

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“EFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DEL EXTRACTO DE *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*”

Tesis presentada por las Bachilleres:

Bravo Ramos, Carmen luz

Saravia Chaiña, Milagros

Para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

Asesora:

Dra. López Valencia Yenny

Arequipa – Perú

2019

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

Expediente N°. 20180000046851

N° Trámite en Fac. 1756-2018

Fecha 17-10-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **BRAVO RAMOS, Carmen Luz**
SARAVIA CHAIÑA, Milagros


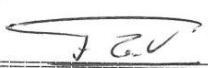
TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EFECTO ANTIMICROBIANO in vitro DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Salvia officinalis* L. (SALVIA) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus mutans* Y *Cándida albicans*"

DICTAMINADORES: 1) Q. F. Fernando Torres Vela 2) Mgter. Jeaneth Medina Pérez

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: **"EFECTO ANTIMICROBIANO in vitro DEL EXTRACTO DE *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*"**, 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 09-01-2019

ASESOR: Dra. Yenny López Valencia

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"EFECTO ANTIMICROBIANO in vitro DEL EXTRACTO DE *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma  Fecha 8/7/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dra. Gaby Velasco Lozano** 3) **Dra. Karin Vera López**
2) **Q. F. Fernando Torres Vela**

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 los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma   (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha

JURADOS: Presidente DRA. GABY VELASCO LOZANO
Vocal Q. F. FERNANDO TORRES VELA
Secretario DRA. KARIN VERA LOPEZ

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 17/10/19 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)


DECANO

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a dios, gracias a la fuerza espiritual que me brindaba en aquellos momentos de dificultad y debilidad he logrado culminar mi carrera.

A mis dos madres Zoila y Leonor porque gracias a su apoyo, sus consejos, su cariño y comprensión hicieron de mí una mejor persona.

A mi padre que, aunque no esté conmigo, sé que desde donde está me cuida y vela siempre por mi bien, él pudo ser mi fuente de inspiración para poder superarme cada día más, hizo que sea perseverante consiguiendo lo que me proponga, luchando siempre por lo que anhelo.

A mis hermanos por su cariño y apoyo incondicional durante todo el proceso de elaboración de la tesis.

Y a todas aquellas personas que me brindaron su amistad, palabras de confianza y aliento, contribuyendo para que logre mis objetivos y metas.

CARMEN LUZ

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a Dios que supo guiarme, conducirme, bendecirme y darme muchas fuerzas para seguir adelante.

A mis padres quienes por ellos soy lo que soy, sé que a mi padre César hoy por hoy ya no se encuentra en este mundo, te extraño y te amo con todo mi corazón y sé que estas orgulloso de mi. A mi madre Alejandra que simplemente me hace llenar de orgullo y no va haber manera de devolverte todo lo que me has ofrecido y que siempre has luchado para que nunca me falte nada. A mis hermanos y demás familiares, amigas que siempre me han brindado su apoyo incondicional.

MILAGROS



AGRADECIMIENTOS

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

A Dios y a la Virgen por estar siempre con nosotras en todo momento, por darnos la fortaleza y sabiduría para poder realizar una de nuestras principales metas.

A todos nuestros docentes que participaron en nuestra formación académica, nos brindaron sus enseñanzas y sabios consejos a lo largo de nuestra carrera.

A nuestras familias por el apoyo incondicional cuando se presentaron los obstáculos en el tiempo de ejecución de nuestra tesis.

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin la colaboración de muchas personas que nos han brindado su apoyo, sus conocimientos y parte de su tiempo; nuestras más sinceras gratitudes a todos ellos.

MUCHAS GRACIAS

INTRODUCCIÓN

Existen algunos metabolitos secundarios procedentes de plantas que vienen siendo aprovechados por la medicina y la industria farmacéutica por sus diversos beneficios en la salud humana (1), debido a que, las plantas poseen metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, terpenos, entre otros que se relacionan directamente con la actividad terapéutica (2,3,4,5), así mismo, uno de los beneficios más conocidos es la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano (6,7).

Encontrar nuevos beneficios terapéuticos de las especies vegetales hacen factible continuar con más estudios, ya que en el medio existen algunos microorganismos que son considerados patógenos como es el caso de *Cándida albicans* que produce infecciones cutáneas, en las mucosas, infecciones subcutáneas y micosis sistémicas. Así mismo, otro microorganismo es el *Staphylococcus aureus* que hasta la fecha sigue siendo un patógeno versátil y peligroso en los seres humanos, ya que es responsable de infecciones nosocomiales, las cuales han aumentado constantemente (8), así pues el tratamiento de estas infecciones se ha vuelto más difíciles, debido a la aparición de cepas resistentes como el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR).

Otro microorganismo conocido por su patogenicidad es la *Escherichia coli* que pertenece a la flora normal no patógena predominante del intestino humano. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* han desarrollado la capacidad de causar enfermedades del sistema gastrointestinal, urinario o nervioso central. Así mismo varios síndromes clínicos acompañan a la infección en 4 categorías de (*E. coli* productora de enterotoxina citotónicas), que incluyen la diarrea del viajero, (*E. coli* enterohemorrágica) que incluye el síndrome hemolítico - urémico, (*E. coli* enteroinvasora) produce una enfermedad parecida a la shigelosis y (*E. coli* enteropatógena) diarrea acuosa en lactantes (9).

En la presente investigación se buscó determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans* ya que no hay muchas investigaciones sobre la actividad terapéutica de esta especie y evaluar sus propiedades antimicrobianas de más especies vegetales podría dar resultados útiles.

RESUMEN

Actualmente, las terapias antimicrobianas son cada vez más escasas debido a que algunos microorganismos desarrollan resistencia por diversos mecanismos, es por ello que se busca investigar el desarrollo de nuevas especies vegetales con la finalidad de hallar metabolitos que conlleven al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas de vital importancia.

El objetivo de la presente investigación fue la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*.

Se recolectó muestras de algas marinas de Aracanto, en la localidad de Matarani, ubicado en la provincia de Islay, luego se procedió a seleccionar las láminas que se encontraban en buen estado; posteriormente fueron lavadas, secadas y pulverizadas para su posterior extracción. Se obtuvieron extractos etanólicos por el método de Percolación con un rendimiento promedio de 11.62 ± 0.10 %; dichos extractos fueron analizados por Cromatografía en Capa Fina (CCF) encontrando la presencia de terpenos, taninos y flavonoides.

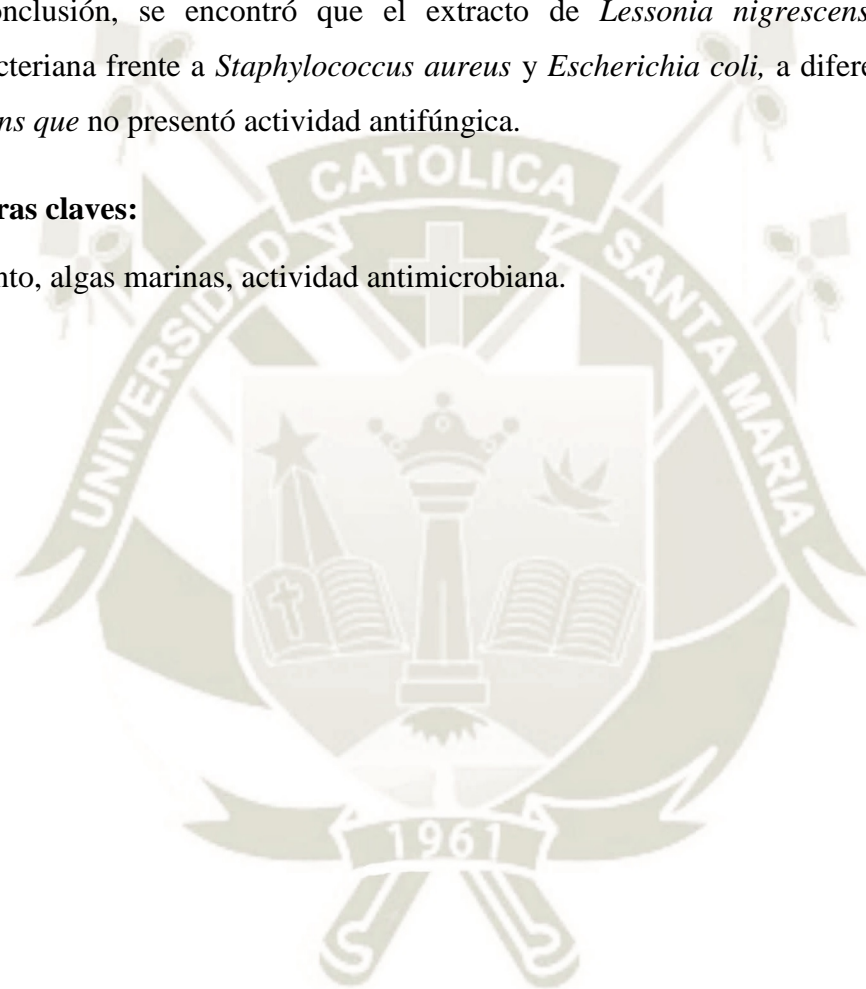
Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana encontrando que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto de *L. nigrescens* frente *E. coli* son 50 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente. Por otro lado, la CIM y CBM del extracto de *L. nigrescens* (Aracanto) frente a *S. aureus* es 25 mg/mL. Así mismo, la CIM del extracto de *L. nigrescens* frente a *C. albicans* es de 100 mg/mL y no presenta Concentración Fungicida Mínima (CFM).

Finalmente, se procedió con el estudio de sensibilidad por el método de Kirby Bauer usando discos impregnados con diferentes concentraciones del extracto, dando como resultado que, *E. coli* presenta sensibilidad al extracto etanólico de *L. nigrescens* con halos de inhibición de 6, 7.4, 11.2 y 12.8 mm a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/mL, por otro lado, *S. aureus* presenta sensibilidad al extracto etanólico de *L. nigrescens* con halos de inhibición de 7.8, 11.0, 13.6 y 15.4 mm a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/mL.

En conclusión, se encontró que el extracto de *Lessonia nigrescens* tiene actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, a diferencia de *Cándida albicans* que no presentó actividad antifúngica.

Palabras claves:

Aracanto, algas marinas, actividad antimicrobiana.



ABSTRACT

Currently, antimicrobial therapies are increasingly scarce because some microorganisms develop resistance through various mechanisms, which is why we seek to develop research in new plant species in order to find unknown metabolites that lead to the development of new therapeutic alternatives for vital importance.

The objective of the present investigation was the evaluation of the antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Lessonia nigrescens* (Aracanto) on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cándida albicans*

Samples of seaweed from Aracanto, from the Matarani district, located in the province of Islay, were collected, then the sheets that were in good condition were selected; subsequently they were washed, dried and pulverized for later extraction. Ethanolic extracts were obtained by the Percolation method with an average yield of $11.62 \pm 0.10\%$; These extracts were analyzed by Thin Layer Chromatography (CCF) finding the presence of terpenes, tannins and flavonoids.

Subsequently, the antimicrobial activity was evaluated finding that the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the extract of *L. nigrescens* on *E. coli* are 50 mg/mL and 100 mg/mL respectively. On the other hand, the CIM and CBM of the extract of *L. nigrescens* (Aracanto) against *S. aureus* is 25 mg/mL. Likewise, the MIC of the extract of *L. nigrescens* against *C. albicans* is 100 mg/mL and does not present Minimum Fungicidal Concentration (CFM)

Finally, we proceeded with the sensitivity study using the Kirby Baer method using disks impregnated with different concentrations of the extract, resulting in *E. coli* being sensitive to the ethanolic extract of *L. nigrescens* with inhibition halos of 7.4, 11.2 and 12.8 mm at concentrations of 50, 75 and 100 mg/mL, on the other hand, *S. aureus* presents sensitivity to the ethanolic extract of *L. nigrescens* with inhibition halos of 7.8, 11.0, 13.6 and 15.4 mm at concentrations of 25, 50, 75 and 100 mg/mL.

In conclusion, it was found that the extract of *Lessonia nigrescens* has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, unlike *Cándida albicans* that did not present antifungal activity

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INTRODUCCIÓN

RESUMEN

ABSTRACT

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO 1

1. *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)..... 2

1.1. GENERALIDADES 2

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA..... 3

1.3. NOMBRES COMUNES 3

1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS 3

2. EXTRACTOS VEGETALES 6

2.1. MÉTODOS EXTRACTIVOS 6

3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA..... 8

3.1. APLICACIÓN DE LA MUESTRA Y DESARROLLO DE LA PLACA 9

3.2. LA FASE ESTACIONARIA (ADSORBENTE)..... 9

3.3. FASE MÓVIL 10

3.4. VENTAJAS 10

4. MICROORGANISMOS PATÓGENOS..... 10

4.1. *Staphylococcus aureus*..... 10

4.2. *Escherichia coli* 13

4.3. *Cándida albicans* 15

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS..... 18

1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN 19

2. MATERIALES..... 19

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO 19

2.2. MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPOS..... 20

2.3. METODOLOGÍA 22

2.4. MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA
DE CAPA FINA 26

2.5. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE REFERENCIA	27
2.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO	27
2.7. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO)	34
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	41
2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO)	41
2.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Lessonia nigrescens</i> (Aracanto).....	42
3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)	43
3.1. IDENTIFICACIÓN GENERAL	43
3.2. IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS.....	44
4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	48
5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Escherichia coli</i>	48
5.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Escherichia coli</i>	49
5.2. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Escherichia coli</i>	49
5.3. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE <i>Escherichia coli</i> AL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO)	50
6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i>	53
6.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i>	53
6.2. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i>	54

6.3. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE <i>Staphylococcus aureus</i> AL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO).....	54
7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Cándida</i> <i>albicans</i>	57
7.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Cándida</i> <i>albicans</i>	57
7.2. CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO <i>Lessonia nigrescens</i> (ARACANTO) FRENTE A <i>Cándida</i> <i>albicans</i>	58
CONCLUSIONES	62
SUGERENCIAS	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica	3
Tabla 2. Diluciones para hallar la Concentración Inhibitoria Mínima de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	37
Tabla 3. Diluciones para hallar la Concentración Inhibitoria Mínima de <i>Cándida albicans</i>	37
Tabla 4. Rendimiento del extracto seco de <i>Lessonia nigrescens</i> (Aracanto) obtenido por percolación	41
Tabla 5. Cuadro de Comparación de los Metabolitos Secundarios.....	47
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria de extracto de <i>Lessonia nigrescens</i> sobre microorganismos de <i>Escherichia coli</i>	49
Tabla 7. Concentración Bactericida mínima de extracto de <i>Lessonia nigrescens</i> sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	50
Tabla 8. Análisis de Varianza (ANOVA) sensibilidad antibacteriana de <i>Escherichia coli</i> al extracto etanólico <i>Lessonia nigrescens</i> (Aracanto)	50
Tabla 9. Test de HSD de Tukey de la sensibilidad antibacteriana de <i>Escherichia coli</i> al extracto etanólico <i>Lessonia nigrescens</i>	51
Tabla 10. Concentración Inhibitoria Mínima de extracto de <i>Lessonia nigrescens</i> sobre microorganismos de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Tabla 11. Concentración Bactericida Mínima de extracto de <i>Lessonia nigrescens</i> sobre microorganismos de <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Tabla 12. Análisis de Varianza (ANOVA) sensibilidad antibacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> al extracto etanólico <i>Lessonia nigrescens</i> (Aracanto).....	55
Tabla 13. Test de Tukey HSD de la sensibilidad antibacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> al extracto etanólico <i>Lessonia nigrescens</i> (Aracanto).....	55
Tabla 14. Concentración Mínima Inhibitoria de extracto de <i>Lessonia nigrescens</i> sobre microorganismos de <i>Cándida albicans</i>	57
Tabla 15. Concentración Fungicida Mínima de extracto de <i>Lessonia nigrescens</i> sobre cepas de <i>Cándida albicans</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Lessonia nigrescens.....	2
Figura 2.	Distribución geográfica del género Lessonia.....	4
Figura 3.	Presencia de Lessonia en Sudamérica característico de relieves rocosos.	5
Figura 4.	Estructura química del florotanino.....	6
Figura 5.	Separación de componentes de una muestra por Cromatografía en Capa Fina.....	9
Figura 6.	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
Figura 7.	<i>Escherichia coli</i>	13
Figura 8.	<i>Cándida albicans</i>	16
Figura 9.	Muestra algas de Lessonia nigrescens (aracanto).....	19
Figura 10.	Molienda de láminas de Lessonia nigrescens (Aracanto) en un molino de cuchillas marca Oster.....	23
Figura 11.	Pulverización de láminas de Lessonia nigrescens (Aracanto).....	24
Figura 12.	Sistema de Percolación usando solvente etanólico.....	25
Figura 13.	Concentración del extracto para determinar el rendimiento del extracto seco de Lessonia nigrescens por percolación.....	42
Figura 14.	Identificación general de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina.....	43
Figura 15.	Identificación de terpenos por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de Lessonia nigrescens.....	44
Figura 16.	Identificación de taninos por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de Lessonia nigrescens.....	45
Figura 17.	Identificación de flavonoides por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de Lessonia nigrescens.....	46
Figura 18.	Identificación de alcaloides por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de Lessonia nigrescens.....	47
Figura 19.	Diagrama de Cajas y Bigotes correspondiente a los tratamientos para evaluar la sensibilidad antibacteriana de Escherichia coli al extracto etanólico Lessonia nigrescens y comparada con amikacina y ciprofloxacino.	52
Figura 20.	Diagrama de Cajas y Bigotes correspondiente a los tratamientos para evaluar la sensibilidad antibacteriana de Staphylococcus aureus al extracto etanólico Lessonia nigrescens y comparada con vancomicina y amoxicilina + ácido clavulánico.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	71
ANEXO 2	72
ANEXO 3	75
ANEXO 4	76
ANEXO 5	78
ANEXO 6	80
ANEXO 7	82
ANEXO 8	83
ANEXO 9	84
ANEXO 10	85
ANEXO 11	88
ANEXO 12	90
ANEXO 13	92
ANEXO 14	94
ANEXO 15	96

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%RE: Porcentaje de Rendimiento de Extracción

CCF: Cromatografía de Capa Fina

RF: Factor de Referencia

CMI: Concentración Mínima inhibitoria

CBM: Concentración Bactericida Mínima

CFM: Concentración Fungicida Mínima

TSI: Agar Triple Azúcar Hierro

LIA: Agar Lisina Hierro

RM-VP: Prueba de Rojo de Metilo – Voges Proskawer

HIP: Halo de Inhibición Promedio



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

1.1. GENERALIDADES

La familia *Lessonia* son algas pardas que corresponden al orden de laminariales que geográficamente están ubicadas en las costas del Océano Pacífico de Sudamérica (10), las cuales son utilizadas en la mayoría como materia prima con el fin de extraer los alginatos, que son polisacáridos naturales presentes en las especies *Lessonia nigrescens* y *Lessonia trabeculata* (11).



Figura 1. *Lessonia nigrescens*

Fuente. Spanish.alibaba (12)

En un contexto general, estas algas se caracterizan por poseer una gran cantidad de proteínas, mucílagos, oligoelementos y vitaminas; justificando su empleo en la alimentación humana, así mismo estas algas no poseen raíz, hojas, ni tallo, sin embargo, poseen una estructura general llamada “talo”. Las algas marinas que principalmente se

extraen y comercializan en el sur del Perú pertenecen a los géneros *Lessonia* y *Macrocystis*, ambas representantes del grupo de algas pardas, y productoras de ficocoloides conocidos como alginatos (10).

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según el IMARPE (2015) la clasificación taxonómica del Aracanto (13) es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación taxonómica

División	Phaeophyta
Clase	Phaeophyceae
Orden	Laminariales
Familia	Lessoniaceae
Género	Lessonia
Especie	<i>Lessonia nigrescens</i>

Fuente. Arenas (2016) (13).

1.3. NOMBRES COMUNES

En el Perú se le conoce popularmente como Aracanto negro, negra, cabeza y en otros países como Chile se le llama Chascón y Huiro negro (11)

1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

1.4.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Son algas pardas grandes que pueden alcanzar una longitud de hasta 4 metros y se caracterizan por ser de color verde oliváceo, parduzcas o casi negro, frondosa, formada por un disco rizoidal grande y conoideo del cual nacen estípites gruesos, rígidos, cilíndricos y flexibles. El estípite principal puede medir de 1.5 hasta 3 cm de diámetro, dividiéndose dicromáticamente. Cuando son jóvenes presentan solo una lámina por eje. Las láminas tienden a ser lisas, onduladas o con dientes romos.

Disco de fijación macizo de superficie lisa, en forma de “chupón”, formado por hapterios entrelazados y fusionados (10,11,14).

1.4.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Lessonia nigrescens está ubicada en Sudamérica en la costa del Océano Pacífico Este del hemisferio sur, está distribuida desde la provincia de Callao (Perú), hasta el cabo de Hornos (Chile). Son dominantes en aguas frías en ambos hemisferios. Así también podemos mencionar que están ubicadas en las Islas Malvinas, Islas Heard y Kerguelen (11,15).

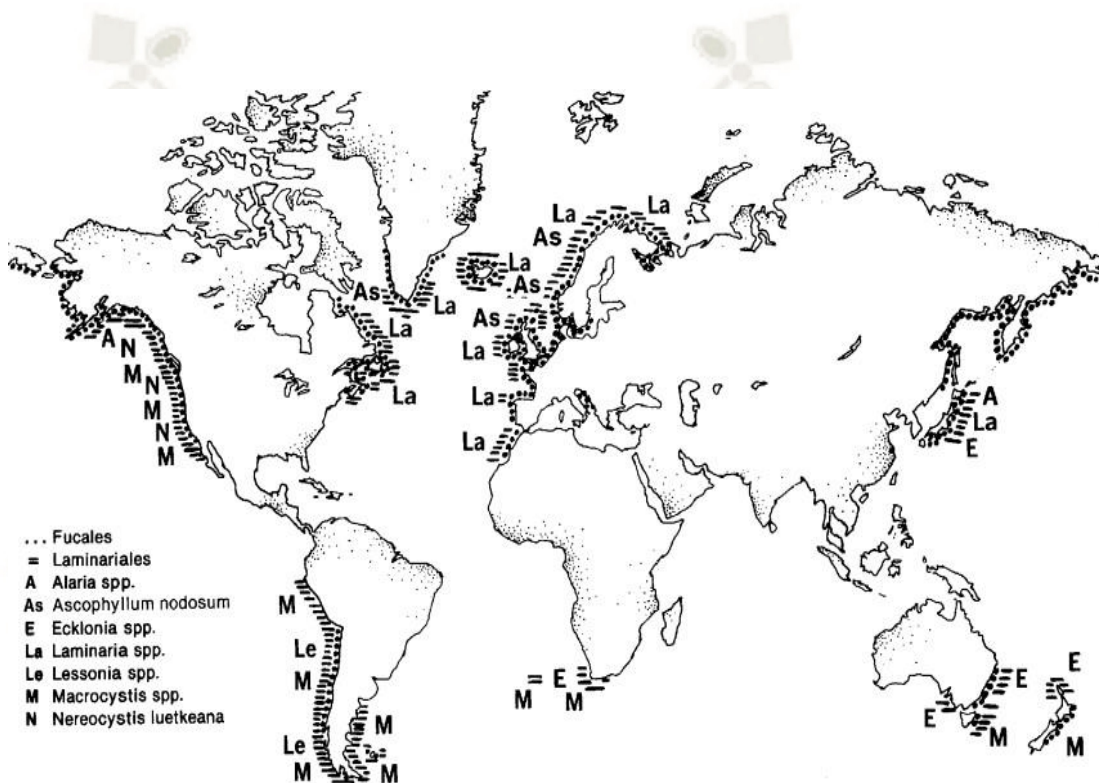


Figura 2. Distribución geográfica del género *Lessonia*

Fuente. Clare (1993) (16)

1.4.3. HABITAT Y ASPECTOS ECOLÓGICOS

Se encuentra en zonas intermareales y submareales de playas rocosas, formando cinturones, preferentemente en zonas expuestas y semi expuestas a las olas. Las praderas formadas por esta especie modifican su estructura y funcionamiento de la biodiversidad en sistemas costeros donde se desarrolla. Siendo considerados “ingenieros ecosistémicos” estructuradores de hábitat para un número de especies de peces y macro invertebrados (11).



Figura 3. Presencia de *Lessonia* en Sudamérica característico de relieves rocosos.

Fuente. Peteiro (2017) (17)

1.4.4. USOS

Lessonia nigrescens como recurso biológico es de gran importancia ya que es utilizada para la extracción de alginatos, como también en la industria alimentaria, cosmética, textil y farmacéutica. Por otro lado, también cumple un rol ecológico ya que cumple una importante función al ser como una protección brindando un lugar de establecimiento de invertebrados marinos y peces siendo utilizados como alimento por invertebrados (15).

1.4.5. ESTUDIOS TERAPÉUTICOS

Un estudio demostró la actividad antidiabética del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* en ratones diabéticos tipo 2 inducidos por estreptozotocina (SZT) alimentados con una dieta alta en sacarosa y grasas. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas en ratones diabéticos tipo 2 disminuyeron significativamente después de la administración del extracto (18).

1.4.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Lessonia contiene una amplia gama de compuestos bioactivos, como los fucanos y los florotaninos (Figura 4) (18); otro estudio reveló que los estípites, haptera y frondas presentan fucanos. Cada uno de los “fucanos” contenía proporciones variables de fucosa (mayor), galactosa, manosa, xilosa, ácido glucurónico y pequeñas proporciones de proteína; además de ácido glucurónico y ácido algínico o alginatos (Figura 5) (19).

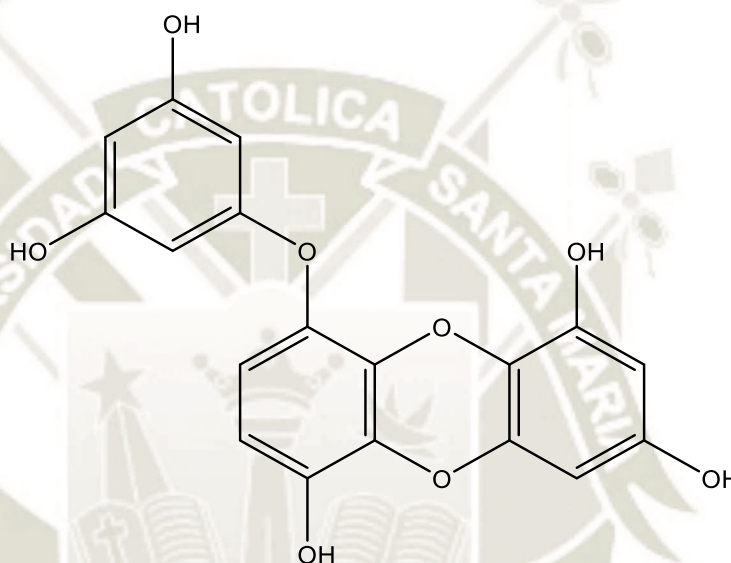


Figura 4. Estructura química del florotanino
Fuente. Elaboración propia

2. EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos son obtenidos a partir de la droga que puede ser de consistencia sólida, semisólida o líquido. Estos principios activos de dicha planta a extraer, se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal siendo aquí el proceso extractivo cuando el disolvente va a ingresar a la célula, con el propósito de facilitar la extracción de sus metabolitos secundarios (principios activos) (20).

2.1. MÉTODOS EXTRACTIVOS

Existen varios métodos para obtener los principios activos de la droga de dicha planta. En la actualidad el aislamiento de estos principios activos por lo general está vinculado a ensayos farmacológicos, permitiendo la selección de extractos y

aislamiento de sus principios activos no solo por su uso terapéutico sino también para analizar y estudiar las nuevas sustancias activas de cualquier especie vegetal (21).

2.1.1. EXTRACCIÓN DISCONTÍNUA

A. MACERACIÓN

Es utilizada para la extracción de los principios activos termolábiles, por lo que se trabaja a temperatura ambiente, también es útil cuando los principios activos de la droga son muy solubles y la estructura de la droga es permeable al disolvente; así mismo, también una desventaja es que la extracción de los principios activos de la droga es incompleta (20).

B. DIGESTIÓN

La digestión es un proceso muy parecido a la maceración, la diferencia es que trabaja a temperaturas más elevadas (20).

C. INFUSIÓN

Es el proceso donde se trabaja macerando la droga con un disolvente (agua) a temperatura próxima a la de ebullición por un tiempo corto. Finalmente este proceso se deja enfriar hasta temperatura ambiente (20).

2.1.2. EXTRACCIÓN CONTÍNUA

El método de extracción continua consiste en poner en contacto la droga con el disolvente manteniendo en todo momento el desequilibrio para así poder evitar que se detenga la extracción para lo cual permite que se produzca la difusión celular pasiva (20).

A. PERCOLACIÓN

Es el método oficial de extracción, descrito en la farmacopea americana. Es un método que consiste en que el menstuo (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de la droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes, por lo que la droga toma contacto siempre por nuevas proporciones de menstuo, así acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva (22).

Este tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95 % de sustancia extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el menstruo y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. “La percolación es el método extractivo menos adecuado en el caso de gran gelificación o si las drogas son muy voluminosas”. Cabe recalcar que previo a la extracción es necesario humectar la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del menstruo en las membranas celulares durante la percolación (22).

B. SOXHLET

Es un proceso de extracción sólido-líquido. La temperatura en el método de Soxhlet puede ser un principal inconveniente ya que es usado a temperaturas altas, pero también facilita la solubilización de las sustancias, principalmente utilizan disolventes de punto de ebullición bajo, ya sea como el diclorometano, metanol o hexano (21).

La extracción se realiza en un aparato de consta de tres partes, un matraz de fondo plano, un cuerpo extractor y un refrigerante. En el cuerpo extractor se coloca el disolvente orgánico y la droga, generalmente envuelta en un material poroso que permita el contacto con el disolvente. En el matraz de fondo plano se coloca el disolvente orgánico que se lleva a ebullición y los vapores del disolvente ascienden por el tubo lateral y llegan al refrigerante donde condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo extractor. Cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo, éste se vacía por el sifón lateral interno y desemboca en el matraz inferior. El disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior (21).

3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina adsorbente, retenida sobre una superficie plana (23), que

constituye una herramienta fundamental en química orgánica para analizar pequeñas cantidades de muestras en forma rápida. Es una técnica únicamente cualitativa (24).

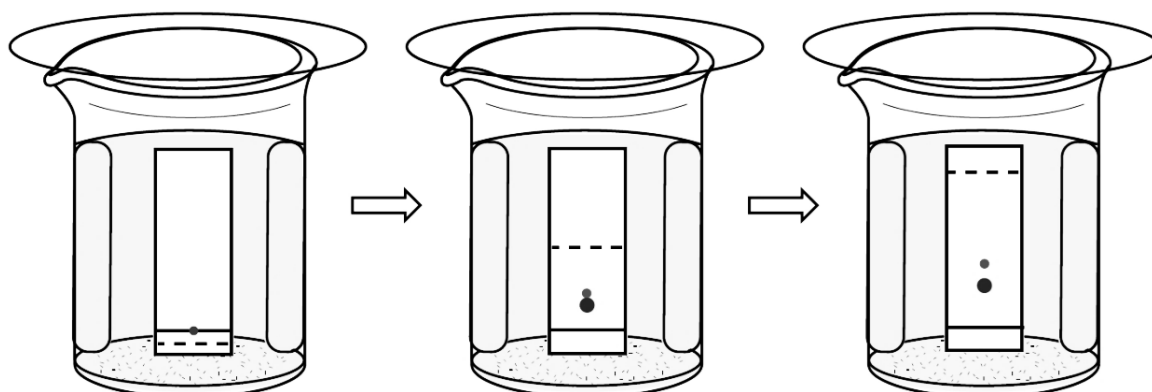


Figura 5. Separación de componentes de una muestra por Cromatografía en Capa Fina

Fuente. Overview of TLC (25)

3.1. APLICACIÓN DE LA MUESTRA Y DESARROLLO DE LA PLACA

En esta técnica, la muestra a analizar es aplicado por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.), en forma de una pequeña mancha circular posteriormente se deja secar. Luego se sumerge la placa en el disolvente o fase móvil. El disolvente asciende la placa por capilaridad, arrastrando el sustrato. Antes de alcanzar el extremo superior de la placa se debe retirar dicha placa de la cámara cromatografía, marcando con un lápiz la posición alcanzada por el frente del disolvente. Por lo general la muestra no se desplaza a la misma velocidad que el disolvente. También se marca la posición de la mancha de la muestra (23,26).

Luego se calcula el R_f de cada uno de los componentes.(13)

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}} \times 100$$

3.2. LA FASE ESTACIONARIA (ADSORBENTE)

Es un sólido que forma la parte fija del sistema, debe ser inerte, poroso e insoluble para los solventes utilizados como fase móvil. Los materiales más comunes son la sílica gel, alúmina o celulosa. (27).

3.3. FASE MÓVIL

Está formado por el eluyente que se desplaza a través de la fase estacionaria (sílica gel), arrastrando todos los componentes de la muestra (28).

La elección del disolvente más adecuado a utilizar es difícil, debido al gran número de disolventes en la actualidad. La característica más relevante es su polaridad seguidamente su carácter ácido o básico. Generalmente se usan mezclas de disolventes, pero algunas veces puede ser mejor con un solo disolvente puro (26).

3.4. VENTAJAS

La CCF está reconocido como técnica analítica de gran importancia para las modernas farmacopeas. Las principales ventajas son:

- Versatilidad, se debe al empleo de un gran número de adsorbentes como por ejemplo la celulosa, óxido de aluminio, hidróxido cálcico, poliamida; aunque es la sílica gel el que se emplea con mayor frecuencia (21).
- Velocidad, se debe a la naturaleza compacta del soporte cuando se embebe (21).
- Sensibilidad (21).
- Se requiere de un equipo simple y de bajo costo (23).
- De fácil compresión y ejecución (23).
- Se utiliza una pequeña cantidad de solvente, además de la muestra a analizar (23).
- Es posible analizar varias muestras en una sola placa cromatográfica (23).
- Es posible revelar las placas con reactivos cromogénicos, facilitando la detección de sustancias que no absorben en la región UV/visible (23).

4. MICROORGANISMOS PATÓGENOS

4.1. *Staphylococcus aureus*

A. GENERALIDADES

En la actualidad se han descrito 42 especies diferentes de *Staphylococcus*, algunas de ellas constituyen la flora microbiana normal de piel y mucosas en seres humanos y otras se encuentran sólo en la flora de animales mamíferos y aves (29).

Son cocos Gram positivos que se encuentran aislados en parejas, tétradas, cadenas cortas o agrupadas en forma de racimos de uvas, la mayoría presenta un diámetro de entre 0.5 y 1.5 μm (29,30)

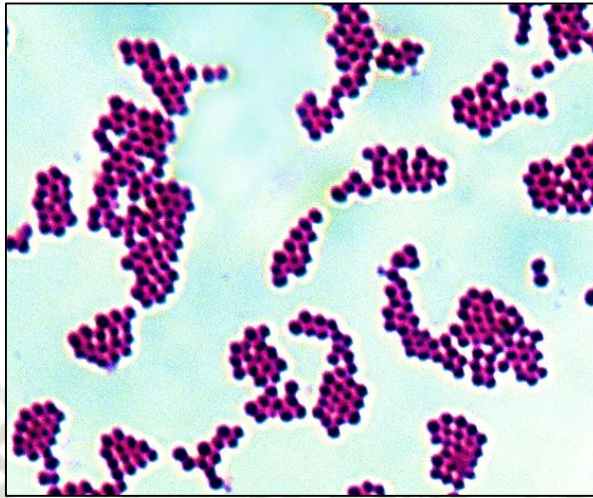


Figura 6. *Staphylococcus aureus*

Fuente. gettyimages (31)

Son bacterias inmóviles, no formadores de esporas, por lo general no poseen cápsula y son capaces de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicamente en presencia de una elevada salinidad, además de ser resistentes a temperaturas de 18-40°C (29,30).

Las colonias de *Staphylococcus aureus* pueden presentar un color amarillo o dorado por los pigmentos carotenoides que se van formando durante su crecimiento. Es la especie más común e importante presente en el ser humano. La mayor parte de las especies producen catalasa, el género *Staphylococcus* presenta “catalasa positiva”.

La principal característica que diferencia a *S. aureus* de otras especies de estafilococos es la producción de la enzima coagulasa, permitiendo a la bacteria coagular el plasma, “coagulasa positiva” (29,30).

B. PATOGENIA

Staphylococcus aureus es el patógeno humano más importante entre los estafilococos, se encuentra en el medio ambiente y coloniza las narinas en un 20 a 40% de los adultos, también en los pliegues cutáneos intertriginosos, el perineo, las

axilas y vagina. Aunque forma parte de la microflora normal del ser humano, es capaz de causar infecciones importantes en condiciones apropiadas (32).

Los *Staphylococcus aureus* es causante de diferentes procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas las cuales pueden ser mortales sino se trata en forma adecuada (32).

Existen muchos factores que pueden causar infecciones graves por *S. aureus*:

- Enfermedades producidas por toxinas (síndrome estafilocócico de piel escaldada, intoxicación alimentaria, Shock tóxico) (30,32).
- Infecciones cutáneas que pueden afectar los folículos pilosos y producir foliculitis simple, forúnculos e impétigo. Este último se caracteriza por la producción de vesículas que se rompen y forman costras (32).
- Infecciones de heridas postquirúrgicas, las cuales pueden conllevar a infecciones sistémicas (32).
- Lesiones cutáneas (quemaduras, eccema) (32).
- La neumonía estafilocócica, suele presentarse con mayor frecuencia en ancianos y la neumonía hospitalaria se presenta en pacientes con enfermedad obstructiva crónica e individuos sometidos a intubación y aspiración de secreciones (32).
- Presencia de cuerpos extraños (suturas, vías intravenosas, dispositivos de prótesis) (32).
- Enfermedades malignas subyacentes como el cáncer (32).
- Meningitis, se produce en pacientes con afecciones del sistema nervioso central (32).
- Osteomielitis (32).
- Endocarditis (32).

C. TRATAMIENTO Y RESISTENCIA

En un principio, la penicilina fue el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones graves por *Staphylococcus aureus*. La resistencia a la penicilina se debió a la adquisición de elementos genéticos llevados por plásmidos que codifican la producción de β -lactamasa.

Las cepas de *S. aureus* son capaces de producir hasta cuatro enzimas β -lactamasa diferentes. Actualmente, más del 80% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a la penicilina por la acción de estas enzimas β -lactamasa hidrolíticas o penicilinasas. Las penicilinas resistentes a la penicilinasas, semisintéticas (oxacilina y meticilina) son los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la penicilina (32).

Debido a esta resistencia de las penicilinas a la penicilinasas, la vancomicina se volvió el tratamiento de elección para infecciones debidas al SARM. Pero en el año de 1996 se dio a conocer la primera infección causada por una cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (32).

4.2. *Escherichia coli*

A. GENERALIDADES

Son bacilos gramnegativos, su tamaño oscila de 0.3 a 3 μm . Son aerobias y anaerobias facultativos, microorganismos capaces de fermentar la glucosa, son oxidasa negativa. Son móviles por la presencia de flagelos (33).

Sus componentes estructurales son el citoplasma, membrana celular, genoma, ribosomas, pared con su membrana externa, flagelos y pili. La membrana interna o citoplasma está constituida por una bicapa fosfolipídica. La pared está formada por una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa que contiene proteínas purinas (33).



Figura 7. *Escherichia coli*

Fuente. slideshare.net (34)

B. PATOLOGÍA

Forma parte de la flora normal, pero puede ser causante de enfermedad. Habita naturalmente en el intestino del hombre y animales (35).

a) **Infecciones del Aparato Urinario:** *E. coli* es la causa principal de infecciones en el tracto urinario debido a que es la más abundante en el tubo digestivo y el periné, desde donde logran invadir el tracto urinario por vía ascendente; además es el responsable de casi 90% de infecciones urinarias en mujeres.

Presentan un tiempo de generación muy corto, por ello se multiplican con mayor rapidez (35).

Algunos signos y síntomas que se manifiestan en el tracto urinario bajo (cistitis) son la poliuria disuria, piuria y fiebre. Cuando la infección asciende (pielonefritis) se presenta un dolor lumbar, fiebre elevada y mal estado general (36).

b) **Enteritis por *E. coli*:** Algunas cepas de *E. coli* producen enteritis por su capacidad enteropatógena. Se clasifican por su mecanismo de patogenicidad en cuatro grupos:

– *E. coli* **enteroinvasora (ECEI):** Produce una enfermedad parecida a la shigelosis, las cepas de ECEI presentan la capacidad de invadir y multiplicarse en las células epiteliales de la mucosa intestinal, produciendo lesiones ulceradas. Se manifiesta con diarrea febril aunque en situaciones de gravedad se puede manifestar con sangre y moco en las heces (36).

– *E. coli* **productora de enterotoxinas citotónicas (ECET):** Es la causa principal de la diarrea del viajero, así como causante de enteritis en países subdesarrollados. Existen 2 tipos de toxinas secretoras, una termolábil y otra termoestable que pueden o no ser producidas a la vez por una misma cepa

La toxina termolábil presenta una estructura y antígenos similares a la toxina del *Vibrio cholerae*, las ECET se adhieren a las paredes del intestino delgado mediante factores de colonización, su codificación es plasmídica. Se

manifiesta con diarrea acuosa, dolor abdominal y fiebre, no hay presencia de moco y sangre (36).

- *E. coli* **productora en enterotoxinas citotóxicas (*E. coli* enterohemorrágica: ECEH):** Son capaces de producir verotoxina, llamada así por su efecto citotóxico sobre la línea Vero. Causan una lesión a la mucosa intestinal provocando un sangrado. El serotipo O157:H7 es el principal agente patógeno causante de enteritis hemorrágica. Se manifiesta con un intenso dolor abdominal y diarrea acuosa sanguinolenta. Puede mostrar una complicación con el síndrome hemolítico-urémico (36).
- *E. coli* **enteropatógena clásica (ECEPc):**
Es la causante de diarrea en lactantes en países subdesarrollados. Las bacterias de ECEPc se adhieren íntimamente al epitelio intestinal afectando y destruyendo las microvellosidades celulares. Se manifiesta con vómitos y diarrea con moco, con ausencia de sangre (36).

C. TRATAMIENTO

Las bacterias de *E. coli* tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia, por lo que es indispensable las pruebas de la sensibilidad a los antibióticos mediante un antibiograma (36). La amoxicilina, el clotrimoxazol (sulfametoxazol + trimetoprima), las quinolonas y los aminoglucosidos, son considerados muy eficaces (36).

4.3. *Cándida albicans*

A. GENERALIDADES

Durante los últimos años se ha incrementado las infecciones micóticas causadas por levaduras y hongos levaduriformes. Estas infecciones por lo general se deben a especies de *Cándida*, se observan sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, pacientes posquirúrgicos, pacientes traumatizados y en pacientes con catéteres venosos permanentes durante periodos prolongados (37).

Son hongos levaduriformes, grampositivas con un metabolismo aerobio, se observan como células redondas ovaladas de 3 a 5 μm , se desarrollan en agar glucosado Sabouraud formando colonias lisas y cremosas de aspecto y olor peculiar (levadura de pan), se incuban de 24 a 48 horas con una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 37°C (38).

Fermentan la glucosa, la maltosa y la sacarosa con producción de ácido y gas. En la sacarosa no producen gas (40).

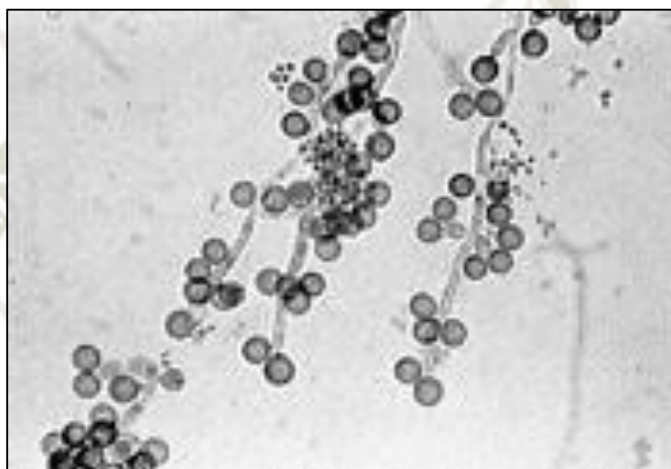


Figura 8. *Cándida albicans*

Fuente. candidalbicans.blogspot (39)

B. PATOLOGÍA

Cándida albicans forma parte de la flora normal de la cavidad bucal, tracto gastrointestinal y tracto genital femenino, también habitan en la piel; en determinadas circunstancias pueden afectar y lesionar cualquier tejido produciendo una candidiasis (40).

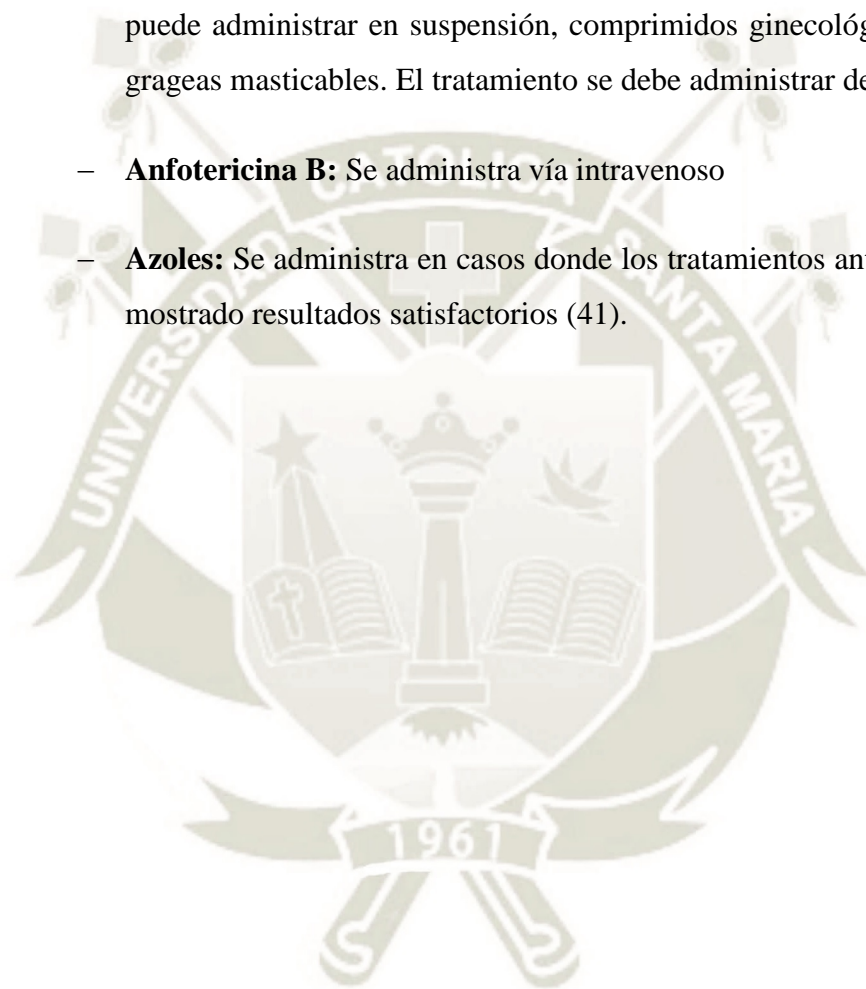
La formación de tubos germinativos permite que *C. albicans* presenten la facilidad de adherirse a las células epiteliales de la boca y de la vagina, células endoteliales, fibronectina, coágulos sanguíneos y a otras estructuras orgánicas. Es así, que se conocen algunas infecciosas como la Candidiasis cutáneomucosas, la candidiasis oral o muget es la infección más común de las mucosas producida por *Cándida albicans* se manifiesta con manchas blanquecinas en la mucosa bucal, lingual y gingival. La vulvovaginitis se caracteriza por irritación, prurito y secreción vaginal; las infecciones intertriginosas afecta los pliegues genitales, axilar, submamario,

interglúteo y espacios interdigitales; la onicomicosis es una inflamación dolorosa y eritematosa, afecta las uñas (36).

C. TRATAMIENTO

a) Candidiasis cutáneo mucosas

- **Nistatina:** Es un fungicida que actúa por contacto directo prolongado. Se puede administrar en suspensión, comprimidos ginecológicos, pomadas o grageas masticables. El tratamiento se debe administrar de 7 a 10 días
- **Anfotericina B:** Se administra vía intravenoso
- **Azoles:** Se administra en casos donde los tratamientos anteriores no hayan mostrado resultados satisfactorios (41).





CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en la provincia de Arequipa, la muestra algal fue recolectada en la localidad de Matarani ubicada en la provincia de Islay, en el mes de diciembre del año 2018 y los ensayos se ejecutaron en los laboratorios de farmacognosia (H-103), Farmacotecnia (H-203) y microbiología (H-403) de la Universidad Católica de Santa María Arequipa.

2. MATERIALES

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

En cuanto al material biológico se usaron algas de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) obtenidas de la localidad de Matarani, ubicado en la provincia de Islay, departamento de Arequipa.



Figura 9. Muestra algas de *Lessonia nigrescens* (aracanto)

Por otro lado, se estudiaron con microorganismos obtenidos del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional Honorio Delgado de la ciudad de Arequipa, dichos microorganismos fueron identificados como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*.

2.2. MATERIAL REACTIVOS Y EQUIPOS

A. MATERIALES

- Algodón
- Asa de kolle
- Baguetas
- Balón
- Barbijo
- Capilares
- Cubas cromatográficas
- Cubre objetos
- Espátula
- Fiolas
- Gradilla para tubos de ensayo
- Láminas portaobjetos
- Lápiz marcador
- Luna de reloj
- Matraz Erlenmeyer
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel kraft
- Pinzas
- Pipetas
- Placas de sílica gel
- Placas Petri
- Probetas
- Regla
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado
- Discos de sensibilidad
- Papel Whatman N°4
- Guantes quirúrgicos

B. REACTIVOS

- Acetato de Etilo
- Ácido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Anhídrido acético
- Agua destilada
- Alcohol etílico 96°
- Cloroformo
- Metanol
- N-butanol
- Tolueno
- Twen 80
- Vainillina
- Reactivo de Cloruro de Aluminio
- Reactivo de Cloruro Férrico
- Reactivo de Dragendorft A y B
- Reactivo de Liebermann Burchard
- Reactivo de Kovacs
- Peróxido de hidrogeno
- Alfa naftol
- Rojo de metilo
- Hidróxido de potasio
- Suero fisiológico
- Cristal violeta
- Lugol
- Acetona
- Safranina

C. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mac Conkey
- Agar Manitol Salado

- Agar Mueller Hilton
- Agar Sabouraud
- Agar triple azúcar hierro (TSI)
- Agar lisina hierro (LIA)
- Agar citrato de Simmons
- Caldo Peptona
- Caldo MRVP

D. EQUIPOS

- Autoclave
- Balanza analítica
- Equipo de Percolación.
- Estufa de incubación.
- Horno de esterilización.
- Lámpara de luz ultravioleta
- Mechero Bunsen.
- Microscopio.
- Refrigerador
- Rotavapor.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL ALGAL

A. RECOLECCIÓN

Las algas de *Lessonia nigrescens* (aracanto), fueron recolectadas de las zonas rocosas del mar de la localidad de Matarani, ubicado en la provincia de Islay. El material biológico recién extraído fue almacenado en bolsas Ziploc y transportadas en hielo hasta la ciudad de Arequipa. Un espécimen completo fue enviado al Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín para su identificación taxonómica. El resto de la muestra algal fresca fue destinado al ámbito de ejecución del presente estudio.

B. SELECCIÓN

Luego de recolectar la muestra algal se procedió a seleccionar las láminas que se encontraban en buen estado, retirando las láminas en mal estado, o cualquier material ajeno a nuestro objeto de estudio. Posteriormente fueron lavadas con agua potable y enjuagadas con agua destilada para la remoción de sales, arena y epífitos.

2.3.2. DESECACIÓN

Las muestras seleccionadas fueron desecadas en una estufa a 40 ° C durante 72 horas, una vez secas, se almacenaron en papel Kraft en ausencia de luz.

2.3.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRA

A. Molienda

Se realizó la trituración del material algal en un mortero de porcelana, posteriormente se utilizó un molino extractor de cuchillas y por medio de moliendas repetidas se obtuvo una pulverización moderada y homogénea.



Figura 10. Molienda de láminas de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) en un molino de cuchillas marca *Oster*

Finalmente, para optimizar la pulverización se tamizó a través un tamiz N° 20. Este material se conservó en papel Kraft debidamente rotuladas para su posterior uso.



Figura 11. Pulverización de láminas de *Lessonia nigrescens* (Aracanto)

2.3.4. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO DE PERCOLACIÓN

El principio de este procedimiento indica que se tiene que dar una maceración en la primera etapa, añadiendo de manera continua el disolvente para mantener la gradiente de concentración lo más alto posible. El disolvente corre de arriba hacia abajo a través de la droga, desplazando las sustancias extraídas sin que sea necesario aplicar presión (42).

Para cada extracción se pesaron 30 g de la muestra de *Lessonia nigrescens*, previamente pulverizada, luego se llevó a una botella ámbar, donde se colocó una torunda de algodón en la punta cubriéndose la parte superior con papel filtro para impedir que se revuelva el polvo de la droga, sujetadas con unas perlas de vidrio.

Luego se agregó el etanol al sistema de percolación hasta que todo el material vegetal se encuentre humectado, con un exceso de 2 cm. Después de 24 horas, se procedió a recolectar el extracto a goteo lento, haciendo uso de un equipo de venoclisis. Finalmente se recibió el extracto hasta llegar a un volumen de 150 mL por cada extracción (43). (Ver anexo 2)

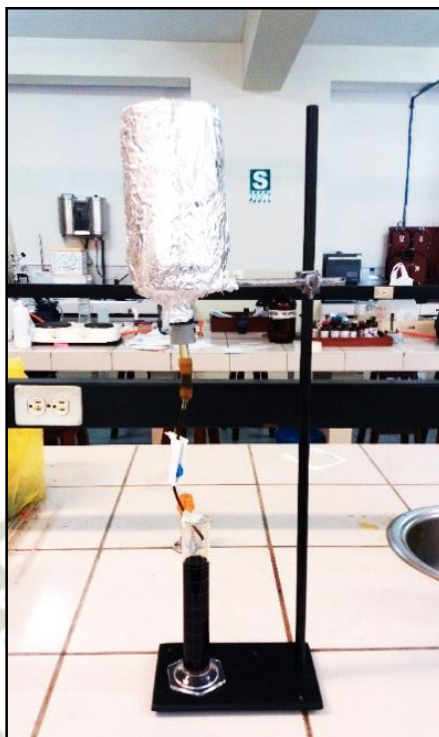


Figura 12. Sistema de Percolación usando solvente etanólico

2.3.5. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN

El porcentaje de rendimiento de extracción (% RE) o el porcentaje de sólidos solubles, se fundamenta en calcular la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto obtenido (44).

Con la finalidad de eliminar el disolvente, el extracto fue llevado a un equipo de rotavapor, y así obtener un extracto seco. Una vez obtenido el extracto por el método de percolación fue transferido a un balón de fondo redondo previamente pesado, posteriormente se transfirió el extracto a un vaso de precipitado también pesado, para continuar con el secado se llevó a baño maría para su evaporación completa.

Finalmente se procedió a calcular el rendimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso (g) del extracto seco}}{\text{Peso (g) del muestra seca}} \times 100$$

2.4. MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se utilizaron placas de silicagel como fase estacionaria, las cuales fueron divididas en 20 plaquitas de 3 x 10 cm y en cada una de ellas se trazó una línea horizontal a 1 cm de distancia del inicio en la placa cromatográfica. Luego se procedió a sembrar el extracto en cada placa de silicagel (fase estacionaria) con ayuda de un tubo capilar, se esperó unos minutos dejándolas secar.

Posteriormente se sumergió la placa en el disolvente o fase móvil hasta que ascienda a 1 cm de distancia del borde superior de las placas. Una vez secas se observó a la luz UV y para una mejor identificación se utilizaron reveladores. (Ver anexo 3)

2.4.1. Corrida General

Para la corrida general se usó como fase móvil una mezcla de acetato de etilo: metanol: agua en proporción de 6: 1.25: 0.25 y como revelador: ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 1% en etanol.

2.4.2. Identificación de Terpenos:

La identificación fue desarrollada usando como fase móvil tolueno: acetato de etilo (5:5) y como revelador: Reactivo de Liebermann-Burchard. Posteriormente se observó a luz UV a 254 nm.

2.4.3. Identificación de Taninos

Para identificación de Taninos se usó como fase móvil: metanol: agua (9:1) y como Revelador: cloruro férrico al 5% en etanol. Posteriormente se dejó secar a estufa a 100°C durante 10 minutos.

2.4.4. Identificación de Flavonoides

Para la identificación de flavonoides se usó como fase móvil al n-butanol: ácido acético: agua (7.5:2:0.5) y como revelador: cloruro de aluminio al 1 % en etanol. Posteriormente se observó a luz UV a 254 nm.

2.4.5. Identificación de Alcaloides

Finalmente, para la identificación de alcaloides se usó como fase móvil cloroformo: metanol (9.5: 0.5) y como revelador: Reactivo de Dragendorff, posteriormente se observó a luz UV a 254 nm.

2.5. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE REFERENCIA

El Factor de Referencia es la relación que existe entre las distancias recorridas por la muestra y por el eluyente desde el centro de la mancha, además que cada compuesto presenta un valor constante en condiciones cromatográficas específicas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.) (45,46).

Para calcular el Rf se aplicó la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}} \times 100$$

2.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

2.6.1. *Staphylococcus aureus*

La identificación de *S. aureus* se realizó mediante la tinción Gram y pruebas bioquímicas como la prueba de la catalasa, coagulasa, fermentación de manitol; que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus* (47).

A. Tinción Gram

Es la más utilizada en los laboratorios de bacteriología, de acuerdo a la estructura y grosor de su pared bacteriana permite diferenciar a las bacterias Gram positivas de las bacterias Gram negativas. Las Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicano y poseen una membrana externa (48).

- Se colocó 1 ó 2 gotas de agua destilada en una lámina de portaobjetos limpia.

- Con el asa de siembra previamente flameada se tomó una pequeña cantidad de cultivo bacteriano y se extendió sobre la lámina portaobjetos.
- Se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se realizó la fijación de las bacterias por calentamiento de la muestra con la finalidad de inactivarlas y adherirlas al vidrio para que no se pierdan durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina portaobjetos sobre un soporte de tinción, luego se cubrió con abundante colorante de cristal violeta durante 1 minuto. Se lavó con agua el exceso de colorante.
- Se cubrió la lámina portaobjetos con lugol durante 1 minuto, luego se lavó con agua el exceso de lugol.
- Se sostuvo la lámina portaobjetos entre el pulgar y el índice y se decoloró con alcohol acetona hasta que la preparación deje de perder cristal violeta durante 30 segundos, se lavó con agua para eliminar el resto de disolvente.
- Se cubrió la lámina portaobjetos con safranina durante 1 minuto, luego se lavó con agua para eliminar el colorante de contraste.
- Se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se observó al microscopio con el objetivo de 40X, posteriormente a 100X con aceite de inmersión.

B. Pruebas de Catalasa

Los estafilococos producen una enzima llamada catalasa, capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, dando la formación de burbujas de oxígeno. Esta prueba diferencia los estafilococos que son positivos de los *streptococcus* y *enterococcus* que son catalasa negativos (49).

Procedimiento

En una lámina portaobjetos se colocó una colonia de microorganismos, luego se agregó 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. Se observó la reacción.

Interpretación

La formación de burbujas se considera como prueba positiva.

C. Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una enzima producida por algunos microorganismos capaz de coagular el plasma (49), esta enzima actúa sobre la protrombina formando un complejo, el cual reacciona con el fibrinógeno para formar fibrina (50). Permite diferenciar *Staphylococcus aureus*, coagulasa positiva del resto de especies de *Staphylococcus*, que son coagulasa negativa.

Procedimiento

En un tubo de ensayo estéril, se colocó 0.5 mL de plasma, con el aza de col de añadió de 2 a 3 colonias del microorganismo. Se mezcló por rotación suave. Se incubó a 37°C observando el tubo cada 30 minutos en posición inclinada, sin agitarlo durante 4 horas.

Interpretación

La formación de un coágulo que no puede ser resuspendido por agitación se considera una reacción positiva.

D. Fermentación de manitol

Para dicha prueba se usa al agar manitol salado que es un medio selectivo y diferencial para aislar e identificar *S. aureus*. Contiene 1% de manitol y 7.5% de NaCl, rojo de fenol y peptonas. La alta concentración salina inhibe el desarrollo de otros microorganismos a excepción de los *enterococos*, permitiendo el crecimiento selectivo de los *estafilococos* (32).

Procedimiento

Se preparó el agar manitol salado. Se sembró en la superficie del agar un inóculo por el método de estría. Finalmente se dejó incubar en estufa durante 24 horas a 37°C. (Ver Anexo 4.1)

Interpretación

Las colonias de *S. aureus* se caracterizan por la presencia de una zona amarilla alrededor de las colonias, indicando la producción de ácido a partir del manitol.

2.6.2. *Escherichia coli*

A. Agar MacConkey

Es un medio selectivo, diferencial y utilizado con mayor frecuencia. Contiene cristal violeta para inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, permitiendo sólo el desarrollo de bacterias gramnegativas. Presenta una propiedad diferencial porque contiene un indicador de pH, rojo neutro (37).

Procedimiento

Se preparó el agar MacConkey, se sembró en la superficie del agar un inóculo por el método de estría. Finalmente se dejó incubar en estufa durante 24 horas a 37°C. (Ver Anexo 4.2)

Interpretación

Las bacterias capaces de fermentar la lactosa disminuyen el pH del medio por la formación de ácidos. Como resultado las bacterias fermentadoras de lactosa se observan de color rosa a rojo. Las bacterias no fermentadoras de lactosa permanecen incoloras y translúcidas.

B. Agar Triple azúcar hierro (TSI)

Es un medio de cultivo utilizado para determinar si los bacilos gramnegativos fermentan glucosa, lactosa o sacarosa y forman sulfuro de hidrogeno. El rojo fenol y el sulfato ferroso son indicadores de acidificación y formación de H₂S (37).

Procedimiento

Se sembró 2 a 3 colonias de *Escherichia coli* en agar TSI por punción hasta el fondo del tubo, estriando la superficie del pico de flauta. Posteriormente se dejó incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.

Interpretación

- **K/K:** Se observa un tubo de color rojo y no fermenta ninguno de los azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa).
- **K/A:** Se observa el pico de flauta de color rojo y el fondo del tubo de color amarillo, solo hay fermentación de glucosa.
- **A/A:** Todo el medio se acidifica, se observó el tubo de color amarillo, fermenta glucosa, sacarosa o lactosa con la producción de gas.

C. Agar lisina hierro (LIA)

Se utiliza para determinar si un bacilo gramnegativo tiene la capacidad de descarboxilar o desaminar la lisina; además formar ácido sulfhídrico (H₂S).

Fundamento

En el agar LIA la peptona y el extracto de levadura son los responsables de aportar los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, la lisina el sustrato que detecta la presencia de las enzimas carboxilasa y desaminasa. El citrato amónico férrico y tiosulfato de sodio son los indicadores para la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol, es el indicador de pH (50).

Procedimiento

Se sembró 2 a 3 colonias de *Escherichia coli* en agar LIA por punción dos veces hasta el fondo del tubo y luego estriando la superficie del pico de flauta. Posteriormente se dejó incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.

Interpretación:

- **K/K:** Se observó un tubo de color violeta, hay descarboxilación de la lisina sin fermentación de la glucosa, con producción o no de H₂S. Se interpreta como lisina positiva.

- **K/A:** Se observa el pico de flauta de color violeta y el fondo del tubo de color amarillo, hay fermentación de glucosa, con producción o no de H₂S. Se interpreta como lisina negativa, es decir no descarboxila, ni desamina la lisina.
- **R/A:** Se observa el pico de flauta de color rojo y el fondo del tubo de color amarillo, hay desaminación de lisina y fermentación de glucosa (50).

D. Prueba de rojo de metilo – Voges Proskauer (MR-VP)

Procedimiento

Se sembró el microorganismo de *Escherichia coli* en el caldo MRVP, luego se dejó incubar a 37°C durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se separó el caldo para la prueba Rojo Metilo y la prueba Vogues Proskauer.

A la prueba RM (rojo metilo) se le agregó 5 a 6 gotas de reactivo rojo de metilo, en 5 ml de caldo. Luego se realizó la lectura de inmediato.

A la prueba VP (voges-proskauer) se le agregó 6 gotas de solución alfa naftol al 5% y 2 gotas de hidróxido de potasio al 5%, en un mililitro de caldo. Se agitó bien el tubo después de agregar los reactivos, finalmente se dejó reposar durante 5 minutos.

La prueba de rojo metilo es positiva ya que se observó un color rojo brillante en la superficie del medio, indicador de fermentación ácida mixta.

La prueba de Voges Proskauer es negativa ya que se observa un color amarillo en la superficie del medio.

E. Prueba de agar Citrato de Simmons

Esta prueba determina si las bacterias son capaces de metabolizar el citrato como única fuente de carbono, también contiene fosfato de amonio como única fuente de fosfato y como indicador de pH azul de bromotimol. Cuando el microorganismo utiliza el citrato se libera iones de amonio que viran el medio de verde a azul (51).

Procedimiento

Se sembró 2 a 3 colonias de *Escherichia coli* en agar Citrato de Simmons por punción hasta el fondo del tubo y luego estriando la superficie del pico de flauta. Posteriormente se dejó incubar a 37°C durante 48 a 72 horas dejando los tubos destapados para que se desprenda el anhídrido carbónico.

Se observa una coloración verde, no hubo cambio de color ni crecimiento, lo cual indica que no hay utilización de citrato como fuente de carbono por lo tanto la prueba es negativa.

F. Caldo peptonado (INDOL)

Se emplea para captar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias, mediante la degradación del aminoácido triptófano a indol (51).

Procedimiento

Se sembró una muestra de microorganismo en caldo peptonado, se agitó y dejó incubar a 37°C durante 24 horas. Luego de la incubación se añadió 5 gotas del reactivo Kovacs. Se agitó suavemente. Finalmente se dejó unos minutos en reposo.

Se observó un anillo de color rojo en la superficie del caldo, indicando la presencia de la enzima triptofanasa, dando como resultado una prueba positiva (51).

2.6.3. *Cándida albicans*

A. Tinción Gram

El procedimiento fue el mismo que el empleado en el *S. aureus*.

B. Agar glucosado de Sabouraud

Este agar fue utilizado para favorecer el crecimiento de *Cándida albicans*.

(Ver Anexo 4.3)

C. Prueba del tubo germinal

Es una prueba sencilla, rápida, económica y de mayor aceptación, utilizada en un 90 a 95% para la identificación de *Cándida albicans*. Conocida también como prueba de filamentación en suero o filamentación precoz.

Procedimiento

Se tomó una colonia aislada y se suspendió en un tubo que contenía 0.5 mL de suero humano. Luego se incubó a 35°C durante 2 horas. Después de la incubación, se colocó una gota de la suspensión sobre un portaobjetos limpio, se colocó un cubreobjetos. Finalmente se observó a 40X.

La prueba es positiva si se llega a observar tubos germinales.

2.7. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

2.7.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Es la menor concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo. Se determinó por el método de dilución (52), se basa en emplear diferentes concentraciones de antibiótico en un medio líquido (caldo líquido) y la comprobación del crecimiento bacteriano a las diferentes concentraciones (53).

Después de la incubación se podrá observar que el tubo con la menor concentración de antimicrobiano que ha inhibido la bacteria y que no presenta turbidez determina la concentración mínima inhibitoria (CIM).

A. Preparación de la Solución madre del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (Aracanto)

Se preparó una solución del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) obtenido por el método de extracción por percolación a una concentración de 200 mg/mL.

En una probeta se agregó 3.4 g de extracto seco, al cual se le agregó tween 80 al 1% para diluir completamente la solución madre. Finalmente se enrazó con agua

desionizada hasta llegar a un volumen de 17 mL, obteniendo una concentración de 200 mg/mL.

B. Preparación del Inóculo

Se tomó 3 a 4 colonias de los microorganismos a evaluar (*Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Candida albicans*), para seguidamente ser diluidas en 5 mL de caldo peptonado hasta alcanzar la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la Escala de Mac Farland, la cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL.

Luego se realizó una dilución 1/100 del inóculo para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL. De esta solución se tomó 100 μ L y se inoculó en cada uno de los tubos.

Fue necesario usar luz apropiada y colocar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste para una mejor visualización.

C. Preparación de las Diluciones

Se preparó las diluciones para los 3 microorganismos de cada especie, cada batería consta de 8 tubos, donde a cada tubo se agregó 1 mL. de caldo peptonado,

Tubo 1: Se añadió 1000 μ L de caldo peptonado con 1000 μ L de solución madre (Extracto de 200 mg/mL), retirando 1000 μ L de esta solución al tubo 2, se adicionaron 100 μ L de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final de 100 mg/mL de extracto.

Tubo 2: Se añadió 1000 μ L de caldo peptonado con los 1000 μ L retirados del tubo 1 antes de adicionar el inóculo. Retirando 1000 μ L de esta solución al tubo 3, luego se adicionaron 100 μ L de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final de 50 mg/mL del extracto.

Tubo 3: Se añadió 1000 μ L de caldo peptonado con los 1000 μ L retirados del tubo 2 antes de adicionar el inóculo. Retirando 1000 μ L de esta solución al tubo 4, se adicionaron 100 μ L de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final de 25 mg/mL del extracto.

Tubo 4: Se añadió 1000 μL de caldo peptonado con los 1000 μL retirados del tubo 3 antes de adicionar el inóculo. Retirando 1000 μL de esta solución al tubo 5, se adicionaron 100 μL de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final de 12.5 mg/mL del extracto.

Tubo 5: Se añadió 1000 μL de caldo peptonado con los 1000 μL retirados del tubo 4 antes de adicionar el inóculo. Retirando 1000 μL de esta solución al tubo 6, se adicionaron 100 μL de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final 6.25 mg/mL de extracto.

Tubo 6: Se añadió 1000 μL de caldo peptonado con los 1000 μL retirados del tubo 5 antes de adicionar el inóculo. Retirando 1000 μL de esta solución al tubo 7, se adicionaron 100 μL de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final 3.125mg/mL de extracto.

Tubo 7: Se añadió 1000 μL de caldo peptonado con los 1000 μL retirados del tubo 6 antes de adicionar el inóculo. Retirando 1000 μL de esta solución al tubo 8, se adicionaron 100 μL de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL lográndose una concentración final 1.562 mg/mL de extracto.

Tubo 8: Fue el control positivo al cual se le agregó 1000 μL de caldo peptonado con 100 μL de inóculo bacteriano de 10^6 UFC /mL.

Tabla 2. Diluciones para hallar la Concentración Inhibitoria Mínima de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Tubos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	C(+)
Concentración (mg/mL)	100.00	50.00	25.00	12.50	6.25	3.13	1.56	-
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Extracto Solución madre (µL) [Solo al primer tubo]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
Caldo peptonado (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Inóculo (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100
<ul style="list-style-type: none"> - Solución madre (200 mg/ml) - Incubar a 37°C durante 24 horas. 								

Fuente. Elaboración propia

Tabla 3. Diluciones para hallar la Concentración Inhibitoria Mínima de *Cándida albicans*

Tubos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	C(+)
Concentración mg/mL.	100.00	50.00	25.00	12.50	6.25	3.13	1.56	-
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Extracto Solución madre (µL) [Solo al primer tubo]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
Caldo Sabouraud (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Inóculo (µL)	100	1000	1000	1000	1000	1000	1000	100
<ul style="list-style-type: none"> - Solución madre (200 mg/ml) - Incubar a 37°C durante 24 horas. 								

Fuente. Elaboración propia

2.7.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CMB) y Concentración Fungicida Mínima (CMF)

Se definen como la menor concentración del antimicrobiano capaz de eliminar a más del 99.9 % de los microorganismos (54).

Método de Dilución en placa

Para determinar la CBM y CFM se realizó la siembra por agotamiento a partir de los tubos que se emplearon en la CMI donde no se observó crecimiento bacteriano, previamente se preparó los agares para los microorganismos en estudio. Agar Mueller Hinton para *Staphylococcus aureus* y *Echerichi coli* y agar *Sabouraud* para *Cándida albicans*.

Las placas se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C. Finalmente se observó el crecimiento bacteriano.

2.7.3. Determinación de la Sensibilidad antimicrobiana y antifúngica

Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se utilizó el método Kirby Bauer.

Método Disco

Se basa en impregnar diversas concentraciones de los extractos en discos para luego ponerla en contacto con la superficie del agar. La actividad de la sustancia se evalúa midiendo el halo de inhibición.

Sembrado

Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión del inóculo, luego se retiró presionando sobre las paredes del tubo, con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

Se sembró de manera homogénea de derecha a izquierda cubriendo toda la superficie de la placa. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos con extractos.

Adición de los extractos

Se realizó diluciones sucesivas de los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (aracanto), conforme a un cuadro de diluciones. Luego los discos de papel filtro esterilizados fueron sumergidos en tubos de diferentes concentraciones de 100, 75, 50 y 25 mg/mL.

Posteriormente, los discos fueron extraídos y colocados en los medios previamente sembrados con los microorganismos en estudio. Se dejaron los discos por 1 minuto antes de invertir las placas y ser llevadas a incubación durante 24 horas a 37°C.

Finalmente se midió los diámetros de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco, utilizando un vernier y se expresaron los resultados en milímetros.





CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans* que fueron obtenidas de Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional Honorio Delgado de la ciudad de Arequipa y los resultados se presentan en detalle en el presente capítulo.

1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Lessonia nigrescens (Aracanto) procedente de la localidad de Matarani, ubicado en la provincia de Islay, fueron trasladadas al Área de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de la ciudad de Arequipa, donde fue debidamente identificado en el “Herbario Arequipensis”, certificando que dicha especie pertenece a *Lessonia nigrescens* (Ver Anexo 1).

2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

Posterior a su identificación como *Lessonia nigrescens* (Aracanto) se procedió con la obtención del extracto etanólico por el método de percolación usando la muestra algal.

Una vez obtenido el extracto, fue llevado a un equipo de rotavapor (Figura 14) para recuperar el solvente y concentrar la muestra, posteriormente usando Baño María se completó la evaporación del solvente hasta sequedad y así calcular su rendimiento. Para evaluar el rendimiento se realizó tres repeticiones para la extracción.

Tabla 4. Rendimiento del extracto seco de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) obtenido por percolación

Extracciones	Muestra (g)	Extracto seco (g)	Rendimiento (%)
1	30	3.4727	11.58
2	30	3.4645	11.55
3	30	3.5210	11.74
Promedio (g)			11.62
Desviación estándar			0.102
Coefficiente de variación (%)			0.88

Fuente. Elaboración propia

En la Tabla 4 se observan los resultados obtenidos de los rendimientos porcentuales luego de las tres extracciones, dando como resultado un rendimiento promedio de 11.62 ± 0.10 %.



Figura 13. Concentración del extracto para determinar el rendimiento del extracto seco de *Lessonia nigrescens* por percolación

Wong et al. (2018) indica que en su investigación no encontró diferencia significativa en cuanto a la Concentración Bactericida Mínima en los extractos obtenidos por maceración, percolación y Soxhlet (55), en la presente investigación se optó por trabajar con el método de percolación del material algal correspondiente a *Lessonia nigrescens*.

2.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lessonia nigrescens* (Aracanto)

El extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) presenta un color verde oscuro, aspecto viscoso, olor característico y sabor amargo.

3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

Obtenido el extracto etanólico se realizó un análisis por CCF, con la finalidad de identificar las principales familias de metabolitos secundarios obteniendo los siguientes resultados:

3.1. IDENTIFICACIÓN GENERAL

Para la identificación general se sembró el extracto en las placas de Sílica gel usando como fase móvil acetato de etilo: metanol: agua en proporción de 6: 1.25: 0.25 y como reveladores Ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 1% en etanol.

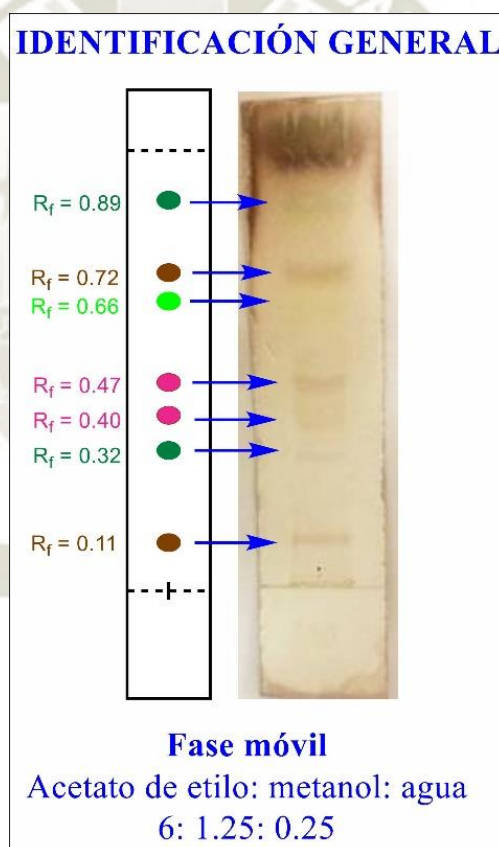


Figura 14. Identificación general de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina

En la placa cromatográfica de la Figura 14 se observan manchas rosadas, ccafé, verdes claras y oscuras. Los factores de referencia obtenidos son 0.11, 0.32, 0.40, 0.47, 0.66, 0.72 y 0.89.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS

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

En la placa cromatográfica de la Figura 15 se observan los factores de referencia con manchas rosadas características. Los R_f identificados fueron 0.19, 0.34 y 0.58, se presume la presencia de monoterpenos y diterpenos.

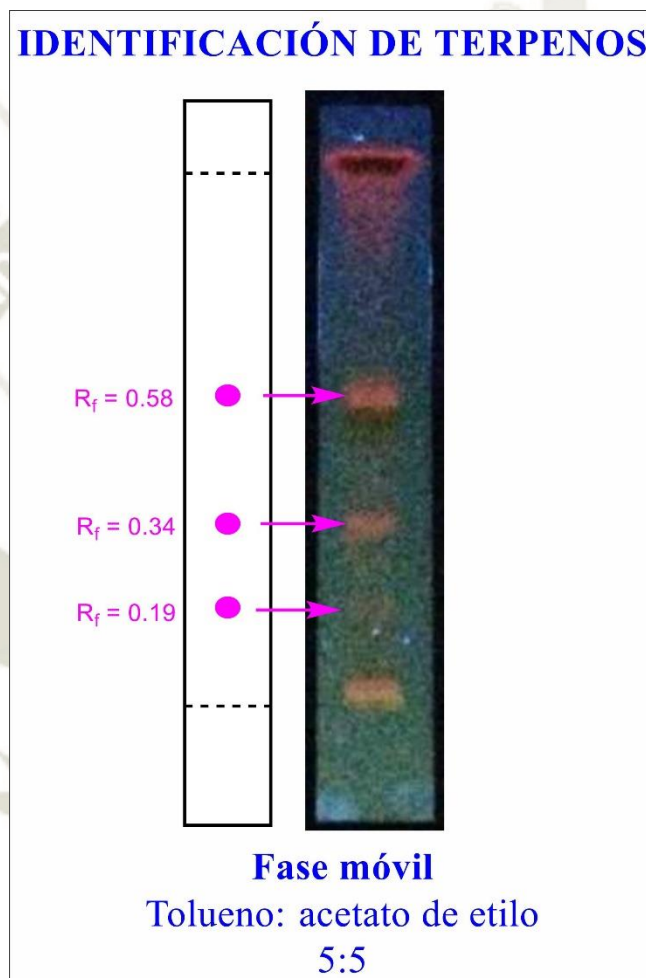


Figura 15. Identificación de terpenos por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de *Lessonia nigrescens*

3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Para la identificación de taninos se utilizó una fase móvil metanol: agua (9:1) y como revelador cloruro férrico al 5% en etanol y dio como resultados manchas

verdes y marrones claras. Los taninos presentan colores característicos que varían de color verde a marrón (JEAN BRUNETON, 2004)

En la placa cromatográfica de la Figura 16 se observan los factores de referencia de 0.65 y 0.68, se presume la presencia de taninos.

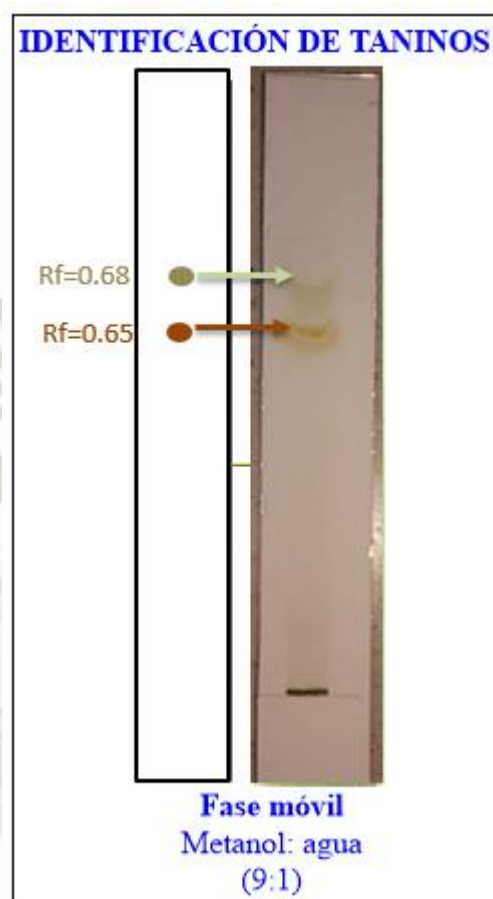


Figura 16. Identificación de taninos por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de *Lessonia nigrescens*

3.2.2. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la identificación de flavonoides se utilizó una fase móvil n-butanol: ácido acético: agua (7.5:2:0.5) y como revelador cloruro de aluminio al 1 % en etanol, seguidamente se sometió la placa a radiación UV de 366 nm, dando como resultado la visibilidad de una mancha de color celeste fluorescente con un factor de referencia de 0.62 como se muestra en la Figura 17.

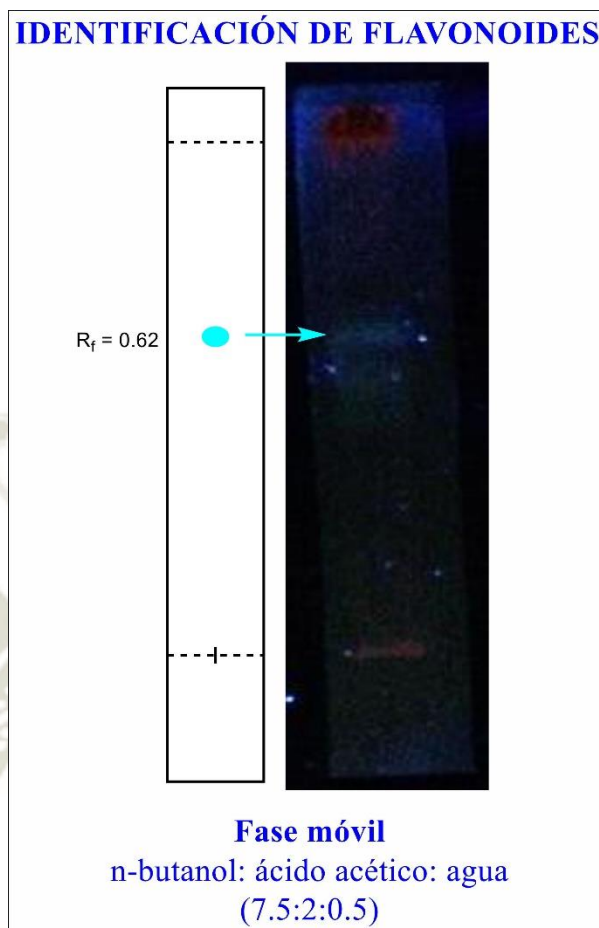


Figura 17. Identificación de flavonoides por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de *Lessonia nigrescens*

Los flavonoides se están convirtiendo en el tema de la investigación médica. Se ha informado que poseen muchas propiedades útiles, que incluyen actividad antiinflamatoria, actividad estrogénica, inhibición enzimática, actividad antimicrobiana (56,57), actividad antialérgica, actividad antioxidante (58), actividad vascular y actividad antitumoral citotóxica (59).

3.2.3. Identificación de Alcaloides

Para la identificación de alcaloides se utilizó una fase móvil de cloroformo: metanol (9.5: 0.5) y como revelador al Reactivo de Dragendorff.

En la placa cromatográfica de la Figura 18 se observa manchas de color oscuro, no hubo variación de color, dando como resultado negativo para alcaloides.



Figura 18. Identificación de alcaloides por Cromatografía en Capa Fina presentes en el extracto de *Lessonia nigrescens*

Tabla 5. CUADRO DE COMPARACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

METABOLITOS	IDENTIFICACIÓN
Terpenos	+++
Taninos	++
Flavonoides	++
Alcaloides	-

Fuente. Elaboración propia

- +++ Mayor presencia de Rf encontrados en la identificación de Terpenos en CCF
- ++ Menor presencia de Rf encontrados en la identificación de taninos y flavonoides en CCF
- Resultado negativo para alcaloides.

4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Tabla 6. Resultados de las Pruebas Bioquímicas

<i>Escherichia Coli</i>	
Coloración Gram	Bacilos Gram Negativos
Agar MacConkey	Colonias rosas a rojas, fermentadoras de lactosa
Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)	A/A
Agar Lisina Hierro (LIA)	K/K
Prueba de Rojo de Metilo-Voges Proskauer	RM (+) VP(-)
Agar Citrato de Simmons	Negativo
Caldo Peptonado (INDOL)	Positivo
<i>Staphylococcus auerus</i>	
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en forma de racimos
Prueba de Catalasa	Prueba Positiva
Prueba de Coagulasa	Prueba Positiva
Agar Manitol salado	Fermentación, Colonias amarillas
<i>Cándida Albicans</i>	
Coloración Gram	Levaduras, Gram positivas
Agar Sabouraud	Colonias lisas, beige.
Prueba de Tubo Germinativo	Presencia de tubos germinativos

Fuente. Elaboración propia

En la tabla anterior se muestra la identificación de los microorganismos obtenidos del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional Honorio Delgado de la ciudad de Arequipa.

En dicha tabla se muestra como resultado luego de realizar las pruebas bioquímicas correspondientes a cada microorganismo, se lograron identificar a las especies como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. (Ver anexo 5,6 y 7).

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos luego de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto en estudio, se presenta a continuación:

5.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Escherichia coli*

En la Tabla 7 se observan los resultados en porcentaje de los microorganismos que crecen y no crecen en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* por el método de dilución en caldo, donde N corresponde al número de microorganismos estudiados que en total son 10 cultivos de *Escherichia coli*.

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria de extracto de *Lessonia nigrescens* sobre microorganismos de *Escherichia coli*

Concentración de extracto	No Crece		Crece	
	N	%	N	%
100 mg/mL	10	100	0	0
50 mg/mL	10	100	0	0
25 mg/mL	6	60	4	40
12.5 mg/mL	0	0	10	100
6.25 mg/mL	0	0	10	100
3.125 mg/mL	0	0	10	100
1.563 mg/mL	0	0	10	100
Control (+)	0	0	10	100

Fuente. Elaboración propia
N: Número de pacientes

En la tabla anterior se observa que la concentración mínima del extracto de *Lessonia nigrescens* a la cual se inhibe el crecimiento del 100 % de los microorganismos de *Escherichia coli* estudiados, es de 50 mg/mL (CIM). (Ver Anexo 8).

5.2. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Escherichia coli*

En la Tabla 8 se observan los resultados en porcentaje de los microorganismos que crecen y no crecen luego de sembrar los tubos 1, 2, 3 y 4 del ensayo de CIM donde N corresponde al número de microorganismos estudiados que en total son 10 cultivos de *Escherichia coli*.

Tabla 8. Concentración Bactericida mínima de extracto de *Lessonia nigrescens* sobre cepas de *Escherichia coli*

Concentración de extracto	No Crece		Crece	
	N	%	N	%
100 mg/mL	10	100	0	0
50 mg/mL	8	80	2	20
25 mg/mL	0	0	10	100
12.5 mg/mL	0	0	10	100
Control (+)	0	0	10	100

Fuente. Elaboración propia
N: Número de pacientes

En la tabla anterior se observa que la concentración mínima del extracto de *Lessonia nigrescens* necesaria para eliminar el 99.9 % de los microorganismos de *Escherichia coli* estudiados, es de 100 mg/mL (CBM). (Ver Anexo 9)

5.3. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE *Escherichia coli* AL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

En la Tabla 9 se observan los resultados del Análisis de Varianza luego de evaluar la sensibilidad de los halos de inhibición presentados en el Anexo 9 donde se evaluaron diferentes concentraciones del extracto de 25, 50, 75 y 100 mg/mL, así como ciprofloxacino y amikacina como control.

Cabe señalar que los discos de sensibilidad fueron obtenidos al sumergirlos en diferentes diluciones del extracto etanólico *Lessonia nigrescens* (aracanto).

Tabla 9. Análisis de Varianza (ANOVA) sensibilidad antibacteriana de *Escherichia coli* al extracto etanólico *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2463.5	5	492.71	305.11	0.000
Intra grupos	87.2	54	1.62		
Total	2550.7	59			

Fuente. Elaboración propia
Desv. Estándar: 6.42
Moda: 11
Media: 12.93
Mediana: 11.50

En la tabla anterior se nota que el valor de la probabilidad p es menor a 0.05 por lo cual al menos un grupo de tratamiento es diferente en cuanto a la sensibilidad producida al 95 % de confianza.

Por lo expuesto, se procedió a realizar la prueba de confirmación de HSD de Tukey la cual indica el ciprofloxacino y la amikacina con halos de inhibición promedio de 19.6 mm y 21.6 mm de diámetro en las diez microorganismos de *Escherichia coli* estudiados, poseen mejor efecto que los extractos al diferir estadísticamente al 95 %.

Además, se nota que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de los extractos etanólicos de 25, 50 mg/mL; así como 75 y 100 mg/mL en cuanto a la sensibilidad obtenida frente a *Escherichia coli* al 95 % de confianza.

Tabla 10. Test de HSD de Tukey de la sensibilidad antibacteriana de *Escherichia coli* al extracto etanólico *Lessonia nigrescens*

Tratamiento	Casos	Media Halo de Inhibición (mm)	Grupos Homogéneos
25 mg/mL	10	6	A
50 mg/mL	10	7.4	A
75 mg/mL	10	11.2	B
100 mg/mL	10	12.8	B
Ciprofloxacino	10	19.6	C
Amikacina	10	21.6	C

Fuente. Elaboración propia

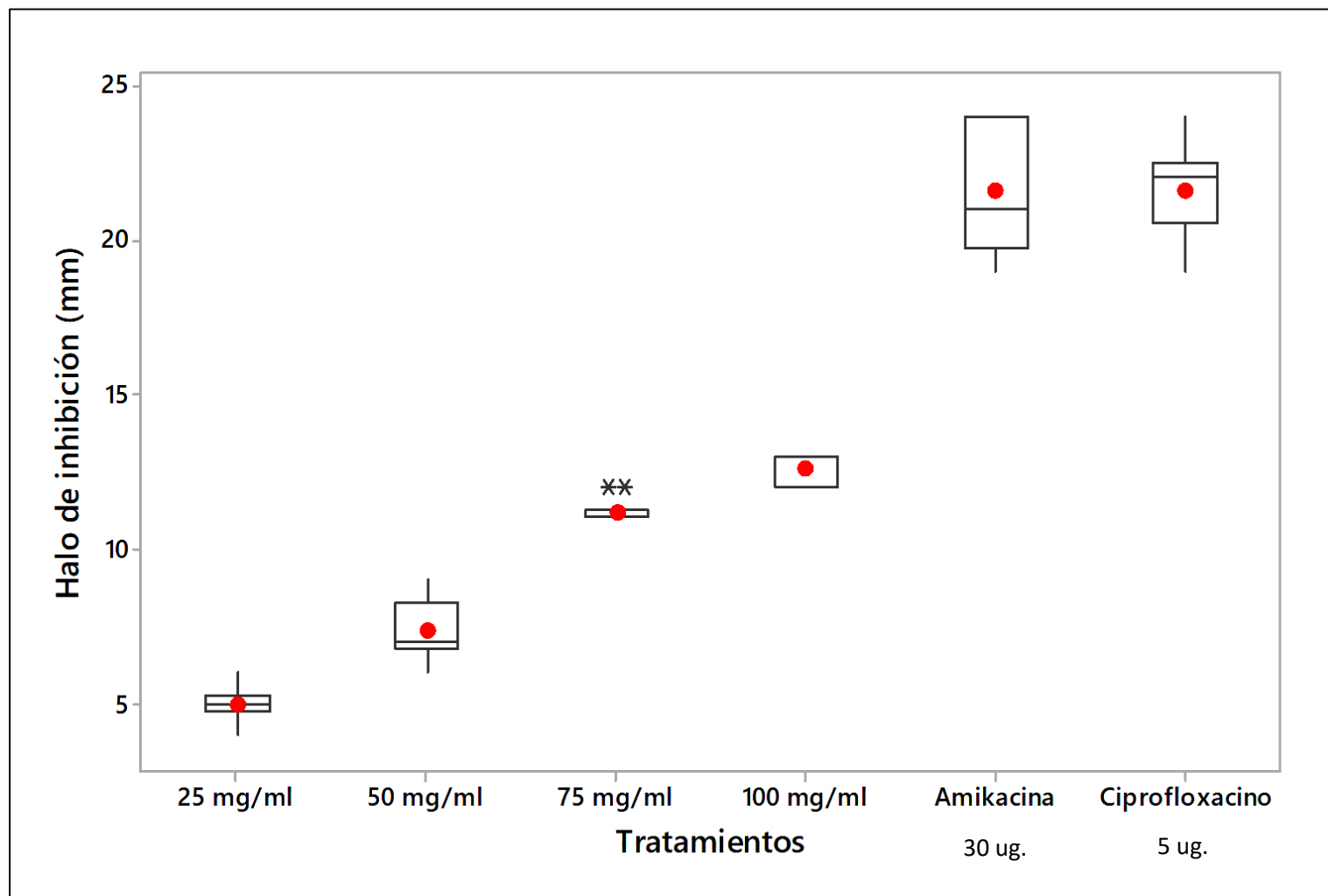


Figura 19. Diagrama de Cajas y Bigotes correspondiente a los tratamientos para evaluar la sensibilidad antibacteriana de *Escherichia coli* al extracto etanólico *Lessonia nigrescens* y comparada con amikacina y ciprofloxacino.

En la Figura 19 y Tabla 9 se observa que a una concentración de 25 mg/mL hay un halo de inhibición promedio (HIP) de 6 mm de diámetro, a una concentración de 50 mg/mL hay un HIP de 7.4 mm de diámetro, a una concentración de 75 mg/ mL hay un HIP de 11.2 mm de diámetro, a una concentración de 100 mg/ mL hay un HIP de 12.8 mm de diámetro; concluyendo que a medida que incrementa la concentración del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* la sensibilidad de *Escherichia coli* aumenta; sin embargo no se compara con la sensibilidad de los antibióticos amikacina y ciprofloxacino que muestran un HIP de 19.6 mm y 21.6 mm de diámetro respectivamente.

6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Los resultados obtenidos luego de la evaluación de actividad antibacteriana del extracto en estudio, se presenta a continuación:

6.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 11 se observan los resultados en porcentaje de los microorganismos que crecen y no crecen en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* por el método de dilución en caldo, donde N corresponde al número de microorganismos estudiados con un total de 10 cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 11. Concentración Inhibitoria Mínima de extracto de *Lessonia nigrescens* sobre microorganismos de *Staphylococcus aureus*

Concentración de extracto	No Crece		Crece	
	N	%	N	%
100 mg/ml	10	100	0	0
50 mg/ml	10	100	0	0
25 mg/ml	10	100	0	0
12.5 mg/ml	6	60	4	40
6.25 mg/ml	0	0	10	100
3.125 mg/ml	0	0	10	100
1.563 mg/ml	0	0	10	100
Control (+)	0	0	10	100

Fuente. Elaboración propia

*N: Número de pacientes

En la tabla anterior se observa que la concentración mínima del extracto de *Lessonia nigrescens* a la cual se inhibe el crecimiento del 100 % de los microorganismos de *Staphylococcus aureus* estudiados, es de 25 mg/mL (CIM). (Ver Anexo 8)

6.2. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 12 se observan los resultados en porcentaje de los microorganismos que crecen y no crecen, luego de sembrar los tubos 1, 2, 3 y 4 del ensayo de CIM donde N corresponde al número de microorganismos estudiados que en total son 10 cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 12. Concentración Bactericida Mínima de extracto de *Lessonia nigrescens* sobre microorganismos de *Staphylococcus aureus*

Concentración de extracto	No Crece		Crece	
	N	%	N	%
100 mg/ml	10	100	0	0
50 mg/ml	10	100	0	0
25 mg/ml	10	100	0	0
12.5 mg/ml	6	60	4	40
Control (+)	0	0	10	100

Fuente. Elaboración propia

*N: Número de pacinetes

En la tabla anterior se observa que la concentración mínima del extracto de *Lessonia nigrescens* necesaria para eliminar el 99.9 % de las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas, es de 25 mg/mL (CBM). (Ver Anexo 9).

6.3. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE *Staphylococcus aureus* AL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

En la Tabla 13 se observan los resultados del Análisis de Varianza luego de evaluar la sensibilidad de los halos de inhibición presentados en el Anexo 9, donde se evaluaron diferentes concentraciones del extracto de 25, 50, 75 y 100 mg/mL, así como vancomicina y amoxicilina + ácido clavulánico.

Cabe señalar que los discos de sensibilidad fueron obtenidos al sumergirlos en diferentes diluciones del extracto etanólico *Lessonia nigrescens* (Aracanto).

Tabla 13. Análisis de Varianza (ANOVA) sensibilidad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* al extracto etanólico *Lessonia nigrescens* (ARACANTO)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4161.3	5	832.26	826.15	0.000
Intra grupos	54.4	54	1.007		
Total	4215.7	59			

Fuente. Elaboración propia

Desv. Estándar: 8.43

Moda: 15

Media: 17.23

Mediana: 14.50

En la tabla anterior se nota que el valor de la probabilidad p es menor a 0.05 por lo cual al menos un grupo de tratamiento es diferente al 95 % de confianza.

Por lo expuesto, se procedió a realizar la prueba de confirmación de HSD de Tukey la cual indica que la vancomicina y amoxicilina + ácido clavulánico con halos de inhibición promedio de 23 mm y 32.6 mm de diámetro respectivamente en diez microorganismos de *Staphylococcus aureus* estudiados posee mejor efecto que los extractos al diferir estadísticamente al 95 % de los mismos. Por otro lado también se nota que si existe diferencia significativa en el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/mL

Tabla 14 Test de Tukey HSD de la sensibilidad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* al extracto etanólico *Lessonia nigrescens* (Aracanto)

Tratamiento	Casos	Media Halo de Inhibición (mm)	Grupos Homogéneos
25 mg/mL	10	7.8	A
50 mg/mL	10	11	B
75 mg/mL	10	13.6	C
100 mg/mL	10	15.4	D
Vancomicina	10	23	E
Amoxicilina + ácido clavulánico	10	32.6	F

Fuente. Elaboración propia

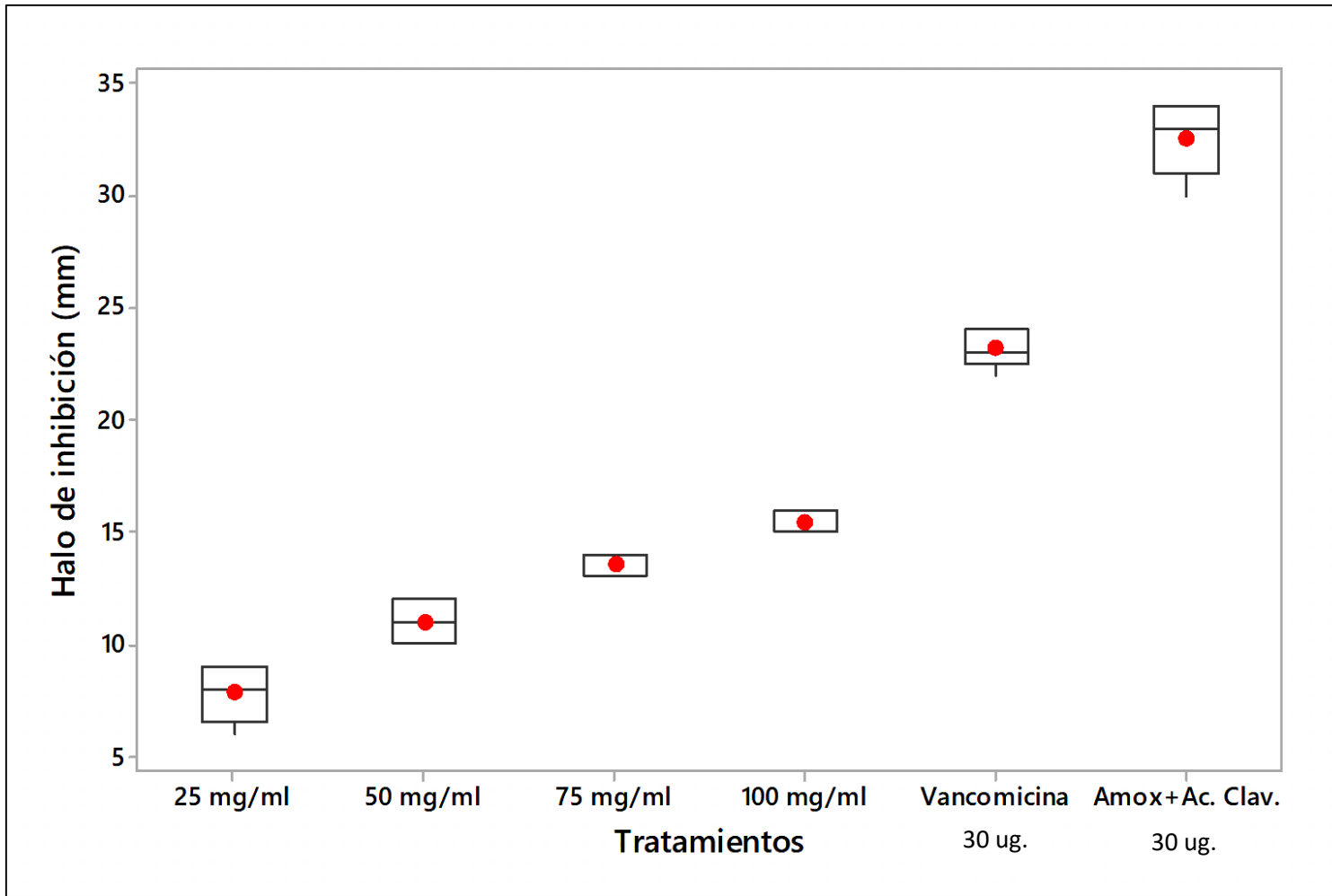


Figura 20. Diagrama de Cajas y Bigotes correspondiente a los tratamientos para evaluar la sensibilidad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* al extracto etanólico *Lessonia nigrescens* y comparada con vancomicina y amoxicilina + ácido clavulánico.

En la Figura 20 se observa que a una concentración de 25 mg/mL hay un HIP de 7.8 mm de diámetro, a una concentración de 50 mg/mL hay un HIP de 11mm de diámetro, a una concentración de 75 mg/mL hay un HIP de 13.6 mm de diámetro, a una concentración de 100 mg/mL hay un HIP de 15.4 mm de diámetro; concluyendo que a medida que incrementa la concentración del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens nigrescens* la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* aumenta; sin embargo no se compara con la sensibilidad de los antibioticos Vancomicina y Amoxicilina + ácido clavulánico que muestran un HIP de 23 mm y 32.6 mm de diámetro respectivamente.

7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Cándida albicans*

Los resultados obtenidos luego de la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto en estudio, se presentan a continuación:

7.1. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Cándida albicans*

En la Tabla 15 se observan los resultados en porcentaje de los microorganismos que crecen y no crecen en presencia de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* por el método de dilución en caldo, donde N corresponde al número de microorganismos estudiados, con un total de 10 cultivos de *Cándida albicans*.

Tabla 15. Concentración Mínima Inhibitoria de extracto de *Lessonia nigrescens* sobre microorganismos de *Cándida albicans*

Concentración de extracto	No Crece		Crece	
	Nº	%	Nº	%
100 mg/ml	10	100	0	0
50 mg/ml	0	0	10	100
25 mg/ml	0	0	10	100
12.5 mg/ml	0	0	10	100
6.25 mg/ml	0	0	10	100
3.125 mg/ml	0	0	10	100
1.563 mg/ml	0	0	10	100
Control (+)	0	0	10	100

Fuente. Elaboración propia

*N: Número de pacientes

En la tabla anterior se observa que la concentración mínima del extracto de *Lessonia nigrescens* a la cual se inhibe el crecimiento del 100 % de los microorganismos de *Cándida albicans* estudiadas, es de 100 mg/mL (CIM). (Ver Anexo 8).

7.2. CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) FRENTE A *Cándida albicans*

En la Tabla 16 se observan los resultados en porcentaje de los microorganismos que crecen y no crecen luego de sembrar los tubos 1, 2, 3 y 4 del ensayo de CIM donde N corresponde al número de microorganismos estudiados que en total son 10 cultivos de *Cándida albicans*. (Ver Anexo 9).

Tabla 16. Concentración Fungicida Mínima de extracto de *Lessonia nigrescens* frente a microorganismos de *Cándida albicans*

Concentración De Extracto	No Crece		Crece	
	N°	%	N°	%
100 mg/ml	0	0	10	100
50 mg/ml	0	0	10	100
25 mg/ml	0	0	10	100
12.5 mg/ml	0	0	10	100
Control (+)	0	0	10	100

Fuente. Elaboración propia

*N:Número de pacientes

En la tabla anterior se observa que el extracto de *Lessonia nigrescens* a las concentraciones estudiadas no logró eliminar a los microorganismos de *Cándida albicans* estudiadas, por lo cual no se hizo estudios de sensibilidad al no presentar un efecto significativo.

Cushie (2005), indica que numerosos grupos de investigación han tratado de dilucidar los mecanismos de acción antibacterianos de los flavonoides. La actividad de la quercetina, por ejemplo, se ha atribuido al menos parcialmente a la inhibición de la girasa del ADN. También se ha propuesto mecanismos de inhibición de la función de la membrana citoplásmica, inhibición del metabolismo energético (60). Dichos mecanismos estudiados por Cushie podrían justificar la actividad antibacteriana del extracto de *Lessonia nigrescens* ya que se encontró presencia de flavonoides.

En cuanto a los Taninos varios mecanismos podrían explicar el efecto en la inhibición del crecimiento bacteriano, como la desestabilización de la membrana citoplásmica, la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, la inhibición de las enzimas microbianas extracelulares, acciones directas sobre el metabolismo microbiano o la privación de los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano, especialmente micronutrientes minerales esenciales como como el hierro y el zinc (a través de la quelación de proantocianidina con los metales), cuyo agotamiento puede limitar gravemente el crecimiento bacteriano (61,62). En la presente investigación se al igual que los flavonoides, también se encontraron presencia de taninos que podrían contribuir al efecto antibacteriano encontrado frente a *E. coli* y *S. aureus*.

Por otro lado, Yoshihiro (2004), evaluó la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, encontrando que los terpenos propician la salida de iones K^+ los cuales brindan a estos metabolitos efectos antibacterianos (63). Dichos hallazgos por Yoshihiro respaldaría el efecto antibacteriano hallado en la presente investigación.

Por otro lado, Xie et al. (2015) encontró que los hidroxilos en sitios especiales en los anillos aromáticos de los flavonoides mejoran la actividad. Sin embargo, la metilación de los grupos hidroxilo activos generalmente disminuye la actividad. Los sustituyentes hidrófobos, tales como grupos prenilo, cadenas de alquilamino, cadenas de alquilo y restos heterocíclicos que contienen nitrógeno u oxígeno, generalmente aumentan la actividad de todos los flavonoides. Los mecanismos antibacterianos propuestos de los flavonoides son los siguientes: inhibición de la síntesis de ácido nucleico, inhibición de la función de la membrana citoplásmica, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de la porina en la membrana celular, alteración de la permeabilidad de la membrana, y atenuación de la patogenicidad (66). Estos hallazgos explican la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* frente a *S. aureus* y *E coli* encontradas.

Farhadi et al. (2019) indica que, según los informes de la Organización Mundial de la Salud, la resistencia de las bacterias a antibióticos es un importante desafío para la salud mundial ahora y en el futuro, por ello, se han propuesto diferentes estrategias para abordar este problema, incluida la inhibición de resistencia a múltiples fármacos y el desarrollo de nuevos antibióticos con un nuevo mecanismo de acción. Los flavonoides son una gran clase de compuestos naturales, se han estudiado ampliamente por su

actividad antibacteriana y se han publicado más de 150 artículos sobre este tema desde 2005. El enfoque principal de estudios previos fue la evaluación de la actividad antibacteriana de los flavonoides aislados en diferentes cepas de bacterias, especialmente MRSA y *E. coli* (65).

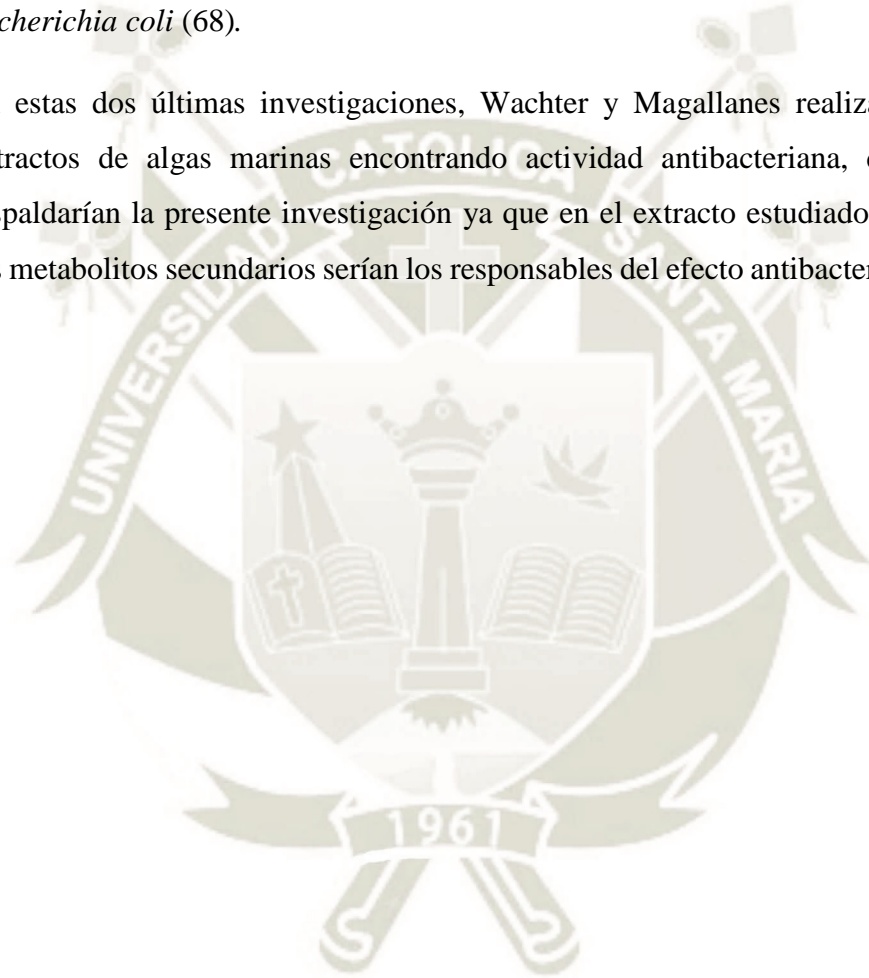
Otro metabolito responsable en muchos casos de la actividad terapéutica es la quercetina, que se ha utilizado en muchos ensayos clínicos excepto para la actividad antibacteriana y ha pasado con éxito los ensayos clínicos de fase 1. La quercetina mostró una notable actividad sinérgica en combinación con medicamentos de referencia y se puede usar de forma segura para futuros estudios (65). En la presente investigación se aporta con resultados preliminares sobre la actividad antibacteriana frente a microorganismos de pacientes y se evidenció dicha actividad, sin embargo, es necesario realizar mayores estudios como el aislamiento de componentes activos.

Según Fuertes et al (2016) la actividad antimicrobiana es determinada por la presencia de flavonoides y la actividad antifúngica por los alcaloides. La mayor inhibición se debe al extracto alcohólico por la presencia de flavonoides y alcaloides; con similar o igual poder de inhibición contra Gram positivos y Gram negativos, la acción antimicrobiana se debería a que los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipitan las proteínas protoplasmáticas. La acción antibacteriana y antifúngica de los alcaloides se podría deber a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida (67). En la presente investigación no se logró encontrar actividad antifúngica contra *Cándida albicans* se podría deber a la ausencia de alcaloides en el extracto etanólico de *Lessonia nigrescens*.

En otra investigación realizada por Wachter et al. (2001), se logró identificar y aislar fisisterol y saringosterol de un extracto metanólico de *Lessonia nigrescens*, para luego determinar la actividad antitubercular contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), encontrando valores de CMI de 0.25, 1.00 y 0.125 $\mu\text{g/mL}$ de saringosterol (64). En la presente investigación se logró encontrar actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus* CMI 50 mg/mL y 25 mg/mL respectivamente. Este hallazgo hecho por Wachter podría respaldar a la presente investigación ya que en el extracto estudiado podría existir la presencia de saringosterol que en conjunto con los flavonoides, taninos y terpenos sean responsables del efecto antibacteriano encontrado.

Magallanes et al. (2003), estudió la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de 12 especies de macroalgas marinas de las cuales solamente 5 (*Grateloupia doryphora*, *Ahnfeliopsis durvillaei*, *Prionitis decipiens*, *Petalonia fascia* y *Bryopsis plumosa*) presentaron algún efecto antibacteriano frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la cepa no clínica *Staphylococcus aureus* ATCC 6633. En la presente investigación se encontró actividad antibacteriana del extracto de *Lessonia nigrescens* frente a cepas clínicas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (68).

En estas dos últimas investigaciones, Wachter y Magallanes realizaron estudios en extractos de algas marinas encontrando actividad antibacteriana, dichos hallazgos respaldarían la presente investigación ya que en el extracto estudiado en conjunto con los metabolitos secundarios serían los responsables del efecto antibacteriano encontrado.



CONCLUSIONES

PRIMERA: Se logró evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Cándida albicans*.

SEGUNDA: Se obtuvieron extractos etanólicos de apariencia verde oscura, viscosa de olor y sabor característico, con un rendimiento de 11.62 ± 0.10 %.

TERCERA: El análisis por cromatografía en capa fina del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* reveló presencia de terpenos por la aparición de tres manchas con Rf de 0.19, 0.34, 0.58; taninos por la aparición de dos manchas con Rf de 0.65 y 0.68; flavonoides por la aparición de una mancha con Rf de 0.62 y para alcaloides dando un resultado negativo.

CUARTA: La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Escherichia coli* son 50 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente.

QUINTA: La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Staphylococcus aureus* es 25 mg/mL para ambos casos.

SEXTA: La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) *in vitro* del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Cándida albicans* es de 100 mg/mL y no presenta Concentración Fungicida Mínima (CFM) a las concentraciones estudiadas.

SÉPTIMA: *Escherichia coli* presenta sensibilidad al extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* con halos de inhibición de 6, 7.4, 11.2 y 12.8 mm de diámetro a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/mL, obteniendo con la mayor concentración una sensibilidad Intermedia; sin embargo dicha sensibilidad es menor comparada con el ciprofloxacino y amikacina al 95 % de confianza.

OCTAVA: *Staphylococcus aureus* presenta sensibilidad al extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* con halos de inhibición de 7.8, 11.0, 13.6 y 15.4 mm de diámetro a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/mL, obteniendo con la mayor concentración una sensibilidad Intermedia; sin embargo, dicha sensibilidad es menor comparada con el vancomicina y amoxicilina + ácido clavulánico al 95 % de confianza.

NOVENA: *Cándida albicans* no presenta sensibilidad a los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* en las concentraciones estudiados.



SUGERENCIAS

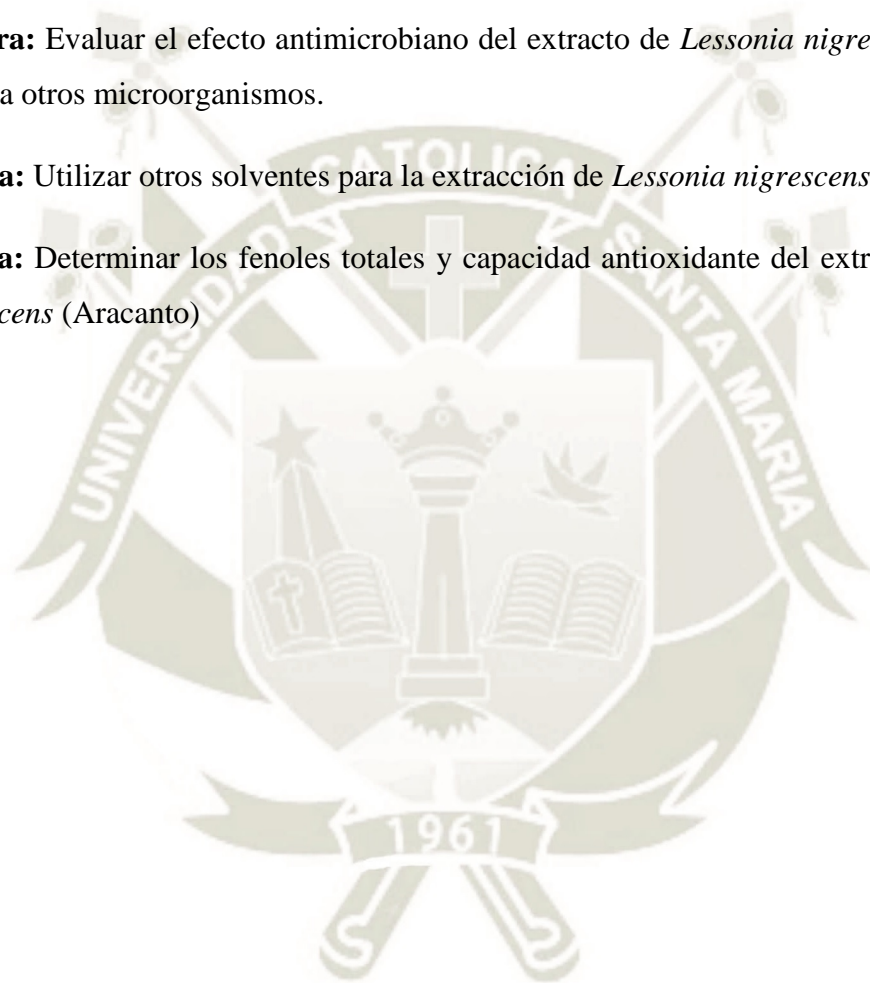
Primera: Realizar análisis por cromatografía de gases acoplado a Masas (GC/MS) para identificar los posibles componentes del extracto de *Lessonia nigrescens*

Segunda: Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a cepas ATCC

Tercera: Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a otros microorganismos.

Cuarta: Utilizar otros solventes para la extracción de *Lessonia nigrescens* (Aracanto)

Quinta: Determinar los fenoles totales y capacidad antioxidante del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto)



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

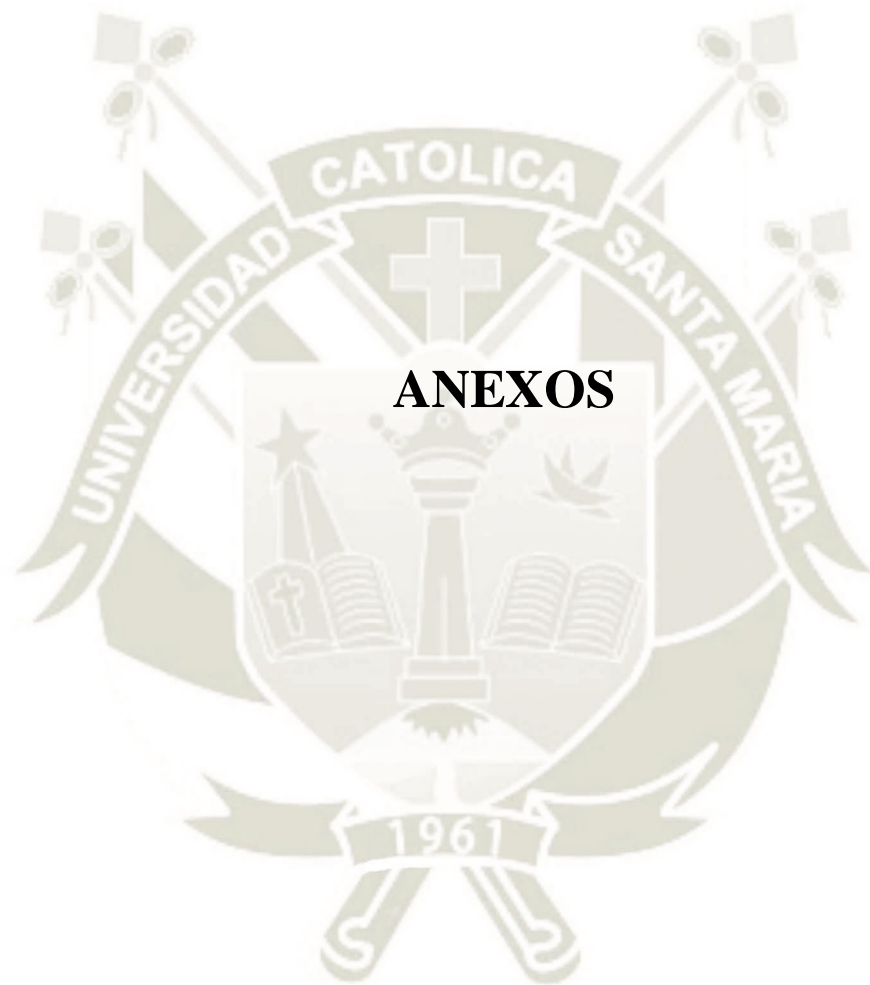
- 1 Delaquis P, Mazza G. Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. *Food Technol.* 1995; 49: p. 73-84.
- 2 Bullerman C, Leiu F, Seier S. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and cloves oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 1977; 42: p. 1107-1109.
- 3 Jay J. *Modern Food Microbiology*. Tercera ed. New York: Van Nostrand Reinhold; 1986.
- 4 Chang H. Antibacterial effect of spices and vegetables. *Food Industries.* 1995; 27: p. 53-61.
- 5 Holt D, Gomez N. A research note: anti-mycotic activity of garlic extracts and extract fractions in vitro and plant. *J. Food Prot.* 1995; 58: p. 322-325.
- 6 Chiu N, Chang K. *The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan*. Taipei, SouthernMaterials Center. 1986; 2: p. 273-274.
- 7 Zaika L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety.* 1988; 9: p. 97-118.
- 8 Lowy F. Staphylococcus aureus infections. *The New England Journal of Medicine.* 1998; 339(8): p. 520-532.
- 9 Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998; 11(1): p. 142-201.
- 10 Aragón B, Castillo R, Zavala J. Estudios sobre macroalgas pardas en el sur del Perú 2011 - 2015. *Inst del mar del Perú.* 2012; 1(1): p. 61-65.
- 11 Arenas M. Determinación de los parámetros tecnológicos para la obtención de alginato de sodio a partir de aracanto (*Lessonia nigrescens*). Tesis de Título profesional. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2016.
- 12 Alibaba. Spanish. [Online].; 2019 [cited 2019 Junio 10. Available from: <https://spanish.alibaba.com/product-detail/lessonia-nigrescens-berteroana-spicata--50033370692.html>.
- 13 Arenas M. Determinación de los parámetros Tecnológicos para la obtención de alginato de sodio a partir de aracanto (*Lessonia nigrescens*). Tesis de Título Profesional. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2016.

- 14 Carbajal P, Gamarra A. Guía para recolección y reconocimiento de macroalgas pardas comerciales del Perú. Instituto del Mar del Perú. 2018; 45(2): p. 3.
- 15 Ruiz A. Viabilidad en el desarrollo de esporas de *Lessonia nigrescens* bory en relacion a estacionalidad y procedencia, norte y sur de Chile. Tesis de grado. Puerto Montt: Universidad Austral de Chile; 2012.
- 16 Clare K. ALGIN. Industrial Gums (Third Edition). 1993;: p. 105-143.
- 17 Peteiro C. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. Alginates and Their Biomedical Applications-Springer, Singapore. 2017; 11: p. 27-66.
- 18 Zhao C, Yang C, Chen M, Liu B, Xiao J. Antidiabetic Activity of *Lessonia nigrescens* Extract in Type 2 Diabetic Mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 112(1): p. 159.
- 19 Percival E, Venegas M, Weigel H. Carbohydrates of the brown seaweed *lessonia nigrescens*. *Phytochemistry*. 1983; 22(6): p. 1429-1432.
- 20 Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural Barcelona: Omega; 2000.
- 21 Villar A. Farmacognosia General. Madrid: Editorial Sintesis; 1999.
- 22 Jara A, Cándida G. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. Tesis de grado. Cuenca: Universidad de Cuenca; 2010.
- 23 Sharapin N, Machado L, Pinzón R. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos Santa Fé de Bogotá: CYTED; 2000.
- 24 Ocampo R, Rios L, Betancur L, Ocampo D. Curso práctico de química organica. Universidad de Caldas; ed. Caldas; 2008.
- 25 Nichols, L. Overview of TLC. [Online].; 2019 [cited 2019 Junio 10. Available from: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_\(Nichols\)/2%3A_Chromatography/2.2%3A_Thin_Layer_Chromatography_\(TLC\)/2.2A%3A_Overview_of_TLC](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/2%3A_Chromatography/2.2%3A_Thin_Layer_Chromatography_(TLC)/2.2A%3A_Overview_of_TLC).
- 26 Walton H, Reyes J. Análisis químico e instrumental moderno Barcelona: Reverté; 1983.
- 27 Guarnizo A, Martínez P. Experimentos de Química Orgánica Colombia: ELIZCOM S.A.S ; 2013.

- 28 Durán P, Miró T, Paredes J. Operaciones Básicas de Laboratorio España: Ediciones Paraninfo; 2012.
29. Pahissa A. Infecciones producidas por Staphylococcus aureus Barcelona: MARGE; 2009.
- 30 Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. Séptima ed. Barcelona: ELSEVIER; 2013.
- 31 gettyimages. gettyimages.com. [Online].; 2019 [cited 2019 junio 10. Available from: <https://www.gettyimages.com/photos/staphylococcus-aureus?sort=mostpopular&mediatype=photography&phrase=staphylococcus%20aureus>.
- 32 Koneman E. Koneman Diagnóstico microbiológico. Sexto ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2008.
- 33 García J, Picazo J. Compendio de Microbiología Médica Madrid: Harcourt; 1999.
- 34 slideshare. slideshare.net. [Online].; 2014 [cited 2019 junio 10. Available from: <https://es.slideshare.net/TLC-enterobacterias/escherichia-coli-41807045>.
- 35 Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Décimo novena ed. Mexico D.f: El Manual Moderno; 2008.
- 36 García G, Picazo J. Microbiología Médica General Españ: Edición Harcourt Brace.; 1998.
- 37 Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. Décimosegunda ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2009.
- 38 Liebana J. Microbiología Oral. Primera ed. México D.F.: Mcgraw-HILL; 1997.
- 39 candidalbicans.blogspot. candidalbicans.blogspot.com. [Online].; 2007 [cited 2019 junio 10.
- 40 Carmona O. Microbiología Médica. Quinta ed. Caracas: Mcgraw-HILL; 1944.
- 41 Rodríguez J, Miranda J, Morejón L, Santana J. Candidiasis de la mucosa bucal. Rev Cubana Estomatol. 2019; 39(2): p. 187-233.
- 42 Vila J. Tecnología Farmecéutica Madrid: Editorial Sintesis; 1997.
- 43 Mogrovejo A. Determinación del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de Calendula officinalis L. (Caléndula) en animales de experimentación. Tesis de Título Profesional. Arequipa: Universidad Católica de Santa Maria; 2014.

- 44 Medina M. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de Equisetum giganteum L. (cola de caballo) sobre el crecimiento de Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Candida albicans. Tesis de título profesional. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2015.
- 45 Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica Mexico D.F.: Omnia Science; 2016.
- 46 Harris W, Laitinen H. Análisis químico Barcelona: Análisis químico S.A.; 1982.
- 47 Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del Staphylococcus aureus. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2014; 61.
- 48 Rodríguez E. Bacteriología General. Principios y prácticas de laboratorio Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2005.
- 49 Granados R, Villaverde C. Microbiología Madrid: Editorial Paraninfo; 1998.
- 50 Macfaddin R, Rondidone S, Giovanniello O. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2003.
- 51 Díaz R, Gamazo C, López I. Manual Práctico de Microbiología. Tercera ed. Barcelona: Masson; 2005.
- 52 Prats G. Microbiología Clínica. Primera ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2005.
- 53 Porres N, Ruiz E. Microbiología Clínica. Primera ed.: Paraninfo; 2018.
- 54 Horna G, Silva M, Vicente W, Tamariz J. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Rev Medica Hered. 2005; 16(1): p. 39–44.
- 55 Wong J, Rubio C, Reyes A, Noé C, Carrillo M. Phenolic content and antibacterial activity of extracts of Hamelia patens obtained by different extraction methods. Brazilian Journal of Microbiology. 2018; 49: p. 656–661.
- 56 Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem Pharmacol. 1983; 32: p. 1141–1148.
- 57 Grange J, DAvey R. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J R Soc Med. 1990; 83: p. 159–160.

- 58 Middleton J, Chrithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The flavonoids: advances in research since 1986*. 1993.
- 59 Harbone J, Williams C. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 1992; 55: p. 481–504.
- 60 Cushnie T, Lamb J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005; 26(5): p. 343-356.
- 61 Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics — a Finnish perspective. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51: p. 684-691.
- 62 Dixon R, Xie D, Sharma S. Proanthocyanidins — a final frontier in flavonoid research? *New Phytol*. 2005; 165: p. 9-28.
- 63 Yoshihiro I, Shiraishi A, Toshiko H, Kazuma H, Hamashima H, Shimada J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 2004; 237(2): p. 325–331.
- 64 Wachter G, Franzbau S, Montenegro G, Hoffmann W, Timmermann B. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Growth by Saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *Natural Products*. 2001; 64: p. 1463-1464.
- 65 Farhadi F, Khameneh B, Iranshani M, Iranshahy M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review. *Phytother Res*. 2019; 33(1): p. 13-40.
- 66 Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Curr Med Chem*. 2015; 22(1): p. 132-149.
- 67 Fuertes C, Roque M, Tristan M. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* C.C. Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*. 1998; 1(2): p. 71-80.
- 68 Magallanes C, Córdova C, Orozco R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. peru. biol*. 2003; 10(2): p. 125-132.



ANEXO 1



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



CONSTANCIA N° 005-2019-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que el espécimen preservado presentado por **Milagros Saravia Chaiña y Carmen Luz Bravo Ramos**, egresado de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María para la ejecución de su Tesis "**Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans***". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico preservado, para determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Reino	Plantae
Division	Phaeophyta
Clase	Phaeophyceae
Orden	Laminariales
Familia	Lessoniaceae
Genero	<i>Lessonia</i>
Especie	<i>Lessonia nigrescens</i> Bory 1826

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

Arequipa 04 de febrero del 2019.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

ANEXO 2

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO



Figura 1.1 Láminas de *Lessonia nigrescens* (Aracanto) seleccionadas, cortadas y llevadas a estufa a 40 °C



Figura 1.2 Pulverización de láminas de *Lessonia nigrescens* (Aracanto)



**Figura 1.3 Molienda de láminas de *Lessonia nigrescens*
(Aracanto)**



**Figura 1.4 Tamizado de láminas de *Lessonia nigrescens*
(Aracanto)**

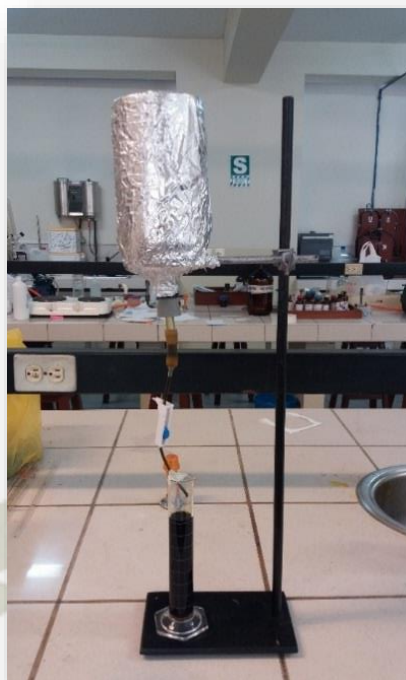


Figura 1.5 Sistema de Percolación



Figura 1.6 Sistema de Rotavapor

ANEXO 3

PROCEDIMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA



Figura 2.1 Solventes utilizados en Cromatografía General



Figura 2.2 Corrida cromatográfica General

ANEXO 4 PREPARACIÓN DE AGARES



Figura 4.1. Preparación de Agar manitol salado para la identificación de *Staphylococcus aureus*.



Figura 4.2. Preparación de Agar Mac Conkey para la identificación *Escherichia coli*

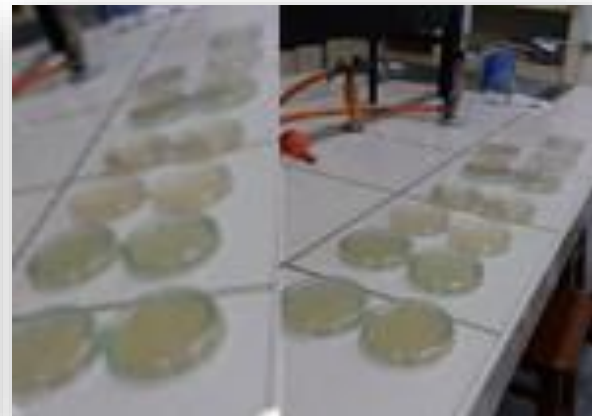
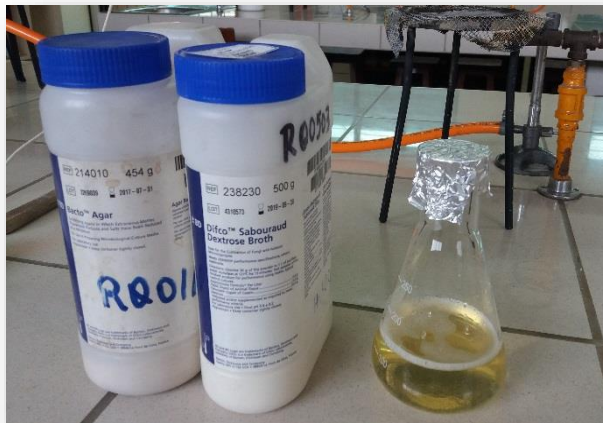


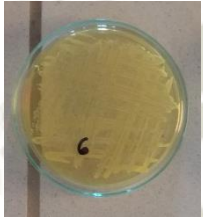
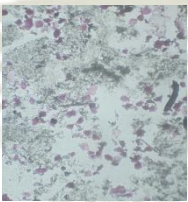


Figura 4.3. Preparación de Agar Sabouraud para la identificación de *Cándida albicans*

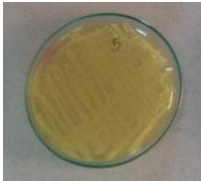





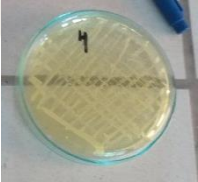
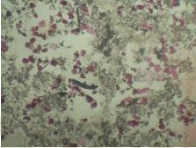
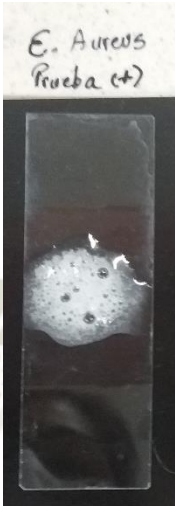

Figura 4.4. Preparación de Agar Mueller Hinton

ANEXO 5

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*





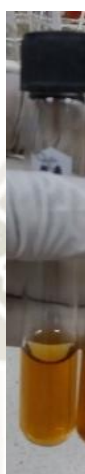


<i>Staphylococcus aureus</i>			
Repetición N° 1			
AGAR MANITOL SALADO	TINCIÓN GRAM	CATALASA	COAGULASA
			
Positivo	Gram Positivo	Positivo	Positivo








<i>Staphylococcus aureus</i>			
Repetición N° 2			
AGAR MANITOL SALADO	TINCIÓN GRAM	CATALASA	COAGULASA
			
Positivo	Gram Positivo	Positivo	Positivo

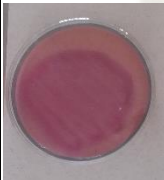



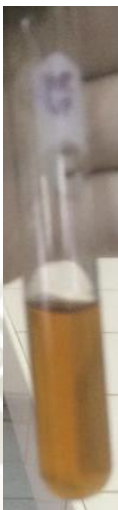


<i>Staphylococcus aureus</i>			
Repetición N° 3			
AGAR MANITOL SALADO	TINCIÓN GRAM	CATALASA	COAGULASA
			
Positivo	Gram Positivo	Positivo	Positivo

ANEXO 6

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>						
Repetición 1						
AGAR MAC CONKEY	TSI	LIA	MR	VP	CITRATO DE SIMONS	INDOL
						
Positivo	A/A CO ₂ (Positivo)	K/K (Positivo)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo

<i>Escherichia coli</i>						
Repetición 2						
AGAR MAC CONKEY	TSI	LIA	MR	VP	CITRATO DE SIMONS	INDOL
						
Positivo	A/A CO ₂ (Positivo)	K/K (Positivo)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo

<i>Escherichia coli</i>						
Repetición 3						
AGAR MAC CONKEY	TSI	LIA	MR	VP	CITRATO DE SIMONS	INDOL
						
Positivo	A/A CO ₂ (Positivo)	K/K (Positivo)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo

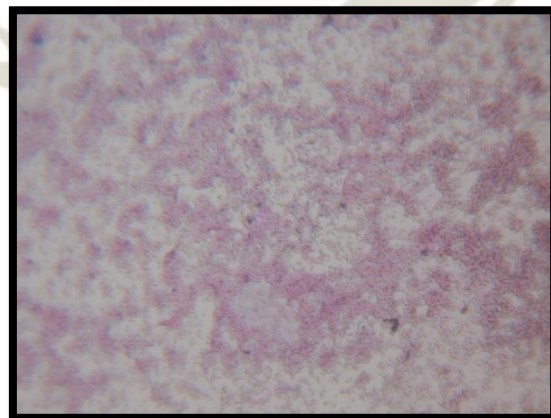
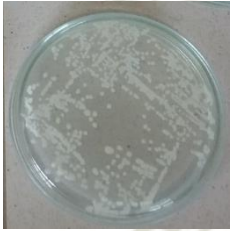
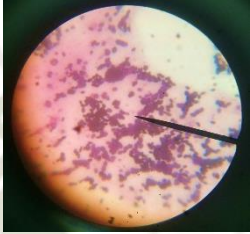



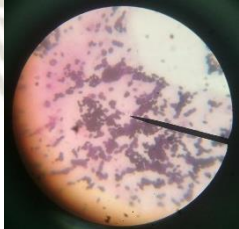


Figura 4.1 Tinción Gram *Escherichia coli*

ANEXO 7

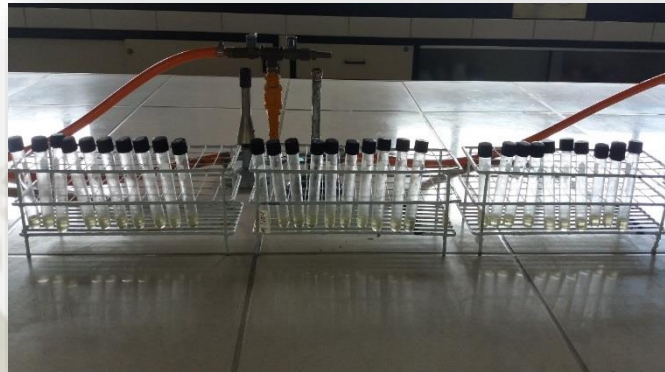
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Cándida albicans*

<i>Cándida albicans</i>		<i>Cándida albicans</i>	
Repetición N° 1		Repetición N° 2	
AGAR SABOURAUD	TINCIÓN GRAM	AGAR SABOURAUD	TINCIÓN GRAM
			
Positivo	Gram Positivo	Positivo	Gram Positivo

<i>Cándida albicans</i>	
Repetición N° 3	
AGAR SABOURAUD	TINCIÓN GRAM
	
Positivo	Gram Positivo

ANEXO 8

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA



ANEXO 9

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA

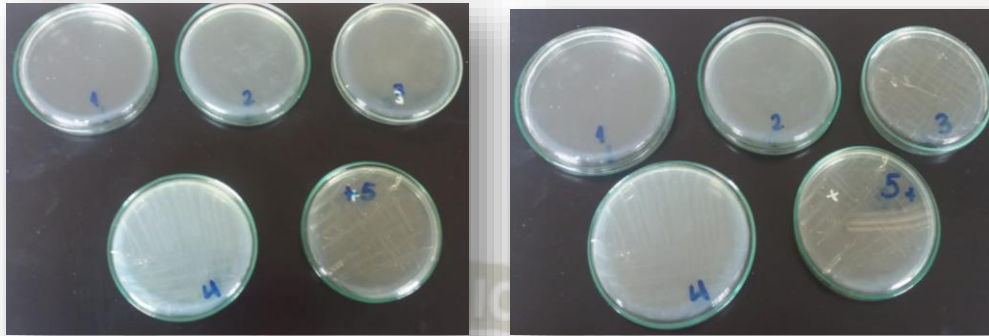


Figura 9.1: Concentración bactericida mínima (CBM) frente a
Staphylococcus aureus.



Figura 9.2: Concentración bactericida mínima (CBM) frente a
Escherichia coli

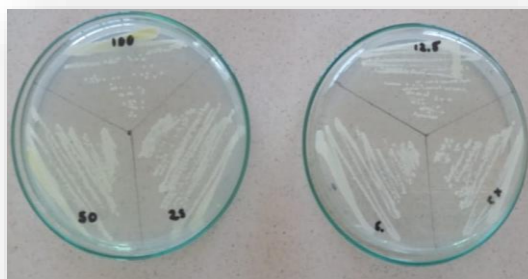


Figura 9.2: Concentración bactericida mínima (CBM) frente a
Cándida albican

ANEXO 10

RESULTADOS OBTENIDOS DE SENSIBILIDAD



Figura 10.1: Sembrado de placas

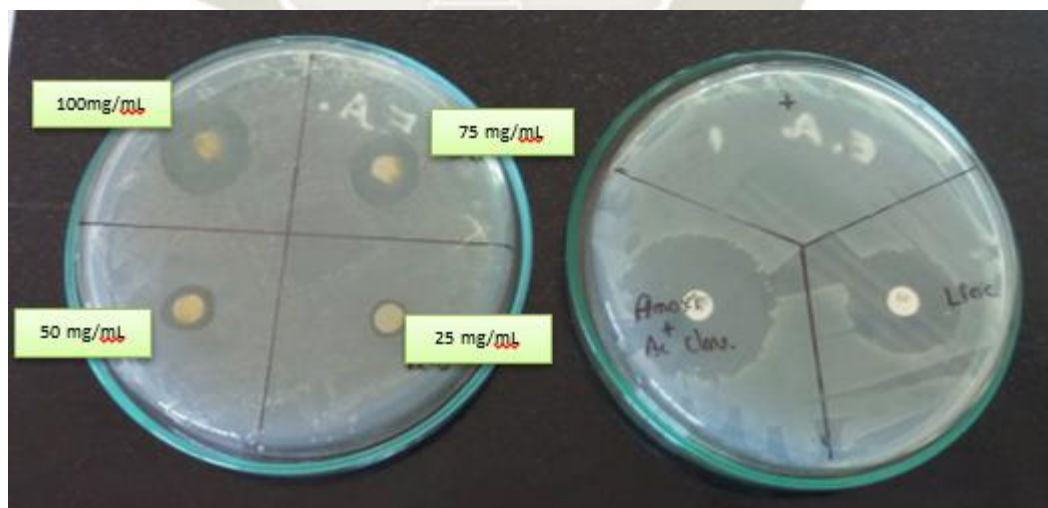


Figura 10.2: Halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*.

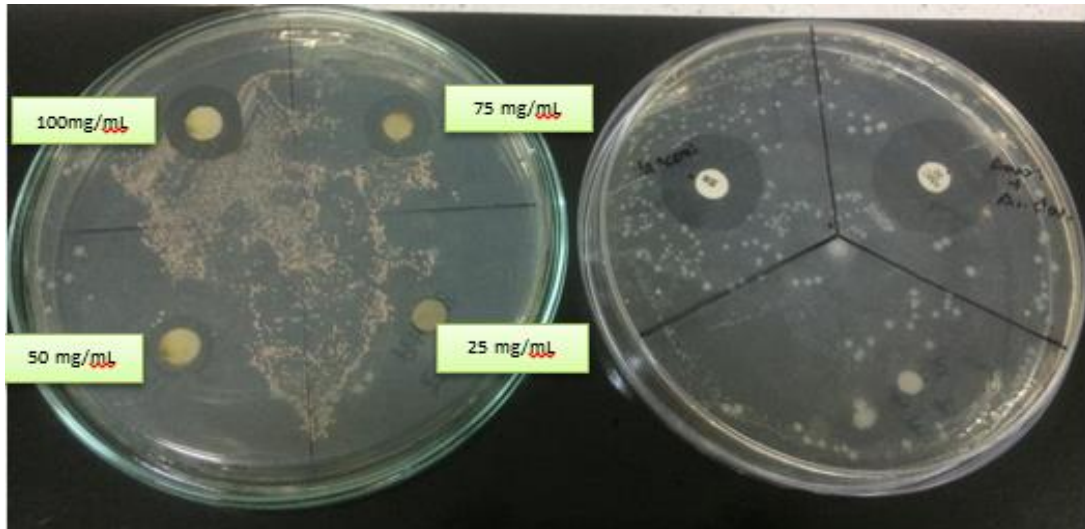


Figura 10.3: Halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*.

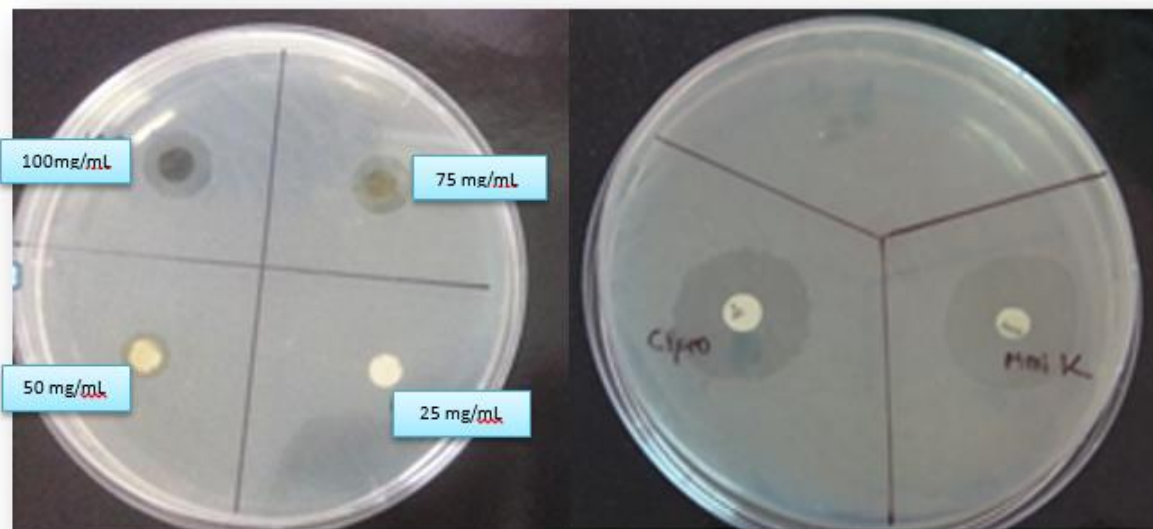


Figura 10.4: Halos de inhibición frente a *Escherichia coli*

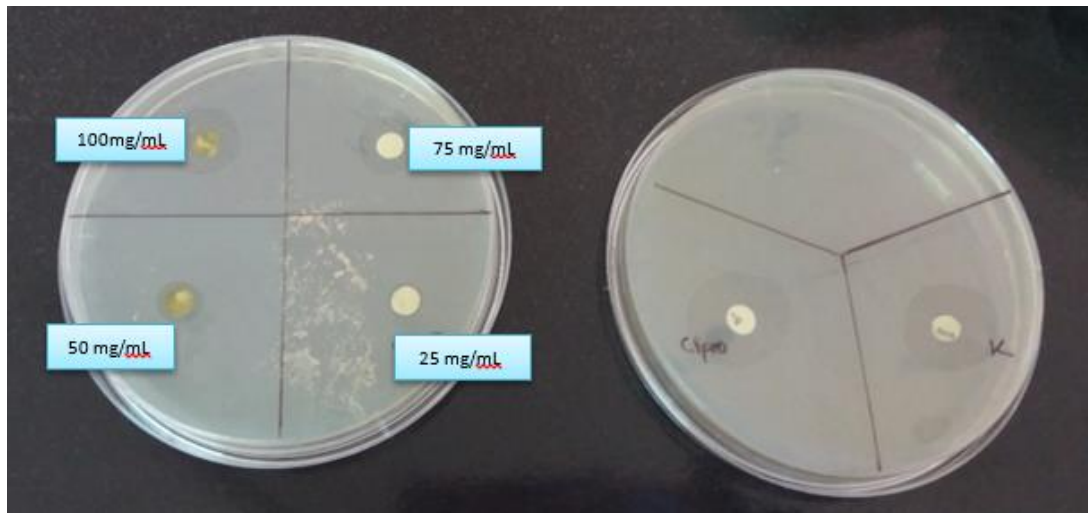
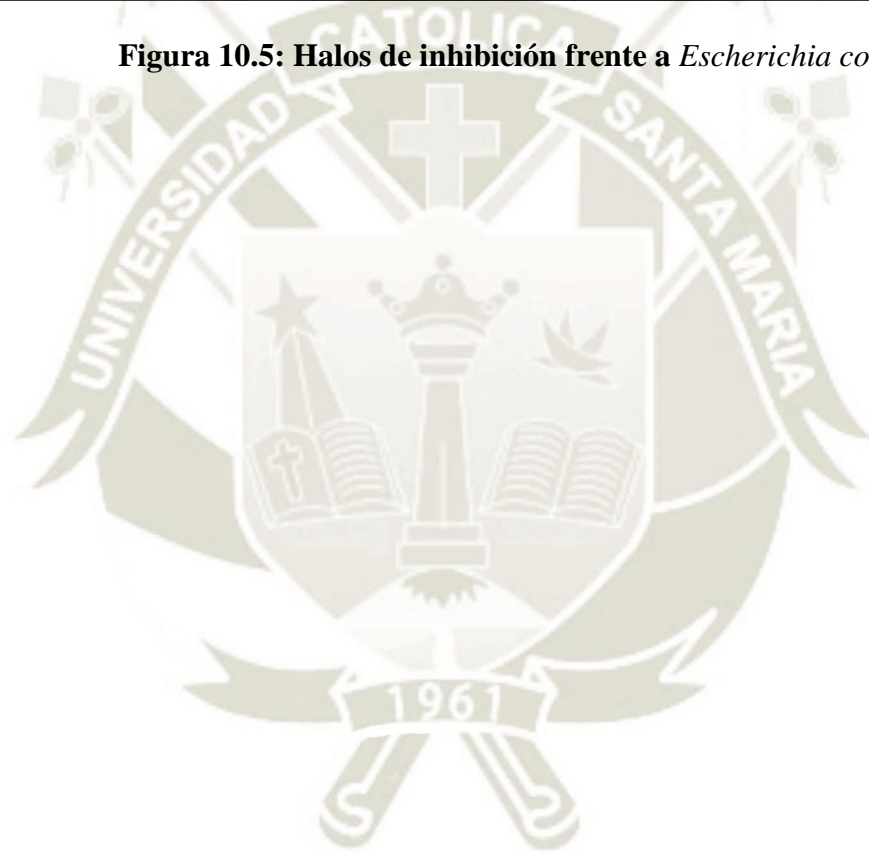


Figura 10.5: Halos de inhibición frente a *Escherichia coli*



ANEXO 11

AGAR MANITOL SALADO

Es un medio utilizado para el aislamiento y diferenciación de microorganismos pertenecientes al género estafilococos a partir de diferentes muestras.

Colonias típicas:

Se dice que la alta concentración de cloruro de sodio resulta en una inhibición total o parcial de microorganismos no pertenecientes al género *staphylococcus*, la fermentación del manitol es evidenciada por un cambio del indicador rojo fenol, lo que permite la diferenciación de las especies de este género.

Fundamento:

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su elevada concentración salina y diferencial debido a la capacidad de fermentación de manitol por los microorganismos. El medio de cultivo, el extracto de carne, la peptona de carne y la tripteína, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales que promueven el desarrollo microbiano. Ya que se dice que el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración de sodio) es el agente selectivo que va a inhibir el desarrollo del acompañante y el rojo fenol es el indicador del pH y por último el agar que va a ser el agente solidificante. Las bacterias que crecen en un medio con una elevada concentración salina y van a fermentar el manitol van a producir ácidos con los que se modifica el pH del medio y vira el indicador del pH del color rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en elevadas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se observaran como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo del color. Los estafilococos coagulasa negativos no fermentan el manitol, presentan colonias rodeadas de una zona roja o purpura.

Formula (en gramo por litro)		Procedimiento
Extracto de carne	1.0 g	Pesar el medio para luego suspender 111 gr de medio en un litro de agua destilada. Calentar en un mechero agitando a menudo y dejar hervir durante unos minutos para disolver totalmente, evitando el sobrecalentamiento. Seguidamente se lleva a autoclave para esterilizar de 118-121 °C durante unos 15 a 20 minutos. Finalmente se deja enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización en placas o tubos
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final 7.4 ±0.2		

Siembra:

En una superficie de un inóculo denso de la muestra por estría.

Incubación:

A 35-37°C, durante 18-24 horas. Si las placas presentan resultado negativo, incubar otras 24 horas.

Conservación:

A 2-8°C.

Resultados:

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bueno
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bueno

ANEXO 12

MAC CONKEY AGAR

Se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos.

Fundamento:

Las peptonas, van aportar los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. La lactosa es el hidrato de carbono no fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante. Los microorganismos fermentadores de lactosa disminuyen el pH produciendo colonias de color rojo neutro. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Formula (en gramo por litro)	Procedimiento
Peptona	Pesar el medio para luego suspender 50 gr de medio en un litro de agua destilada. Calentar en un mechero agitando a menudo y dejar hervir durante unos minutos para disolver totalmente, evitando el sobrecalentamiento. Seguidamente llevar a autoclave para esterilizar de 118-121 °C durante unos 15 a 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización
Pluripeptona	
Lactosa	
Mezcla de sales biliares	
Cloruro de sodio	
Agar	
Rojo neutro	
Cristal violeta	
pH final	

Siembra:

Sembrar en superficie, inocular directamente la muestra por estría.

Incubación:

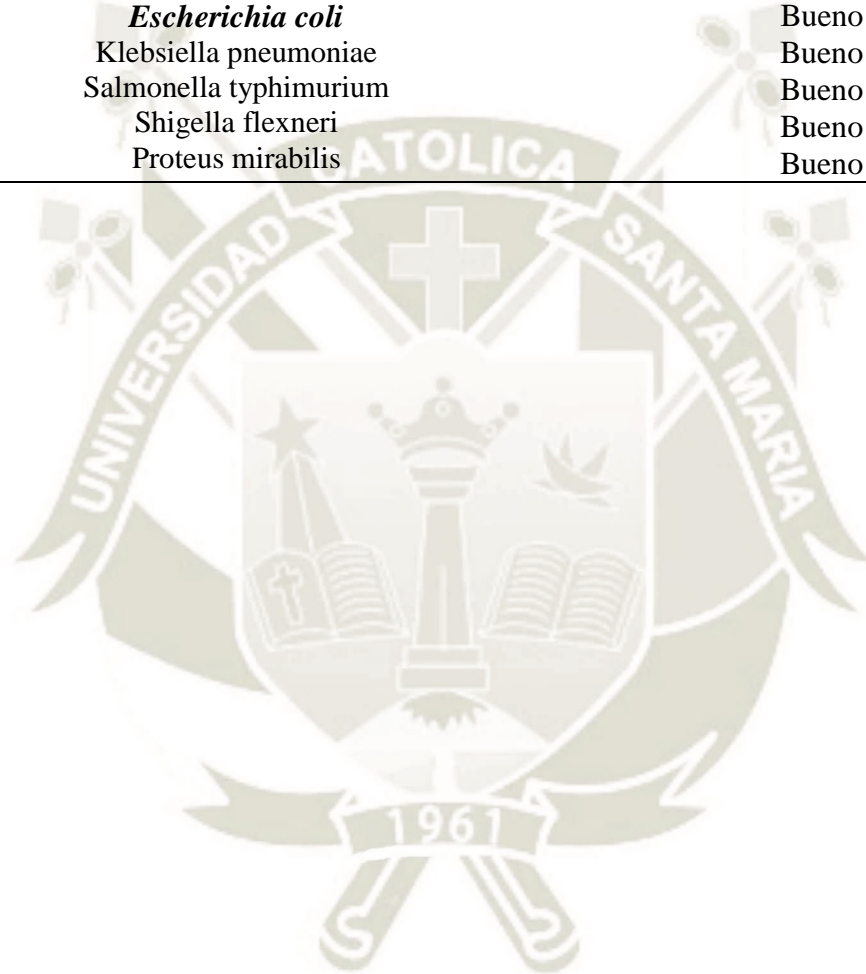
De 35 a 37 °C durante 18-48 horas, en aerobios.

Conservación:

- Medio deshidratado: a 10-35 °C
- Medio preparado: a 2-8 °C.

Resultado:

<i>MICROORGANISMOS</i>	<i>Crecimiento</i>
<i>Escherichia coli</i>	Bueno
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bueno
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bueno
<i>Shigella flexneri</i>	Bueno
<i>Proteus mirabilis</i>	Bueno



ANEXO 13

AGAR SABOURAUD

También conocido como Agar dextrosa Sabouraud. Es un medio que es utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos, patógenos y saprofitos. Así también es utilizado para el cultivo de levaduras.

Fundamento:

Es un medio de cultivo que es recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas ya sea como la piel, pelo, etc. En el medio de cultivo, la pluripectona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias. Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Formula (en gramo por litro)	Procedimiento
Digerido enzimático de caseína 10.0 g	Pesar el medio para luego suspender 65 gr de medio en un litro de agua destilada. Calentar en un mechero agitando a menudo y dejar hervir durante unos minutos para disolver totalmente, evitando el sobrecalentamiento. Seguidamente llevar a autoclave para esterilizar de 118-121 °C durante unos 15 a 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización
Dextrosa 40.0 g	
Agar 15.0 g	
Agua destilada c.s.p 100 mL	
pH final	5.6 ±0.2

Siembra:

La siembra puede depender del uso ya que puede ser en placa como en tubo.

Incubación:

El tiempo de incubación dependerá de los microorganismos que se está buscando separar.

Conservación o almacenamiento:

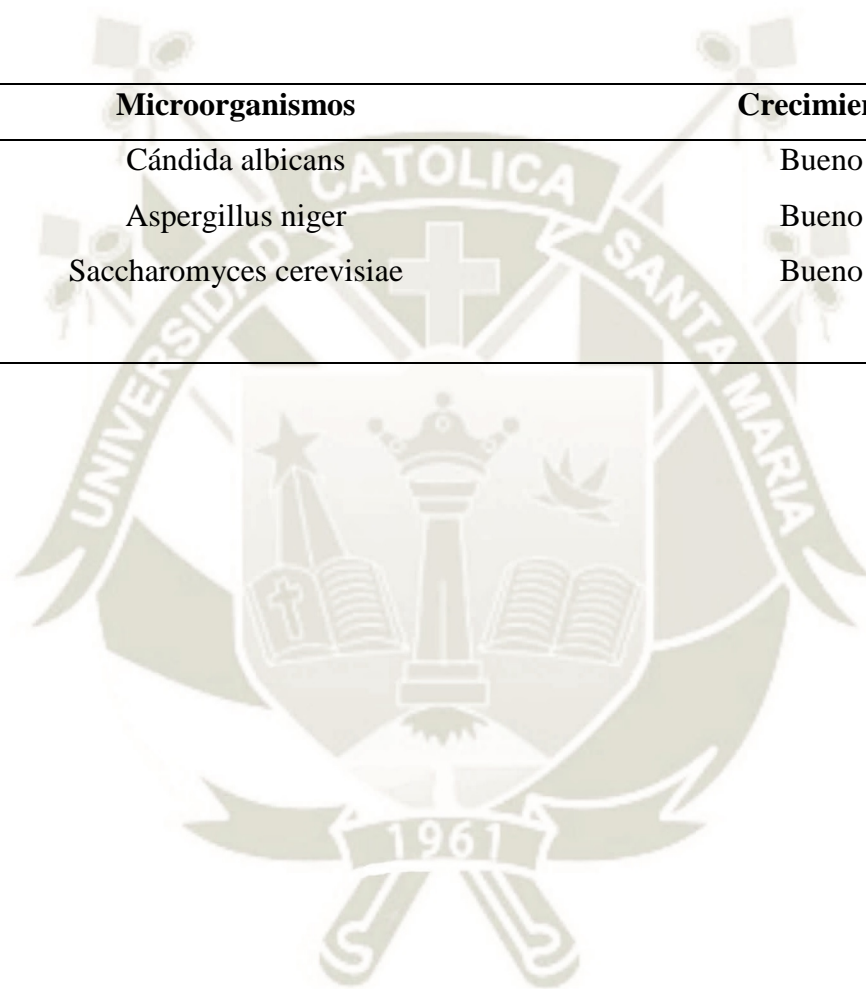
Para poder conservar los cultivos de hongos se pueden guardar:

- Medio deshidratado: a 10-35 °C,
- Medio preparado: a 2-8 °C.

As también se puede alargar la conservación de la cepa para así poder evitar el pleomorfismo si se eliminar por completo la dextrosa del agar y si se disminuye la cantidad de agar al medio para así evitar la resequedad.

Resultados:

Microorganismos	Crecimiento
Cándida albicans	Bueno
Aspergillus niger	Bueno
Saccharomyces cerevisiae	Bueno



ANEXO 14

AGAR MUELLER HINTON

Fundamento:

Su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetropina y tetraciclina es bajo la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. Con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos.

Formula (en gramo por litro)		Procedimiento
Infusión de carne	300.0 g	Pesar el medio para luego suspender 38 gr de medio en un litro de agua destilada. Calentar en un mechero agitando a menudo y dejar hervir durante unos minutos para disolver totalmente, evitando el sobrecalentamiento. Seguidamente lo llevar a autoclave para esterilizar de 118-121 °C durante unos 15 a 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización
Peptona acida de caseína	17.5 g	
Almidón	1.5 g	
Agar	15.0 g	
pH final		7.3±0.1

Nota: La infusión de carne es equivalente a 3g de polvo

Siembra:

El inóculo microbiano dependerá del microbio o microorganismo en estudio.

Incubación:

El tiempo de incubación dependerá de los microorganismos que se busca aislar.

Resultados:

<i>MICROORGANISMOS</i>	<i>CRECIMIENTO</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bueno</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bueno</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Bueno</i>

Conservación:

- Medio deshidratado: a 10-35 °C.
- Medio preparado: a 2-8 °C.



ANEXO 15

CALDO PEPTONADO

Es un medio utilizado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Fundamento:

Es un medio de enriquecimiento no selectivo. Utilizado para recuperar células enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento. En casos de que sea utilizado como medio base para la fermentación de hidratos de carbono, se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono.

Formula (en gramo por litro)		Procedimiento
Peptona de carne	10.0	Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada .mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave de 118-121 °C durante 15 a 20 minutos.
Cloruro de sodio	5.0	
pH final 7.2 ±0.2		

Siembra:

Directa a partir del estudio. Como también se dice que como diluyente se realiza las diluciones de 1:10 y 1:100 dependiendo como es utilizado.

Incubación:

De 35 a 37 °C durante un periodo de 18 a 24 horas, anaeróbica.

Resultados:

Microorganismos	Crecimiento
Escherichia coli	Bueno
Staphylococcus aureus	Bueno
Candida albicans	Bueno

Características del medio:

Medio preparado: ámbar claro

Almacenamiento:

- Medio deshidratado: a 10-35 °C,
- Medio preparado: a 2-8 °C.

