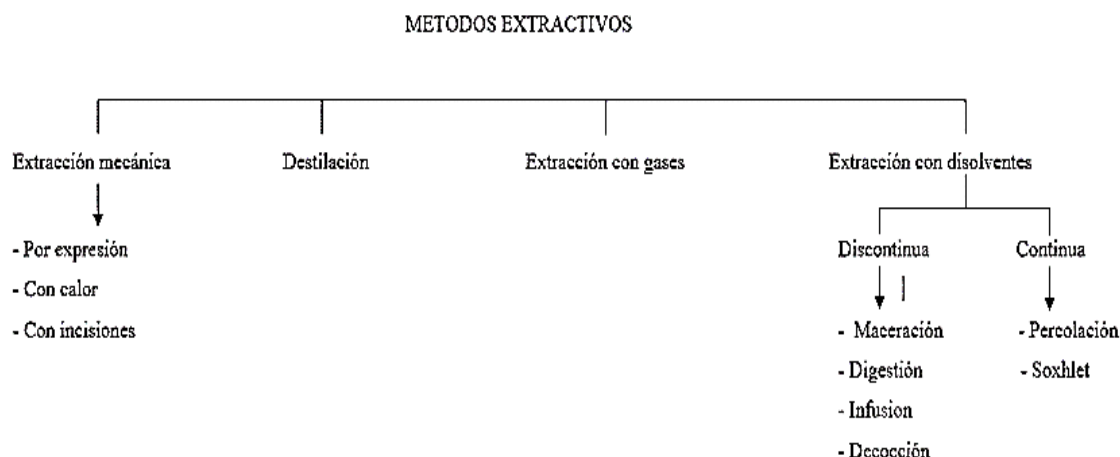
Diabetes química por aloxano, es el patrón de elaboración de hiperglicemia usado, que es una sustancia que destroza las células beta del interior del páncreas, que son responsables de generar insulina, de lo anterior, entonces podemos concluir que estas plantas le dan la protección al páncreas de la acción tóxica del aloxano; no obstante, investigaciones preliminares llevadas a cabo, con Cuti cuti, se halló que esta planta evita la hiperglicemia aloxánica y reestablece, incluso los límites normales, la glicemia aumentada por actuación del aloxano, cuando se supone que las células beta ya se destruyeron (12, 14).

1.12. EXTRACTOS

La USP (por sus siglas en inglés United States Pharmacopeia) determina a los extractos como compuestos concentrados de drogas hechas de animales o vegetales conseguidos a través del removimiento de los integrantes activos de las correspondientes drogas con menstros adecuados, con la dispersión de la totalidad del disolvente y el ajustamiento del polvo o de las masas residuales conforme con las reglas determinadas. Se tiene conocimiento de 3 formas de extractos líquidos o semilíquidos que poseen densidad melosa, masas plásticas llamadas como polvos secos y extractos sólidos, llamados extractos en polvo (13).

1.12.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Partiendo de la droga se lleva a cabo un procedimiento de extracción para separar los principios activos en forma directa de esta. Existen diversas técnicas o métodos extractivos como son: (Esquema N° 1) (19).



ESQUEMA N° 1: Métodos generales de obtención de los Principios activos

FUENTE: KUKLINSKI Claudia, Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural (19)

1.12.1.1. EXTRACCIÓN POR SOXHLET

Es un método de extracción sólido-líquido en el cual se extrae mediante un mecanismo que está conformado por un refrigerante (C), un cuerpo extractor (B) y un matraz de fondo plano (A).

En el interior del cuerpo extractor se ubica la droga y el disolvente orgánico, en forma general embalado en un material poroso que facilite la unión con el disolvente.

Se pone el disolvente orgánico dentro del matraz de fondo plano, es conducido a ebullición, los vapores del disolvente suben por el tubo lateral (D) y consiguen llegar al refrigerante en donde se compactan y caen encima de la droga colocada en el cuerpo extractor llenándose de líquido extractivo, este líquido es expulsado por el sifón lateral interno (E) y culmina dentro del matraz inferior (A).

Se recicla el disolvente orgánico en el tiempo que dura el proceso, en tanto que los principios activos se concentran dentro del matraz inferior. (Figura N° 23) (19).

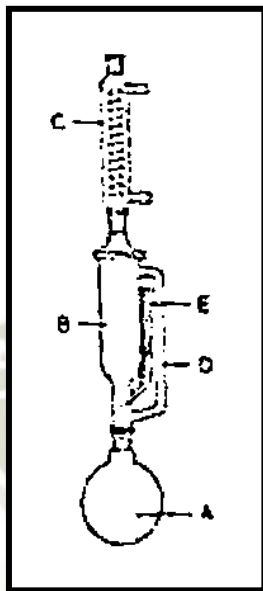


FIGURA N° 23 : Equipo soxhlet

FUENTE: Kuklinsky C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural (19).

1.13. TIPOS DE EXTRACTOS

Son compuestos que se obtienen por concentraciones totales o parciales o total de los líquidos extractivos (19).

Se puede diferenciar distintas clases de extractos conforme a la concentración de principio activo en relación con la droga primigenia y de acuerdo a su consistencia.

- Extractos fluidos: Se da la evaporación del disolvente dentro del rotavapor hasta lograr una concentración de principio activo parecida a la concentración del principio activo en la droga primigenia. Son de consistencia líquida y se consiguen en forma general mediante percolación o maceración. Es mayormente mezcla hidroalcohólica o agua el disolvente. Asimismo, podrán ser conseguidos por disolución de extractos secos. Cambian con facilidad los extractos fluidos cuando se ponen en contacto el aire y la luz y frecuentemente son utilizados para

conseguir formas líquidas como pociones, gotas, jarabes, entre otros, debido a que se realiza la dosificación y manipulación de forma fácil (19).

1.13.1. EXTRACTOS BLANDOS

Presentan una concentración de principio activo mayor con respecto a la droga primigenia y son de consistencia semisólida. El disolvente con frecuencia es mezcla hidroalcohólicas o agua. Los extractos blandos son difíciles de manejar y tienen poca estabilidad por lo cual en realidad no se usan (16).

1.13.2. EXTRACTOS SECOS

Se consiguen mediante la evaporación completa del disolvente presentado una consistencia de polvo. Tienen una concentración mayor de principio activo que la droga primigenia. Son compuestos que poseen mucha estabilidad sin embargo en varias ocasiones son higroscópicos y de manipulación sencilla que son usados para realizar la preparación de fluidos, extractos, tinturas, entre otros.

En la actualidad se puede obtener extractos secos nebulizados aún con mayor estabilidad que los extractos secos de siempre, especialmente debido a que, presentan unos niveles menores de higroscopicidad (19).

1.14. TEMPERATURA

El incremento de temperatura facilita extraer los principios activos de las drogas debido a que eleva sus niveles de solubilidad en los disolventes usados, pero también propicia degradar tales principios activos, por lo cual es requerido manejarla para obtener una cantidad mayor de extracción para los principios activos sin efectos indeseados. Para extraer los principios activos termolábiles bajo ninguna circunstancia se debe emplear temperaturas altas (19).

1.15. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

CCF o TLC por sus siglas en inglés, Thin Layer Chromatography, donde la fase estacionaria es un sólido poroso dispuesto, que forma una capa delgada, encima de una placa de vidrio o metálica. Cuando se ha situado la muestra encima de la placa se pone en forma vertical en un contenedor hermético que en su interior tiene el eluyente en su fase móvil en el fondo del contenedor. La fase móvil circula en sentido ascendente de forma que arrastra los distintos elementos del compuesto a distintas velocidades, con lo cual se logra separarlos.

Se podrán controlar las sustancias que se analizan observando las placas en el ultravioleta o en el visible, o haciendo uso de reactivos reveladores particulares para las diferentes clases de sustancias.

Finalmente, cuando estén pulverizados cada uno de los sólidos podrán absorber en una cantidad menor o mayor a otras sustancias encima de su extensión; y en forma similar, cada una de las sustancias podrá ser absorbida, unas de forma más fácil que las otras. Es el principio elemental de la cromatografía, este evento de absorción selectiva (17).

Se deposita la placa de CCF en el interior de un recipiente de cromatografía, al cual con anterioridad se le ha agregado una cantidad reducida del eluyente elegido. Se debe de prestar mucha atención en observar que los niveles de eluyente estén más abajo del punto donde el producto ha sido pinchado. (Figura N° 24) (15).

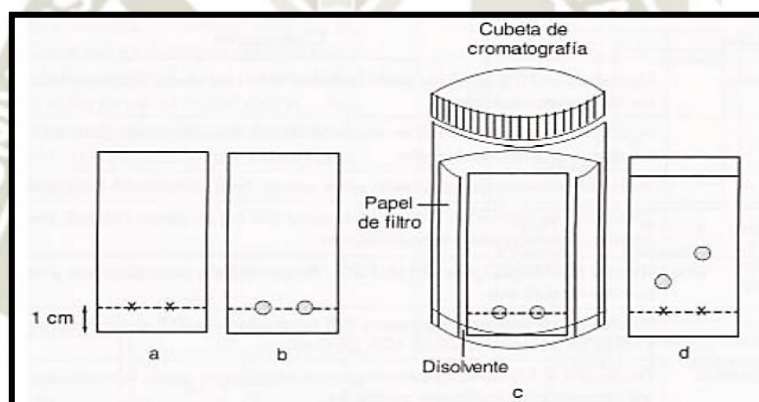


FIGURA N°24 : Cuba cromatografía

FUENTE: Cromatografía en placa fina – UAM (15)

1.16. FACTOR DE REFERENCIA (Rf)

Rf es el registro y se define como:

$$Rf = \frac{\text{distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$$

El factor de Rf está supeditado a las condiciones en las que se circula la muestra como: el vapor de saturación, la temperatura, las condiciones de la placa, el eluyente, la clase de absorbente, entre otros.

Posee una reproducibilidad de valores entre +/- 20%, por lo cual es preferible correr copias de la misma placa (17).

1.17. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El screening fitoquímico o tamizaje fitoquímico es la primera fase del estudio para determinación cualitativa de los fundamentales conjuntos de elementos químicos que existen en una planta de superior interés, el empleo de reacciones de coloración y haciendo uso de los solventes adecuados (17).

1.17.1. TERPENOS

La mayor parte de los terpenos son propios del reino vegetal. De igual forma, los terpenos, provienen vía escualeno del mevalonato. Cada uno de los esteroides y terpenos guardan relación en que están formados por el enlace de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas que se derivan del 2-metilbutadieno. Cada conjunto de terpenos es el efecto de la condensación “cabeza-cola” de una cantidad voluble de unidades isoprenicas. (Figura N° 25)

Los fundamentales terpenos, se forman a través de reacciones catalizadas por enzimas, éstos son los esteres pirofosfóricos de alcoholes en $(C_5)_n$, que se forman por la agregación en secuencia de una unidad en C_5 , el pirofosfato de isopentenilo (IPP) encima de una molécula está el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) es el término inicial de la serie, un pirofosfato de prenol alílico.

La variedad de los metabolitos terpénicos naturales nos conduce a tener en cuenta presentar los mecanismos y reacciones que hacen justificable la presencia de los fundamentales esqueletos:

- Monoterpenos irregulares llamados también piretrinas.
- Monoterpenos regulares, los cuales son: oleorresinas, iridoides y aceites esenciales.
- Diterpenos tienen 20 átomos de carbono (C) procediendo de la unión de 4 unidades de isopreno.
- Triterpenos y esteroides, los cuales son: triterpenos modificados, fitoesteroles, heterósidos cardiotónicos y saponósidos.
- Sesquiterpenos, los cuales son: lactonas sesquiterpénicas y aceites esenciales.
- Poliisoprenos o cauchos naturales.

- Carotenos (18).

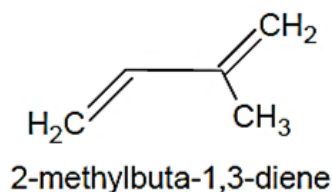


FIGURA N°25 : Estructura Química del Isopreno

FUENTE: Chems sketch

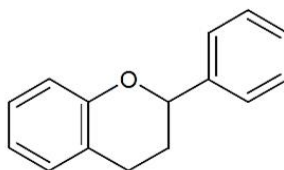
1.17.2. FLAVONOIDES

Los compuestos relacionados y los flavonoides, los cuales son: leucoantocianidinas, catequinas y antocianos, provienen del metabolismo secundario de los vegetales por medio de la ruta de los policétidos y de la ruta del ácido shikímico, se localizan casi en cada una de las plantas superiores, en especial, en zonas aéreas como: frutos, flores y hojas. Ciertos flavonoides están encargados de la coloración amarilla de algunas flores.

Son estructuras de la clase C₆-C₃-C₆, que tienen 2 anillos aromáticos enlazados entre ellos a través de una cadena de tres carbonos (C) ciclada por medio de un oxígeno (O). Cada uno de los flavonoides presentan un carbonilo en la posición cuatro (4) y las alteraciones se generan en el anillo B y en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C₃. (Figura N°26)

- Chalconas: con el anillo C abierto.
- Isoflavonoides: Presentando el anillo B en posición 3, es decir, 3-fenil-γ-cromona
 - No presentando doble enlace entre las posiciones 2 y 3:
- Flavonololes: con OH (Grupo Hidroxilo) en posición 3
- Chalconas: con el anillo C abierto.
- Flavononas: con H (Hidrógeno) en posición 3
 - Presentando doble enlace entre las posiciones 2 y 3:
- Flavonoles: con OH (Grupo Hidroxilo) en la posición 3

- Flavonas: con H (Hidrógeno) en la posición 3



2-phenyl-3,4,4a,8a-tetrahydro-2H-chromene

FIGURA N°26 : Estructura Química de los Flavonoides (Flavano)

FUENTE: Chems sketch

- Solubilidad: está supeditado a la forma en que se localizan:
 - a. **Aglicones:** Son solubles en disolventes orgánico bien sean apolares como: el cloroformo y el éter etílico, o polares como el metanol y el etanol; son poco solubles en mezclas hidroalcohólicas; y son insolubles en agua.
 - b. **Heterósidos:** Son insolubles en disolventes orgánicos apolares y son solubles en mezclas hidroalcohólicas y en el agua.
- En general se reconocen por cromatografía de capa fina (CCF) o también llamado TLC por sus siglas en inglés, Thin Layer Chromatography, y puede ser revelado al UV. Se observan distintas reacciones para su reconocimiento como son las siguientes:
- **Ionización en medio básico,** es un reactivo NaOH (Hidróxido de sodio) o NH_3 (amoníaco), de color amarillo fuerte.
- **Reacción con FeCl_3 ,** es un reactivo FeCl_3 (tricloruro de hierro), de color azul verdoso.
- **Reacción de constantinesu,** es un reactivo AlCl_3 (cloruro de aluminio), de color amarillo.
- **Reacción de la cianidina,** es un reactivo $\text{Mg}^{2+}/\text{HCl}$ (magnesio/ácido clorhídrico), de color amarillo a rojo formándose antocianidinas.
- Las distintas especies que presentan flavonoides que tienen acciones farmacológicas muy diversas como:
 - Antiespasmódicos
 - Diuréticos y anti urémicos
 - Antibacterianos, antivíricos y antifúngicos
 - Anti hepatotóxicos
 - Antirradicales libres
 - Antiinflamatorios

- Protectores de la pared vascular o capilar
- Antiarrítmicos
- Antihemorrágicos
- Acción vitamina P (19)

1.17.3. TANINOS

Compuestos por un extenso conjunto de compuestos hidrosolubles que presentan una estructura polifenólica, que se hidrolizan con facilidad en medio ácido en tanto que los taninos condensados son resistentes en mayor grado a la hidrólisis. Son insolubles en disolventes orgánicos apolares como el cloroformo y el éter etílico; pero son solubles en disolventes orgánicos polares como en la glicerina, el alcohol y la acetona, y además en el agua.

Los principales usos y acciones farmacológicas de los taninos son los siguientes:

- **Antioxidantes:** Tienen la capacidad de captar radicales libres e inhibir la autooxidación del ácido ascórbico y la peroxidación lipídica.
- **Protectores:** Se utiliza en pomadas de uso exterior, logrando impermeabilizar la piel protegiéndola de los factores externos, favoreciendo la regeneración y además de tener poder analgésico.
- **Antisépticos:** Presentan acción antifúngica, bacteriostática y bactericida.
- **Astringentes:** Son capaces de precipitar proteínas de la piel, es decir el curtido de la piel, utilizándolo por vía exterior.
- **Antídotos:** Se usan contra las intoxicaciones por alcaloides y metales pesados.

Los taninos gálicos producen color rosado con yoduro potásico, es decir, el ácido gálico libre se pinta de naranja con este reactivo. (Figura N°27). Los taninos elágicos se pintan con ácido nitroso (HNO_2) en el medio acético, en un inicio de color rosado, luego se torna violeta y azul, y los taninos condensados se pintan de color rojo con vainillina clorhídrica ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$). Se visualizan mediante la observación de fluorescencia al UV (20).

Son esteres que se forman mediante una molécula de azúcar enlazada a una cantidad voluble de moléculas de ácidos fenólicos ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$), su dímero, el ácido

elágico o el ácido gálico. A través de la destilación seca se genera pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno). Al emplear los taninos hidrolizables con cloruro férrico (FeCl_3) aparece un color azul (19).

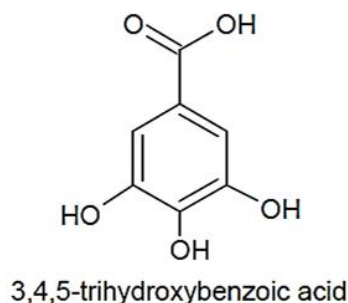


FIGURA N°27 : Estructura química de los taninos (tanino gálico)

FUENTE: Chemskech

1.17.4. ALCALOIDES

Presentan un conjunto de características y rasgos básicos mayormente de origen vegetal, además de ser sustancias orgánicas nitrogenadas. Poseen una estructura compleja y realizan actividades fisiológicas variadas inclusive a dosis muy bajas. Tienen una alta toxicidad y tienen la capacidad de precipitar algunos reactivos típicos.

Proviene del metabolismo secundario y son formados desde los aminoácidos, sin embargo, existen asimismo alcaloides de procedencia variada, como las bases xánticas y los esteroídicos.

Están ubicados los alcaloides en tejidos periféricos como: las semillas, los frutos, las hojas, las raíces y la corteza. Pertenecen a un conjunto diverso de compuestos que tienen estructuras complejas y heterogéneas. Cada uno presenta carbono, hidrógeno y nitrógeno. Algunos poseen oxígeno y en una cantidad reducida azufre.

El nitrógeno (N) que posee pueden constituir un ciclo (con N-heterocíclico: es lo más usual) o no (con N no heterocíclico; existen casos aislados: colchicina, estrocnina, entre otros). Habitúan ser sólidos cristalizables los alcaloides oxigenados y en forma general tienen una coloración blanca o incolora.

Cada uno de ellos es amargo. En su forma libre presentan insolubilidad en agua y presentan solubilidad en disolventes orgánicos polares como los alcoholes, y frente a disolventes orgánicos apolares como el hexano, el cloroformo y el éter, excepto en las bases xánticas y en las sales de amonio cuaternarias que presentan solubilidad en agua, y las mezclas hidroalcohólicas presentan solubilidad en disolventes orgánicos apolares. Se consiguen por destilación con arrastre de vapor.

Es un reactivo general de yodo bismutato potásico, cuya fórmula es KbI_4 , presenta un color anaranjado rojizo, cuyo nombre es el Reactivo de Dragendorff (19).

1.18. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL *Propionibacterium acnes*

1.18.1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Cuando se extraen muestras de la piel o de las mucosas, se debe tomar prevenciones estrictas para limpiar las zonas de forma apropiada.

Es recomendable hacer la limpieza con jabón quirúrgico, continuado por el empleo de etanol o isopropanol al 70% y solución alcohólica de yodo, después quitar el yodo con alcohol. Sin embargo, se debe tener en cuenta que ciertos pacientes son alérgicos a la solución alcohólica de yodo.

Como otra posibilidad es beneficioso limpiar con alcohol, continuado por polividona yodada ($\text{C}_6\text{H}_9\text{I}_2\text{NO}$) al 10%, con la prevención de facilitar la actuación del betadine en la piel por un tiempo no menor a 2 minutos antes de extraer la muestra.

Cuando sea factible, se debe hacer uso de jeringa y aguja para extraer las muestras de cultivos en anaerobiosis. La extracción de muestras con hisopos debe ser descartada, porque se secan y están expuestos a los anaerobios, si están presentes, al oxígeno del ambiente. Cuando ya se haya recolectado, se debe tomar prevenciones específicas para la protección de las muestras y llevarlas al laboratorio con prontitud (21).

Los criterios de lectura:

- **Negativo:** Con desarrollo en la parte de arriba del tubo, no se puede observar ácido graso (biomolécula formada por lípidos).

- **Positivo:** Con desarrollo denso con creación de sedimento granular en la parte de abajo del tubo con la existencia de ácido graso (biomolécula formada lípidos) (28).

1.18.2. AISLAMIENTO DEL *Propionibacterium acnes*

La capacidad de distinguir ciertos anaerobios hallados con mayor habitualidad, después de 4 horas de incubación en anaerobiosis, comparando con las 24 a 48 horas que se requiere.

No obstante, la obligación de cosechar la cantidad necesaria de colonias en cultivo puro, para conseguir inóculos que equivalen al tubo 5 del Estándar de McFarland, tiene la tendencia a reducir las ventajas del breve tiempo de incubación para el caso de cepas de desarrollo complejo y pausado.

Se debe completar con pruebas suplementarias para el reconocimiento exacto y decisivo de conjuntos elegidos de anaerobios. Para los bacilos anaerobios grampositivos no esporulados (es decir para los bacilos que no forman esporas), el empleo de pruebas de hidratos de carbono convencionales elegidas, de esculina y de bilis 20%, se requiere analizar y realizar la interpretación correcta de las colonias, de la morfología microscópica y de las coloraciones del Gram.

Es de especial relevancia tener mucho cuidado con la extracción, el transporte apropiado y al escoger las muestras clínicas para recuperar las bacterias anaerobias.

Son métodos de laboratorio con los cuales debe haber un adecuado manejo de la calidad, estos son: las técnicas de siembra e incubación, la elección de los medios de cultivo, observación de los cultivos positivos y el procesamiento de las muestras.

Se efectúa la coloración Gram de los cultivos positivos y se da la observación de bacilos delgados Gram positivos, en parejas, pareciendo letras en Y o V, o con letras chinas. Tal como con los cocos Gram positivos en pares, también un gran número de gotas de grasa (28).

Desde el caldo tioglicolato, se sembró en placas de agar manitol salado y en placas de agar sangre, para separar la flora estafilocócica acompañante y el

Propionibacterium. Las placas se incuban a una temperatura de 37°C por un periodo que va desde las 24 a las 48 horas (28).

1.19. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA LAS BACTERIAS ANAEROBIAS

No son recomendables las pruebas directas de sensibilidad de muestras clínicas, en su totalidad, porque los inóculos no están estandarizados debido a que con habitualidad se tiene la presencia de una mezcla de diversas especies bacterianas. Para hemocultivos positivos se han correlacionado de forma correcta con pruebas estándar ejecutadas de colonias separadas, las pruebas directas de sensibilidad efectuadas en el medio líquido de botellas.

La interpretación de los últimos puntos de los exámenes de sensibilidad por micro dilución en caldo usando lectores de micro placas que están disponibles en el comercio se ha realizado la comparación convenientemente con la observación visual.

La mayor parte de los anaerobios contaban con modelos de sensibilidad antimicrobiana predictibles y que el reconocimiento exacto de las separaciones era todo lo que se requería para pronosticar la susceptibilidad de separaciones particulares para distintos antibióticos. Aun cuando ciertos elementos antimicrobianos son activos contra prácticamente todas las bacterias anaerobias, muchos otros elementos antimicrobianos que pueden ser escogidos para su utilización en terapia, son poco predecibles en sus tareas contra las especies y géneros escogidos de anaerobios (21).

1.19.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO

El Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés National Committee for Clinical Laboratory Standards) realiza la evaluación y revisión continua al Método de Disco Difusión. Establecer una prueba estándar nacional para la difusión con discos no solo ha facilitado un manejo de calidad más preciso, además de eso se puede comparar de una forma válida los resultados entre los distintos laboratorios haciendo uso de este método. Una vez que el disco impregnado en el antibiótico se ponga en contacto con el área húmeda del agar, el agua es absorbida en el papel de filtro y el antibiótico se difunde en el entorno que lo circunda. La rapidez de remoción del antibiótico al

exterior del disco es superior que su difusión hacia dentro del medio, de manera que la concentración próxima al disco puede sobrepasar a la del propio disco.

Sin embargo, con respecto que crezca la separación, el antibiótico sufrirá una disminución logarítmica de su concentración. Si las placas ya pasaron por un proceso de inoculación con una suspensión de bacterias, se genera el aumento en simultaneidad de las bacterias en el área del agar.

Al obtener una masa celular crítica de bacterias, se excede las actividades inhibitorias y surge el desarrollo de las bacterias. El tiempo necesario para lograr una masa celular crítica es específico de toda especie, pero dependerá de la temperatura de incubación y de la constitución del entorno. La amplitud lateral de la difusión antimicrobiana con antelación de que se cumpla el tiempo crítico sufrirá afectación por el grosor del agar, esto se debe a que la difusión se genera en las 3 dimensiones.

Los puntos en los que se obtiene la masa celular crítica surgen como círculos de desarrollo de las bacterias, con márgenes determinados con claridad con el entorno del disco desarrollado en el medio del círculo, si la prueba se efectúa de forma adecuada.

La concentración del antibiótico que se extendió en esta interfaz de desarrollo y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se acerca a la CIM hallada en las pruebas de dilución. Pese a que en la práctica no se efectúa los cálculos directos de la concentración inhibitoria, la CIM podrá calcularse con exactitud adecuada si se tiene conocimiento de las cualidades de difusión del antimicrobiano y el desarrollo de las bacterias. (Figura N°28,29) (21).

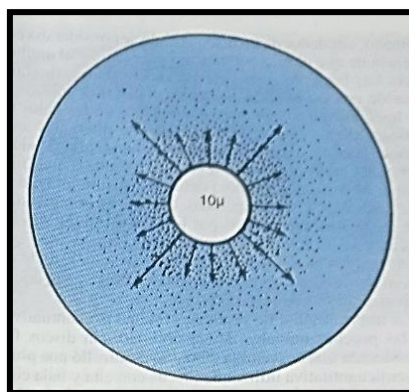


FIGURA N°28 : Principio de la difusión del antibiótico en agar: su concentración disminuye a medida que se incrementa la distancia desde el disco.

FUENTE: Koneman diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas (21).

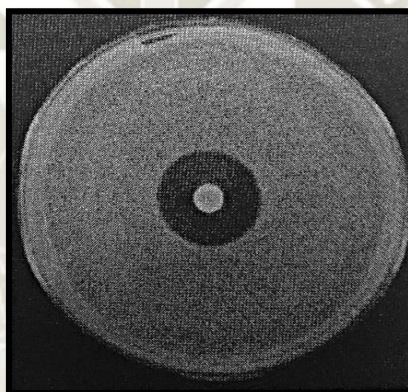


FIGURA N°29 : Placa de susceptibilidad con un disco de antibiótico que puede observarse un borde neto.

FUENTE: Koneman diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas (21).

1.19.2. MÉTODO MICROBIOLÓGICO: EXCAVACIÓN-PLACA-CULTIVO

Se sustenta en la expansión del antibiótico por medio de una capa de agar endurecida e incluido en una placa Petri, formando a su entorno un área de inhibición del desarrollo del organismo microscópico perceptible (22).

1.19.3. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

En el procedimiento de macro dilución se utiliza una batería de tubos por cada combinación microorganismo/antimicrobiano. Con frecuencia se habilita la batería de tubos con 1 ml en medio estéril sin contener antimicrobiano.

Se le agrega al primero de ellos 1 ml de la primera solución del tubo de antimicrobiano hasta obtener la concentración más grande a estudiar (considerando que este paso inicial presume la dilución al 50% de la solución madre y que, cuando se hayan pasado por inoculación los tubos, con 1 ml de inóculo, se procederá a diluir de nuevo la concentración de antimicrobiano al 50%).

Después de mezclar de forma apropiada, se traspasa 1 ml al próximo tubo; esta actividad se repite la cantidad de veces como diluciones se desean estudiar, suprimiendo del tubo final de la serie de 1 ml de medio antimicrobiano, con el propósito de conservar el último volumen de 1 ml. Para todo paso de dilución se deberá utilizar una pipeta distinta. La sucesión de tubos se termina con uno tubo de control sin antimicrobiano que solo contiene 1 ml de caldo (23).

1.19.4. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se agregan concentraciones que decrecen del extracto en diluciones 1:2 en tubos que albergan caldo de cultivo que mantendrá el crecimiento del organismo microscópico. Se realizará la preparación del elemento antimicrobiano en una solución madre concentrada y después se hará diluir hasta lograr las concentraciones adecuadas.

Un tubo de caldo se sostendrá sin realizar su inoculación como control negativo de desarrollo y otro que albergue inóculo, pero sin contener extracto como control positivo.

Después de la incubación apropiada es decir en un tiempo de 24 horas, se podrá observar el nivel de turbidez de los tubos que señalará el crecimiento de las bacterias. Se dará el crecimiento del organismo microscópico en el tubo control y en los demás tubos que no alberguen un número necesario de elementos antimicrobianos para que inhiban el crecimiento de las bacterias, la concentración de extracto fundamental en que no haya crecimiento descubierto por la ausencia de turbidez (que se iguale al control negativo) será llamada como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (24).

1.19.5. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Es la cual mata al menos el 99,9% de un inóculo bacteriano estandarizado. Se requiere tener mucho cuidado a la hora de realizar la interpretación de los

resultados. La concentración de fármaco que inhibe el crecimiento de las bacterias sin matar efectivamente a los organismos microscópicos, pero la mayor parte de los que se utilizan actualmente tienen una acción letal.

La concentración de fármaco que inhibe el crecimiento está muy próxima a la concentración que genera la eliminación de la bacteria (21).

1.20. ANTIBIOGRAMA

Un antibiograma es el producto de las pruebas de sensibilidad *in vitro* realizadas para tener conocimiento del comportamiento de un organismo microscópico frente a ciertos antibióticos, cuyos efectos se manifiestan en expresiones de resistencia y susceptibilidad.

Poniendo como ejemplo, el caso de las pruebas de difusión en agar, como es el procedimiento de difusión con discos explicado por Kirby y Bauer, al que se le han hecho importantes cambios subsiguientes conforme a normas del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés, Clinical & Laboratory Standards Institute), estos resultados siguen un procedimiento de fácil interpretación a través de puntos de corte de los halos de inhibición surgidos en el entorno de cultivo.

Actualmente este procedimiento se ha complicado excesivamente por el aumento de la fortaleza de las bacterias, al inicio de una gran cantidad de mecanismos originados por los organismos microscópicos para evitar las consecuencias de los antibióticos y su esparcimiento en la población de microbios, que logran que no siempre se puedan considerar los resultados del antibiograma sin un análisis preliminar.

Cuando se lleva a cabo a través del método de difusión, a lo largo de la realización de un antibiograma convencional, son acomodados los discos de los antibióticos marcadores de forma adecuada para visibilizar los resultados y poner en evidencia los probables instrumentos de resistencia.

Por último, se podrá sintetizar como beneficios que consigue la ejecución de la lectura con interpretación del antibiograma los puntos a continuación:

- Administración y una superior calidad de los resultados
- Descubrimiento de novedosos mecanismos de resistencia.

- Conocer la epidemiología de la resistencia.
- Una superior adaptación a las terapias antimicrobianas (25).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

La ejecución de la parte experimental del presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio H-102 y H- 402 de la Universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa – Perú, durante el periodo de setiembre del 2018 a enero del 2019.

1. TIPO DE ESTUDIO

Investigación de tipo experimental y prospectiva, *in vitro*.

1.1. MATERIAL

1.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron las hojas y tallos de la especie botánica *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

1.1.2. CEPA DE *Propionibacterium acnes*

La cepa fue extraída de 37 pacientes del Hospital III Goyeneche-Arequipa

1.2. MATERIALES DE LABORATORIO, REACTIVOS Y EQUIPO

1.2.1. MATERIALES

1.2.1.1. MATERIALES DE VIDRIO

- Cuba cromatografía
- Matraz erlenmeyer 100 ml,250ml
- Placas petri 60 mm y 100 mm
- Baguetas (Boeco)
- Fiolas de 10mL (Pyrex)
- Luna de reloj
- Capilares
- Frascos color ambar
- Laminas portaobjetos
- Laminas cubreobjetos
- Mechero de vidrio
- Vaso precipitado 500mL,1000mL
- Pipetas de 1mL,2mL,5mL,10mL (Pyrex)
- Probeta 25 mL (Pyrex)
- Tubos de ensayo

- Vaso de precipitado de 100mL, 250mL (Pyrex)
- Pipeta Pasteur

1.2.1.2. EQUIPOS Y APARATOS

- Balanza analítica (KERN ABJ-NM/ABS-N)
- Equipo de Soxhlet
- Microscopio
- Autoclave
- Cocina eléctrica
- Termobalanza (Modelo MB35 HALOGEN-OHAUS)
- Mufla
- Estufa esterilizadora
- Lámpara de luz ultravioleta
- Refrigerador
- Mechero bunsen
- Campana extractora
- Cámara de CO₂

1.2.1.3. MATERIAL ANEXO

- Algodón
- Barbijos
- Gorros descartables
- Papel filtro
- Papel filtro Whatman N°40
- Gasa
- Papel Kraft
- Mortero de porcelana
- Trípode
- Rejilla
- Papel aluminio
- Guantes de látex estériles
- Gradilla para tubos de ensayo
- Pinzas

- Espátula
- Asa de kohl
- Vernier
- Hisopos estériles
- Jeringas hipodérmicas de 1mL, 5mL y 10mL
- Marcador indeleble
- Capilares
- Espátula
- Cintas de pH
- Vernier 12 cm metal

1.2.1.4. REACTIVOS

- Agua destilada (UCSM; H-102 y H-402)
- Etanol al 96 % (Diproquim)
- Acetato de etilo (UCSM – H102)
- Tolueno (UCSM – H102)
- Metanol (UCSM; H-102)
- Ácido acético (UCSM; H-102)
- Ácido fórmico (UCSM; H-102)
- N-butanol (UCSM; H-102)
- Peróxido de hidrogeno 3%
- Reactivo de Kovacs (UCSM; H-402)
- Ácido sulfamínico 0.8% (UCSM; H-402)
- Ácido acético glacial (UCSM; H-402)
- α – naftilamina 0.5% (UCSM; H-402)
- Almidón (Diproquim)
- Rojo de metilo (UCSM; H-402)
- α – naftol (UCSM; H-402)
- Hidróxido de potasio (UCSM; H-402)
- Éter de petróleo (UCSM; H-204)
- Vainillina (UCSM; H-102)
- Ácido sulfúrico 5% (UCSM; H-204)
- Reactivo de cloruro férrico 1% (UCSM; H-102)

- Reactivo de Dragendorff (UCSM; H-102)
- Reactivo de cloruro de aluminio (UCSM; H-102)
- Iodo metálico (UCSM; H-204)
- Cristal violeta (UCSM; H-402)
- Lugol (UCSM; H-402)
- Alcohol – acetona (UCSM; H-402)
- Safranina (UCSM; H-402)

1.2.1.5. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Sangre Base Soya Trypticase (UCSM; H-402)
- Agar Müeller Hinton (UCSM; H-402)
- Agar Nutritivo (UCSM; H-402)
- Agar Manitol Salado (UCSM; H-402)
- Caldo Tioglicolato (UCSM; H-402)
- Caldo Peptonado (UCSM; H-402)
- Caldo Rojo de Metilo – Vogues Proskauer (UCSM; H-402)
- Caldo Nitratos (UCSM; H-402)
- Caldo Triptona (UCSM; H-402)

1.2.2. MÉTODOS

1.2.2.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La especie botánica *Notholaena nivea* “Cuti cuti” (Figura N°30); fue obtenida en la ciudad de Cuzco, en la provincia de Calca, distrito de Lanata, entre los meses de mayo-agosto del 2018 a las 5 de la mañana.

Fue envuelta en papel Kraft para poder realizar el transporte del material vegetal al laboratorio (Anexo N°10) y seleccionar las hojas que se encontraban en buen estado, eliminando las hojas dañadas, marchitas o podridas.

Para eliminar las impurezas que pudiera tener el material vegetal se lavó con agua destilada, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente en un lugar fresco, sin luz.



FIGURA N°30 : *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

FUENTE: Elaboración propia

1.2.2.1.1. MOLIENDA

Después de una semana de realizada la desecación del material vegetal, se procedió a la tritución con un mortero de porcelana hasta que se obtengan partículas uniformes. (Figura N°31)



FIGURA N°31 : Molienda *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

FUENTE: Elaboración propia

1.2.2.1.2. EXTRACCIÓN DE LA PLANTA *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

1.2.2.1.2.1. PROCEDIMIENTO

Se realizó mediante equipo Soxhlet, con 3 disolventes; alcohol etílico 96°, éter de petróleo y hexano, de los cuales se agregó 150 ml al contenedor del solvente de cada sistema.

Se pesaron 10 gramos del material vegetal previamente triturados para cada solvente, estos fueron envueltos en papel filtro y amarrados con pabilo, los cuales fueron depositado en la cámara de extracción del equipo. (Figura N°32)

Luego se procedió a la extracción etanólica, etérea y hexánica, tales fueron realizadas a temperaturas de 60°C, 35°C y 68°C respectivamente, en ciclos continuos hasta agotamiento de la muestra por un tiempo aproximado de 8 horas. (Figura N°33)

Este procedimiento fue realizado por triplicado.

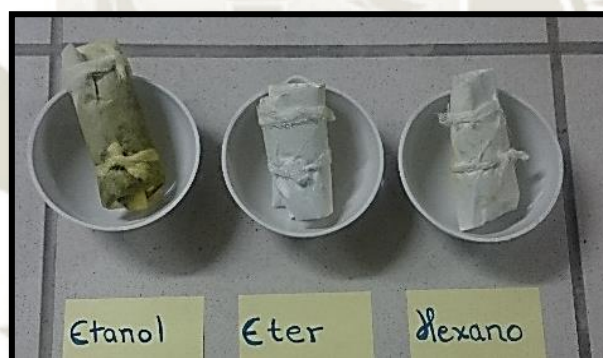


FIGURA N°32 : Muestra empaquetada con papel filtro

FUENTE: Elaboración propia



FIGURA N°33 : Extracción de la muestra por equipo Soxhlet con diferentes solventes

FUENTE: Elaboración propia

1.2.2.1.3. CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

1.2.2.1.3.1. PROCEDIMIENTO

Una vez concluida la extracción, se llevaron los extractos a los Becker de 250 ml cada uno, para poder evaporar el solvente hasta sequedad a baño maría con temperaturas inferiores a su punto de ebullición para evitar que la muestra se deteriore. (Figura N°34)



**Figura N°34 : Extracto seco de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” obtenido por Baño
María**

FUENTE: Elaboración propia

1.3. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Se hizo un análisis organoléptico a los extractos de las hojas y tallos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, tomando en cuenta los siguientes parámetros: color, sabor, olor y aspecto.

1.4. TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO DE LA PLANTA *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

1.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Se procedió a cortar la placa cromatográfica de silica gel en pedazos de 10 cm de largo por 3 cm de ancho, trazando una línea con lápiz de punta fina en la parte inferior y superior de 1 cm de separación.

En la línea inferior trazada se hizo una separación de 1 cm en el centro, zona donde se sembró con un capilar en punta, finalmente se siembra el extracto (con mayor porcentaje de rendimiento) dando un espacio de un minuto para que seque la siembra y repetir por 3 veces.

Se utilizó una cuba cromatografía de vidrio agregándose 5 ml de fase móvil, se esperó un tiempo adecuado (aproximadamente 30 minutos) para poder garantizar una buena saturación con los solventes. Luego se introdujo la placa sembrada para que entre en contacto con la fase móvil, 1 cm antes que llegue al extremo superior de esta, se da por concluido el desarrollo cromatográfico, retirando la placa y dejándola secar a temperatura ambiente por un lapso de 15 minutos. (Figura N°35)

Después del tiempo transcurrido se procedió al revelado de las placas de silica gel con diferentes reveladores químicos, y expuestas a luz UV.



FIGURA N°35 : Desarrollo cromatográfico

FUENTE: Elaboración propia

1.4.2. PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

- **Identificación general**

Fase móvil: Acetato de etilo: Metanol: Agua (3.75:0.83:0.42)

Revelador: Solución A. ácido sulfúrico al 5% en etanol

Solución B: vainillina al 1% en etanol

Se pulverizó la placa para luego dejarla secar a medio ambiente por 15 minutos y seguidamente someterla a estufa por 5 minutos a 100 °C.

- **Identificación de terpenos**

Fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo (4.5:0.5)

Revelador: Solución A: ácido sulfúrico 5% en etanol

Solución B: vainillina al 1% en etanol

Se pulverizó la placa para luego dejarla secar a medio ambiente por 15 minutos y seguidamente someterla a estufa por 5 minutos a 100 °C.

- **Identificación de taninos**

Fase móvil: Metanol: Agua (3.5:1.5)

Revelador: Solución de cloruro férrico al 5% en etanol

Se pulverizó la placa para luego dejarla secar a medio ambiente por 15 minutos y seguidamente someterla a estufa por 5 minutos a 100 °C.

- **Identificación de alcaloides**

Fase móvil: Ácido acético: Metanol: Agua (3.5:0.5:1)

Revelador: Reactivo de Dragendorff

Se pulverizó la placa para luego dejarla secar a medio ambiente por 15 minutos y seguidamente someterla a estufa por 5 minutos a 100 °C.

Revelador: Iodo metálico

Se calentó el iodo metálico y se concentró los vapores en un frasco tapado con una luna de reloj para así introducir la placa cromatográfica para su revelado.

- **Identificación de flavonoides**

Fase móvil: n-butanol: Acetato de etilo: Agua: Metanol (1:3:0.5:0.5)

Revelador: Solución de tricloruro de aluminio al 1% en etanol

Se pulverizó la placa para luego dejarla secar a medio ambiente por 15 minutos y seguidamente se observó a luz UV.

1.5. PROCESAMIENTO DE LA BACTERIA EN ESTUDIO

1.5.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Para poder realizar la obtención de las muestras en pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital III Goyeneche, se solicitó la autorización al Comité de Ética Institucional de Investigación de la Universidad Católica De Santa María (Anexo N°2).

El material biológico se esterilizo en luz UV durante 30 minutos (Figura N°36), para luego ser empleado en la extracción de las muestras con equipo de bioseguridad (Figura N°37).

Previo al procedimiento, se le informó y se le entregó la ficha de consentimiento informado a los pacientes (Anexo N°3).

Las muestras para la identificación de *Propionibacterium acnes* fueron obtenidas por expresión de pústulas de un total de 37 pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital III Goyeneche. (Figura N°38)



FIGURA N°36 : Esterilización del material de extracción

FUENTE: Elaboración propia

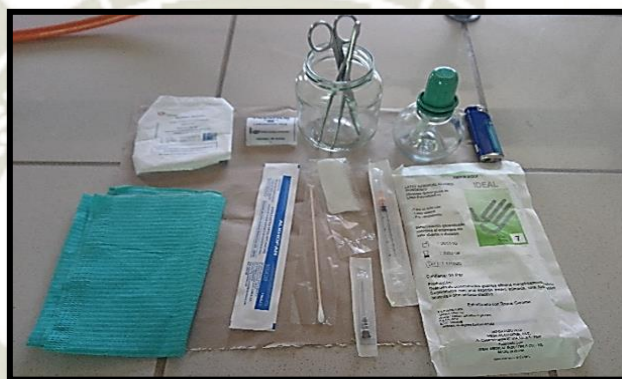


FIGURA N°37 : Material de extracción para el *Propionibacterium acnes*

FUENTE: Elaboración propia

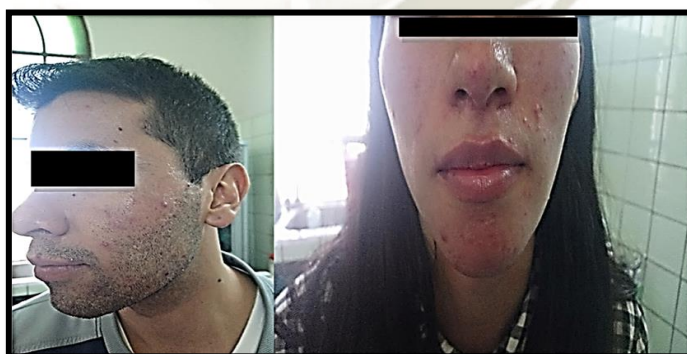


FIGURA N°38 : Pacientes con diagnostico Acné Vulgaris

FUENTE: Elaboración propia

1.5.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra extraída fue colocada en caldo tioglicolato enriquecido con vitamina K, el cual fue transportado a una temperatura de 4°C, inmediatamente después se

llevó al laboratorio para poder incubarla en cámara de CO₂ al 5% a 35°C por 72 horas.

Pasadas las 72 horas, se procedió a realizar el sembrado del tubo con caldo tioglicolato a placas con agar base soya tripticaasa sangre de cordero al 5% por 72 horas y agar manitol salado por 24 horas. (Figura N°39)

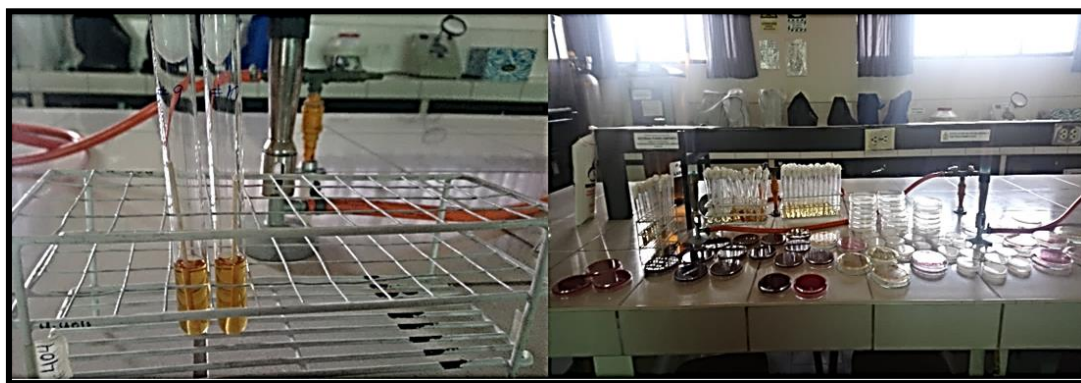


Figura N°39 : Muestra de extracción de pústula en caldo tioglicolato y procesamiento

FUENTE: Elaboración propia

1.5.3. COLORACION DE GRAM

Para realizar la tinción gram se tomó con un asa de kolle una porción pequeña de la cepa incubada para realizar un frotis en una lámina porta objeto limpia, se deja secar pasándola por la llama del mechero suavemente para poder fijarla.

La lamina porta objetos fue colocada sobre un soporte de tinción, se cubrió esta con solución cristal violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño. Seguidamente el frotis fue cubierto con solución de lugol durante 1 minuto y se lavó con agua de caño, a continuación, se echa decolorante alcohol-acetona durante 30 segundos para arrastrar el colorante violeta de cristal y se lava con agua de caño hasta quitar el exceso de la solución. Finalmente se cubrió la superficie con safranina por 1 minuto y se quitó el exceso con agua de caño. (Figura N° 40)

Se puso a secar la lámina con la muestra a temperatura ambiente para poder ser observada al microscopio.



FIGURA N° 40 : Tinción Gram

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Una vez obtenidas aisladas las colonias en el agar base soya tripticasa sangre de cordero al 5 % se realizaron las pruebas bioquímicas para su respectiva identificación

1.5.4.1. PRUEBA DE LA CATALASA

Esta prueba se realizó colocando con el asa de kolle una colonia de la cepa sembrada en agar base soya tripticasa sangre de cordero 5%, en el centro de una lámina porta objetos, a continuación, se agregó 2 o 3 gotas de peróxido de hidrogeno y se observó la formación de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno. (Figura N°41)

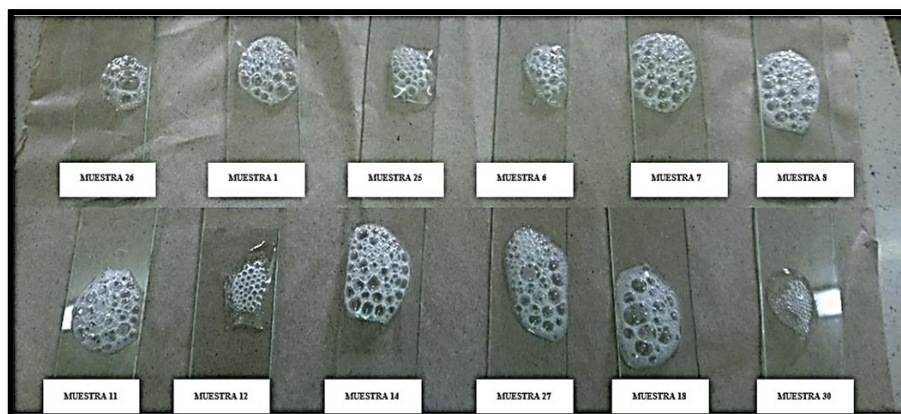


FIGURA N°41 : Reacción de Catalasa

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.2. CULTIVO EN CALDO TRIPTICASA

Con esta prueba se pone de manifiesto la presencia de la enzima Triptofanasa en la bacteria, si se encuentra presente degradará el triptofano y lo liberará al medio indol; formando un anillo fucsia en la superficie, sino este se tornará amarillo.

Se tomó una colonia con el asa de kolle en argolla de la cepa en estudio y se inoculó el caldo tripticasa, luego se puso a incubar a 35 °C por 24 horas.

Una vez pasada la incubación se agregó 5 gotas del reactivo de kovacs donde se observó la formación de un color fucsia como resultado positivo. (Figura N°42)



FIGURA N°42 : Reacción de Indol

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.3. CULTIVO EN CALDO NITRATOS

Mediante esta prueba se pone de manifiesto la capacidad de transformar los nitratos en nitritos. Para esto se inocular con la cepa aislada los tubos con el medio caldo nitratos a 35 °C durante 72 horas. Pasadas las 24 horas del tiempo de incubación, añadimos 2 o 3 gotas del reactivo "A-B" (A: α -naftilamina al 0.5% en ácido acético glacial 5N y B: ácido sulfanílico al 0.8% en ácido acético 5N), si aparece coloración rojo cereza indica que es positivo, si no aparece coloración es un presunto negativo. Si el último día a las 72 horas la bacteria da negativo, entonces podemos decir con seguridad que no tiene capacidad para reducir los nitratos. (Figura N°43)



FIGURA N° 43 : Reacción de reducción de Nitratos

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.4. PRUEBA DE LA LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA

Se preparó 250 ml de agar nutritivo, se disolvieron 10 g de gelatina sin sabor en la mitad del agua hirviendo para el agar nutritivo, se mezclaron ambas soluciones y se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C, se colocó en tubos de ensayo y se esperó a que solidifique para ser inoculado. Con el asa de kolle recta se realiza la punción del medio hasta una profundidad de 1 cm antes de llegar al fondo.

Se preparó un tubo control, el cual no fue inoculado, para ser procesado junto con los tubos inoculados.

Finalmente, los tubos fueron incubados a 35°C por 72 horas, cada 24 horas se colocaron los tubos en un baño de hielo durante 1 hora para observar si hubo licuefacción de la gelatina. (Figura N°44)



FIGURA N°44 : Reacción de licuefacción de la Gelatina

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.5. CULTIVO EN CALDO MRVP (ROJO DE METILO / VOGUES-PROSKAUER)

Se sembraron 20 tubos con caldo MRVP con el cultivo puro de la cepa de *Propionibacterium acnes* y se sembró a 35°C durante 24 horas.

Finalizada la incubación se agregó:

- Reactivo para rojo de metilo: 5 gotas de rojo de metilo (Figura N°45)
- Reactivo para vogues - proskauer: Se agregó 6 gotas de α -naftol al 5%, seguido de 2 gotas de KOH al 40% y se dejó reposando por 15 minutos. (Figura N°46)

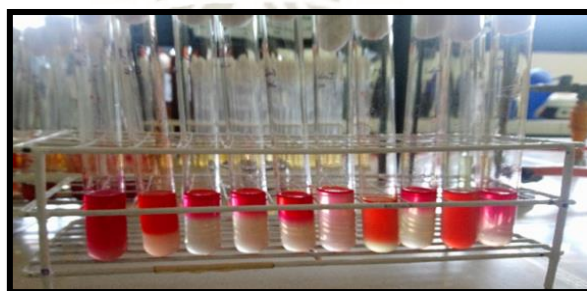


FIGURA N°45 : Reacción Rojo de Metilo

FUENTE: Elaboración propia



FIGURA N°46 : Reacción Vogues – Proskauer

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.6. CULTIVO EN AGAR ALMIDÓN

Se preparó una solución almidón-agua en la proporción 2:20 de la cual se tomó 10 ml (fuente de almidón), se mezcló con 5.75 g de agar agar y se llevó a 250 ml agua des ionizada.

Se plaqueó y se esperó a que el medio se solidifique para luego sembrar la cepa por el método de estría en agar y se incubó a 35°C durante 24 h. Después de este tiempo se adicionó 5 gotas de lugol y se extendió sobre la superficie del agar almidón el cual da como resultado: negativo a la formación de un halo claro alrededor de la cepa y positivo se observa color azul en todo el agar. (Figura N°47)



FIGURA N°47 : Reacción del Almidón

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.7. CULTIVO EN AGAR BILIS ESCULINA

A partir del cultivo de *Propionibacterium acnes*, microorganismo en estudio, se tomó una colonia con un asa de kolle en punta y se inoculó el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie de este. (Figura N° 48)

El medio de cultivo fue incubado a 35 °C durante 24 horas.

- **Positivo:**
Se observa un oscurecimiento o ennegrecimiento del medio de cultivo.
- **Negativo:**
Ausencia de oscurecimiento del medio de cultivo



FIGURA N°48 : Reacción Agar Bilis Esculina

FUENTE: Elaboración propia

1.5.4.8. CULTIVO EN AGAR TSI (TRIPLE SUGER IRON)

A partir del cultivo aislado se toma una colonia y se siembra en agar TSI, picando el fondo y está extendiendo sobre la superficie del medio e incubar a 35°C por 24 horas. (Figura N° 49)

1.5.4.8.1. INTERPRETACIÓN

- a) Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- b) Anaranjado/anaranjado (control, sin inocular).
- c) Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

- d) Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- e) El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico (H₂S).
- f) La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.

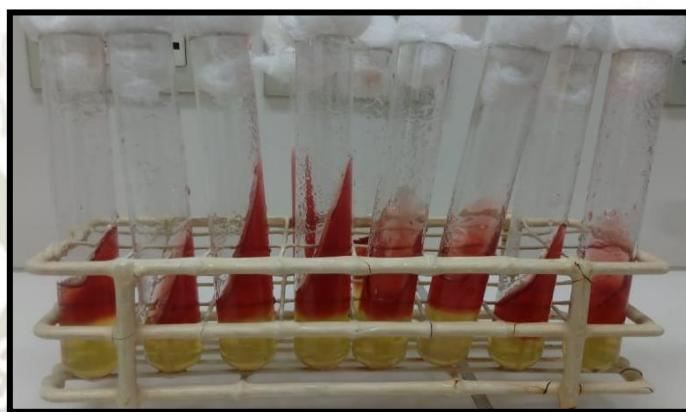


FIGURA N°49 : Reacción Triple Sugar Iron

FUENTE: Elaboración propia

1.6. DETERMINACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, HEXÁNICO Y ETÉREO DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

1.6.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO MADRE

Con los extractos obtenidos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, por el método de extracción de Soxhlet, se preparó el extracto madre a una concentración de 100 mg/ml cada uno.

Se obtuvo 1.17 g de residuo seco del extracto etanólico, 0.358g de residuo seco del extracto etéreo y 0.23g de residuo seco del extracto hexánico, disueltos con 11.7 ml, 3,58 ml y 2.3 ml de agua ultra pura respectivamente, a la cual se le realizó un blanco para descartar que no presente efecto antibacteriano.

1.6.2. PRUEBA PILOTO

Se sometieron los extractos etanólico 96°, hexánico y etéreo, a un análisis preliminar en el que se evaluó la actividad antibacteriana, por el método difusión de discos, permitiendo así elegir el extracto que presentará mayor actividad antibacteriana.

Los métodos hoyo-placa-cultivo y difusión de discos ambos se realizaron por quintuplicado con el siguiente procedimiento

1.6.3. PREPARACIÓN DEL INOCULO

De la cepa aislada con un asa de kolle se tomó 4 a 5 colonias que fueron transferidas a un tubo con 5 ml de caldo peptonado; este se ajusta a la escala de Mac Farland N°5 y de forma visual se compara hasta obtener la misma turbidez, para ello se puso como contraste un fondo blanco con líneas negras y una luz adecuada. La suspensión preparada de la bacteria contiene aproximadamente 10^8 UFC/ml.

Seguidamente se realizó una dilución de 0.1 ml del inóculo 10^8 UFC/ml en 9.9 ml de caldo peptonado esterilizado que nos dio una concentración final de 10^6 UFC/ml y fue utilizado para realizar las pruebas antibacterianas.

1.6.4. PREPARACION DE LOS DISCOS

Se preparó 30 discos de 6 mm de diámetro con papel filtro Whatman N° 4 y se colocaron 10 de ellos en 3 diferentes frascos, que fueron impregnados uno por uno con 10 μ l de los diferentes extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” en una dosis de 1 mg por disco.

1.6.5. METODO HOYO-PLACA-CULTIVO

Se preparó agar Mueller Hinton, una vez esterilizado y a una temperatura adecuada se plaquearon las placas Petri, se esperó a que el agar este totalmente endurecido y con el reverso de una pipeta Pasteur se realizó 4 hoyos en el agar. (Figura N° 50)

Luego cerca del mechero se procedió a sembrar en toda la superficie del agar el inóculo preparado de 10^6 UFC/ml y en cada hoyo se añadió 10 μ l de cada extracto, se dejó secar durante 15 minutos y se incubó a 35 °C por 24 horas, posteriormente medimos los halos de inhibición.



FIGURA N°50 : Esquema de la preparación de pozos en placa con agar Müller

Hinton

FUENTE: Elaboración propia

1.6.6. METODO DE DIFUSION DE DISCOS

Se preparó agar Mueller Hinton, una vez esterilizado y a una temperatura deseada, se plaquearon las placas petri y se esperó a que el agar este totalmente endurecido. Luego cerca del mechero se procedió a sembrar en toda la superficie del agar el inóculo preparado de 10^6 UFC/ml y se espero que seque durante 15 minutos, se dividió la placa en 4 cuadrantes para poder colocar en cada cuadrante un disco preparado con los diferentes extractos a una dosis determinada, se incubó a 35°C por 24 horas, y medimos los halos de inhibición. (Figura N°51)

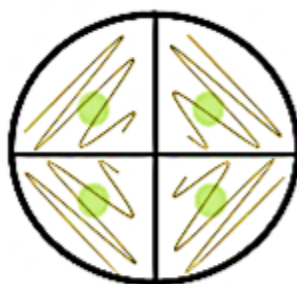


FIGURA N°51 : Esquema de la posición de los discos en placa con agar Müller

Hinton

FUENTE: Elaboración propia

1.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

1.7.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Se determinó la concentración inhibitoria mínima por el método de dilución en tubo.

1.7.1.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN TUBO DEL EXTRACTO MADRE DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

1.7.1.1.1. PREPARACIÓN DEL INOCULO

De la cepa aislada con un asa de kolle se tomó 4 a 5 colonias que fueron transferidas a un tubo con 5 ml de caldo peptonado; este se ajusta a la escala de Mac Farland N°5 y de forma visual se compara hasta obtener la misma turbidez, para ello se puso como contraste un fondo blanco con líneas negras y una luz adecuada. La suspensión preparada de la bacteria contiene aproximadamente 10^8 UFC/ml.

Seguidamente se realizó una dilución de 0.1 ml del inóculo 10^8 UFC/ml en 9.9 ml de caldo peptonado esterilizado, el cual nos dio una concentración final de 10^6 UFC/ml el cual fue utilizado para realizar las pruebas antibacterianas.

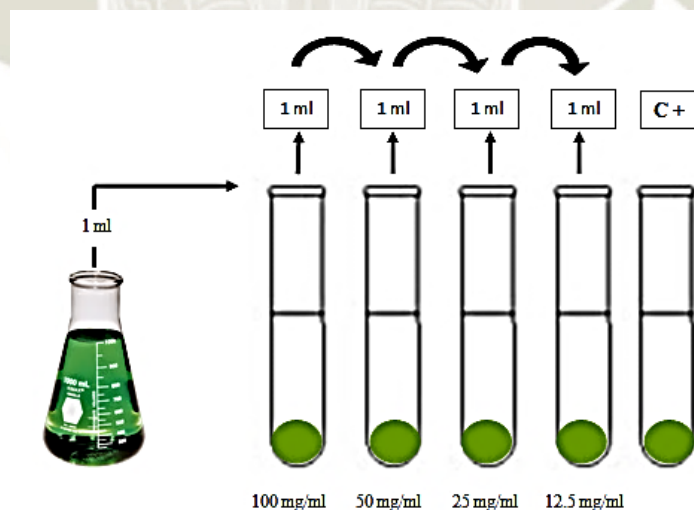
1.7.1.1.2. PREPARACION DE LAS DILUCIONES

Se trabajó con una cantidad total de 10 microorganismos de la cepa *Propionibacterium acnes*, aislada de los pacientes del Servicio de Dermatología del hospital III Goyeneche.

Se hizo una batería de 5 tubos (Tabla N° 6) a los cuales se les añadió 1 ml de caldo peptonado estéril, seguidamente al tubo 1 se le añade 1 ml de extracto de *Notholaena nivea* “Cutí cutí”, se mezcló y de este se extrae 1 ml y se agrega al tubo 2 nuevamente se mezcló y se extrajo 1 ml y se añadió al tubo 3 finalmente del tubo 3 se extrajo 1 ml el cual fue añadido al tubo 4 se mezcló y se descartó 1 ml de este, el tubo 5 fue nuestro control positivo al cual no se le añadió extracto. (Figura N°52)

TABLA N° 6 : Preparación de diluciones para la CMI

DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE TUBOS				
	1	2	3	4	5 (CONTROL +)
CALDO PEPTONADO (ml)	1	1	1	1	1
EXTRACTO SECO 100 mg/ml	1	1	1	1	-
VOLUMEN INICIAL (ml)	1	1	1	1	1
CONCENTRACIÓN 2 (mg/ml)	50	25	12.5	6.25	-
INOCULO 10⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1
VOLUMEN FINAL (ml)	2	2	2	2	2
CONCENTRACIÓN FINAL (mg/ml)	25	12.5	6.25	3.12	-

FUENTE: Elaboración propia

FIGURA N°52 : Diluciones de la muestra para obtener diferentes concentraciones
FUENTE: Elaboración propia

1.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Con agar Müller Hinton esterilizado se plaquearon placas Petri y se dejó a 35°C por 24 horas incubando, para verificar que esté libre de patógenos, ya que es el agar donde se realiza el resembrado.

Una vez realizada la prueba para determinar la concentración mínima inhibitoria, se observaron los tubos que no presentaban turbidez que indican que no tiene crecimiento antibacteriano “sin velo” para el resembrado.

Después de realizar la observación del crecimiento bacteriano se procedió a sembrar los tubos del 1 al 5 y se incubó a 35 °C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a observar crecimiento microbiano en las placas, para poder indicar el punto de quiebre donde. (Figura N°53)

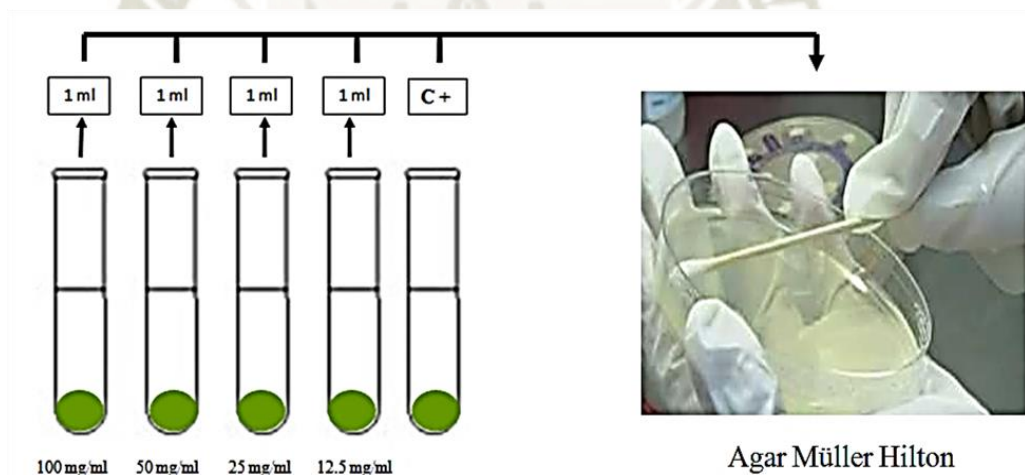


FIGURA N°53 : Siembra de la concentración mínima inhibitoria

FUENTE: Elaboración propia

1.7.3. CÁLCULO DE NUEVAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti” PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI)

Si en la determinación de la concentración mínima bactericida se encontraran cepas viables a una determinada concentración, se decidirá recalcular las concentraciones del extracto a partir de la concentración donde no se presentan

cepas viables hasta la concentración donde sí se presentarán cepas viables, para poder determinar la nueva concentración mínima inhibitoria. (Tabla N°7)

Preparación de las diluciones para la determinación de la concentración mínima inhibitoria por quintuplicado. (Figura N°54)

- En un matraz se preparó caldo peptonado, seguidamente se calculó los mililitros de este a ser añadidos a 35 tubos de ensayo para obtener las diferentes concentraciones y se esterilizó cada tubo.
- Luego se agregó los mililitros de extracto calculado para obtener 1 ml de volumen final.
- Enseguida del inóculo previamente preparado se añadió 1 ml a los tubos de ensayo conteniendo la solución de caldo peptonado y extracto de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, a las concentraciones recalculadas obteniendo 2 ml de volumen final.
- Finalmente se homogenizó los tubos y se incubó 35 °C durante 24 horas.

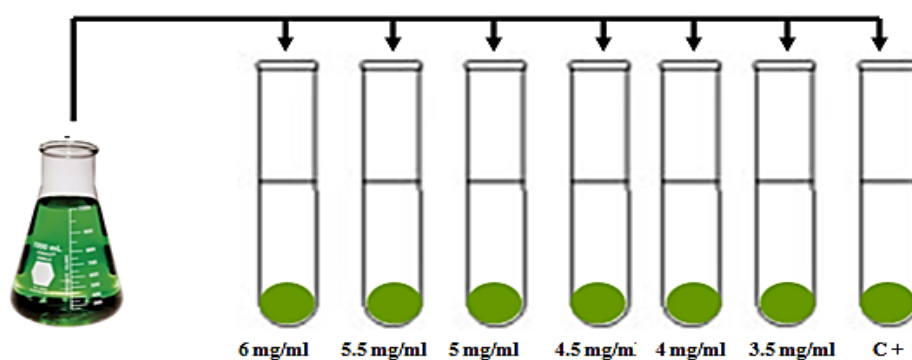


FIGURA N°54 : Preparación de nuevas concentraciones del extracto

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N°7: Preparación de nuevas diluciones para la CMI

DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE TUBOS						
	1	2	3	4	5	6	7 (CONTROL +)
CALDO PEPTONADO (ml)	0.88	0.89	0.90	0.91	0.92	0.93	1
EXTRACTO SECO 100 mg/ml	0.12	0.11	0.10	0.09	0.08	0.07	-
VOLUMEN INICIAL (ml)	1	1	1	1	1	1	1
CONCENTRACIÓN 2 (mg/ml)	12	11	10	9	8	7	-
INOCULO 10⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1	1
VOLUMEN FINAL (ml)	2	2	2	2	2	2	2
CONCENTRACIÓN FINAL (mg/ml)	6	5.5	5	4.5	4	3.5	-

FUENTE: Elaboración propia

1.7.4. DETERMINACIÓN DE LA NUEVA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MINIMA (CBM) A PARTIR DE LAS NUEVAS CONCENTRACIONES

Se preparó agar Müller Hinton, una vez esterilizado y verificado después de 24 horas que esté libre de patógenos, se plaqueó 35 placas Petri, las cuales fueron sembradas con los 6 tubos de la CMI y una placa control positivo de cada batería.

Se dejó en incubación a 35 °C por 24 horas, finalmente se observó el crecimiento bacteriano en placas y el punto de ruptura en las placas. (Figura N°55)



FIGURA N°55 : Siembra en agar de las nuevas concentraciones del extracto

FUENTE: Elaboración propia

1.7.5. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA POR EL METODO DE DIFUSION DE DISCOS

Para la determinación de la sensibilidad antibacteriana se utilizó el método Kirby Bauer, el cual se realizó por quintuplicado.

1.7.5.1. PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD DEL EXTRACTO DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

Se hicieron discos de 6 mm de diámetro con papel filtro Whatman N° 4 y cada uno fue impregnado con 10 µl de extracto de *Notholaena nivea* “Cutí cutí”, en diferentes dosis.

Se esperó que el papel filtro seque, para colocarlos en las placas Petri.

Fórmula para la preparación de los discos de sensibilidad:

$$Dosis\ del\ disco = \frac{a \times b}{c}$$

Donde:

a: dosis del extracto (mg)

b: cantidad del extracto impregnado en el disco (µl)

c: ml en los que se encuentra la dosis del extracto (1000 µl)

1.7.5.2. MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó agar Müller Hinton esterilizado y plaqueado en placas Petri, seguidamente con un hisopo estéril se sembró toda la superficie de este sin dejar espacios vacíos del agar, con el inóculo previamente preparado a una concentración de 10^6 UFC/ml.

Una vez seca la placa, se colocaron los discos de sensibilidad con una pinza estéril dejando un espacio adecuado de separación, para que no se superpongan los halos de inhibición formados, finalmente se incubaron las placas a 35 °C por 24 horas.

1.7.5.3. LECTURA

A las 24 horas, se midieron los halos de inhibición que se formaron alrededor de los discos.

1.8. ANTIBIOGRAMA CON LOS MEDICAMENTOS DOXICICLINA (30 mcg), TETRACICLINA (30 mcg) Y CLINDAMICINA (2 mcg)

En agar Müller Hinton, se sembró el inóculo con una concentración de 10^6 UFC/ml previamente preparado en toda la placa y se esperó a que este seque para poder colocar los discos de sensibilidad.

1.8.1. DISCOS DE SENSIBILIDAD

Los discos de sensibilidad con concentración definida del medicamento se colocaron en la placa a una distancia determinada entre ellos de al menos 15 mm para poder observar los halos de inhibición y se llevó a incubación a 35°C durante 24 horas.

1.8.2. LECTURA

A las 24 horas de incubación, se midieron los halos de inhibición que se formaron alrededor de los discos.

1.9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para comparar el efecto antibacteriano mediante la medición de halos de los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba específica de Tuckey, para establecer si los resultados

presentan una diferencia significativa, realizados con un nivel de confianza al 95%, utilizando el software Statgraphics Centurion XVII.

1.9.1. MEDIA Y DESVIACION ESTÁNDAR

El valor promedio utilizado fue la media aritmética (en forma abreviada, la media), que es la suma de las medias dividida por el número de medidas:

La media, $\bar{x}$, de n medidas viene dada por $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Donde:

$\sum x_i$ = suma de todas las medidas

n = numero de medidas

Una medida más útil, que utiliza todos los valores, es la desviación estándar, s , que se define como sigue:

La desviación estándar, s , de n medidas viene dada por:

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

Donde:

$\bar{x}$ = media de las medidas

x_i = medidas

n = numero de medidas

1.9.2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Es una técnica muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación, se puede usar las técnicas ANOVA en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria y también se puede utilizar para separar y estimar las fuentes de variación.

Un análisis de varianza (ANOVA) prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente.

Para ejecutar un ANOVA, debe tener una variable de respuesta continua y al menos un factor categórico con dos o más niveles. Los análisis ANOVA requieren datos de poblaciones que sigan una distribución aproximadamente normal con varianzas iguales entre los niveles de factores. Sin embargo, los procedimientos de ANOVA funcionan bastante bien incluso cuando se viola el supuesto de normalidad, a menos que una o más de las distribuciones sean muy asimétricas o si las varianzas son bastante diferentes. Las transformaciones del conjunto de datos original pueden corregir estas violaciones (37).

1.9.3. PRUEBA TUKEY

El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado. Es importante considerar la tasa de error por familia cuando se hacen comparaciones múltiples, porque la probabilidad de cometer un error de tipo I para una serie de comparaciones es mayor que la tasa de error para cualquier comparación individual. Para contrarrestar esta tasa de error más elevada, el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que usted especifique (38).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti” fue recolectada en la ciudad de Cuzco entre los meses de mayo-agosto del 2018, se realizaron tres extractos por el método de Soxhlet, usando tres solventes de diferentes polaridades los cuales fueron: etanol polar 96°, éter de petróleo medianamente polar y hexano apolar.

1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

1.1. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

Se llevó la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti” al Herbarium Arequipense de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa para su identificación y tipificación. (Anexo N°1)

1.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Para la obtención de estos extractos, se usaron las hojas y los tallos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, se llevó a un proceso de desecación y pulverización, seguidamente se realizó la obtención de los extractos etanólico 96°, hexánico y etéreo, mediante el método de extracción por Soxhlet, ya que es una técnica que extrae un amplio rango de principios activos, evitando los principales interferentes de la extracción, como son tiempo y cantidad de disolvente empleado. (Figura N°56)



FIGURA N°56 : Extracto Etanólico, hexánico y etéreo de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

FUENTE: Elaboración propia

1.3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Los resultados que se describe en la tabla N°8, son las características organolépticas de los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

TABLA N°8 : CARACTERES ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

PARÁMETROS	TIPO DE EXTRACTO		
	Etanólico	Hexánico	Etéreo
Color	Amarillo pardo	Verde pastel claro	Verde pastel claro
Olor	Característico, intenso	Característico	Característico
Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
Aspecto	Ligeramente turbio	Turbio	Turbio

FUENTE: Elaboración propia

1.4. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, que fueron obtenidos por el método de Soxhlet, fueron traspasados a vasos de precipitados debidamente tarados para obtener el peso real de cada uno de los extractos y así poder calcular el porcentaje de rendimiento. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

Para poder validar los extractos obtenidos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, con los tres solventes empleados, se les realizaron tres extracciones mediante el equipo extractor Soxhlet, obteniéndose un promedio final de los porcentajes de rendimientos para cada uno de los extractos. (Tabla N°9)

TABLA N°9 : Porcentaje de rendimiento promedio de los extractos secos de
***Notholaena nivea* “Cuti cuti”**

SOLVENTE	DESCRIPCIÓN	Peso de la planta (g)	Extracto seco (g)	Rendimiento
ETANOL	1°	10.6541 g	1.17 g	10.98 %
	2°	10.4053 g	1.13 g	10.86 %
	3°	10.4569 g	1.14 g	10.90 %
	Promedio			10.91 %
	Desviación estándar			0.061
HEXANO	1°	10.3947 g	0.23 g	2.21 %
	2°	10.3181 g	0.23 g	2.23 %
	3°	10.2203 g	0.23 g	2.25 %
	Promedio			2.23 %
	Desviación estándar			0.02
ÉTER DE PETRÓLEO	1°	10.1333 g	0.359 g	3.54 %
	2°	10.0211 g	0.358 g	3.57 %
	3°	10.0132 g	0.358 g	3.58 %
	Promedio			3.58 %
	Desviación estándar			0.58

FUENTE: Elaboración propia

Los resultados obtenidos luego del cálculo son mostrados en la tabla N°9 observando que los datos de las repeticiones muestran un comportamiento normal. Conforme a los resultados obtenidos, se puede decir que el extracto etanólico fue el que obtuvo mayor porcentaje de rendimiento con un promedio de 10.91 % con una desviación estándar de 0.061, seguido del extracto etéreo con un rendimiento de 3.58%, una desviación estándar de 0.021 y por último el extracto hexánico con un rendimiento de 2.23 %, una desviación estándar de 0.02.

1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

TABLA N°10 : Análisis de Varianza (Anova) de los Extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Valor P
Entre grupos	131.200556	2	65.6002778	43095.1	3.3728E-13	5.14325285	0.0000
Dentro de los grupos	0.00913333	6	0.00152222				
Total	131.209689	8					

FUENTE: Elaboración propia

La tabla N°10 nos indica que el valor P es de 0.0000 siendo menor que $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se aprueba la hipótesis alternativa que nos indica que si existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 3 extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” con un nivel del 95.0% de confianza.

Al realizar la prueba de Tukey HSD se confirmó que todos eran diferentes entre sí tal y como se muestra en la tabla 11 y 12.

TABLA N°11 : Comparación de medias significativamente diferentes para el rendimiento de los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

	CASOS	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
Extracto Hexánico	3	2.23	X
Extracto Etéreo	3	3.56333	X
Extracto Etanólico	3	10.9133	X

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N°12 : Comparaciones en parejas de Tukey HDS de los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Extracto Etanólico - Extracto Hexánico	*	8.68333	0.0977442
Extracto Etanólico - Extracto Etéreo	*	7.35	0.0977442
Extracto Hexánico - Extracto Etéreo	*	-1.33333	0.0977442

* indica una diferencia significativa

FUENTE: Elaboración propia

La Tabla N°12 nos muestra una comparación por parejas entre los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” respaldado con el estadístico Tukey HDS el cual indica que hay diferencia significativa de la media de los tres grupos de contraste entre los extractos etanólico, hexánico y etéreo a un intervalo de confianza del 95%.

PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

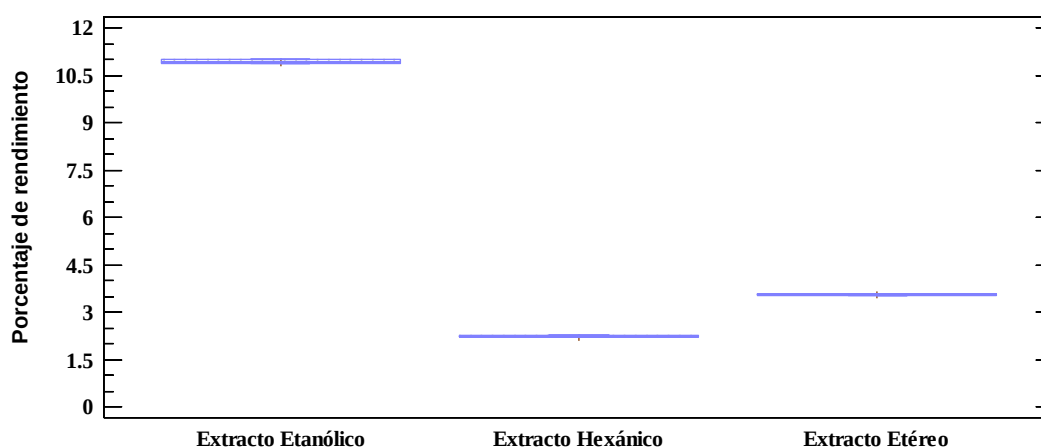


FIGURA N°57 : Promedios de los rendimientos (%) de los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para cada tipo de solventes

FUENTE: Elaboración propia

La figura N°57, nos muestra la media (línea roja vertical de cada caja) del porcentaje de rendimiento para cada tipo de solvente, observando que la caja del extracto etanólico difiere en el rendimiento respecto a los solventes hexánico y etéreo.

1.6. PROCESAMIENTO DE LA CEPA EN ESTUDIO

Se tomaron muestras de pústulas de 37 pacientes del hospital III Goyeneche, las cuales fueron transportadas en caldo tioglicolato enriquecido con vitamina k en

condiciones de anaerobiosis al laboratorio H-402 de la universidad Católica de Santa María en el cual se procedió a incubar la muestra en cámara de CO₂ a 35 °C durante 72 horas.

A las 72 horas se observaron los tubos de caldo tioglicolato y se realizó una primera clasificación por su forma de crecimiento en: 1) nieve cayendo, 2) turbio y 3) sin crecimiento (el caldo se mantuvo transparente). En 11 caldos de tioglicolato (29.73%) crecimiento en velo superficial, mientras que en 26 caldos de tioglicolato (70.27%) presentaron crecimiento de diferentes patrones.

De estos el patrón “nieve cayendo” se presentó en 8 muestras (30.77%) y el patrón turbio en 18 muestras (69.23%).

Una vez obtenido el crecimiento en caldo tioglicolato, se procedió a sembrar en placas de agar sangre en base soya-tripticosa y agar manitol salado.

El agar sangre de cordero en base soya-tripticosa fue incubado a 35°C por 120 horas con atmósfera de CO₂ (Figura N° 58), mientras que el agar manitol salado fue incubado a 35 °C en cámara de CO₂ y 37°C en estufa de incubación por 24 horas.

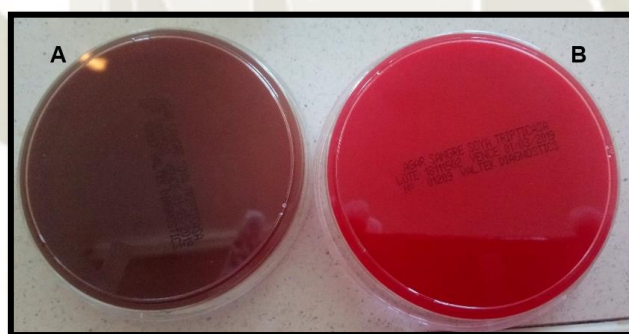


FIGURA N°58 : (A) placa de agar sangre de cordero en base soya-tripticosa sembrada en CO₂; (B) placa de agar sangre de cordero en base soya-tripticosa sin sembrar

FUENTE: Elaboración propia

Los microorganismos que crecieron en el agar sangre fueron identificados mediante pruebas bioquímicas. En el caso del agar manitol salado, la identificación se basó en ver el crecimiento tanto en condiciones anaerobias como aerobias, la morfología en tinción de Gram, pruebas de catalasa y coagulasa.

La lectura de la placa de agar sangre en base soya-tripticasa mostró colonias pequeñas, de color blanco grisáceo, ligeramente mucosas, de bordes enteros, consideradas como *Propionibacterium* y en la placa de agar manitol salado se observaron colonias puntiformes, de bordes enteros, de color blanco. (Figura N°59)



FIGURA N°59 : (A) Placa Agar Sangre en Base soya– Tripticasa (*Propionibacterium*); (B) Placa Agar Manitol salado no fermenta en manitol

FUENTE: Elaboración propia

Se observó los distintos tipos de fermentación del Agar Manitol Salado, donde se presume las dos especies de *Staphylococcus*, con una coloración amarilla por la producción intensa del ácido para *Staphylococcus aureus* (Figura N°60) y una coloración rojo color vino porque no hay producción del ácido para el *Staphylococcus epidermidis* (Figura N°61).

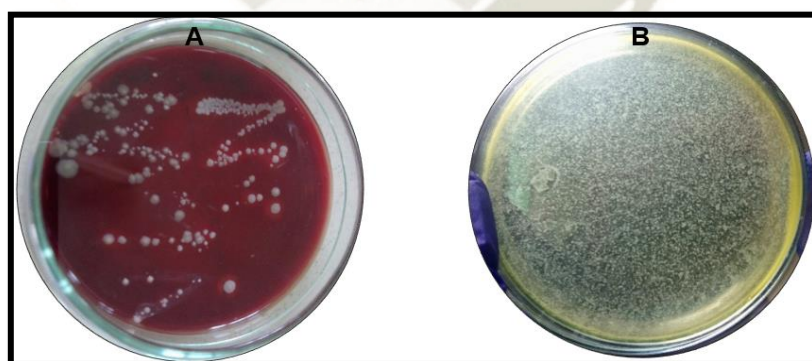


FIGURA N°60 : (A) Placa Agar Sangre en Base soya– Tripticasa (*Staphylococcus aureus*); (B) Placa Agar Manitol salado hay crecimiento y si fermenta en manitol

FUENTE: Elaboración propia

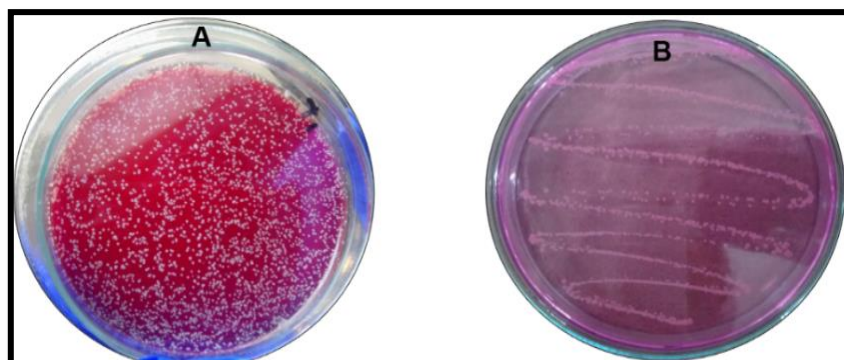


FIGURA N°61 : (A) Placa Agar Sangre en Base soya – Tripticasa (*Staphylococcus epidermidis*); (B) Placa Agar Manitol salado hay crecimiento no fermenta en manitol

FUENTE: Elaboración propia

Luego se realizó la tinción Gram a todas aquellas muestras que presentaron crecimiento, encontrándose en 26 muestras (70.27%) bacilos Gram positivos y en 11 muestras (29.73%) se presentaron cocos Gram positivos en grupos.

La figura N°62 muestra la tinción Gram en la cual pudimos observar un microorganismo Gram positivo que se presenta en cadenas, en pares o formando configuraciones en “V”, “Y” o semejando letras chinas que se consideraron tentativamente como la cepa *Propionibacterium acnes*.



FIGURA N°62 : Tinción de Gram para aislado bacteriano aumento 100x

FUENTE: Elaboración propia

La figura N°63 muestra microorganismos Gram positivos que se presenta como células cocoides o cocobacilares, cocos en pares que se consideraron tentativamente como cepas de *Staphylococcus epidermidis* (B1) y *Staphylococcus aureus* (B2).

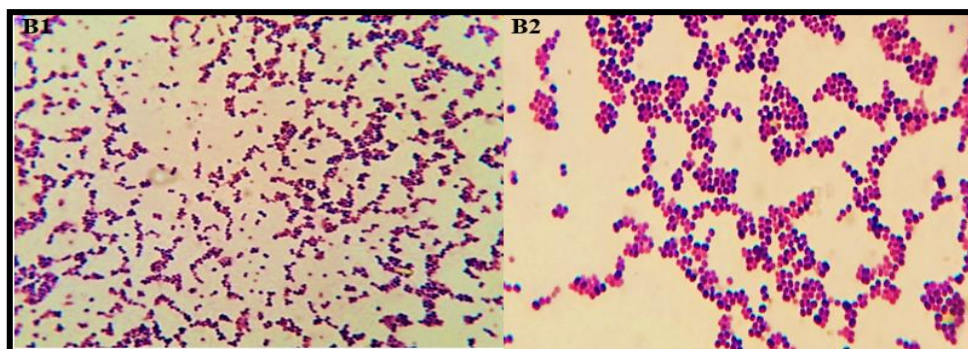


FIGURA N°63 : Tinción de Gram (B1) *Staphylococcus epidermidis*; (B2) *Staphylococcus aureus*. aumento 100x

FUENTE: Elaboración propia

1.6.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para la correcta identificación de este microorganismo, se realizaron diferentes pruebas bioquímicas, a continuación, se muestran los resultados en la tabla N°13.

TABLA N°13 : Resultados de la identificación bioquímica

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
Prueba de catalasa	Positivo
Prueba de la coagulasa	Negativo
Prueba de indol	Positivo
Reducción de nitratos	Positivo
Licuefacción de la gelatina	Negativo
Hidrolisis de almidón	Negativo
Prueba de RMVP	RM (+), VP (-)
Prueba de la esculina	Negativo
Prueba de TSI	R/A --

FUENTE: Elaboración propia

Jaramillo y Bazalar (28) realizaron una evaluación microbiológica en 20 pacientes con diferente grado de acné vulgaris en 12 pacientes se aisló *Propionibacterium acnes* y en 7 la asociación de *Propionibacterium acnes* con *Staphylococcus epidermis*, y en 1 la asociación de *Propionibacterium acnes* con

Propionibacterium granulosum sus resultados confirman que la flora bacteriana de las lesiones inflamatorias del acné vulgaris está constituida principalmente por *Propionibacterium acnes* con *Staphylococcus epidermis* por lo tanto, *Propionibacterium acnes* podría jugar un rol directo en la iniciación y mantenimiento de las lesiones inflamatorias del acné vulgaris.

De este modo podemos concluir que el microorganismo en estudio es *Propionibacterium acnes*. De los 37 pacientes estudiados, todos los pacientes presentaban piel grasosa y referían antecedentes familiares de acné vulgaris.

Se aisló *Propionibacterium acnes* en 26 pacientes, en mayor predominancia se observó *Staphylococcus epidermidis* en combinación con *Propionibacterium acnes* en 7 pacientes y *Staphylococcus aureus* en combinación con *Staphylococcus epidermidis* en 4 pacientes. (Tabla N°14)

TABLA N°14: Resultados del análisis microbiológico en pacientes con acné vulgaris

Muestra	Edad	Sexo	Antecedentes Familiares	Microorganismos aislados
1	22	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
2	29	M	Si	<i>S. epidermidis</i> - <i>P. acnes</i>
3	27	M	Si	<i>S. epidermidis</i> - <i>P. acnes</i>
4	16	M	Si	<i>S. epidermidis</i> - <i>P. acnes</i>
5	24	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
6	20	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
7	18	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
8	21	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
9	22	F	Si	<i>S. aureus</i> - <i>S. epidermidis</i>
10	24	F	Si	<i>S. epidermidis</i> - <i>P. acnes</i>
11	17	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
12	29	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
13	23	F	Si	<i>S. epidermidis</i> - <i>P. acnes</i>
14	26	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
15	25	M	Si	<i>S. aureus</i> - <i>S. epidermidis</i>

16	17	F	Si	<i>S. aureus - S.epidermidis</i>
17	21	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
18	23	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
19	27	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
20	18	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
21	24	M	Si	<i>S. epidermidis - P. acnes</i>
22	27	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
23	21	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
24	21	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
25	19	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
26	25	M	Si	<i>S. aureus - S.epidermidis</i>
27	28	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
28	27	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
29	16	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
30	26	F	Si	<i>S. epidermidis - P. acnes</i>
31	24	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
32	22	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
33	23	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
34	24	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
35	18	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
36	22	F	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>
37	19	M	Si	<i>Propionibacterium acnes</i>

FUENTE: Elaboración propia

1.7. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí” FRENTE A LA CEPA *Propionibacterium acnes*

Para poder realizar las pruebas antibacterianas, con el microorganismo identificado bioquímicamente, realizamos una prueba piloto donde observamos cuál de los tres extractos de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” presentó mayor efecto antibacteriano.

Los extractos trabajados se utilizaron con agua ultra pura para comprobar que este no inhiba el crecimiento bacteriano, se realizó una prueba con el inóculo equivalente

a 10^6 UFC/mL en el medio de cultivo Müller Hinton en el que fue sembrado, dividido en 4 cuadrantes, se puso un disco de cada extracto con la concentración establecida y un disco con agua ultra pura. (Figura N°64)

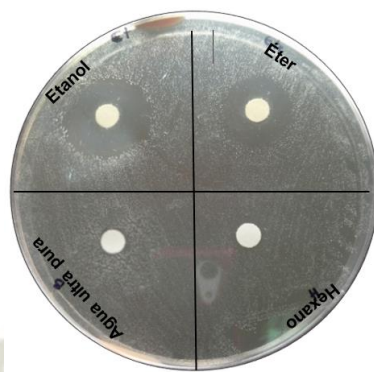


FIGURA N°64 : Prueba piloto de los extractos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

FUENTE: Elaboración propia

Observamos los resultados de la prueba piloto, en la cual obtenemos mayor diámetro de halo de inhibición en el extracto etanólico, seguido el extracto etéreo, en cuanto el extracto hexánico y el agua ultra pura no presentaron halo de inhibición. (Tabla N°15)

TABLA N°15 : Evaluación preliminar por el método difusión de discos

Extractos	Concentración	P1	P2	P3	P4	P5
Etanol	1 mg	22 mm	23 mm	22 mm	21 mm	23 mm
Hexano	1 mg	SH	SH	SH	SH	SH
Éter de petróleo	1mg	12 mm	10 mm	10 mm	9 mm	11 mm
Agua ultra pura	-	SH	SH	SH	SH	SH

*

Leyenda: SH = Sin Halo

FUENTE: Elaboración propia

Por lo que podemos decir que el agua ultra pura no presenta ninguna acción antibacteriana y si puede ser utilizada como disolvente del extracto, eligiendo el extracto etanólico por presentar mayor efecto antimicrobiano.

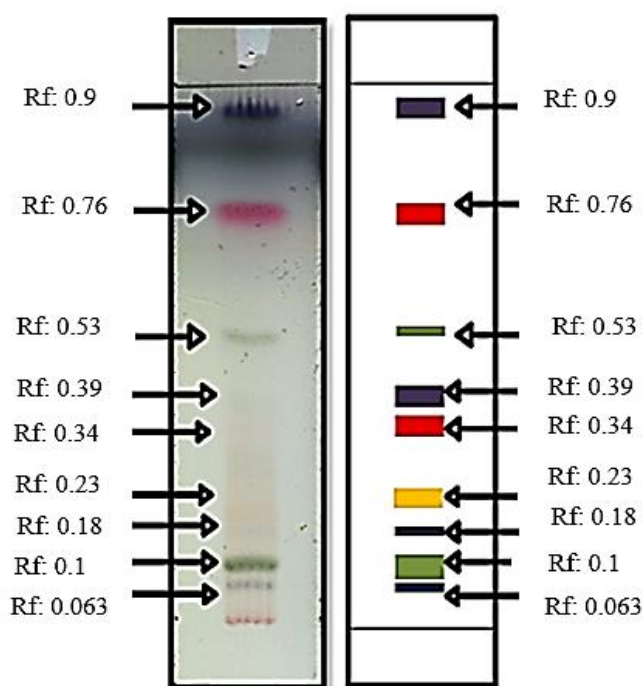
1.8. ANÁLISIS FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

Después de haber obtenido nuestros extractos etanólico 96°, hexánico y etéreo, se optó por elegir el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” debido a que presentó mayor efecto inhibitorio en la prueba piloto, ya que probablemente presente un alto contenido de sustancias polares.

Según Cabrera (26), la presencia de los metabolitos encontrados, los azúcares reductores, alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides están relacionados con la actividad hipoglicemiante. En este estudio se realizaron pruebas de solubilidad, precipitación y colorimetría en tubos de ensayo, y en placa o lámina para determinar la presencia de los principales grupos metabólicos.

1.8.1. IDENTIFICACIÓN GENERAL

La identificación cromatográfica general fue realizada con una fase móvil de acetato de etilo: metanol: agua a una proporción de (3.75:0.83:0.42), fase estacionaria; placa de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm. Obteniéndose en la placa (figura N°65) manchas de diferentes colores con un factor de retención de: 0.90 (azul), 0.76 (rojo), 0.53 (verde), 0.39 (azul), 0.34 (rojo), 0.23 (amarillo), 0.18 (azul), 0.10 (verde) y 0.063 (azul), para la identificación de metabolitos secundarios.



Revelador: Solución A: ácido sulfúrico 5% en etanol

Solución B: vainillina 1% en etanol

FIGURA N°65: Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para la identificación de metabolitos secundarios

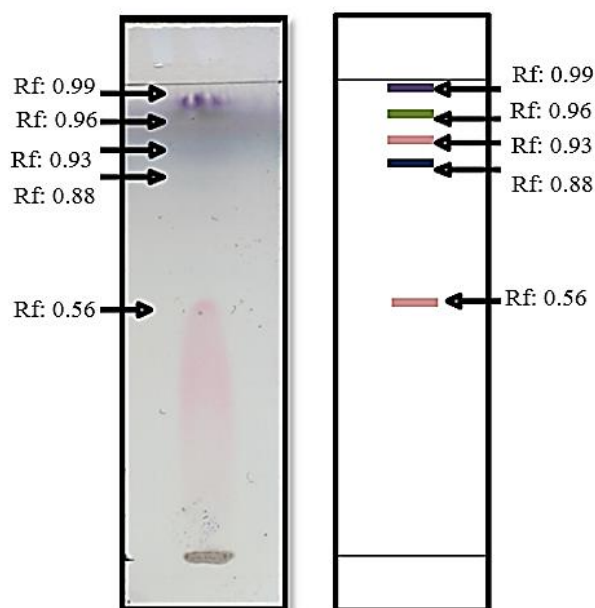
FUENTE: Elaboración propia

Como observamos en la cromatografía de capa fina para la identificación general, el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, presento una variedad de grupos de metabolitos secundarios que pueden ser identificados.

Cabrera (26), demuestra en su investigación la presencia de metabolitos encontrados como, azúcares reductores, alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides relacionados con la actividad hipoglicemiente de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” con pruebas de solubilidad, precipitación y colorimetría en tubos de ensayo, para determinar la presencia de los principales grupos metabólicos.

1.8.2. IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS

La identificación cromatográfica para la identificación de terpenos fue realizada con una fase móvil de tolueno: acetato de etilo a una proporción de (4.5:0.5), con una fase estacionaria de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda a 254 nm.



Revelador: Solución A: ácido sulfúrico 5% en etanol

Solución B: vainillina 1% en etanol

FIGURA N°66 : Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para la identificación de terpenos.

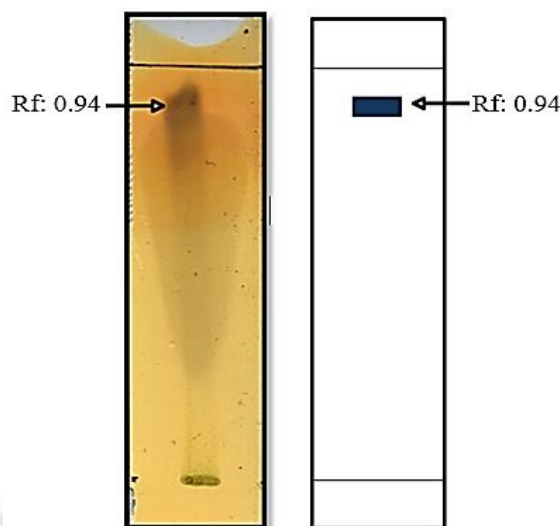
FUENTE: Elaboración propia

En la figura N°66 observamos diferentes manchas de colores con los factores de retención: 0.99 (morado), 0.96 (verde), 0.93 (rosado), 0.88 (azul) y 0.56 (rosado), lo que indica la presencia de terpenos en el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, se presume la presencia de monoterpenos y diterpenos por el viraje de color y también otras sustancias no identificadas.

García (27), menciona que la *Notholaena nivea* es un helecho americano usado en la Medicina Tradicional Peruana para el tratamiento de la diabetes, por lo que utilizaron un extracto de cloruro de metileno de la planta para realizar un estudio fitoquímico por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas, donde identificaron 11 triterpenos: 8 con esqueleto de cicloartanol y 3 de hopano.

1.8.3. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Para la identificación cromatográfica de taninos, se usó como fase móvil: metanol: agua con una proporción de (3.5:1.5) y una fase estacionaria de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm.



Revelador: Solución cloruro férrico 5% en etanol

FIGURA N°67 : Cromatografía de capa fina del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para la identificación de Taninos.

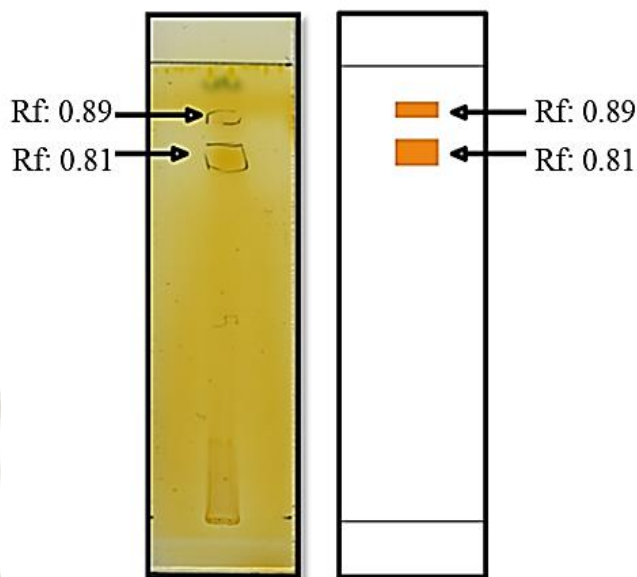
FUENTE: Elaboración propia

Castañeda et al. (12), determinaron que en la planta denominada *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, predominan los compuestos fenólicos, los alcaloides y los taninos.

Por lo tanto, en la figura N°67 se detectó la posible presencia de taninos hidrolizables debido a que observamos una mancha de color azul con un factor de retención de 0.94, después de haber sido tratada con cloruro férrico. Lo que indica presencia de taninos en el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

1.8.4. IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

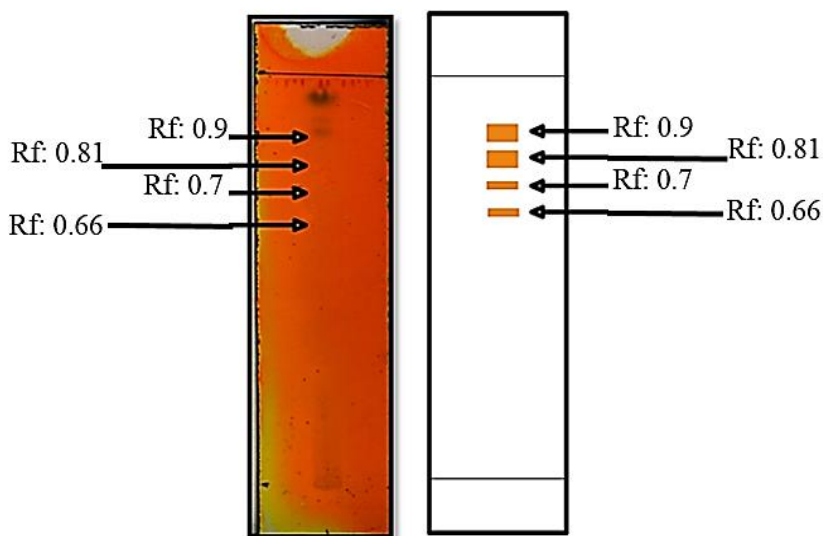
Para la identificación cromatográfica de alcaloides, se usó como fase móvil: ácido acético: metanol: agua con una proporción de (3.5:0.5:1) y una fase estacionaria de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda a 254 nm.



Revelador: Ioduro metálico (vapores)

FIGURA N°68 : Cromatografía de capa fina del Extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para la identificación de Alcaloides.

FUENTE: Elaboración propia



Revelador: Reactivo de Draggendorf

FIGURA N°69 : Cromatografía de capa fina del Extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para la identificación de Alcaloides

FUENTE: Elaboración propia

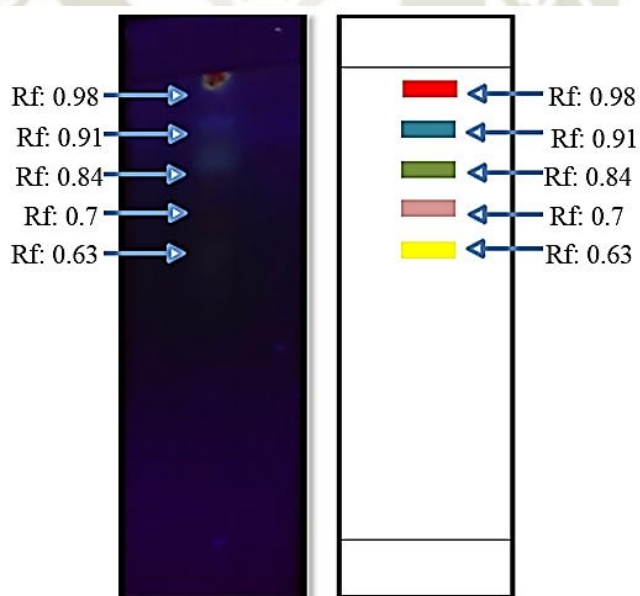
En la figura N°68 observamos 2 manchas de color anaranjado con factores de retención de: 0.89 y 0.81 usando el revelador de vapores de yoduro metálico para poder visualizar mejor las manchas. En la figura N°69 observamos 4 manchas de

color naranja con factores de retención de: 0.90, 0.81, 0.70 y 0.66 usando reactivo de Dragendorff para su revelación. Lo que indica presencia de alcaloides en el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

Castañeda y colaboradores (12) demostraron la presencia de alcaloides en su estudio como principios activos para determinar el efecto hipoglicémico, concluyendo que tanto los extractos atomizados como el pool de alcaloides totales de Cuti-Cuti, son eficaces para reducir la hiperglicemia inducida por Aloxano.

1.8.5. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la identificación cromatográfica de flavonoides, se usó como fase móvil: n-butanol: acetato de etilo: agua: metanol con una proporción de (1:3:0.5:0.5) y una fase estacionaria de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda a 360 nm.



Revelador: Solución de tricloruro de aluminio 1% en etanol

FIGURA N°70 : Cromatografía de capa fina del Extracto Etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para la identificación de Flavonoides

FUENTE: Elaboración propia

En la figura N°70 observamos diferentes manchas de colores con un factor de retención de: 0.98 (rojo), 0.91 (azul), 0.84 (verde), 0.70 (rosado) y 0.63 (amarillo), lo que indica presencia de flavonoides en el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

Castañeda, y colaboradores (12), utilizaron un extracto metanólico de la planta *Notholaena nivea* “Cutí-Cutí”, para identificar mediante un estudio fitoquímico cualitativo la presencia de flavonoides donde observaron Rutina y Quercetina confirmados por TLC, HPLC e IR para evaluar el efecto hipoglicemiante.

En la tabla N°16 se puede apreciar el resumen de los resultados del estudio fitoquímico preliminar efectuado en cromatografía en capa fina al extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí”, el cual muestra que está constituido por flavonoides, alcaloides, taninos y terpenos.

TABLA N°16 : Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

METABOLITOS	RESULTADO
Terpenos	+++
Taninos	+
Alcaloides	++
Flavonoides	+++

FUENTE: Elaboración propia

*** Leyenda:** (+) Resultado positivo leve, (++) resultado positivo evidente, (+++) resultado positivo intenso

Castañeda y colaboradores (12), realizaron un screening fitoquímico a *Notholaena nivea* (Poir.) Desv. “cutí cutí”, determinando la presencia de lípidos, aminoácidos libres, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides, azúcares reductores, oximas, alcoholes, glucósidos y saponinas, de igual forma en nuestro trabajo de investigación se logró también determinar alcaloides, taninos, flavonoides y terpenos.

Podemos afirmar que el efecto antibacteriano de la planta *Notholaena nivea* “Cutí cutí” pueda deberse a que hubo una buena concentración de grupos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico, los cuales son taninos y flavonoides, tal como se indica en la base de datos ya mencionadas sobre sus acciones farmacológicas principales.

1.9. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

A continuación, en la Tabla N° 17, se puede observar los resultados correspondientes a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenidos al exponer la cepa con el extracto etanólico (96°) de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” a distintas concentraciones por el método de dilución en tubo por quintuplicado.

TABLA N°17: Diluciones para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (n=5)

DESCRIPCIÓN	NUMERO DE TUBOS				
	1	2	3	4	5 (Control +)
CALDO PEPTONADO (mL)	1	1	1	1	1
EXTRACTO SECO 100mg/mL	1	1	1	1	-
VOLUMEN INICIAL (mL)	1	1	1	1	1
CONCENTRACIÓN 2 (mg/mL)	50	25	12.5	6.25	-
INOCULO 10 ⁶ UFC/mL	1	1	1	1	1
VOLUMEN FINAL (mL)	2	2	2	2	2
CONCENTRACIÓN FINAL (mg/mL)	25	12.5	6.25	3.12	-
RESULTADOS	Repetición 1	-	-	-	+
	Repetición 2	-	-	-	+
	Repetición 3	-	-	-	+
	Repetición 4	-	-	-	+
	Repetición 5	-	-	-	+

FUENTE: Elaboración propia

***Leyenda:** (+): Crecimiento bacteriano; (-): Sin crecimiento bacteriano

Observamos que el tubo 4 correspondiente a la concentración 3.12mg/mL presentó crecimiento bacteriano.

Según estos resultados es probable que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” frente a *Propionibacterium acnes* sea de 6.25mg/mL ya que puede encontrarse inhibido a esta concentración. (Figura N°71)

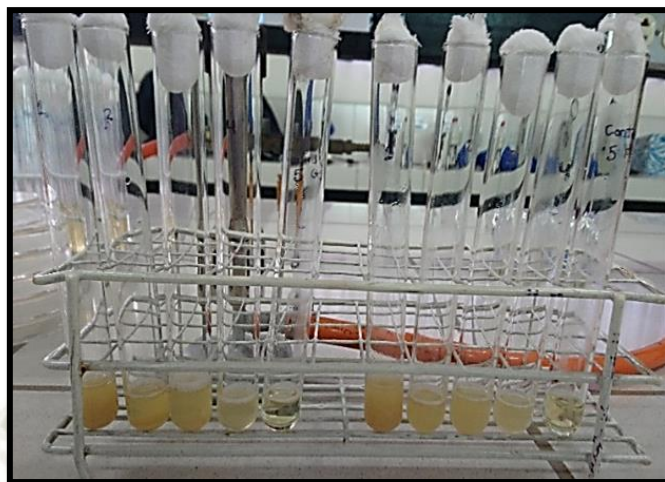


**FIGURA N° 71 : Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de
Notholaena Nivea “Cuti cuti”**

FUENTE: Elaboración propia

1.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena Nivea* “Cuti cuti”

En la figura N°72 observamos que en la placa N°4 (3.12 mg/mL) presento crecimiento de cepas viables, donde el poder antibacteriano del extracto no tuvo efecto, comparado con la placa N°5 que fue nuestro control positivo.

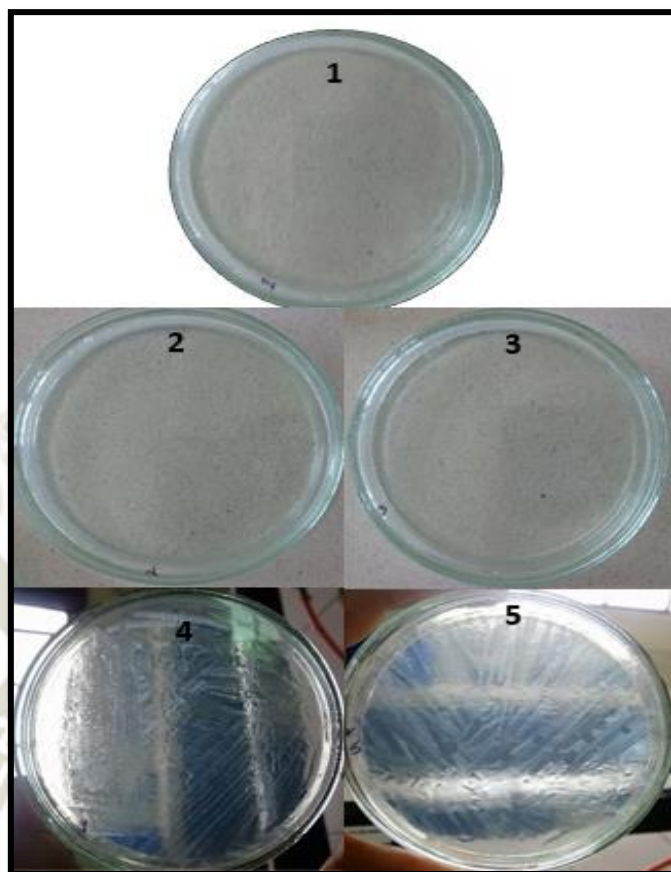


FIGURA N° 72 : Concentración bactericida mínima del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

FUENTE: Elaboración propia

1.11. DETERMINACIÓN DE LA NUEVA CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A PARTIR DE LAS NUEVAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena Nivea* “Cuti cuti”

Debido a que la concentración mínima inhibitoria fue en un rango de concentración de 6.25mg/mL a 3.12mg/mL, se decidió hacer nuevas concentraciones en ese rango para poder observar el punto de quiebre donde el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” ya no presente efecto antibacteriano frente a la cepa *Propionibacterium acnes*.

En la Tabla N° 18 presentamos las nuevas diluciones referidas a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

TABLA N° 18 : Diluciones del Extracto Etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria sobre *Propionibacterium acnes* (n=5)

DESCRIPCIÓN	NUMERO DE TUBOS						CONTROL +
	1	2	3	4	5	6	
CALDO PEPTONADO (mL)	0.88	0.89	0.90	0.91	0.92	0.93	1
EXTRACTO SECO 100 mg/mL	0.12	0.11	0.10	0.09	0.08	0.07	-
VOLUMEN INICIAL (mL)	1	1	1	1	1	1	1
CONCENTRACIÓN 2 (mg/mL)	12	11	10	9	8	7	-
INOCULO 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)	6	5.5	5	4.5	4	3.5	-
RESULTADOS	Repetición 1	-	-	+	+	+	+
	Repetición 2	-	-	+	+	+	+
	Repetición 3	-	-	+	+	+	+
	Repetición 4	-	-	+	+	+	+
	Repetición 5	-	-	+	+	+	+

FUENTE: Elaboración propia

***Leyenda:** (+): Crecimiento bacteriano; (-): Sin crecimiento bacteriano

Podemos decir que la nueva concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” frente a *Propionibacterium acnes* es de 5.5 mg/mL (tubo 2), debido a que no hubo crecimiento bacteriano. Sin embargo, si hubo crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 5 mg/mL (tubo 3) hacia adelante (Figura N°73).

A comparación con el estudio de Achahuanco y colaboradores (29), con los extractos etanólico 70 % y glicólico de las hojas de *Flourenzia polycephala* M. P. Dillon (Phauca) sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnes* su concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico para la cepa

de *Propionibacterium acnes* fue de 0.34 mg/25 μ l y del extracto glicolico 0.84 mg/25 μ l.

Por otro lado, Matiz y colaboradores (30), destacan que los aceites de *T. vulgaris* (tomillo), *E. caryophyllata* (clavo) y *C. verum* (canela), que con 50 μ L de concentraciones seriadas entre 1000 (1mg) y 50 (mg) partes por millón (ppm) de los aceites esenciales evaluados, son activos entre las 600 (0.6 mg) y las 800 (0.8 mg) ppm sobre *Propionibacterium acnes*, la más importante de las 3 bacterias en el desarrollo del componente infeccioso del acné y la más resistente.

Se puede decir que su concentración es menor en cuanto a nuestro resultado, esta diferencia puede deberse a ciertas condiciones como el tiempo de incubación de la cepa, solvente, tipo de extracto, componentes que pueda tener el extracto, medio de cultivo, condiciones anaerobias o aerobias, humedad y temperatura.



FIGURA N°73: Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” por el método de dilución en tubo

FUENTE: Elaboración propia

1.12. DETERMINACIÓN DE LA NUEVA CONCENTRACION BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) A PARTIR DE LAS NUEVAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena nivea* “Cutí cutí”

En la Figura N°74 observamos los resultados referidos a la concentración bactericida mínima (CBM) que se expuso a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cutí cutí” sobre las cepas de *Propionibacterium acnes* por el método de siembra en agar.

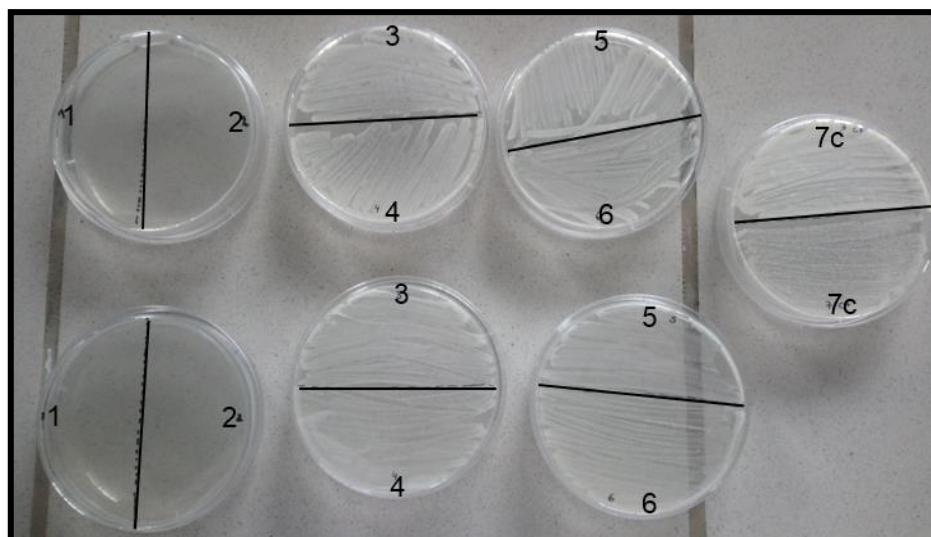


FIGURA N°74 : Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” en siembra de placa

FUENTE: Elaboración propia

Por lo tanto, la concentración bactericida mínima (CMB) del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” frente a *Propionibacterium acnes* es de 5.5 mg/mL (Placa N°2), es probable que el extracto etanólico esté actuando como bactericida ya que no hubo crecimiento bacteriano en las placas con agar Müller Hilton de los tubos de donde se hizo el resembrado.

1.13. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena Nivea* “Cuti cuti”

Se estudió el diámetro de los halos de inhibición formados por el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” a distintas concentraciones, teniendo como referente tres controles positivos clindamicina, tetraciclina y doxiciclina.

1.13.1. ACCIÓN ANTIBACTERIANA FRENTE A *Propionibacterium acnes*

Se realizó una prueba del método difusión en hoyo-placa-cultivo para poder determinar el método con el cual se haría la determinación de la sensibilidad antibacteriana.

1.13.1.1. MÉTODO HOYO-PLACA-CULTIVO

Se añadieron 10 µL del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” a 3 diferentes concentraciones apreciándose los halos de inhibición alrededor de los hoyos. (Tabla N°19)

TABLA N°19 : Halos de Inhibición por el Método Hoyo-Placa-Cultivo

Concentración	1°	2°	3°	4°	5°	Promedio
1 mg	12 mm	13 mm	11 mm	12 mm	11 mm	11.8 mm
0.5 mg	10 mm	11 mm	10 mm	10.7 mm	10.3 mm	10.4 mm
0.25 mg	8.7 mm	9 mm	9.2 mm	8.9 mm	8.4 mm	8.84 mm

FUENTE: Elaboración propia

Se puede apreciar que el método hoyo - placa – cultivo realizado a una concentración de 1 mg ha logrado en promedio 11.8 mm de halo de inhibición. Sin embargo, las concentraciones de 0.50 mg y 0.25 mg permitieron menores resultados.

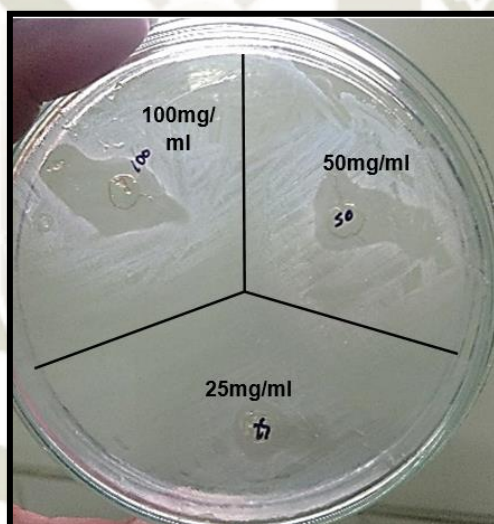


FIGURA N° 75 : Formación de halos de inhibición por el método hoyo-placa-cultivo en agar Müller Hilton

FUENTE: Elaboración propia

En la Figura N° 75 observamos los resultados obtenidos al realizar la medición de los halos de inhibición a concentraciones de 1 mg, 0.5 mg y 0.25 mg del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” que no fueron uniformes en la formación de halo inhibición a las diferentes concentraciones.

1.13.2. ELECCIÓN DEL MÉTODO A USAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

Se observó la diferencia de los diámetros al realizar la medición de los halos de inhibición de la cepa *Propionibacterium acnes* con el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” que se obtuvieron con los métodos: difusión de discos y método hoyo-placa-cultivo, por lo que se decide usar el método que presento uniformidad y mayor halo de inhibición con la concentración de 1 mg.

1.13.2.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Notholaena nivea* “Cuti cuti”

El método de difusión en discos para cada concentración donde se obtuvieron los siguientes resultados observados en la Figura N° 76, donde se midieron los halos de inhibición, los cuales fueron registrados en la Tabla N° 20.

TABLA N°20 : Halos de inhibición por el método difusión de discos

Repetición	CONCENTRACIONES EN mg											
	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.06	0.055	0.05	0.045	0.040	0.035	0.0312
1	22 mm	18 mm	15 mm	11 mm	10 mm	8.5 mm	7.5 mm	SH	SH	SH	SH	SH
2	21 mm	16 mm	13 mm	12 mm	9.5 mm	9.2 mm	6.8 mm	SH	SH	SH	SH	SH
3	20 mm	18 mm	14 mm	11 mm	10 mm	8.4 mm	7.3 mm	SH	SH	SH	SH	SH
4	21mm	17 mm	14 mm	12 mm	11 mm	8.8 mm	7.6 mm	SH	SH	SH	SH	SH
5	20 mm	18 mm	13 mm	11 mm	10 mm	9 mm	6.7 mm	SH	SH	SH	SH	SH

***Leyenda:** SH = Sin Halo

FUENTE: Elaboración propia

Observamos en la tabla N°20 los resultados obtenidos al realizar la medición de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto las cuales fueron: (1 mg, 0.5 mg, 0.25 mg, 0.125 mg, 0.0625 mg, 0.06 mg, 0.055 mg, 0.05 mg, 0.045 mg, 0.040 mg, 0.035 mg, 0.0312 mg), resultando que a la concentración del disco 0.05 mg no se evidencio la formación de halos de inhibición, por lo que la mínima dosis a la cual se

formó un halo de inhibición fue de 0.055 mg entonces podemos decir que esta es la mínima dosis a la cual la cepa *Propionibacterium acnes* es sensible.

Achahuanco y colaboradores (29), indican que el halo de inhibición máximo que obtuvieron para el extracto etanólico de las hojas de la especie vegetal *Flourensia Polycephala* M. O. Dillon (Phauca) para *Propionibacterium acnes* fue de 12.39 mm con una concentración mínima inhibitoria de 0.34mg/25uL de podemos concluir que el resultado con nuestra planta es mejor en un rango de concentración de [0.5mg -0.25mg] con un rango de halo de inhibición en promedio de [17.4 mm -13.8 mm].

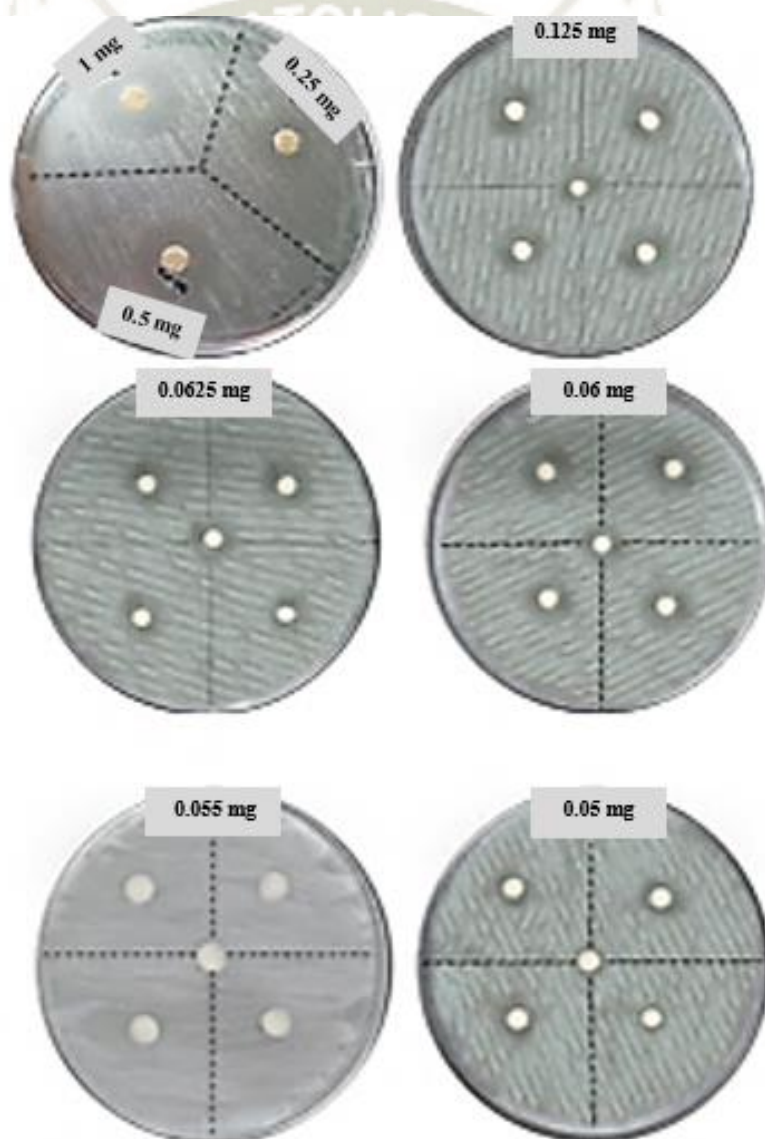


FIGURA N°76 : Formación de halos de inhibición por el método de difusión de discos en agar Müller Hilton

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N°21: Análisis de varianza ANOVA para el método difusión de discos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Valor P
Entre grupos	715.76	6	119.293333	271.209267	1.8258E-23	2.4452594	0.0000
Dentro de los grupos	12.316	28	0.43985714				
Total	728.076	34					

FUENTE: Elaboración propia

En la Tabla N° 21 podemos ver la razón F, que en este caso es igual a 271.209. El valor P de la prueba F es menor que 0.05, por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las diferentes concentraciones con un nivel del 95.0% de confianza.

TABLA N°22 : Medias con intervalos de confianza del 95.0% - Tukey HSD para el método difusión de discos

			Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
	Casos	Media			
1 mg	5	20.8	0.2966	20.1346	21.4654
0.5 mg	5	17.4	0.2966	16.7346	18.0654
0.25 mg	5	13.8	0.2966	13.1346	14.4654
0.125 mg	5	11.4	0.2966	10.7346	12.0654
0.0625 mg	5	10.1	0.2966	9.43461	10.7654
0.06 mg	5	8.78	0.2966	8.11461	9.44539
0.05 mg	5	7.18	0.2966	6.51461	7.84539
Total	35	12.78			

FUENTE: Elaboración propia

En la tabla N°23 se muestra el valor de la media de los halos de inhibición por el método difusión de discos realizado por quintuplicado para cada concentración utilizada.

TABLA N°23 : Comparación de las medias significativamente diferentes de los halos de inhibición para el método difusión de discos

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0.05 mg	5	7.18	X
0.06 mg	5	8.78	X
0.0625 mg	5	10.1	XX
0.125 mg	5	11.4	X
0.25 mg	5	13.8	X
0.5 mg	5	17.4	X
1 mg	5	20.8	X

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N°24 : Comparaciones en parejas de Tukey HDS de los halos de inhibición del método difusión de disco

CONTRASTE	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 mg - 0.5 mg	*	3.4	1.33078
1 mg - 0.25 mg	*	7.0	1.33078
1 mg - 0.125 mg	*	9.4	1.33078
1 mg - 0.0625 mg	*	10.7	1.33078
1 mg - 0.06 mg	*	12.02	1.33078
1 mg - 0.05 mg	*	13.62	1.33078
0.5 mg - 0.25 mg	*	3.6	1.33078
0.5 mg - 0.125 mg	*	6.0	1.33078
0.5 mg - 0.0625 mg	*	7.3	1.33078
0.5 mg - 0.06 mg	*	8.62	1.33078
0.5 mg - 0.05 mg	*	10.22	1.33078
0.25 mg - 0.125 mg	*	2.4	1.33078
0.25 mg - 0.0625 mg	*	3.7	1.33078
0.25 mg - 0.06 mg	*	5.02	1.33078
0.25 mg - 0.05 mg	*	6.62	1.33078
0.125 mg - 0.0625 mg		1.3	1.33078
0.125 mg - 0.06 mg	*	2.62	1.33078

0.125 mg - 0.05 mg	*	4.22	1.33078
0.0625 mg - 0.06 mg		1.32	1.33078
0.0625 mg - 0.05 mg	*	2.92	1.33078
0.06 mg - 0.05 mg	*	1.6	1.33078

* indica una diferencia significativa

FUENTE: Elaboración propia

La Tabla N° 24 nos indica según la prueba de Tukey HDS que hay diferencia significativa de la media entre 19 grupos de contraste, no se halló diferencias significativas con valores entre [0.125 mg – 0.625mg] y [0.0625mg – 0.06mg] entre la media respectivamente. Todo este resultado se halló al 95% de confianza y 5 % de error.

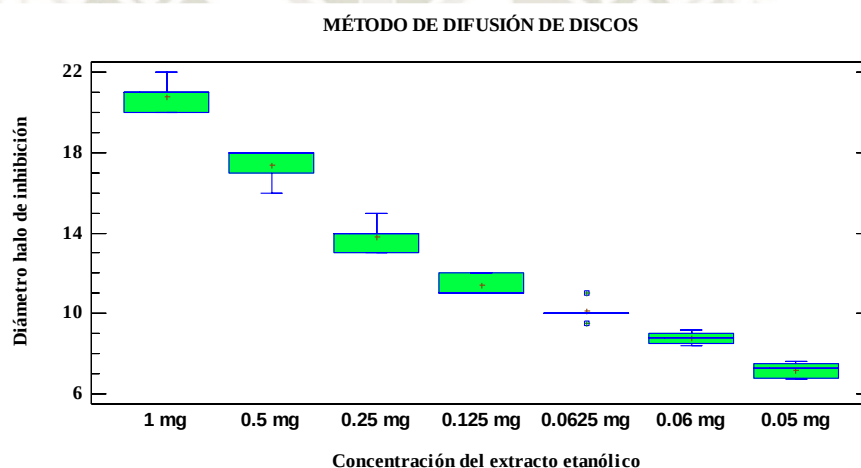


FIGURA N° 77 : Promedios de los halos de inhibición del método difusión de discos

FUENTE: Elaboración propia

La Figura N°77 muestra el desplazamiento de las gráficas de caja que van en descenso hacia la derecha, indicando que a mayor concentración de extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” mayor diámetro de halo de inhibición presenta, en el caso de la concentración de 0.0625 mg/ml no se evidencia un gráfico rectangular definido debido a que el cuartil Q1=10 y Q3=10 tienen valores iguales, con una media de valor 10.1 la cual se ve señalada con una cruz roja y valores moderadamente atípicos representados con el cuadrado de interior vacío de valores 9.5 el inferior y 11 el superior.

1.14. MÉTODO DIFUSIÓN POR DISCO (KIRBY-BAUER)

De un total de 26 cepas de *Propionibacterium acnes* analizadas, el 100% resultaron sensibles a todos los antimicrobianos probados (doxiciclina 30mcg, tetraciclina 30 mcg y clindamicina 2 mcg).

TABLA N°25 : Halos de inhibición por el método difusión de discos de los medicamentos

REPETICIONES	ANTIBIÓTICOS		
	Tetraciclina 30mcg (TE)	Doxiciclina 30mcg (DO)	Clindamicina 2mcg (DA)
1	33 mm	35 mm	25 mm
2	32 mm	33 mm	24 mm
3	30 mm	28 mm	21 mm
4	32 mm	29 mm	24 mm
5	33 mm	31 mm	23 mm

FUENTE: Elaboración propia

En la Tabla N°25 se observan las medidas de los halos de inhibición de los antibióticos tetraciclina, clindamicina y doxiciclina, frente a la cepa *Propionibacterium acnes*.

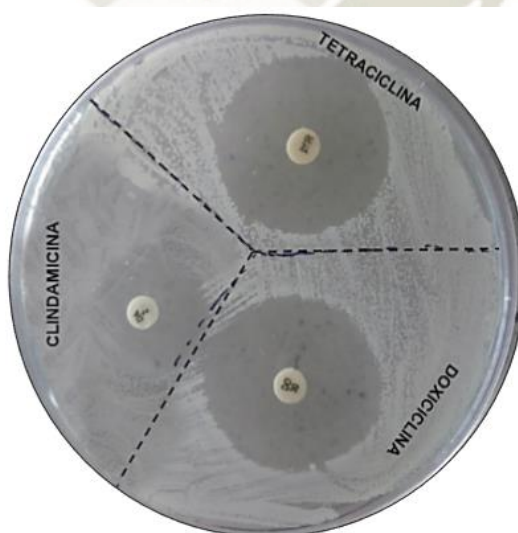


FIGURA N°78 : Formación de halos de inhibición de los antibióticos por el método de difusión de discos en agar Müller Hinton

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N°26 : Análisis de varianza ANOVA para el método difusión de discos con antibióticos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Valor P
Entre grupos	225.733333	2	112.866667	28.2166667	2.9072E-05	3.88529383	0.0000
Dentro de los grupos	48	12	4				
Total	273.733333	14					

FUENTE: Elaboración propia

En la Tabla N°26 podemos ver la razón F, que en este caso es igual a 28.216, puesto que el valor P de la prueba F es menor que el valor $\alpha=0.05$, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se aprueba la hipótesis alternativa, que nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa para el método difusión de disco con los antibióticos de control: clindamicina, doxiciclina y tetraciclina con un nivel del 95.0% de confianza.

TABLA N° 27 : Medias con intervalos de confianza del 95.0% - Tukey HSD para el método difusión de discos con antibióticos

			Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
	Casos	Media	(s agrupada)		
Tetraciclina 30 mcg	5	32.0	0.894427	30.3081	33.6919
Doxiciclina 30 mcg	5	31.2	0.894427	29.5081	32.8919
Clindamicina 2 mcg	5	23.4	0.894427	21.7081	25.0919
Total	15	28.8667			

FUENTE: Elaboración propia

En esta Tabla N°27 se muestra la media para cada columna de datos, también muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad del muestreo.

TABLA N°28 : Comparación de las medias significativamente con intervalos de confianza del 95% - Tukey HSD para el método difusión de discos con antibióticos

	Casos	Medi a	Grupos Homogéneos
Clindamicina 2 mcg	5	23.4	X
Doxiciclina 30 mcg	5	31.2	X
Tetraciclina 30 mcg	5	32.0	X

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N°29 : Comparaciones en parejas de Tukey HDS de los halos de inhibición del método difusión de disco con antibióticos

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Tetraciclina 30 mcg - Doxiciclina 30 mcg		0.8	3.38389
Tetraciclina 30 mcg - Clindamicina 2 mcg	*	8.6	3.38389
Doxiciclina 30 mcg - Clindamicina 2 mcg	*	7.8	3.38389

* indica una diferencia significativa

FUENTE: Elaboración propia

La Tabla N°29 nos indican mediante la prueba de Tukey HDS que hay diferencia significativa de la media entre 2 grupos de contraste, en cuanto el contraste tetraciclina 30 mcg – doxiciclina 30 mcg, para un alfa de 0, 05, con la prueba de Tukey no presentó diferencia significativa con un valor de 0.8 de la media.

DIFUSIÓN DE DISCOS - ANTIBIÓTICOS

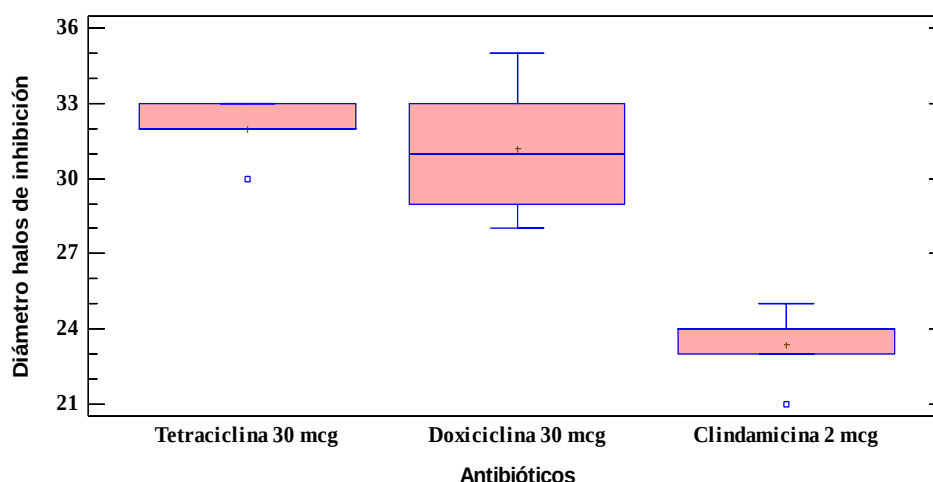


FIGURA N°79 : Promedios de los halos de inhibición por el método difusión de discos con antibióticos

FUENTE: Elaboración propia

En la Figura N°79 se observa que el gráfico de Doxiciclina 30 mcg, es de una distribución normal, pues la mediana está ubicada en el centro de la caja. La tetraciclina 30 mcg y la clindamicina 2 mcg muestran valores moderadamente atípicos.

Podemos decir conforme a los resultados obtenidos que la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti” posee efecto antibacteriano al igual que los medicamentos trabajados como control positivo del tratamiento del acné vulgaris (clindamicina, doxicilina y tetraciclina) en el servicio de dermatología del Hospital III Goyeneche.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, se puede utilizar como antibacteriano ya que cuenta con resultados que lo demuestra como son: concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima de 5.5 mg/ml y concentración en disco de sensibilidad de 0.055 mg con un halo de inhibición de 7.18 mm en promedio, en relación con los controles positivos que mostraron un halo de inhibición de clindamicina 2 µg de 23.4 mm, doxiciclina 30 µg de 31.2 mm y tetraciclina 30 µg de 32 mm en promedio cada uno.

CONCLUSIONES

PRIMERA:

Se obtuvo el extracto etanólico de las hojas y tallos de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”, por el método de extracción de Soxhlet, el cual presento rendimiento de 10.8% a diferencia del extracto etéreo y hexánico que fueron de 3.6% y 2.2% respectivamente.

SEGUNDA:

Se extrajo la cepa *Propionibacterium acnes* a través de la expresión de pústula de 37 pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital III Goyeneche, dando positivas solo 26 muestras y se seleccionó 10 muestras representativas.

TERCERA:

Se determinó que el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” mostró un mayor efecto antibacteriano, cuya concentración del disco fue de 1 mg, presentando un halo de inhibición de 23 mm, en relación con el extracto etéreo con una concentración del disco de 1 mg, el halo de inhibición fue de 12 mm y en cuanto al extracto hexánico no presento halo de inhibición a la misma concentración.

CUARTA:

Se estableció que la concentración mínima inhibitoria (CMI) hallada con el extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” para el *Propionibacterium acnes* es de 5.5 mg/ml.

Se determinó que la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” fue de 5.5 mg/ml por lo tanto esto indica que posee actividad bactericida.

QUINTA:

Se realizó la técnica de cromatografía en capa fina, observándose la presencia de terpenos, taninos, alcaloides y flavonoides a partir del extracto etanólico de *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

SEXTA:

Se determinó mediante el método difusión de disco la sensibilidad del extracto etanólico de *Notholaena nivea*. “Cuti cuti”, cuya concentración del disco es de 0.055 mg, mostrando tener

efecto como para inhibir a la cepa *Propionibacterium acnes*, comparando como control positivo, los tratamientos tradicionales del Servicio de Dermatología del Hospital III Goyeneche; Doxicilcina 30 μg con un halo de inhibición en promedio de 31.2 mm, Tetraciclina 30 μg con un halo de inhibición en promedio de 32 mm de y Clindamicina 2 μg con un halo de inhibición en promedio de 23.4 mm



SUGERENCIAS

PRIMERO:

Se sugiere realizar estudios para evaluar la actividad antibacteriana vía tópica in vivo del extracto de *Notholaena nivea* “Cuti cuti” sobre *Propionibacterium acnes*. A su vez desarrollar formulaciones para la preparación de formas farmacéuticas.

SEGUNDA:

Se recomienda identificar y separar las moléculas de la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti” responsables de la actividad antibacteriana evaluada en la presente investigación.

TERCERA:

Realizar investigaciones respecto a los taninos y alcaloides, ya que es de importancia para el proceso inflamatorio del acné vulgaris.

CUARTA:

Efectuar estudios Fito terapéuticos y fitoquímicos de la planta *Notholaena nivea* “Cuti cuti”.

BIBLIOGRAFIA

1. Cuenca, V. J. El acné y su relación en la autoestima de los/las estudiantes del Bachillerato de la Unidad Educativa "Fernández Suárez Palacio" del Barrio Carigán de la Ciudad de Loja. periodo Febrero – Julio del 2016 [Tesis de pregrado]. Loja. Universidad Nacional de Loja; 2017.
2. Molina MT. Acné y Rosácea [Internet]. Santiago: Universidad de Chile.
3. Palacios JR. Tejidos. Membranas. Piel. Derivados de la Piel [Internet]. Barcelona: Col-Legi. Oficial Infermeres I Infermeres; (s.f.).
4. Borge J M, Pérez J. Fisiología General. La Piel: Estructura y Funciones [Internet]. Cantabria: Universidad de Cantabria; [citado 2019 Nov 22]. (s.f.).
5. Rossetti M L. Acné en la adolescencia. Glándulas sebáceas: Anatomía y fisiología [Internet]. Rosario, Argentina: 1996.
6. Santacana RG. Acné [Internet]. Madrid. Asociación Española de Pediatría; (s.f.).
7. McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes* [Internet]. Londres: Journal Of Medical Microbiology; 2008.
8. Predari SC. Microorganismos Anaerobios [Internet]. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología (AAM); (s.f.).
9. Sánchez L., Sáenz E., Pancorbo J., Lanchipa P. y Zegarra R. Antibióticos Sistémicos en Dermatología. Segunda parte: Tetraciclinas, lincosaminas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifamicinas, cloranfenicoles, ácido fusídico, metronidazol y nuevos antibióticos. [en línea]. 2004, n.º 3
10. Gómez G., Molina W. Tratamiento del acné. [en línea]. 2012. [Citado: 2019 noviembre 22]; [7pp].
11. Ministerio del Medio Ambiente de Chile. *Archyroschisma Nivea* [en línea]. Chile: 2012. [Citado: 2019 noviembre 22].
12. Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., e Ibañez, L. Evaluación de la acción citotóxica del extracto metanólico de *Notholaena nivea* "CUTI-CUTI" [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad de San Martín de Porres. 2008
13. Molina, T. L. Elaboración y determinación de eficacia in vivo de un gel para el acné a base de calaguala (*campyloneurum amphostenon* [Tesis para optar el grado de Bioquímico Farmacéutico]. Riobamba - Ecuador: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; 2011.

14. Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., e Ibañez, L. Estudio Fitoquímico y Farmacológico de cuatro plantas con efecto Hipoglicémico. Revista Horizonte Medro. Vol. 8, N° 1. 2008.
15. Universidad Autónoma de Madrid. Cromatografía en Placa fina. Sede Electrónica. Ciudad Universitaria de Canto Blanco. 2018.
16. Carrión, A.V., García, C.R. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica [Tesis para optar el grado de Bioquímico Farmacéutico]. Cuenca - Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010.
17. Silva, C. N. Cuantificación de los alcaloides de *berberis hallii* "carrasquilla" sector La Josefina San Isidro del Cantón Guano Provincia de Chimborazo. [Tesis para optar el grado de Bioquímico Farmacéutico]. Riobamba - Ecuador: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; 2010
18. Girbes, T. y Jimenez, P. Terpenos y Esteroides. Universidad de Valladolid. España. 2013
19. Kuklinsky C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona 2003.
20. BRUNETON, Jean. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. Editorial Acribia España, 2001.
21. Koneman E. y col. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana Quinta Edición. Barcelona. España 2004.
22. Margoth, P. L. Control Microbiológico De Productos Farmacéuticos No Estériles En La Industria Farmacéutica. Trujillo - Perú: Informe De Prácticas Pre Profesionales Para Optar El Título De Químico Farmacéutico. 2016
23. Picazo, J. J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2000.
24. Cruz L. Patricia, Z. M. Evaluación De La Actividad Antioxidante, Antibacteriana y Antifúngica "In Vitro" Del Extracto Alcohólico De *Cestrum auriculatum* L'HÉR. "Hierba Santa" En Bacterias Patógenas Grampositivas, Gramnegativas Y Hongos. Arequipa. 2016.
25. Hernández, D. C. Lectura interpretada del antibiograma. La Habana, Cuba: Rev Cub Med Mil vol.42 no.4 Ciudad de la Habana. 2013.
26. Cabrera Meléndez J. Determinación de metabolitos secundarios en tres pteridofitos, plantas con interés medicinal [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.

27. García Armas J. Estudio fitoquímico de la *Notholaena nivea* var. *nivea* y quimiomodulación de bioactividad del ácido isonotholaenico [Tesis]. Salamanca: Universidad de Salamanca; 1998.
28. Jaramillo M., Bazalar D. Significación etiológica del *Propionibacterium acnés* en el desarrollo del acné vulgaris [en línea]. 2006.
29. Achahuanco M. y Aragón, P. Actividad bacteriana *in vitro* de los extractos Etanólico y Glicólico de las hojas de la especie vegetal *Flourensia Polycephala* M. O. Dillon (Phauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnes*, y su relación con la actividad antioxidante [Tesis de pregrado]. Cuzco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco; 2015
30. Matiz G., León G., Osorio M. Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné [en línea]. 2015 Enero – Marzo [citada: 2019 noviembre 05]; 49 (1):
31. Goldsmith, K. G. (8ª EDICIÓN TOMO I). “Dermatología en Medicina General”. Andrea L. Zaenglein, Emmy M. Graber y Diane M. Thibouto.
32. Kaminsky, A. Acné: un enfoque global. - 1a ed. - Buenos Aires: Colegio Ibero-Latinoamericano de Dermatología. Buenos Aires - Argentina: Colegio Ibero-Latinoamericano de Dermatología (CILAD) 2007
33. Pumisacho V. EVALUACION *in vivo* DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA DE *Lactobacillus acidophilus* FRENTE A *Propionibacterium acnes* EN JOVENES CON DIAGNOSTICO PREVIO DE ACNÉ TIPO II, PARROQUIA DE ZÁMBIZA, DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO, 2015
34. Abate, M. E. (2013). Shedding New Light on Acne: The Effects of Photodynamic Therapy on *Propionibacterium acnes*. INQUIRIES JOURNAL- SOCIAL SCIENCES, ARTS & HUMANITIES.
35. MADIGAN, M. Brock. Biología de los microorganismos. PEARSON EDUCACION. 2015
36. Cuesta Puquios, D. *Notholaena nivea* (Poir.) Provincia del Loa, Región de Antofagasta – 17/09/2012 – Andrea Ugarte.
37. Minitab, S. d. (2018). ¿Qué es ANOVA? Minitab, LLC. All rights Reserved.
38. Minitab, S. d. (2018). ¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples? Minitab 18.

ANEXOS

ANEXO N° 1 CERTIFICADO DE IDENTIFICACION DE LA ESPECIE BOTANICA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



CONSTANCIA 018- 2018-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de hojas y tallos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Notholaena nivea* de la familia Adiantaceae de nombre común "chujchu". Dichas muestras fueron obtenidas del mercado de Lima, proveniente de la sierra Central por YAHANIRA LIZ BERRIOS CALDERON Y LUISA FERNANDA OLIDEN DOMENIQUE para la Tesis: **EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Notholaena nivea* "Cuti Cuti" FRENTE A LA CEPA *Propionibacterium acnés*. AREQUIPA -2018.** de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : PTERIDOPHYTA
CLASE: FILICOPSIDA
ORDEN: POLYPODIALES
FAMILIA: ADIANTACEAE
GENERO: Notholaena
ESPECIE: *Notholaena nivea* (Poiret) Cav.

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

Arequipa 25 de Julio del 2018



[Firma]
Bigo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

ANEXO N° 2 DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION

Arequipa, 19 de octubre 2018

Dr. Gonzalo Dávila
Vicerrector de la Universidad Católica de Santa María
Presente.-



De mi especial consideración.

Me dirijo a usted para hacerle llegar el resultado de la evaluación del proyecto de investigación y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación.

El proyecto denominado “Evaluación in Vitro Del Efecto Antibacteriano del Extracto Etanólico de Notholaena Nivea “Cuti – Cuti” frente a la Cepa Propionibacterium Acnes” – Arequipa 2018” el cual es presentado por las bachilleres Berrios Calderón, Yahanira Liz y Oliden Doménique, Luisa Fernanda, para optar el título profesional de químico farmacéutico en la Universidad Católica de Santa María.

A. OBJETIVO:

Obtener un extracto etanólico de la especie botánica Notholaena nivea “Cuti – cuti”, a partir del método de soxhlet y evaluar sus propiedades antimicrobianas.

B. PROCEDIMIENTOS:

Se desarrollará el control de calidad a la droga cruda y extracto Etanólico. Para ello, se requerirá la obtención de la muestra pustulosa de acné vulgaris para el aislamiento de la cepa de Propionibacterium acnes en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Luego se realizarán pruebas bioquímicas preliminares para la identificación de



COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

Propionibacterium acnés. Posteriormente se hará la coloración “gram”, para el reconocimiento de *Propionibacterium acnes* en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.



RIESGOS:

Los procedimientos no representan riesgos para el medio ambiente, se utilizarán hojas del arbusto espinoso *Notholaena nivea* “Cuti – cuti”, las cuales serán obtenidas de centro comercial.

C. RIESGO DEL ESTUDIO:

Mínimo

D. RECOMENDACIONES:

El equipo deberá informar al Comité resultados finales del estudio y manuscrito previo a una publicación que devenga de este proyecto.

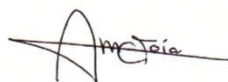


COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM

E. DICTAMEN:

Favorable, procede su ejecución.

DICTAMEN 55 - 2018



Comité Institucional de Ética de la
Investigación UCSM

Cualquier duda comunicarse a: comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com

ANEXO N° 3 EJEMPLO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Evaluación in Vitro del Efecto Antibacteriano del Extracto Etanólico de *Notholaena Nivea* "Cuti – Cuti" Frente a la Cepa "*Propionibacterium Acnes*".

PROPÓSITO: Consentimiento informado dirigido a hombres y mujeres mayores con edades comprendidas entre 15 y 30 años de edad, con diagnóstico de acné que hayan sido atendidos en el Hospital III Goyeneche, Servicio de Dermatología; Arequipa.

Se les invita a participar en el proyecto de investigación "Evaluación in Vitro del Efecto Antibacteriano del Extracto Etanólico de *Notholaena Nivea* "Cuti – Cuti" Frente a la Cepa "*Propionibacterium Acnes*"

Investigadores principales:

Berrios Calderón Yahanira Liz, con DNI 46373413,

N° Cel. 910602591

piolin_1200@hotmail.com (Universidad Católica de Santa María)

Oliden Doménique Luisa Fernanda, con DNI 72525847

N° Cel. 940715774

lu-1.6@hotmail.com (Universidad Católica de Santa María)

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas, Escuela Profesional de farmacia y bioquímica de la Universidad Católica de Santa María. En vista que Ud. Tiene entre 15 a 30 años de edad, y es paciente del Servicio de Dermatología en el Hospital III Goyeneche, ha sido seleccionado para invitarle a participar de esta investigación.

Este estudio incluye revisión de historias clínicas de dermatología y exámenes a los pacientes como son cultivo y antibiograma de las muestra obtenidas del paciente. Esto servirá para formular recomendaciones encaminadas a mejorar el manejo del acné vulgaris. Su decisión de participar es totalmente voluntaria y puede hablar con quién usted tenga más confianza de entre los investigadores para solicitarle cualquier información adicional acerca del estudio.

CONFIDENCIALIDAD: La información que Usted nos proporcione y que se recogerá durante la investigación solamente la revisarán los investigadores. En la base de datos de este estudio usted tendrá un código asignado como participante, y no constará su nombre ni su número de documento de identidad, para mantener su anonimato. La información será guardada en una computadora, asegurada con clave y codificada. Solo el equipo de investigación tendrá acceso a los datos del estudio. Las encuestas serán guardadas en un archivador bajo llave. El equipo de investigación hará todo lo posible para proteger su confidencialidad.

He sido invitado a participar en la investigación sobre **Evaluación in Vitro del Efecto Antibacteriano del Extracto Etanólico de *Notholaena Nivea* "Cuti – Cuti" Frente a la Cepa "*Propionibacterium Acnes***

Entiendo que tomarán en cuenta a las personas que tienen lesiones dérmicas compatibles a acné vulgaris. Me tomaran una muestra pustulosa, con evidencia fotográfica manteniendo oculta mi identidad, para realizar un cultivo. Estoy informado de los riesgos que puede tener esta investigación, y de que no tendrá ningún costo para mí o mi familia, además se me informará sobre los resultados. Este estudio contribuirá a identificar problemas y proponer soluciones para mejorar la atención a las personas con acné. Entiendo que este estudio no me dará ningún incentivo para participar. El beneficio directo que recibiré del estudio, es el resultado del cultivo que se realizará en el laboratorio. Conozco el número y correo electrónico de las personas que me puede informar sobre las preguntas o inquietudes que pueda tener sobre la investigación. He leído (o me han leído) la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y me han contestado en forma sencilla y satisfactoria las preguntas que he tenido. Acepto voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de no realizarme el cultivo sin que afecte de manera alguna mi cuidado médico.

Si ☒ No ☐ Quisiera ser informado de los resultados de este estudio.

Firmo, Acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación.


Firma (o huella dactilar)

Fecha: 21 / 11 / 18

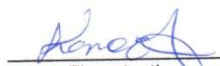
Número del teléfono celular: KGGA Kimicojr@gmail.com

Casa: -

Código de identificación: BNI # 1 / Tio # 1

Fecha de nacimiento: 20 / 06 / 94

Testigo(a): mamá


Firma testigo

Datos del Investigador que toma la muestra: Nombre y apellidos:

YBC


Firma (o huella dactilar)

ANEXO N° 4 CONSTANCIA DE TRABAJO DE INVESTIGACION



Hospital Goyeneche
Gracias por confiar en nosotros:
La Calidad y la Excelencia es Nuestro Compromiso



“AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD”

GERENCIA DE SALUD AREQUIPA HOSPITAL III GOYENECHÉ

CONSTANCIA



El Director General del hospital III Goyeneche, hace constar que las señoritas:

YAHANIRA LIZ BERRIOS CALDERON
LUISA FERNANDA OLIDEN DOMÉNIQUE



Egresadas, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María-Arequipa, han realizado el estudio correspondiente y cumplido con las conclusiones, y recomendaciones, del Proyecto de Tesis Titulado “EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE NOTHOLAENA NIVEA (CUTI-CUTI) FRENTE A LA CEPA PROPIONIBACTERIUM ACNES-AREQUIPA 2018”.

Se expide la presente a solicitud de las interesadas para los fines que crean conveniente.

Arequipa, 14 de Febrero del 2019

GOBIERNO REGIONAL DE AREQUIPA
GERENCIA REGIONAL DE SALUD
HOSPITAL III GOYENECHÉ
Dr. Mario G. Bolognini
DIRECTOR GENERAL
MGP 18848

MGBB/BBB/bvch.
031

Av. Goyeneche N° 100 - Teléfono: (054) 231313 - Telefax: (054) 223501
www.saludarequipa.gob.pe/goyeneche - www.hg.gob.pe - E-mail: hospitalgoyeneche@saludarequipa.gob.pe

ANEXO N° 5 INSERTO AGAR SAGRE

VALTEK S.A.
Phone: + (56) 22654 1100
FAX: + (56) 22654 1199
Av. Marathon 1943 - Ñuñoa
Santiago - CHILE



Agar Sangre En Base Soya - Trypticase

REF 285-350

2

8

IVD Material para Diagnóstico *In Vitro*

Presentación:

Medio de cultivo listo para su uso, estuche de 10 unidades, Placa de 90 mm x 15 mm. (ref. 285-350).

Composición (gramos / litro):

Digesto pancreático de Caseína:	15.00
Digesto papaico de soya:	5.00
Cloruro de Sodio	5.00
Agar Bacteriológico	15.00

Aditivos (mL / litro):

Sangre de cordero fresca estéril, desfibrinada	50.00
--	-------

pH final medio de cultivo listo para el uso: 7.3 +/- 0.2

Uso previsto:

Medio de cultivo enriquecido de uso general para el aislamiento de bacterias comunes y fastidiosas, y para la determinación de reacciones hemolíticas, apto para la realización del Test de Camp.

Descripción:

Medio de cultivo altamente nutritivo, adecuado para el cultivo de una gran variedad de microorganismos incluyendo aquellos de mayores exigencias para su desarrollo. Su formulación permite la recuperación de la mayoría de los patógenos de importancia clínica, obteniéndose características de desarrollo con valor predictivo. La adición de sangre de cordero desfibrinada permite observar los distintos patrones de hemólisis y a la vez aporta nutrientes específicos para los microorganismos más fastidiosos.

Las peptonas de caseína y soya aportan una gran variedad de fuentes de nitrógeno, y aminoácidos esenciales para el desarrollo microbiano. La peptona de soya además aporta algunos carbohidratos naturales.

El cloruro de sodio contribuye al equilibrio osmótico del medio de cultivo. El agar actúa como agente gelificante

Materiales y Reactivos necesarios, pero no suministrados:

Estufa de cultivo.
Asas de siembra.

PRECAUCIONES PARA SU USO ADECUADO:

- Material para diagnóstico *In Vitro*.
- Material listo para ser usado. No requiere interfaz u otro producto sanitario para ser utilizado.
- Sólo debe ser usado por personal calificado. IVD diseñado para ser usado en laboratorios de microbiología clínica.
- No realizar intervenciones en el producto. La utilización según el uso previsto siguiendo las instrucciones que se indican mantiene las garantías.
- Contiene compuestos de origen animal, la inocuidad no es garantizada. Requiere manipulación con precaución relativa a productos potencialmente infecciosos. NO INGERIR EL PRODUCTO, NO INHALAR EL PRODUCTO
- No debe ser usado como materia prima para ninguna otra fabricación.
- No debe usarse pasado su fecha de expiración.
- No debe usarse si se observa contaminación microbiana.
- No debe usarse si presenta signos de deshidratación, congelación, agrietamiento o cualquiera otra alteración. Ante cualquier defecto que impida su uso, contacte al proveedor.
- Material garantizado solo con sus sellos intactos.
- Ambientar el producto antes de su uso. Retirar los sellos solo para su uso inmediato. No re sellar.
- Para la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta las características propias de cada especie bacteriana sometida a prueba, como asimismo los antecedentes clínicos o epidemiológicos del caso en estudio.
- Ambientar la placa sin sello antes de su uso. No resellar.
- El material utilizado debe descartarse de manera segura de acuerdo a las normativas de bioseguridad vigentes en el país

Conservación:

Conservado refrigerado entre 2° y 8° C es estable hasta la fecha de caducidad. El medio de cultivo se debe almacenar sellado y con la cubierta de la placa (tapa) abajo.

Muestras a cultivar:

Muestras de origen clínico que puedan contener bacterias con diversos requerimientos nutricionales, tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y otros microorganismos presentes en muestras médicas.

E-mail: info@valtek.cl - WEB site: <http://www.valtekdiagnostics.com>

Inoculación:

Antes de realizar la siembra, permitir que el medio de cultivo alcance la temperatura ambiente.
La siembra de muestras debe realizarse en condiciones asépticas, bajo campana de bio seguridad y con mechero.
Sembrar solo una muestra por placa.

Sembrar las muestras mediante estría en superficie a partir de muestras primarias

Incubación:

Incubar por 24 a 48 horas entre 35° y 37°C, en las condiciones de atmósfera que prefiera según los microorganismos que espera aislar.

Lectura e Interpretación de Resultados:

Una vez completado el periodo de incubación, observar el desarrollo de colonias y sus características, especialmente el patrón de hemólisis

La evaluación de los patrones hemolíticos es válida solo para las condiciones de tiempo y temperatura de incubación señaladas. Periodos de incubación prolongados o a mayores temperaturas alteran la respuesta del medio de cultivo para este aspecto.

Control de Calidad:

El control de calidad de la performance se ajusta a los criterios de diseño y desarrollo del producto, y su resultado se declara en el Certificado de Análisis emitido para cada lote.

No obstante, el usuario puede someter este medio de cultivo a sus propios controles de calidad según su criterio, lo que podría quedar fuera de la garantía certificada. A modo de referencia, puede realizarse el siguiente ensayo de control de calidad:

Resultados esperados tras 24 horas de cultivo en atmósfera aeróbica a 35°-37°C:

Cepa de Control	Resultado esperado y hemólisis
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Buen desarrollo hemólisis beta
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Buen desarrollo hemólisis gamma
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Buen desarrollo hemólisis alfa
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Buen desarrollo hemólisis beta
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Buen desarrollo hemólisis beta

Limitaciones de Uso:

El Agar Sangre en base de peptonas de soya y caseína, y suplementado con sangre de cordero, es un medio de cultivo no selectivo y de alto valor nutritivo, por lo que presentarán desarrollo todas las bacterias que no posean requerimientos nutricionales específicos. Otras bacterias con mayores requerimientos pueden presentar desarrollos deficientes o ser total o parcialmente inhibidas ante la falta de nutrientes específicos en la composición del medio de cultivo.

La falta de inhibidores en esta formulación puede dificultar el aislamiento cuando se trata de cultivar muestras con altas cargas microbianas.

La realización segura del Test de Camp requiere del uso de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Otras cepas podrían dar resultados negativos.

Certificados de Análisis:

Certificados de Análisis para cada lote pueden ser consultados por el cliente en el sitio web www.valtekdiagnostics.com

Eliminación de Desechos:

El usuario es responsable de la adecuada eliminación de los materiales para diagnóstico microbiológico estén utilizados o no, para lo que deberá estar en conocimiento cabal de la normativa local vigente respecto de la disposición de material infeccioso o potencialmente infeccioso. Cada laboratorio asume la responsabilidad de la gestión de sus desechos y efluentes, sea por cuenta propia o mediante terceros que garanticen el adecuado tratamiento de estos, y según lo determinen las reglamentaciones locales vigentes.

Referencias:

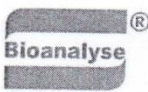
- Altord, Wiese, and Cunter, J. Bact., 69:516. 1955. Clapper and Parker, J. Bact. 70. 1955.
- Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 11th Edition. APHA., Inc. New York, 1960.
- Hentges, A. J. Clin. Path. 38:304. 1962. Kereluk and Gunderson. Applied Microbiol. 22:299. 1959.
- Curry, A.S., G. Joyce and G.N. Moerven, Jr. 1993 CTFA Microbiology guideline, The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington D.C.
- European Pharmacopoeia. 6.3

Rev. 3: 03/2018 CIO

E-mail: info@valtek.cl – WEB site: <http://www.valtekdiagnostics.com>

ANEXO N°6 CONTROL DE CALIDAD DISCOS DE DOXICILINA

23/06/2018



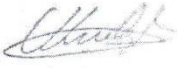
QUALITY CONTROL REPORT

Type of the disc under control	Doxycycline
Concentration of the disc	30 mcg
Code of the product	DO-30
Type of packing	Cartridge (50 discs per cartridge)
Medium	Muller-Hinton Agar
Strains	ATCC
Lot	180621D
Expiry Date	October 2020

The above mentioned production are evaluated in Bioanalyse's QC Laboratory according to the prescribed procedures. The results obtained conforms NCCLS and the considered test parameters.

Although the information provided are accepted as correct, neither the data nor the product are supplied with warranty for a specific use that is not advised at NCCLS criteria and Bioanalyse's prospectus.

BIOANALYSE

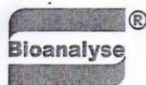


Dr. Remzi Kuleoğlu
Microbiology Specialist
Quality Control Manager

BIOANALYSE TIBBİ MALZEMELER SANAYİ ve TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ

Fabrika/Factory: İvedik Organize Sanayi Bölgesi Ağaç İşleri 1333. Cadde 1377. Sokak No:5 06370 Yenimahalle - Ankara / TURKEY
Phone: +90 312 395 88 70 (PBX) • Fax: +90 312 395 88 66 • e-mail: info@bioanalyse.com • www.bioanalyse.com

ANEXO N° 7 CONTROL DE CALIDAD DISCOS DE CLINDAMICINA



29/08/2018

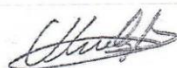
QUALITY CONTROL REPORT

Type of the disc under control	Clindamycin
Concentration of the disc	2 mcg
Code of the product	DA-2
Type of packing	Cartridge (50 discs per cartridge)
Medium	Mueller-Hinton Agar
Strains	ATCC
Lot	180827B
Expiry Date	April 2021

The product stated above has been tested in Bioanalyse QC Laboratories according to the accepted procedures which are prescribed and thoroughly validated by leading microbiological circles.

The above mentioned information is accurate to the best of our knowledge. However, neither the product nor the information is provided with warranty for any specific use apart from CLSI criteria and Bioanalyse prospectus.

BIOANALYSE

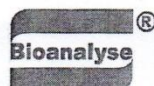


Dr. Remzi Kuleoğlu
Quality Control Manager
Microbiology Specialist

Y-FR-32 / R00

BIOANALYSE TIBBİ MALZEMELER SANAYİ ve TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ
Fabrika/Factory: İvedik Organize Sanayi Bölgesi Ağaç İşleri 1333. Cadde 1377. Sokak No:5 06370 Yenimahalle - Ankara / TURKEY
Phone: +90 312 395 88 70 / BBY • Fax: +90 312 395 88 88

ANEXO N° 8 CONTROL DE CALIDAD DISCOS DE TETRACICLINA



04/08/2018

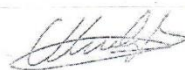
QUALITY CONTROL REPORT

Type of the disc under control	<i>Tetracycline</i>
Concentration of the disc	<i>30 mcg</i>
Code of the product	<i>TE-30</i>
Type of packing	<i>Cartridge (50 discs per cartridge)</i>
Medium	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
Strains	<i>ATCC</i>
Lot	<i>180802D</i>
Expiry Date	<i>October 2020</i>

The product stated above has been tested in Bioanalyse QC Laboratories according to the accepted procedures which are prescribed and thoroughly validated by leading microbiological circles.

The above mentioned information is accurate to the best of our knowledge. However, neither the product nor the information is provided with warranty for any specific use apart from CLSI criteria and Bioanalyse prospectus.

BIOANALYSE



Dr. Remzi Kuleoglu
Quality Control Manager
Microbiology Specialist

BIOANALYSE TIBBİ MALZEMELER SANAYİ ve TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ
Fabrika/Factory: İvedik Organize Sanayi Bölgesi Ağaç İşleri 1333. Cadde 1377. Sokak No:5 06370 Yenimahalle - Ankara / TURKEY
Phone: +90 312 205 88 70 / FAX: +90 312 205 88 71

V-FR-32 / 000

ANEXO N° 9 INFORME DEL ANALISIS FISICOQUIMICO DE LA MUESTRA VEGETAL

ANEXO N° 10 CONSTANCIA ESPECIAL DE USO DE LABORATORIO

 (51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350
AREQUIPA - PERÚ

CONSTANCIA ESPECIAL N°004-Coord.Lab-2019

LA QUE SUSCRIBE COORDINADORA DE LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
SANTA MARÍA, DEJA CONSTANCIA QUE LAS SEÑORITAS:

**BERRIOS CALDERON YAHANIRA LIZ
OLIDEN DOMENIQUE LUISA FERNANDA**

INSTITUCIÓN: UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA - AREQUIPA.

HAN DESARROLLADO EL PROYECTO DE TESIS, INTITULADO:

**“EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ETANOLICO DE NOTHOLAENA NIVEA “CUTI CUTI” FRENTE A LA CEPA
propionibacterium acnes, AREQUIPA 2018”**

PERIODO : del 20 de setiembre al 18 de diciembre del 2018.

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A SOLICITUD EXPRESA, Y PARA LOS FINES QUE
CONVENGA.

Arequipa, 2019,04.01.


Dr. JESÚS MARÍA ZAMBRANO SALAS DE CALLE
COORDINADORA DE LABORATORIOS
Y GABINETES
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

JMZ5/ClyG
rtr