

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA



VALORACION DEL CULTIVO DE *Bixa orellana* (Achiote), EVALUANDO SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANOLICO DE HOJAS Y CORTEZA FRENTE AL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. AREQUIPA, 2013.

**Tesis presentada por el bachiller en
Ingeniería Biotecnológica:**

Troncoso Vargas, Hugo Alfredo

Para optar el título Profesional de:

Ingeniero Biotecnologo

ASESORA:

Ing. Cinthia Córdova Barrios.

Arequipa – Perú

2014

Índice de Contenido

RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
 CAPITULO I: Introducción.....	 1
 HIPÒTESIS.....	 2
OBJETIVOS.....	3
 CAPITULO II: Marco Teórico.....	 4
2.1. Caracterización de <i>Bixa orellana</i>	4
2.1.1. Botánica y Taxonomía.....	4
2.1.2. Hábitat y Distribución.....	6
2.1.3. Mantenimiento del Cultivo y Rendimiento.....	6
2.1.4. Cultivo.....	10
2.1.5. Producción Nacional por Regiones y Beneficio del Cultivo de Achiote.....	11
2.1.6. Propiedades e Importancia.....	12
2.2. Productos Naturales.....	14
2.3. Metabolitos Secundarios.....	14
2.3.1. Metabolitos Secundarios de Importancia.....	15
2.4. Metodología de Obtención de Materia Prima.....	22
2.4.1. Recolección.....	22
2.4.2. Procesamiento.....	24
2.4.3. Desecación.....	25
2.4.4. Fragmentación.....	27
2.4.5. Almacenamiento.....	27
2.5. Extractos Vegetales.....	28
2.6. Métodos de Extracción.....	28

2.6.1. Tipos de extracción.....	28
2.6.2. Consistencia de los Extractos.....	31
2.6.3. Características de los Extractos.....	33
2.6.4. Conservación de los Extractos.....	34
2.7. Agentes Antimicrobianos.....	35
2.8. Descripción de las Bacterias en Estudio.....	35
2.8.1. <i>Escherichia coli</i>	35
2.8.2. <i>Klebsiella oxytoca</i>	38
2.8.3. <i>Proteus mirabilis</i>	39
2.8.4. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	41
2.8.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	43
2.9. Métodos para Determinar la Actividad Antimicrobiana.....	45
2.9.1. Procedimiento para la Realización del Antibiograma.....	45
2.10. Análisis Fitoquímico en el País. Importancia y Perspectivas.....	50
2.10.1. Marcha Fitoquímica Preliminar.....	51
2.11. Medios de Cultivo, Clasificación.....	53
 CAPITULO III: Materiales y Métodos.....	 55
 3.1. Lugar de Realización.....	 55
3.2. MATERIALES.....	55
3.2.1. Material Biológico.....	55
3.2.2. Material de Laboratorio.....	55
3.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	57
3.4. METODOLOGÍA.....	58
3.4.1. Procesamiento del Material Vegetal.....	58
3.4.2. Método de Obtención del Extracto.....	61
3.4.3. Concentración del Extracto.....	62
3.4.4. Determinación del Rendimiento de la Extracción.....	63
3.5. PROCESAMIENTO DE CEPAS EN ESTUDIO.....	64
3.5.1. Obtención de Cepas.....	64
3.5.2. Pruebas de Identificación para cepas Gram negativas: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> y <i>Pseudomona</i>	65

3.5.3.Pruebas de Identificación para la cepa Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i>	67
3.6. PRUEBA PRELIMINAR.....	68
3.6.1.Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por Método de Difusion.....	68
3.7. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	70
3.7.1.Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	70
3.7.2.Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	73
3.8. ANALISIS FITOQUIMICO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS Y ACUOSOS DE <i>Bixa orellana</i> (Achiote).....	73
3.8.1.Marcha Fito química Preliminar.....	73
3.9. METODOS ESTADISTICOS.....	74
CAPITULO IV: Resultados.....	75
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	75
4.1. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE <i>Bixa orellana</i> (Achiote).....	75
4.2. Resultados de las Pruebas de Identificación para las Cepas de, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomona</i> . y <i>Staphylococcus aureus</i>	77
4.3. Prueba Preliminar.....	78
4.3.1. Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por Medio de Halos de Inhibición.....	78
4.4. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.....	83
4.4.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	83
4.4.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	89
4.5. Análisis fitoquímico de los Extractos Etanólicos y Acuosos de <i>Bixa orellana</i> (Achiote).....	94
CAPITULO IV: Conclusión y Recomendaciones.....	96
CONCLUSIONES.....	96
RECOMENDACIONES.....	98
REFERENCIAS.....	99
ANEXO.....	107

Índice de Figuras

Figura 1: Árbol de *Bixa orellana* L “Achiote.”

Figura 2: Características de la planta *Bixa orellana*. 2A .Hojas. 2B. Flores. 2C. Corteza. 2D. Fruto.

Figura 3. Núcleo básico de un flavonoide.

Figura 4. Núcleo básico de un tanino.

Figura 5. Ubicación geográfica del distrito de Tambopata, Provincia de Tambopata, Departamento de Madre de Dios.

Figura 6: Hojas de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 7: Corteza de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 8: Pulverización del Material Vegetal (hojas y Corteza) de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 9: Almacenaje Vegetal (hojas y Corteza) de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 10: Infusión de los Extractos hojas y Corteza de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 11: Maceración de los Extractos de hojas y Corteza de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 12: Equipo de Rota- vapor.

Figura 13: Extractos secos de hojas y Corteza de ***Bixa orellana* (Achiote).**

Figura 14: Extractos acuosos y etanólicos de ***Bixa orellana*.**

Figura. 15. Inóculos de bacterias en estudio.

Figura 16: Inóculos de bacterias en estudio.

Figura 17. Método, Tipo de Solvente y Rendimiento de los Extractos.

Figura. 18. A. Inhibición de los extractos frente a *E. coli.*, B. Inhibición de los extractos frente a *Klebsiella*, C. Inhibición de los extractos frente a *Proteus* Y D. Inhibición de los extractos frente a *Pseudomona*.

Figura. 19. Halos de inhibición generados por los extractos frente a *Staphylococcus aureus*.

Figura 20. Tamaño de Halo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Relación al tipo de extracto obtenido de *Bixa orellana* (Achiote).

Figura 21. Comparación de los halos de inhibición (mm) producidos por la cepa de *Staphylococcus aureus* con Extractos de ***Bixa orellana* (Achiote)**

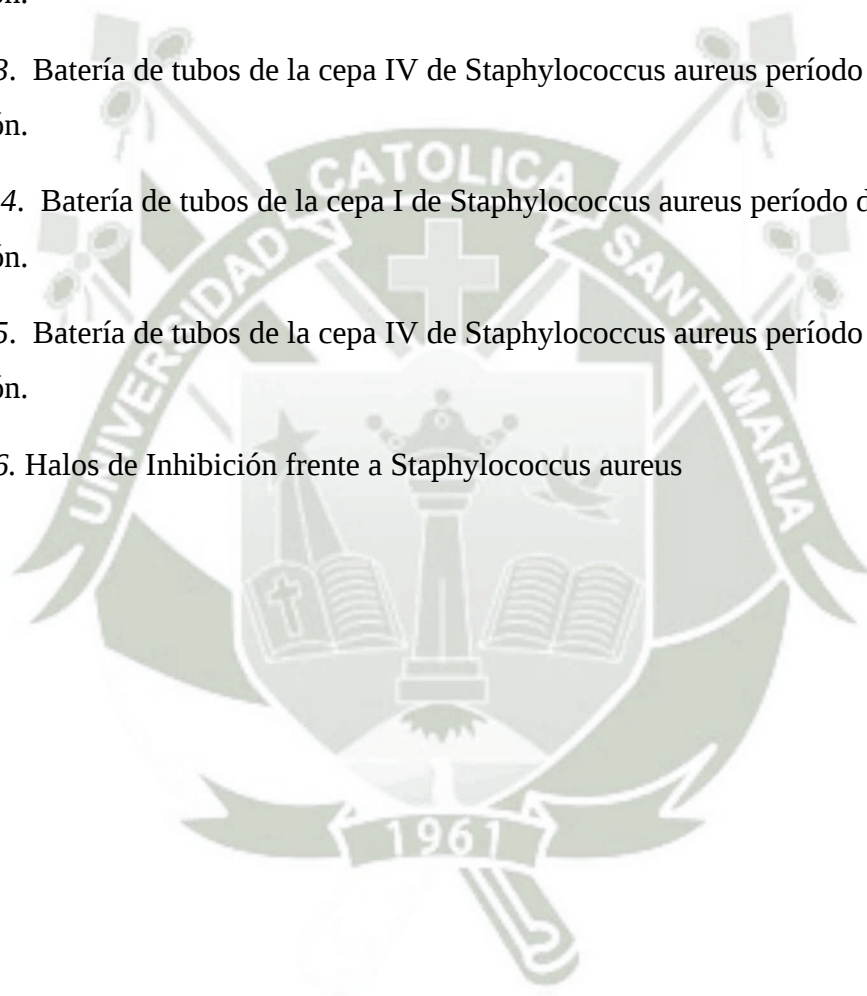
Figura. 22. Batería de tubos de la cepa I de *Staphylococcus aureus* período de incubación.

Figura.23. Batería de tubos de la cepa IV de *Staphylococcus aureus* período de incubación.

Figura. 24. Batería de tubos de la cepa I de *Staphylococcus aureus* período de incubación.

Figura.25. Batería de tubos de la cepa IV de *Staphylococcus aureus* período de incubación.

Figura 26. Halos de Inhibición frente a *Staphylococcus aureus*



Índice de Tablas

Tabla 1. *Rendimiento del Cultivo de Bixa orellana.*

Tabla 2. *Producción por Departamento de Achiote en Toneladas.*

Tabla 3. *Beneficio US\$ del cultivo de Achiote en los primeros 5 años.*

Tabla 4. *Variantes de los Métodos de Extracción discontinua*

Tabla 5. *Variantes de los Métodos de Extracción continúa*

Tabla 6. *Batería de tubos para el extracto Etanólico de Hojas.*

Tabla 7. *Batería de tubos para el extracto Etanólico de Corteza.*

Tabla 8. *Porcentaje de rendimiento de los extractos de **Bixa orellana (Achiote)***

Tabla 9. *Resultados de pruebas bioquímicas*

TABLA 10. *Tipos de Extracto.*

Tabla1. *Tamaño de halos de Inhibición de los Extractos Frente a las bacterias en estudio.*

Tabla 12. *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del ESSALUD.*

Tabla 13. *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de corteza frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del ESSALUD.*

Tabla 14. *Concentración Mínima Inhibitoria (CBM) del extracto etanólico de hojas frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del ESSALUD.*

Tabla 15. *Concentración Mínima Inhibitoria (CBM) del extracto etanólico de corteza frente a 10 Muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del ESSALUD.*

Tabla 16. *Marcha fitoquímica de los extractos en estudio.*

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto *in vitro* de los extractos acuosos y etanólicos de ***Bixa orellana (achiote)*** para darle un valor agregado a dicho cultivo.

Se obtuvieron los extractos secos acuosos y etanólicos del material vegetal (hojas y corteza) de ***Bixa orellana (achiote)*** mediante los métodos de maceración e infusión. Obteniendo rendimientos de 15,02 % para hojas y 4,00 % para corteza por el método de maceración y rendimientos de 17,78 % para hojas y 10,50 % para corteza por el método de infusión.

La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó a través de ensayos de difusión en placa, frente a aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. De acuerdo con los resultados de difusión en placa de los cuatro extractos en estudio (extracto acuoso de hojas, extracto acuoso de corteza, extracto etanólico de hojas y extracto etanólico de corteza) solo los extractos etanólicos de hojas como de corteza tuvieron actividad frente a una cepa en estudio *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 20,3 mm y 28 mm respectivamente.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el método de dilución en tubo y dilución en placa de los extractos frente a *Staphylococcus aureus*. Las cepas de *Staphylococcus aureus* son más susceptibles al extracto etanólico de hojas con valores promedio de CIM 200 mg/mL, CBM 225mg/mL en comparación al extracto etanólico de corteza con valores de CIM 240 mg/mL, CBM 270 mg/mL.

Mediante la marcha Fitoquímica que se realizó a los extractos acuosos y etanólicos de ***Bixa orellana (achiote)***; se observa la presencia de metabolitos secundarios como Taninos, Flavonoides, Alcaloides, Fenoles y Saponinas. Los extractos etanólicos de hojas y corteza con actividad antibacteriana poseen dos de los metabolitos secundarios que influyen en la actividad antibacteriana como son los flavonoides y taninos. El extracto etanólico de hojas posee también compuestos fenólicos que se considera el por qué tiene mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos justifican el uso de hojas y corteza dándole un valor agregado al cultivo de *Bixa orellana* (achiote).



ABSTRACT

In the present investigation the in vitro effect of aqueous and ethanol extracts of *Bixa orellana* (Annatto) to give added value to the crop is determined.

Dry the aqueous and ethanolic extracts of plant material (leaves and bark) of *Bixa orellana* (annatto) by methods and infusion mashing were obtained. Getting yields 15.02% to 4.00% for leaves and bark by maceration method and yields 17.78% to 10.50% for leaves and bark by the infusion method.

The inhibition of bacterial growth was determined by disk diffusion tests, against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. According to the results of plate diffusion study four extracts (aqueous extract of leaves, bark aqueous extract, ethanol extract ethanol extract of leaves and bark) only the ethanolic extracts of leaves and bark had activity against a *Staphylococcus aureus* strain in studio with inhibition zones of 20.3 mm and 28 mm respectively.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was determined by the tube dilution method and plate dilution extracts against *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* strains are more susceptible to the ethanolic extract of leaves with average MIC values 200 mg / mL, compared to 225mg/mL CBM ethanolic extract of bark with MIC values 240 mg / ml, MBC 270 mg / mL.

By Phytochemistry held up the aqueous and ethanol extracts of *Bixa orellana* (Annatto), the presence of secondary metabolites such as tannins, flavonoids, alkaloids, phenols and saponins observed. Ethanolic extracts of leaves and bark with antibacterial activity have two of the secondary metabolites that influence the antibacterial activity are flavonoids and tannins. The ethanol extract of leaves phenolic compounds has also considered the reason has greater antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The results justify the use of leaves and bark giving added value to the cultivation of *Bixa orellana* (Annatto).

ABREVIATURAS

- CMI : Concentración mínima inhibitoria.
- CBM : Concentración bactericidad mínima.
- EMB : Eosina Azul de Metilo.
- TSI : Agar Hierro tres Azucares.
- LIA : Lisina Hierro Agar
- msm : Metros sobre nivel del mar.
- ° C : Grados centigrados.
- mL : Mililitro
- mg : Miligramo
- um : Micrometro
- mm : Milimetro
- s : Segundo

CAPITULO I: Introducción

La Agro-Industria ha abierto los horizontes a varios cultivos que hasta hace poco se les consideraba inútiles y faltos de mercado, este es el caso del achiote, que por el desarrollo tecnológico alcanzado en los últimos tiempos, ha permitido un mejor aprovechamiento de dicho cultivo.

El cultivo de achiote ha adquirido importancia, en varias ramas, tanto en la económica, ecológica, en la biodiversidad, alimentación y medicina naturista, entre otras. Principalmente por la industrialización de las semillas para la obtención de colorante como la Bixina, este colorante natural ha desplazado a los colorantes sintéticos por no ser tóxicos y no alterar el sabor de los alimentos, estos aspectos han incrementado su exportación.

El Perú es uno de los principales exportadores y abastecedores de achiote en el mundo, con el 35% de la producción total. Actualmente, el achiote es convertido en bixina a través de un proceso industrial que permite su exportación como insumo en la industria mundial de alimentos cuyo precio supera los US\$ 100 mil dólares por tonelada.

El cultivo de Achiote en los tres primeros años no es rentable. La mejor producción se alcanza al quinto año de sembrado por lo cual, algunos agricultores no ven con buenos ojos tal cultivo, sin embargo gracias a este estudio se puede dar un valor agregado a las hojas y corteza del cultivo, que se generan como residuo en las podas.

Para la presente investigación se seleccionó a *Bixa orellana* (achiote), planta usada en medicina tradicional que crece en la selva del Perú debido a que existe información de sus propiedades en forma empírica sobre su acción en problemas urinarios, el objetivo fue dar un valor agregado al cultivo de *Bixa orellana* (achiote) evaluando su actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuoso y etanólico de (hojas y corteza) frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.



HIPÒTESIS

Dado que en la actualidad el aprovechamiento de *Bixa orellana* (achiote) se orienta en la obtención de colorantes de sus semillas, es posible dar un valor agregado a dicho cultivo, evaluando la actividad antibacteriana de los extractos de hojas y corteza frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*,.

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

1. Valorar el cultivo de *Bixa orellana* (achiote), evaluando su Actividad Antibacteriana, Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima *in vitro* de los extractos acuoso y etanólico de hojas y corteza frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Arequipa 2013.

Objetivos Específicos:

1. Obtener los extractos secos etanólicos y acuosos a partir de hojas y corteza de *Bixa orellana* (Achiote) utilizando los métodos de maceración e infusión, determinar el % de rendimiento de cada extracto.
2. Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos obtenidos de *Bixa orellana* (Achiote) frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
3. Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos de *Bixa orellana* (Achiote) con actividad antibacteriana frente a los microorganismos sensibles.
4. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de los extractos etanólicos y acuosos obtenidos de hojas y corteza de *Bixa orellana* (Achiote) mediante la realización de una marcha fitoquímica preliminar.

CAPITULO II: Marco Teórico

2.1. Caracterización de *Bixa orellana*

2.1.1. Botánica y Taxonomía

a. Nombre Científico y Nombre Populares

Bixa orellana L. (Achiote, Aneto, bija) (4)

b. Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Phyllum: Spermatophyta

Subphyllum: Magnoliophytina

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilenidas

Orden: Violales

Familia: Bixaceas (5)

c. Descripción botánica

Es una planta arbustiva perenne que alcanza 3 a 5 m de altura, siendo su copa baja y extendida, como se observa en la *Figura 1*. Su tallo es oscuro y ramificado a poca altura del suelo. Las hojas simples, grandes, de color verde claro, de bordes lisos, forma acorazonada y con largos peciolos. Las flores están dispuestas en ramilletes terminales y son hermafroditas, de colores blanco a rosado. El fruto es una capsula de color rojo, erizado de pelos gruesos. En cada valva se encuentra un número variable de semillas, desde 10 hasta 40, en relación con el tamaño de la cápsula. La semilla está recubierta por una sustancia viscosa de color rojo vivo. (2) Características que se puede observar en la *Figura 2*.



Figura 1: Árbol de Bixa orellana L “Achiote.”

Extraído de: <http://www.salvatruchos.com/foro/index.php?topic=2880.0>

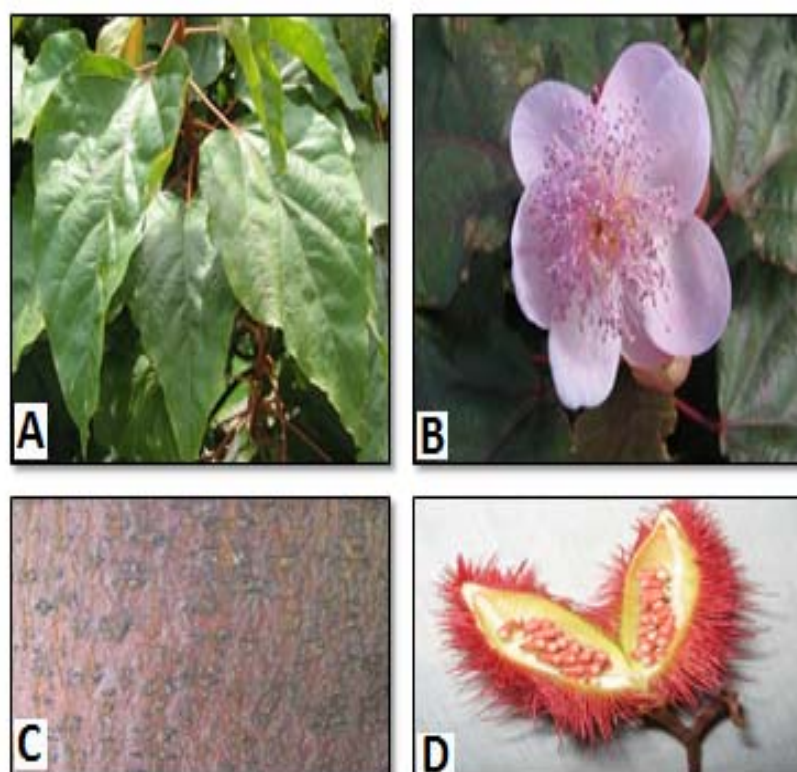


Figura 2: Características de la planta Bixa orellana. 2A .Hojas. 2B. Flores. 2C. Corteza. 2D. Fruto.

Extraído de: <http://www.salvatruchos.com/foro/index.php?topic=2880.0>

2.1.2.Hábitat y Distribución

Habita en climas cálidos, hasta los 1200 msnm. Planta cultivada en huertos familiares; cuando es silvestre se asocia a vegetación perturbada que deriva de bosques tropicales perennifolio. (3)

Es una planta oriunda del Brasil, desde la región amazónica del Brasil hasta Centro América. Los cultivos se han extendido a muchos países tropicales de África y Asia. En el Perú se encuentra distribuido en los departamentos de Huánuco (Tingo María), Pasco, Junín, Tumbes, Piura, Lambayeque, Madre de Dios, Ucayali, Loreto, Amazona, San Martín, Cusco, Puno, Apurímac.(22)

2.1.3. Mantenimiento del Cultivo y Rendimiento

a. Ciclo del cultivo.

Si la plantación de achiote ha sido debidamente cuidada la producción de semilla empieza a los 18 o 20 meses, pero normalmente comienza a los 4 años. La producción fuerte se mantiene por 10 años y puede continuar hasta 20 los 50 años, dándole un buen manejo. El rendimiento anual promedio de un árbol adulto de cinco años es de 2.33 Kg. de semilla. Unas 1111 plantas por hectárea rinden en promedio 2597 Kg. de semilla en oro por hectárea.

b. Cosecha.

Según la variedad y el lugar donde se encuentren sembrada, la primera cosecha se produce a los 20 meses la misma que es escasa, la producción comercial se obtiene pasado los 3 años. La selección de variedades a sembrar dependerá de la preferencia del productor.

Las capsulas se deben cosechar cuando alcancen su madurez comercial, pues ese es el estado en el que la concentración de bixina es mayor. Según la variedad, el estado de madurez comercial se alcanza aproximadamente de 2 a 3 meses después de haber ocurrido la floración. Un buen índice para determinar ese estado es palpar las capsulas, cuando estas resulten duras al tacto se pueden cosechar con seguridad.

Existen algunas variedades que cambian de color cuando alcanzan la madurez comercial lo que constituye un buen indicador para cosechar. La cosecha se debe hacer con la ayuda de tijeras podadoras o de machetes, evitando desgarraduras en las ramas. Se deben cosechar las panículas y no las capsulas individualmente. (27)

c. **Manejo post-cosecha.**

El manejo de pos- cosecha de las capsulas y de las semillas es de fundamental importancia para mantener la integridad de la bixina. De nada sirve sembrar en el campo cultivares altos en bixina, si el manejo post-cosecha no es el apropiado. Un manejo post-cosecha inadecuado puede dar la perdida de todo el trabajo realizado. De ahí la importancia de seguir los siguientes consejos:

- Se deben cosechar únicamente capsulas que estén en su punto adecuado de madurez. Las capsulas inmaduras (muy tiernas) y las que están secas (muy viejas) no tienen los contenidos de bixina adecuadas.
- Como la maduración de las capsulas ocurre gradualmente aun en una misma panícula (racimo) es conveniente esperar a que la mayoría alcance la madures en un tiempo determinado. No cosecharlas a fin de permitir que la mayor parte alcance su madurez y su mayor concentración de colorante.
- Las capsulas secas y abiertas no se deben cosechar pues la bixina se descompone por los rayos solares y por el ataque de plagas, especialmente hongos e insectos.
- Las capsulas maduras cosechadas pueden secarse al aire libre, bajo el sol o bajo sombra según se prefiera. Cuando el secado se realice bajo el sol, se debe tener cuidado que las capsulas no se abran y se expongan las se millas a la acción de los rayos solares.
- Por ningún motivo se deben secar las semillas bajo el sol, pues esta es una de las principales causas de pérdida de colorante.
- No se deben mezclar semillas de cultivares altos en bixina con la de cultivares bajos en bixina. Es mejor hacer las mezclas únicamente de cultivares altos en colorante.

- Solo se debe almacenar semilla seca, con contenidos de agua inferiores a 12%, a fin de evitar el ataque de hongos, si la semilla es atacada por hongos durante el almacenamiento es mejor desecharla, pues la calidad del colorante no será buena.

d. Podas

En vista de que el achiote forma su producción en las yemas terminales es esencial manejar el cultivo con podas, con los propósitos siguientes:

- Mantener la plantación a una altura que se haga más fácil su manejo y su cosecha.
- Mantener la plantación rejuvenecida para aumentar la producción
- Aumentar la densidad de población por unidad de superficie, y
- Realizar la cosecha en una forma más rápida y a más bajo costo.

En tal sentido se recomienda usar el sistema de poda de resepa, el cual permite rejuvenecer la plantación y mantener los índices de producción. Asimismo permite aumentar la densidad de población y manejar las plantaciones en topografía accidentada. Este sistema de podas se recomienda en vista de que los componentes del rendimiento en el achiote son: El número de semillas por cápsula; el número de cápsulas por racimo; y el número de racimos por árbol. Estos racimos se forman en las yemas terminales de los árboles.

Del segundo año en adelante se debe ejecutar una poda anual de limpieza, que consiste en la eliminación de brotes vegetativos en la base de la planta y de ramas secas.

Hay cuatro tipos de **podas** recomendados en el achiote: **Formación, resepa, mantenimiento y rejuvenecimiento.**

- La poda de formación generalmente se logra en el primer año; consiste en dejar un solo tallo y las ramas principales a 30 cm. de largo desde el tallo principal.
- La poda de resepa el cual permite rejuvenecer la plantación y mantener los índices de producción.
- La poda de mantenimiento consiste en la preservación de la poda anterior eliminando los brotes basales o chupones. Esta poda se da en los primeros tres años.
- Luego se aplica la poda de rejuvenecimiento. Esta se realiza a los diez a ocho años a fin de evitar que la planta crezca demasiado alta y la cosecha pueda colectarse fácilmente; consiste en cortar el árbol severamente, dejando los brotes nuevos. (27)

e. Rendimiento

Un árbol empieza a producir semillas a los 2 años, pero su producción normal comienza a los 4 años. Un pequeño árbol de achiote puede producir de 2.5 a 3.0 Kg. de semilla, equivalentes a 1942.5 Kg/Mz. ó 42.74 quintales de semilla/Mz.

Tabla 1.

Rendimiento del Cultivo de Bixa orellana.

Rendimiento en los 5 primeros años del cultivo	
Año	Rendimiento por manzana
2	4 quintales
3	14 quintales
4	30 quintales
5	40 quintales

Fuente: Ministerio de Agricultura.

2.1.4.Cultivo

Requiere clima húmedo y suelo franco-limoso o arcillo-humífero, neutro, profundo y drenado. Se propaga por estaca o semilla; se prefiere la semilla cuya germinación es rápida (10-15 días). Se trasplanta a distancias de 4x3 m a partir del tercer año una plantación produce de 500 a 2, 500 Kg de semilla/árbol. (2)

El achiote tiene poca exigencia nutricional, crece sin mayor limitación en suelos de baja y mediana fertilidad. El primer abonamiento con humus se realiza a los 2 meses de trasplante en terreno definitivo, luego cada 6 meses. Es recomendable proveer un sombreado hasta que la planta alcance unos 35 cm de altura. Se puede realizar también en almácigo bajo sombra y se procede después a su trasplante al lugar definitivo cuando las plántulas hayan alcanzado una altura de 25-30 cm. La época de siembra más adecuada es a principios de primavera, pudiendo prolongarse hasta fin de la misma. (22)

El Achiote tiene un efecto restaurador del medio ambiente relacionado a los aspectos siguientes:

- Produce anualmente una cobertura de hojarasca, lo que permite la formación de humus en el suelo.
- Por el follaje que forma provee la conservación del suelo, controlando la erosión.
- Recuperación de terrenos degradados. Tiene como característica especial el ser una especie utilizada para la regeneración de suelos. Se ha empleado esta planta en otros lugares para rehabilitar sitios donde antes hubo explotación minera.
- En vista de tener un follaje abundante y una floración que dura tres meses la fauna se enriquece.
- La plantación forma una masa de biomasa que libera oxígeno.

2.1.5. Producción Nacional por Regiones y Beneficio del Cultivo de Achiote

Como se observa en la Tabla 2. La producción de Achiote en el Perú se centralizada en el cuzco y Pasco. Debido a la fomentación del cultivo con apoyo del ministerio de agricultura.

Tabla 2.

Producción por Departamento de Achiote en Toneladas.

Años	2009	2010	2011	Var. %	Part. %
Cuzco	2,779	2,440	2,200	-9.84	47.30
Pasco	1,184	1,164	1,859	59.71	39.97
Ayacucho	196	217	230	5.99	4.95
Junín	152	135	124	-8.15	2.67
Ucayali	62	97	109	12.37	2.34
Cajamarca	48	45	45	0.00	0.97
Amazonas	35	33	35	6.06	0.75
Loreto	--	23	23	0.00	0.49
Puno	19	20	18	-10.00	0.39
M. de Dios	9	5	4	-20.00	0.09
La Libertad	1	1	2	100.00	0.04
Tumbes	1	4	2	-50.00	0.04
Total	4,486	4,184	4,651	10.04	100

Fuente: Ministerio de Agricultura.

Como se observa en la Tabla 3. La producción de Achiote en los primeros años no es rentable debido a que los costos de mantenimiento superan el ingreso en venta del producto.

Tabla 3.

Beneficio US\$ del cultivo de Achiote en los primeros 5 años.

Año	Costo	Ingreso	Diferencia
1	913.72	-----	- 913.72
2	670.33	228.56	- 441.77
3	900.68	799.96	- 100.72
4	937.19	1714.20	+ 777.01
5	952.19	2285.60	+ 1333.41
Vida útil de la plantación: Hasta 50 años.			

Fuente: Ministerio de Agricultura.

2.1.6. Propiedades e Importancia

a. Usos medicinales tradicionales atribuidos

- Hojas: Usadas como analgésico (dolor de cabeza), cicatrizante, para el tratamiento de tos, bronquitis, lepra, quemaduras, micosis, infecciones de la piel, hepatitis, diabetes, sida, como afrodisíaco y antipirético, antiinflamatorio conjuntival, antiinflamatorio vaginal, cicatrizante, antihipertensivo y antidiarreico. (22)

La decocción de las hojas, se emplea como inflamatorio en las inflamaciones de boca y garganta y como diurético, purgativo, antivenéreo y reanimante después de las fiebres intermitentes. (2)

- Semillas: Usadas como expectorante, para tratar la tos, bronquitis, quemaduras; como laxante, antídoto para el caso de intoxicación de ácido cianhídrico o alimentos que lo contienen, afrodisíaco, antigonorreico, antihemorroidal, diurético, antiasmático, antipirético y hepáticas; también usadas para diabetes, debilidad, infección gastrointestinales, erupciones de la piel, y erisipela. (22)

Las cataplasmas y los emplastos con infusión de semillas en aceite o leche caliente, se utilizan fríos contra inflamaciones producidas por golpes, esquinces y torceduras. Las semillas se emplean para tratar bronquitis y hemorroides, tónico, digestivo, laxante suave, diurético, purgativo, antiasmático, febrífugo, antidiabético, expectorante, afrodisíaco y repelente de insectos especialmente de mosquitos y zancudos. (2)

- Corteza: Depurativa, antiinflamatoria ocular e infecciones. (22)

b. Otros usos populares

Las semillas se utilizan como colorante en la industria de alimentos y textiles. En la industria para colorear quesos, margarina y mantequilla, pintando muebles. La bixina se usa también como repelente de insectos.

c. Contraindicaciones y precauciones

La semilla puede ser abortiva. (22)

d. Composición química

El extracto acuoso de semillas contiene 9,000-2,000 UI/g de Vitamina A, carotenoides (B-caroteno, bixina, norbixina), aminas, flavonoides, leuco antocianinas, triterpenos y taninos. Las hojas contienen alcaloides, flavonoides y sesquiterpenos. El análisis proximal de 100 g de semilla seca contiene: 13.1 g de proteína, 5 g de grasa y 5.4 g de ceniza; 100 g de planta fresca contiene: 54 calorías, 84.4 g de agua, 0.3g de grasa, 14.3 g de carbohidratos, 0.5 g de fibra, 1.0 g de ceniza, 7 mg de calcio, 10 mg de fósforo, 0.8 mg de hierro, 90 ug de caroteno, 0.005 mg de riboflavina, 0.3 mg de niacina y 2 mg de ácido ascórbico. (2)

2.2. Productos Naturales

Los productos naturales utilizados en medicina tradicional están probando ser una importante fuente de agentes terapéuticos, que basan sus efectos en la presencia de moléculas activas.⁷ Sin embargo, dentro del campo de estudio de productos naturales existe una gran variedad cuyos efectos farmacológicos son desconocidos, o en todo caso sus usos y propiedades solo las conocen gente del campo o específicamente curanderos.

Tomando en cuenta la enorme variedad de productos naturales existentes y sus posibles propiedades farmacológicas, se debe de tener una estrategia a fin de recolectar el producto adecuado y que tenga las propiedades farmacológicas deseadas. Por ejemplo algunas especies muestran características que indican la existencia de moléculas capaces de evitar la pre dación por insectos e infección, lo que sugiere la producción de toxinas químicos. (38)

2.3. Metabolitos Secundarios

Son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales. Los metabolitos son moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen roles muy importantes en el reino vegetal, pueden suponer una ventaja competitiva considerable.

➤ Importancia de los Metabolitos Secundarios

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre.

Así mismo, es importante destacar que a pesar de todos los esfuerzos de naciones, instituciones gubernamentales y no gubernamentales e investigadores en aumentar el nivel y el caudal de conocimientos adquiridos sobre las metodologías de transformación secundaria (de frutos, flores, semillas, hojas y tallos) y de la identificación y caracterización de los metabolitos secundarios de especies vegetales priorizadas.

En la actualidad solo unos pocos metabolitos se utilizan de forma industrial, por lo que se ha creado la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en el entorno trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisorias que pueden tener aplicación en la industria (cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria). (4)

2.3.1. Metabolitos Secundarios de Importancia

a) Flavonoides

Los flavonoides (del latín flavus = amarillo), son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 malonil-CoA a través de la “vía biosintética de los flavonoides”, cuyo producto se cicla gracias a la enzima isomerasa. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos, compuesto por dos anillos de fenilos A y B ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Figura 3. Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, estos son sintetizados en el citoplasma y luego hacia las vacuolas de las células vegetales. Estos compuestos poseen efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antialérgicos, anticancerígenos, antitrombótico, analgésico, antioxidantes, protege el hígado y la mucosa gástrica, entre otros beneficios. (35)

Los pigmentos flavonoides, uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antotaxinas. (28)

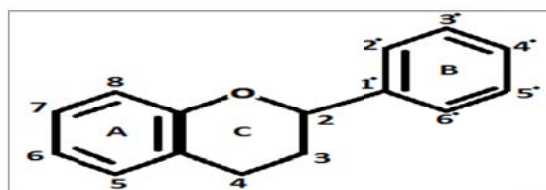


Figura 3. Núcleo básico de un flavonoide.

Los flavonoides tienen importancia farmacéutica como antiinflamatorios, antioxidantes, etc. (39)

Cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glucósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y /o 7 como característica generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol. Los flavonoides se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado.

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunos polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones: edulcorante e insecticidas.

La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidos sus actividades contra la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética.

Destacaremos asimismo la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas. Siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicosidos conocidos. (28)

Los flavonoides son moléculas bioactivas muy distribuidas en el reino Vegetal. Existen miles de Flavonoides descubiertos y cuyas estructuras químicas han sido determinadas; y cada año se descubren centenares de ellos en especie vegetales no estudiadas. (39)

b) Taninos

Los taninos son compuestos poli fenólicos hidrosolubles de sabor áspero y amargo. Su composición química es variable pero poseen una característica común la de ser astringentes y coagular los alcaloides, albuminas y metales pesados. Son polvos amorfos de color amarillento, aspecto grasiento de masa molecular relativamente elevada poco denso solubles en agua y alcohol e insoluble en éter, benceno y cloroformo. Cuando se calienta a 210° C se descomponen produciendo dióxido de carbono y pirogalol.

Dentro de los vegetales, estos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas, actuando como inhibidores enzimáticos la precipitar la fracción proteica de las enzimas, permitiendo la conservación de otros principios activos. Son utilizados en la curtiembre gracias a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas, al igual que en la industria textil por su capacidad de reaccionar con las sales férricas, los cuales dan lugar a productos negro- azulados para tintes igualmente son utilizados como mordientes para la aplicación de tintes en tejidos, papeles o sedas.

En medicina se prescriben por su acción astringente hemostática, antiséptica y tonificante. También son considerados antídotos para diversos envenenamientos por alcaloides tóxicos gracias a su propiedad de formar complejos con los mismos .se emplean en el tratamiento de procesos diarreicos, inflamación de la piel y de la mucosa bucofaríngea, alteraciones gastrointestinales como cicatrizante hemostático, antioxidante, antibacteriano entre otras.

La función antimicrobiana se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para su desarrollo, los taninos pueden ser utilizados como protección contra infecciones, debido especialmente a que provocan desnaturalización de las proteínas. (35)

Los taninos son sustancias fenólicas naturales de origen vegetal que tienen la propiedad de curtir la piel transformándola en cuero y de dar con las sales de fierro coloraciones azul oscuras, negras y verdes.

Los taninos se caracterizan por ser sustancias amorfas, de sabor astringente, son solubles en agua, alcohol y acetona, insolubles en éter y éter de petróleo. Las soluciones acuosas de los taninos de carácter coloidal y tienen reacción acida por la cual se le llama también ácidos tánicos Figura 4. (34)

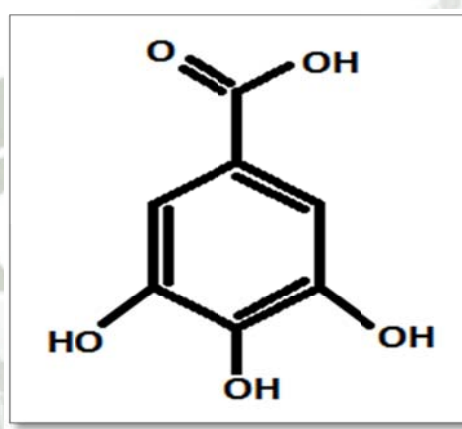


Figura 4. Núcleo básico de un tanino.

c) *Alcaloides*

Los alcaloides son compuestos que poseen reaccion quimica alcalina denominados sales cristalizables, por lo general o en union con ácidos orgánicos y taninos..todos los alcaloides contienen nitrógeno, hidrógeno, carbono y la gran mayoría oxígeno. El caracter basico se debe al par de electrones libres del nivel . por su carcter basico son sensibles a la luz y el calor se estabilizan con ácidos inorganicos. En la naturaleza se encuentran en forma de sales aunque tambien libres.

Los alcaloides son sustancias procedentes del metabolismo secundario y sintetizados a partir de aminoácidos. Tienen la particular de ser amargas al gusto, solubles en alcohol, eter, cloroformo o hexano, cristalizables y poco solubles en agua se localizan generalmente en los tejidos perifericos de la corteza, raices, hojas, frutos y semillas.(35)

Los alcaloides forman un grupo de productos naturales particularmente interesante por la intensidad de los efectos que producen y porque constituyen la materia prima para la obtención de un buen número de principios activos que se emplean actualmente en terapéutica. Desde el punto de vista semisintético, desempeñan un valioso papel en la obtención de fármacos indicados en el tratamiento de procesos neoplásicos. (30)

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, corteza y hojas; al estado libre o como glicosidos, o formando sales con ácidos orgánicos. Aunque no hay una definición exacta para termino alcaloide, en él se incluyen aquellas sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, que manifiestan significativa actividad farmacológica y han sido biosintetizados de aminoácidos como precursores; compuestos que llenan estas características, se dice que son verdaderos alcaloides. (28)

La función de los alcaloides en las plantas es aun no muy conocida, como ocurre con la mayoría de los productos naturales, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores del crecimiento, como repelentes o atracción de insectos; el hecho que aproximadamente el 80% de las plantas no contienen alcaloides hace suponer que estos no son vitales para los organismos vivos. Los alcaloides derivan principalmente de los aminoácidos ornitina, lisina, fenilalanina, triptófano y del ácido antranílico, a través de una serie de reacciones, entre ellas, reacciones tipo aldólica.

Se da el nombre de alcaloides a compuestos nitrogenados dotados de propiedades básicas que se forman en las plantas y por lo general son sustancias fisiológicamente activas. Pertenecen en su totalidad al reino vegetal y forman parte integrante de la composición de muchas plantas, constituyen uno de los principios activos que comunican a éstas. Sus propiedades tóxicas o farmacológicas, justificando su uso en terapéutica. El vocablo alcaloide deriva de álcali: alcalino y eidos: semejante.

Los alcaloides se encuentran por lo común en las raíces hojas, semillas y frutos, aunque suelen producir también en otros tejidos como en la corteza de los tallos.

Los alcaloides oxigenados son sólidos, cristalizados, no arrastrables por el vapor de agua, exceptuando a la Pelletierina. Los alcaloides sólidos y sus sales tienen generalmente color blanco con excepción de la berbenina que es amarilla y las sales de la sanguinaria que son rojas. (28)

Generalmente los alcaloides son poco solubles en agua exceptuando la nicotina, cicutina, codeína, etc. En cambio son muy solubles en alcohol etílico. En el éter, cloroformo, alcohol metílico, éter de petróleo, etc. (40)

d) Saponinas

El termino saponinas deriva del latín sapo= jabón, son heterosidos naturales que siguen la vía del esculeno y poseen características físicas y químicas biológicas comunes agentes tensioactivos, hemolíticos, tóxicos para animales y al hombre por vía endovenosa.

Por hidrolisis dan azúcares y agliconas (sapogenimas) y por rotura de una molécula se puede obtener naftaleno, fenantreno, sapotaleno. Las saponinas poseen propiedades diuréticas, digestivas, antiinflamatorias, expectorantes, antimicrobianas y antiespasmódicas. También favorecen la utilización o aprovechamiento de otras sustancias como el calcio y la sílice.

Estos compuestos poseen una importante actividad antibacteriana debido a que reducen la tension superficial y actuan sobre los lipidos de la membrana provocando alteraciones de las mismas, lo que con lleva a la muerte celular para ello se sugiere la formacion de complejos con el colesterol presente en la membrana. (35)

Las saponinas son sustancias vegetales de naturaleza glicosídica que tienen la propiedad de producir espuma cuando se agita con agua, se caracterizan también por ser sustancias hemolíticas, destruyendo los glóbulos rojos y hematíes de la sangre. La propiedad de las saponinas de producir espuma (propiedad afrogena) es debida a que cambian la tensión superficial de los líquidos (disminuyéndola), por esta propiedad favorecen la emulsión de aceites y resinas en el agua, pudiendo usarse como emulgente.

Son sustancias por lo general amorfas, blancas, a veces amarillentas y pardas, inodoras pero irritantes al olfato, sabor acre y amargo, son estornutatorias, forman con el agua soluciones coloidales, son solubles en alcohol diluido (70-80 %) e insolubles en el éter y cloroformo, son higroscópicas. (40)

2.4. Metodología de Obtención de Materia Prima

2.4.1. Recolección

La recolección es el proceso mediante el cual se obtiene la parte de la planta que va a ser utilizada (droga). La droga se separa de la planta en el momento de recolectar (raíz, flor); o se corta una parte de la planta y posteriormente se separa la parte de interés (hojas, corteza).

La recolección se realiza de forma:

- Manual
- Semimanual
- Mecánica

Las operaciones de cosecha deben realizarse de forma tal que se mantenga la calidad y sanidad del producto, evitando su contaminación. Se obtiene una muestra completa, de hojas, flores y tallos, y raíces en caso de que interese estudiar algún principio activo contenido en ellas.

Como norma general, no deben recogerse las plantas con el tiempo húmedo (lluvia, niebla...). Lo mejor es recolectar por la mañana (cuando se seque el rocío).

- Las hojas se recogen jóvenes pero completamente desarrolladas, justo antes de que las flores estén completamente desarrolladas.
- Las flores se recogen cuando están abiertas del todo pero aún frescas.
- Los frutos se recogen maduros.
- Las raíces totalmente desarrolladas y vigorosas.
- La corteza se recoge en ramas jóvenes.
- La hierba completa se recoge al principio de la floración.

La recolección en campo se hará de modo que no se arranque la raíz, cambiando de lugar para dar tiempo a la regeneración, no más de la mitad de las hojas de una misma planta, dejando frutos y semillas.

a) Momento de la recolección

El momento de recolección viene fijado por la parte de la planta que se quiera aprovechar (semillas, hojas, flor o raíz) y debe tenerse en cuenta que es un factor clave para conseguir la calidad y riqueza deseada en principios activos. El ritmo de recolección debe estar siempre sometido al ritmo de procesado o transformación.

b) Procesos post cosecha

Los siguientes procesos post – cosecha son comunes en plantas medicinales (para uso farmacológico).

c) Corte

Se efectúa para favorecer la salida de la humedad por el aumento de la superficie de evaporación, está en dependencia de la tecnología aplicada y el tipo de cultivo.

d) *Lavado*

Consiste en aplicar agua potable a la parte de la planta que se va a deshidratar con el propósito de eliminar la tierra y otros materiales extraños. (25)

Para cada planta medicinal existe un momento adecuado para la recolección. El seguimiento fitoquímico de los principios activos permite establecer con exactitud la época idónea para la cosecha.

Las cortezas deben ser recolectadas en primavera, al inicio del verano o en otoño, cuando el ambiente húmedo facilita su separación. Deben tomarse algunas precauciones para evitar retirar la corteza por medio de cortes horizontales que circunden el tronco, ya que este procedimiento impide la circulación de la savia produciendo la muerte de la planta.

Los órganos subterráneos, raíces, rizomas y tubérculos deben ser recolectados durante el invierno, en el periodo de reposo vegetativo. Las hojas y las plantas herbáceas se recolectan cuando se inicia a floración.

Las sumidades floridas se recogen en plena floración y antes de la formación de las semillas. Las frutas se recolectan antes de alcanzar el estado maduro. Las semillas se recolectan cuando están maduras. (36)

2.4.2. Procesamiento

El procesamiento posterior a la recolección tiene como objetivo la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas de la droga vegetal.

Un procesamiento post- cosecha inadecuado produce una materia prima de baja calidad, con pérdida de principios activos, aumento de la carga bacteriana y deficiente presentación comercial. Las pérdidas de principios activos involucran:

- Degradación por procesos metabólicos.
- Hidrólisis de principios activos.
- Descomposición enzimática.
- Descomposición por la luz
- Contaminación por hongos y bacterias
- La primera etapa del procesamiento incluye el examen y la separación manual de las partes deterioradas, manchadas y con señales de ataque por insectos u hongos. (36)

La transformación comprende todos aquellos procesos que van a permitir conservar la materia prima, seleccionar la parte utilizada, limpiarla de elementos extraños, triturarla o molturarla, obtener sus principios activos (extracción y destilación), para finalmente ser envasada y etiquetada, para un correcto almacenaje y/o transporte.

El material recolectado ha de pasar por un proceso de manipulación o transformación posterior según el producto buscado. Los procesos principales de transformación y conservación son:

- Secado o liofilización si el destino es planta seca
- Extracción de principios activos no volátiles
- Destilación de aceites esenciales (volátiles)
- Refrigeración o congelación para planta fresca o congelada respectivamente. (25)

2.4.3. Desección

El objetivo es deshidratar por debajo del 10% y que no puedan actuar las enzimas; evitar el ataque de bacterias y hongos, que provoquen moho y por tanto se pierda calidad, al mismo tiempo facilitar el transporte. Plantea problemas pues no todas las drogas tienen el mismo grado de humedad. La textura de las drogas también es diferente y según esta habrá mayor o menor facilidad para que el agua se evapore. Los principios activos pueden ser más o menos sensibles a la temperatura. La deshidratación debe ser lo más rápida posible y que no altere el principio activo. Después de la desecación hay que determinar la humedad para que no sea inferior al 10 %.

El método a emplear dependerá de la naturaleza de la droga, humedad, consistencia, cantidad y naturaleza del principio activo. Los alcaloides son más resistentes que los glicósidos o azúcares. Así, los aceites esenciales no se pueden desecar a temperaturas elevadas por su volatilidad. Tres métodos: por aire, calor, a vacío.

a) *Desecación por aire*

Se practica en países de clima cálido y seco, para cantidades pequeñas de droga y para cuando los principios activos son poco alterables. Esta desecación se hace a la sombra, para evitar la acción del sol, provocaría acciones fotosintéticas sobre el material vegetal.

Normalmente se protege de la humedad de la noche, se hace en lugares cerrados ventilados, extendiendo el material en capas delgadas. Es un proceso lento y puede haber desecación al aire.

b) *Desecación por calor*

Es el más usado, tiene la ventaja de que podemos controlar los dos factores que afectan a una buena desecación: la temperatura y la ventilación. Tendremos que asegurar una eliminación rápida de la humedad, sin alterar el principio activo. Si la temperatura es elevada, se produce una evaporación rápida superficial y se forma una costra que impide que la desecación progrese.

La desecación se suele practicar entre 30 y 40 grados. Para cortezas entre 60 y 70; según el principio activo. La ventilación nos asegura que el aire permanece en contacto con la droga hasta que se satura de humedad. Una vez saturado se retira.

La desecación a pequeña escala se hace en estufas con tiro de aire y en la industria se suele practicar en túneles de desecación. Estos tienen en un extremo un foco calorífico y en el otro un ventilador. En el túnel se introduce la droga en vagonetes con varias bandejas, consiguiendo una desecación progresiva. A medida que va avanzando va encontrando aire menos caliente.

Para la producción de planta seca, se puede hacer secado natural, que requiere más tiempo y espacio, ya sea colgando las plantas o en bandejas, o secado forzado, que consiste en hacer circular aire seco y caliente en un recinto cerrado extrayendo el aire húmedo y frío. Es mucho más rápido, dependiendo también de la humedad de la planta. (25)

La etapa más importante del procesamiento, sin duda, es el secado.

La industria utiliza generalmente drogas vegetales desecadas, lo que posibilita su conservación durante periodos de tiempo prolongados. El secado interrumpe los procesos de degradación causados por enzimas o fermentos, impide el crecimiento de microorganismos y las reacciones de oxidación e hidrólisis. Sin embargo, debido a la aplicación de calor durante el proceso, puede producirse una pérdida de aceites esenciales y sustancias volátiles, y existe el riesgo de degradación de sustancias termolábiles. La mayoría de drogas vegetales puede secarse a temperatura que varían entre 30°C y 60° C. (36)

2.4.4.Fragmentación

Las plantas secas pasan al proceso de molienda para reducir su tamaño y mejorar consecuentemente la superficie de contacto con el solvente. (26)

2.4.5.Almacenamiento

El producto cosechado debe ser almacenado en condiciones tales que mantengan la calidad, sanidad e inocuidad hasta llegar a su utilización. Un correcto almacenamiento del producto prolonga su vida útil.

El proceso debe prestar atención a dos aspectos básicos que influyen en la calidad del producto final:

- Las características y condiciones del almacén.
- Los factores que influyen en el producto durante el proceso y el estado de almacenamiento del producto.

El almacenaje de planta se efectúa en sacos de papel o de arpillera de plástico, o en cajas, evitando en lo posible su fermentación si es planta fresca. Cada envase debe ir identificado con el nombre de productor, la especie, la forma de presentarla y la fecha de recolección. Durante el almacenamiento pueden ocurrir alteraciones: oxidaciones por el aire, aceleración de reacciones por el calor, modificar la apariencia de la droga debido a la luz, o aparición de mohos por la humedad.⁴¹ Las drogas no se pueden conservar indefinidamente y se suelen renovar cada año o dos. Si son cortezas tres o cuatro años. (25)

2.5. Extractos Vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.

2.6. Métodos de Extracción

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación. En el caso de búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en agua o con solución de (0.9 % NaCl). Frecuencia se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad.

Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua. (4)

2.6.1. Tipos de extracción:

Estos métodos extractivos consisten en la difusión de los principios activos presentes en la droga, hasta el disolvente que se pone en contacto con ella. Para que los principios activos pasen desde el material vegetal hasta el disolvente este ha de ser capaz de penetrar en el material vegetal y los principios activos han de ser solubles en el disolvente empleado. Estos disolventes suelen ser agua, alcohol o mezclas de ambos y disolventes orgánicos como benceno y cloroformo. ¹³ Los diferentes tipos de extracción se pueden englobar en dos grupos:

a) *Extracción discontinua o simultanea*

Se sumerge el material vegetal en el solvente, por lo que la totalidad del material vegetal contacta con el solvente utilizando para la extracción y la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio. La extracción discontinua incluye varios métodos de extracción como se describe en la Tabla 4. Atendiendo a la temperatura, tiempo y solventes utilizados. (30)

Tabla 4.

Variantes de los Métodos de Extracción discontinua

Extracción discontinua	Temperatura	Tiempos	Solvente
Maceración	Ambiente	Horas-días	Agua Mezclas Hidroalcoholica Glicerina
Digestión	Ambiente	Horas-días	Agua Mezclas Hidroalcoholica Glicerina
Infusión	Próxima a ebullición	1-2 minutos hasta 30 minutos	Agua
Decocción	Ebullición	15-30 minutos	Agua

- **Maceración**

En este método el material vegetal se pone en contacto con el disolvente durante un tiempo de entre 30 minutos y varias horas o días, dependiendo de la droga y el disolvente empleados, hasta que se produzca la extracción. El proceso tiene lugar a temperatura ambiente, por lo que se utiliza principalmente con sustancias termolábiles y solubles en frío. Para finalizar, se lleva a cabo una filtración para clarificar el disolvente. El líquido así obtenido se denomina tintura.

Un ejemplo doméstico de maceración es la elaboración de aceites o vinagres aromáticos. En medicina naturista y fitoterapia se utiliza para la obtención de alcohol de romero u otras plantas medicinales.

- **Infusión**

En este método el disolvente (principalmente agua), a una temperatura de 100°C, se pone en contacto con el material vegetal y se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Tras su filtrado, la infusión ya está lista para su uso.

Las infusiones son unos preparados bebibles muy usuales a nivel doméstico y que se toman con fines dietéticos o medicamentosos. A nivel comercial las infusiones se presentan en forma de sobres de papel filtrante con la droga vegetal en su interior.

- **Digestión**

Es un proceso similar al anterior aunque la temperatura a la que se lleva a cabo es de 40- 50 °C y la duración es de 24 horas. También existe un filtrado final.

- **Cocción o decocción**

En este caso la droga con el disolvente se mantienen en ebullición (100°C para el agua) durante 15-30 minutos. Posteriormente se filtra y se recoge el líquido resultante denominado cocimiento. (5)

b) *Extracción continua o progresiva*

El solvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección. Son métodos que consisten en poner en contacto el material vegetal con el solvente adecuado y mantener en todo momento el desequilibrio entre la concentración de principio activo en el material vegetal y en el solvente para que se produzca la difusión celular. Mediante estos procedimientos se puede llegar a la extracción prácticamente completa de los principios activos del material vegetal. Se utilizan varios métodos de extracción continua como se describe en la Tabla 5. (30)

Tabla 5.
Variantes de los Métodos de Extracción continúa

Extracción continua	Temperatura	Tiempos	Solvente
Percolación	Ambiente	Variable	Variable
Soxhlet	Ebullición	Variable	Solventes orgánicos

- **Percolación**

En este método el material vegetal, finamente picada o pulverizada, se coloca en un recipiente troncocónico o en forma de columna donde se añade también el disolvente. Este disolvente ayudado por la gravedad, recorre la columna en sentido descendente entrando en contacto con el material vegetal y arrastrando los principios activos que contiene. el recipiente, denominado percolador, presenta, en su parte inferior, una apertura controlada por una llave por donde sale el disolvente con los principios activos disueltos en su interior. Por la parte superior se añade disolvente puro que compensara las salidas inferiores y continuara extrayendo principios activos.

- **Extracción Soxhlet**

Es un método de extracción continua que se basa en un sistema de reflujo que garantiza la provisión de disolvente puro. Para ello se requiere un extractor solxhlet y una fuente de calor que permita la ebullición del disolvente. (30)

2.6.2.Consistencia de los Extractos

Álzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos.

a) *Extractos Blandos*

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa. (4)

Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular, por lo que prácticamente no se utilizan. (30)

b) *Extractos Firmes o de Consistencia Pilular*

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos.

c) *Extractos Secos*

Anteriormente se les conocía con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5% al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. (4)

Se obtienen por evaporación total del solvente y tienen una consistencia de polvo. Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original.

Son preparados bastante estables (aunque en muchas ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación que se pueden utilizar para preparar tinturas, extractos fluidos, etc. (30)

d) *Extractos fluidos*

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada. (4)

El solvente se ha evaporado en el rotavapor hasta conseguir una concentración de principio activo similar a la concentración de principio activo en la droga original. Tienen consistencia líquida y se obtienen generalmente por maceración o percolación. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. También pueden obtenerse por disolución de extractos secos.

Los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y el aire. Son muy utilizados para obtener formas líquidas (jarabes, pociones, gotas, entre otras) ya que se manipulan y dosifican con facilidad. (30)

2.6.3. Características de los Extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- a) Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- b) Algunos son de color café amarillo, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas verdosos debido a la clorofila.
- c) Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- d) Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- e) Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- f) Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholímetro del alcohol con el cual han sido preparados.
- g) Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordell (1995) propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final. Estos trabajos fueron remontados por Corpas, quien propuso realizar ensayos de identidad a los extractos obtenidos.

2.6.4. Conservación de los Extractos

La conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- a) Se deben conservar protegiéndolos de la luz.
- b) Los envases deben estar bien tapados.
- c) Se deben conservar en un medio ambiente seco.

Desde luego, son numerosos los métodos que se han indicado para la conservación de los extractos. Para mayor comodidad ellos se pueden clasificar, en dos categorías. En el primer grupo tenemos aquellos a los cuales no se les ha adicionado ninguna materia extraña. Al segundo grupo, por el contrario, pertenecen aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza fisicoquímico definida. (4)

2.7. Agentes Antimicrobianos

La microbiología médica es en el momento actual una ciencia aplicada de primera necesidad en el manejo de la patología infecciosa. También lo es desde el punto de vista de la investigación, con infinitos objetivos sobre los que especular y proyectar diseños experimentales.

Cabe destacar que, a pesar de los grandes avances tecnológicos (medios de cultivo, automatización, biología molecular), las enfermedades infecciosas y parasitarias no han sido erradicadas, sino que en cierta manera han incrementado en número y a veces en gravedad debido a que existen pacientes más susceptibles. Los antibacterianos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos. Se han identificado cientos de antibacterianos y muchos han sido llevados a la etapa en que tienen utilidad en la terapia de enfermedades infecciones. Los antibacterianos muestran diferencia notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción. (4)

2.8. Descripción de las Bacterias en Estudio

2.8.1. *Escherichia coli*

El microorganismo facultativo más predominante hallado en el intestino grueso del hombre y es el bacilo entérico más frecuentemente aislado en el laboratorio. Es único entre otros patógenos oportunistas en cuanto se asocia con enfermedad gastrointestinal humana, particularmente en niños y viajeros a naciones en desarrollo.

La *Escherichia. coli* ha sido objeto de más investigación experimental que cualquier otro microorganismo, especialmente en el campo de la genética molecular.

➤ **Características Bioquímicas y de los Cultivos:**

La *Escherichia. coli* crece bien en muchos medios comúnmente utilizados. Algunas cepas producen beta hemólisis en agar-sangre. En medios de aislamiento entérico, muchas cepas aparecen como colonias fermentadoras. Muchas cepas son no pigmentadas, móviles, producen lisina descarboxilasa y utilizan acetato como única fuente de carbono. (19)

Es un bacilo de 1 -3 μm por 0.5 μm , que se presenta solo, en pares, en cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil (por flagelos peritricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forma esporas y por lo general es no capsulado y Gram negativo. En cultivos jóvenes la forma coco bacilar es bastante frecuente; en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor.

En agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas, de borde continuo o un tanto ondulado, brillantes y de coloración blanca un poco amarillenta. Con producción de ácido y gas, fermenta la lactosa y un gran número de carbohidratos; algunas cepas son lactosa negativos.

Es indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer (VP) negativa y no utiliza el citrato. Produce H₂S en determinación medios.

Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura optima de crecimiento es de 37°C, pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH favorable es de 7 alguna cepas producen hemolisina. (4)

➤ **Infección Clínica**

La *Escherichia. coli* es la causa más común de infección de las vías urinarias en el hombre. Más del 85% de todas las infecciones de las vías urinarias adquiridas en la comunidad son causadas por este microorganismo.

La enfermedad puede variar de cistitis a pielonefritis. Es más probable que las mujeres presenten infecciones urinarias a una edad menor, siendo muy importantes factores como maduración sexual, partos y tumores. La exposición a maniobras instrumentales, diabetes, obstrucción y embarazo son factores adicionales que predisponen a las personas a infecciones urinarias por *Escherichia. coli* y otros microorganismos.

La *Escherichia. coli* también puede causar neumonía. En algunos hospitales, la *Escherichia. coli* ha causado hasta el 50% de las neumonías hospitalarias primarias. La *Escherichia. coli* es una causa mayor de meningitis neonatal, pero rara vez causa meningitis en población de mayor edad. Puede aislarse de heridas infectadas, particularmente en el abdomen. La peritonitis causada por *Escherichia. coli* y otros microorganismos intestinales es una complicación frecuente de un apéndice roto. La *Escherichia. coli* puede también invadir el torrente sanguíneo durante cualquiera de las infecciones ya mencionadas.

➤ Tratamiento

Las *Escherichia coli* aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad habitualmente son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos gramnegativos. Sin embargo, aparecen formas resistentes, especialmente en pacientes con antecedentes de tratamiento antibiótico previo. Aunque la diarrea infantil ha podido ser controlada por medio de un cierto número de antibióticos, la rápida aparición de formas resistentes exige un estrecho control de los patrones de sensibilidad.

El tratamiento profiláctico con antibióticos como trimetoprima-sulfametoxazol ha reducido la incidencia de la diarrea del viajero. Sin embargo, algunos clínicos creen que este tratamiento puede servir solo para seleccionar bacterias resistentes.

2.8.2. *Klebsiella*

El miembro más comúnmente aislado de las *Klebsiella* es la *Klebsiella pneumoniae* (bacilo de Friedlander). Como su nombre lo indica, puede causar neumonía y originariamente se creyó que era la causa de la neumonía lobar clásica, cuyo verdadero agente es el *Streptococcus pneumoniae*. Como otros oportunistas, la *Klebsiella pneumoniae* puede causar infección de otros sitios del cuerpo además de las vías aéreas.

Las infecciones causadas por *Klebsiella oxytoca* son similares a las causadas por *Klebsiella pneumoniae*. Las otras dos especies restantes de *Klebsiella*, son los agentes causales de infecciones crónicas de la mucosa nasal y faringe y son raras.

➤ **Características Bioquímicas y de los Cultivos:**

La identificación de la *Klebsiella* puede lograrse mejor por medio de las pruebas; fermentación de lactosa positivo, Voges proskauer positivo, Rojo de metilo negativo, Citrato positivo, Lisina descarboxilasa positivo y indol *Klebsiella. pneumoniae* negativo y *Klebsiella. oxytoca* positivo.

Todas las especies característicamente son inmóviles. La presencia de una gran capsula hace que las colonias de *Klebsiella*, que crecen en agar, aparezcan grandes, húmedas y mucosas.

➤ **Infección Clínica**

La *Klebsiella. pneumoniae* puede causar una neumonía primaria. En general, esto ocurre en hombres de edad mediana y ancianos que presentan problemas médicos subyacentes, como alcoholismo, enfermedad broncopulmonar crónica o diabetes. Se constata esputo espeso, no pútrido y sanguinolento en aproximadamente el 25% al 75% de los pacientes con neumonía causada por *Klebsiella*.

Además de la neumonía primaria, la *Klebsiella Pneumoniae* se ha asociado con infecciones de las vías urinarias y de heridas, bacteriemia y meningitis. En algunas instituciones, la *Klebsiella pneumoniae* ha reemplazado a la *Escherichia. coli* como causa principal de la bacteriemia.

La *Klebsiella oxytoca* se asemeja a la *Klebsiella. pneumoniae* en el espectro de enfermedad y desde un punto de vista clínico puede considerarse el mismo microorganismo. La *Klebsiella. oxytoca* causa una rinitis crónica atrófica caracterizada por olor fétido.

El principal papel de estos microorganismos es similar al de otros bacilos entéricos oportunistas y la mayoría de los aislamientos se obtienen de las vías urinarias, tejidos blandos y bacteriemia.

➤ **Tratamiento**

La mayoría de las *Klebsiella pneumoniae* aisladas son resistentes a ampicilina y carbencilina. Las cefalosporinas habitualmente son efectivas, propiedad útil para diferenciar *Klebsiella* de otros microorganismos del género *Enterobacter*. Aunque las cepas aisladas de infecciones hospitalarias a menudo son resistentes a múltiples antimicrobianos.

2.8.3. *Proteus*

Los microorganismos del género *Proteus* se encuentran en suelos, agua, aguas servidas y material animal en descomposición, así como en el tracto intestinal humano.

El esquema de clasificación de Brenner reconoce 2 especies clínicamente importantes en el género *Proteus*, *Proteus mirabilis* y *vulgaris*. Una tercera especie, *myxofaciens*, ha sido aislada solo de larvas de polillas. (15)

➤ **Características Bioquímicas y de los Cultivos:**

Proteus mirabilis y *Proteus vulgaris* son activamente móviles a 37°C y produce una delgada y translúcida película de crecimiento en agar no selectivo. Ambas especies de *Proteus* producen una poderosa ureasa que hidroliza urea en amoníaco y dióxido de carbono. Además, difieren de otros bacilos entéricos en su capacidad para crecer con pH alcalino.

La diferenciación entre las dos especies puede hacerse sobre la base de producción de indol, reacción de ornitina, decarboxilasa y otras pruebas. (15)

➤ **Infección Clínica**

En la mayoría de las infecciones por *Proteus* en el hombre se aísla *Proteus mirabilis*, el cual produce infecciones hospitalarias y extra hospitalarias de las vías urinarias. También se constata neumonía, septicemia e infecciones de heridas.

Cuando se produce infección de las vías urinarias, la hidrólisis de urea amoníaco eleva el pH de la orina, dando como resultado la precipitación de sales de calcio y magnesio y la formación de cálculos.

La ureasa también es importante en la severidad de la enfermedad. Cuando no hay actividad de ureasa, el número de microorganismos en los riñones y la extensión de la lesión renal son menores que cuando la enzima está presente.

➤ **Tratamiento**

Proteus mirabilis se diferencia a otros *Proteaeae* porque es sensible a ampicilina y cefalosporinas. Muchos microorganismos aislados de todas las especies son sensibles a antibióticos aminoglucosidos y a la combinación de trimetoprima y sulfametoxazol. Se constatan formas resistentes, particularmente en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo.

2.8.4. *Pseudomona*

La especie de *Pseudomonas* más frecuentemente asociada con enfermedad humana es la *Pseudomonas aeruginosa*. En algunos hospitales, este microorganismo causa del 10% al 20% de las infecciones hospitalarias.

Ha reemplazado al *Staphylococcus aureus* como el principal patógeno en pacientes con fibrosis quística y con frecuencia se aísla de individuos con enfermedad neoplásica o quemaduras severas.

➤ **Características Bioquímicas y de los Cultivos:**

La *Pseudomona aeruginosa* es un microorganismo extremadamente adaptable que puede utilizar más de 80 compuestos orgánicos diferentes para su crecimiento. La *Pseudomona. aeruginosa* puede crecer en los medios utilizados para el aislamiento de enterobacterias, y su capacidad para tolerar condiciones alcalinas también le permite crecer en medios para aislamiento de *vibrios*. Aunque se trata de un microorganismo aerobio, la temperatura óptima para el crecimiento es de 35°C, pero puede crecer a 42°C. Los microorganismos aislados que crecen en agar sangre con frecuencia son beta hemolíticos. (19)

La energía resultante de la utilización de los hidratos de carbono es obtenida por metabolismo oxidativo más que fermentativo. Dado que el ácido producido por la vía oxidativa es menos que el producido por la vía fermentativa. . (15)

Se utilizan medios como el agar peptona con o sin sangre, Mac Conkey y EMB. Hay medios selectivos para *Pseudomona aeruginosa* como agar cetrimida. La identificación de la especie *aeruginosa* es por: (16)

Olor, produce olor a uvas o nixtamal, por la producción de trimetilaminas. Morfología colonial: Pueden ser lisas, rugosas, mucoides y gelatinoides; en sangre algunas cepas presentan B hemolisis.

- Oxidasa: Son oxidasa positiva, excepto *Stenotrophomonas*.
- Glucosa: son glucosa positivos. (34)

➤ **Infección Clínica**

Las infecciones por *Pseudomona. aeruginosa* se producen en individuos con defensas alteradas. Estos incluyen pacientes con quemaduras, personas con enfermedades malignas o metabólicas. La frecuencia de infecciones de las vías

urinarias es mayor en individuos de edad avanzada. El tratamiento prolongado con drogas inmunosupresoras o antimicrobianos y la radioterapia también predisponen a las infecciones por *Pseudomonas*.

La *Pseudomona. aeruginosa* puede infectar casi cualquier tejido o sitio del cuerpo. Las lesiones localizadas se producen en el sitio de quemaduras o heridas en el tejido corneal, vías urinarias o pulmones. La *Pseudomona. aeruginosa* también puede causar endocarditis bacteriana y gastroenteritis.

Desde una infección localizada, los microorganismos pueden diseminarse por vía hematógica, produciendo una septicemia y lesiones focales en otros tejidos. (19)

Pseudomonas aeruginosa produce infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Puede manifestarse como infección de vías urinarias nosocomial (en pacientes con sondas), meningitis, septicemia, bacteriemia, infecciones de quemaduras y heridas, neumonía primaria, neumonía necrotizante, infecciones pulmonares crónicas, infecciones de piel y tejidos blandos. (34)

➤ Tratamiento

Muchos agentes antimicrobianos son inefectivos para el tratamiento de infecciones por *Pseudomona aeruginosa*. La prevención de la colonización y control de la enfermedad primaria son los principales factores en la supervivencia de los pacientes con infecciones por *Pseudomona. aeruginosa*. Una mayoría de cepas son susceptibles a amikacina, gentamicina, tobramicina y colistina, pero se desarrollan formas resistentes, especialmente en tratamientos prolongados.(19)

Deberemos mantener en mente los pocos antimicrobianos que son de utilidad en el tratamiento de las infecciones por esta cepa, particularmente cuando se hacen tratamientos sintéticos. La gran mayoría de las cepas aisladas son susceptibles a: amikacina, gentamicina, tobramicina y colistina, muchas de ellas también son sensibles a carbenicilina y ticarcilina. (34)

2.8.5. *Staphylococcus aureus*

Forma parte de la flora normal de mucosas y piel e intervienen en procesos patológicos diversos como infecciones supurativas e intoxicación alimenticias. Más del 95% de los *Staphylococcus aureus* producen proteína A, la cual puede estar asociada a la célula o al medio extracelular, con una importante afinidad por la fracción Fc de la Ig G. La presencia de proteína A o coagulasa es de gran utilidad clínica para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies de Estafilococos. *Staphylococcus aureus* es una bacteria que puede causar infección en todos los grupos de edad tanto en forma esporádica como epidémica y se ha identificado como una de las principales causas de infección de heridas quirúrgicas. Su principal forma de transmisión es por contacto.

➤ **Características Bioquímicas y de los Cultivos:**

Son cocos Gram positivos de 0,5 – 1 μ m de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo. Crecen a una temperatura óptima de 37°C y se desarrollan mejor en un pH ligeramente alcalino de 7.6 la adición de glucosa favorece el crecimiento. La capacidad de *Staphylococcus aureus* para fermentar los azúcares como maltosa, manitol, trehalosa es positiva. La producción de una nucleasa termoestable es un buen indicador de la presencia *S. aureus*, al igual que la conversión de nitratos a nitritos. Elaboran diversas enzimas: proteasas, lipasas, fosfatasa, gelatinasa, catalasas y coagulasas.

En cultivo puro resisten una concentración de fenol al 1% durante 15 minutos, pero solo los mata una concentración al 2%. Soportan el calor húmedo a 60°C durante 30 minutos. Muchas cepas de *S. aureus* toleran concentraciones altas de cloruro de sodio (7,5 a 10%), y son fácilmente inhibidos por colorantes como el violeta de genciana. (4)

➤ **Infección Clínica**

Puede formar parte de la flora normal de las personas sanas y se halla en la mucosa nasal del 20 al 40 % y en la piel del 10 al 20%, especialmente en las manos y periné. Se ha observado que, cuando los portadores sufren intervenciones quirúrgicas, son más frecuentes los casos de sepsis. Pero, además, interviene en la mayoría de las infecciones y puede actuar por acción directa en relación con su capacidad invasiva o por mecanismo indirecto por sus exotoxinas. *Staphylococcus aureus* puede producir una variedad de procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales. (38)

➤ **Tratamiento**

En el manejo de las infecciones estafilocócicas localizadas, el principio básico del tratamiento es el drenaje adecuado. Deben extraerse los cuerpos extraños del sitio de infección. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son importantes en la selección del antibiótico apropiado y en la evaluación de su efectividad durante el curso de la infección. En infecciones cutáneas, el tratamiento oral con una penicilina semisintética, como cloxacilina o dicloxacilina, habitualmente es eficaz.¹⁵ Si el paciente es alérgico a la penicilina, puede usarse cefalosporinas, eritromicina o clindamicina por vía oral. En enfermedades estafilocócicas sistémicas serias, se aconseja la administración parenteral de nafcilina, metilcilina, oxacilina o una cefalosporina. Las infecciones estafilocócicas a menudo responden lentamente, y ocurren recaídas con frecuencia si el tratamiento se termina demasiado tempranamente. (19)

2.9. Métodos para Determinar la Actividad Antimicrobiana

2.9.1. Procedimiento para la Realización del Antibiógrama

a) *Valores Críticos del Antibiógrama*

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de las CIM para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados *in vitro* y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados.

b) *Procedimiento de Categorización*

Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D). Por otra parte la lectura interpretativa del antibiógrama, fundada en el conocimiento de los antibiofenotipos de sensibilidad y resistencia permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo de fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiógrama.

c) *Materiales y Equipos*

Todos los equipos utilizados en el procesamiento de las muestras clínicas deben estar en condiciones óptimas.

El correcto funcionamiento de los instrumentos y equipos nos asegura la garantía de la calidad, así como el mantenimiento de buenas prácticas de seguridad tiene una importante influencia sobre el trabajo y productividad global del laboratorio, pues si un equipo o instrumental se daña por algún motivo puede haber una interrupción del ritmo de trabajo y una demora en la emisión de los resultados.

➤ **Preparación del Agar Mueller Hinton**

Preparar el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Auto clavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C - 50°C.

Una vez esterilizado y solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse:

- a. Utilizando un electrodo de superficie
- b. Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión
- c. Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro.

Repartir el medio en placas petri (60 ml – 70 ml o 25 ml – 30 ml, para placas de 150 mm o 100 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.

Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30°C – 35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser, luego, descartadas.

➤ **Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland) para el inóculo**

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland como estándar.

➤ **Preparación del estándar de turbidez.**

- a. Agregar 0,5 ml de una solución de BaCl₂ 0,048 M (BaCl₂·2H₂O al 1,175% Proteus/V) a 99,5 mL de una solución de H₂SO₄ 0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.

b. Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro ó espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.

c. Distribuir de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa de rosca o tapón de jebe, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.

d. Ajustar bien las tapas o tapones y conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.

e. Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.

f. Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.

d) *Inoculación*

Preparación del inóculo

Puede realizarse de dos formas:

Método de desarrollo previo

a. Seleccionar cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa.

b. Tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transferirlo a un tubo que contiene de 4 a 5 mL de caldo apropiado (Ej. Caldo Tripticasa soya).

c. Incubar el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).

d. Ajustar la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar.

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

e. La suspensión preparada contendrá aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL para *Escherichia. coli* ATCC 25922.

Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas

- a. De una placa de cultivo con agar no selectivo e incubada por 18 - 24 h, seleccionar colonias aisladas y preparar una suspensión directa en solución salina ó caldo.
- b. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mc. Farland.

Inoculación de las Placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Inocular la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 1). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

e) *Aplicación de los Discos*

Colocar los discos individuales o multidisco sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

f) Incubación

Incubar las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.

g) Lectura de las Placas e Interpretación de los Resultados

Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.

Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de la hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.

El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo las colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser su cultivadas, reidentificadas y reensayadas. (6)

2.10. Análisis Fitoquímico en el País. Importancia y Perspectivas

El Perú ha sido tradicionalmente un país exportador de algunas plantas aromáticas, medicinales y de colorantes; sin embargo, debido a la competencia creciente de otros países productores, su posición como exportador tiende a decrecer en beneficio de ciertos países de Asia, África y Europa.

El Perú puede recuperar su posición de exportador si se desarrollan cultivos organizados de plantas medicinales, aromáticas y colorantes; si efectúa el control de calidad para apreciar la concentración de principios activos y mejor aún si en vez de ser exportador de materias primas lo es de productos elaborados.

Por otro lado, en el país por la gran riqueza de su flora, de la cual varios miles de especies son conocidas, con varios cientos por descubrir y con menos del 10% estudiadas desde el punto de vista químico y farmacológico, un análisis fitoquímico sistemático dará a conocer nuevas drogas tan o más importantes que las ya en aplicación.

2.10.1. Marcha Fitoquímica Preliminar

Se ha desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en las plantas, basados en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración. (28)

Los análisis fitoquímicos preliminares de caracterización, consisten en pruebas sencillas, sensibles y rápidas, que mediante una reacción química produce la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto y permiten identificar grupos químicos con potencial actividad biológica de las especies vegetales recolectadas.

Estas reacciones pueden ser la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema, la formación de un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, mediante la utilización de reactivos específicos.

Mediante la caracterización fitoquímica se pueden identificar varios principios activos tales como: alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos, sesquiterpenos, lactonas, quinonas, cumarinas saponinas, glucósidos resinas entre otros. (35)

Pruebas de coloración para identificación de fenoles, saponinas, taninos, alcaloides y flavonoides:

a) Flavonoides; Reacción con Shinoda:

Se basa en la reducción del anillo quinólico para dar lugar a la formación de grupos OH con aumento de dobles enlaces y por consiguiente dar origen a coloración, el desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); chalconas y auronas no dan coloración.

b) Taninos; Reacción con Gelatina:

Los taninos al ser mezclados con gelatina, dando una turbidez o precipitación de color blanco indican reacción positiva para taninos.

c) Alcaloides; Reacción con Dragendroff:

Se basa en la reacción de alcaloides en medio básico para dar lugar a la formación de sales insolubles, las cuales se evidencian por la presencia de precipitados anaranjados indica reacción positiva para alcaloides.

d) Saponinas; Reacción de Agua Caliente:

Se basa en la reacción que se genera al mezclar el extracto en estudio con agua caliente para lo cual se agita vigorosamente por un periodo de tiempo obteniendo la formación de espuma sobrenadante resistente indicando una reacción positiva para saponinas.

e) Compuestos Fenólicos; Reacción con Tricloruro Férrico (Fe Cl_3):

Los fenoles al ser mezclados con sales férricas, reaccionan dando lugar a coloraciones o precipitados de color verde y azul intensos debido a la formación de tanato férrico son indicativo de la presencia de compuestos fenólicos. (4)

2.11. Medios de Cultivo, Clasificación

a) Requerimientos energéticos y no energéticos de los medios de cultivo.

Salvo excepciones, las bacterias son cultivables en medios artificiales de laboratorio de tal forma que el medio de cultivo le proporciona los elementos necesarios para su crecimiento y multiplicación.

b) Requerimientos energéticos de los microorganismos.

Los requerimientos energéticos son los nutrientes de ese medio de cultivo, que va a ser utilizado por la bacteria para su crecimiento. Van a ser fuentes de energía en un medio de cultivo, al menos, una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, y fuente no energéticas pueden ser una fuente de fósforo, determinados iones como hierro, el potasio, el sodio, el zinc, el magnesio, etc. Como fuente de energía tenemos:

➤ **Fuente de Carbono:**

Existen muchos tipos de fuentes de carbono, ya que esto está ligado al metabolismo energético de la especie microbio; ejemplo algunas bacterias son capaces de utilizar sustancias muy sencillas como ácido acético, alcohol, citrato sodio, etc.

En otras ocasiones, la mayoría de bacterias usan como fuente de carbono a azúcares en forma de mono o disacáridos, como glucosa, lactosa, maltosa, etc.

➤ **Fuentes de nitrógeno:**

Es una fuente bastante menos energética que la fuente de carbono pero es necesaria para el metabolismo microbiano, produciendo también energía. Esta fuente de nitrógeno la van a formar las proteínas, péptidos o aminoácidos.

Pueden presentarse como proteínas completas, que sería el caso de gelatina, o incluso proteínas aún más complejas, como el caso de extractos de carne, sales de amonio, también es frecuente encontrar peptonas como fuente de energía.

c) **Requerimientos no energéticos de los microorganismos.**

➤ **Fuente de Azufre:**

Todos los microorganismos que utilizan en su metabolismo azufre lo hacen mayoritariamente en forma de sulfatos, a veces en forma de tiosulfatos y en otras ocasiones lo pueden obtener a partir de algún aminoácido; metionina, cisteína, tiamina, etc.

➤ **Fuente de Fósforo:**

En general, las bacterias que utilizan el fósforo lo suelen hacer en forma de fosfato.

➤ **Iones Metálicos:**

Son utilizados por las bacterias bajo la forma de iones a concentraciones muy bajas; el sodio, el potasio magnesio, hierro, etc. Son esenciales para el crecimiento microbiano y dependiendo de su concentración puede inhibir el crecimiento de otros, como el caso del sodio que a concentraciones altas inhibe el crecimiento de un tipo de microorganismos y facilita el crecimiento de otros.

➤ **Factores de Crecimiento:**

No todas las bacterias son capaces de crecer sobre medios donde se encuentran cubiertas las necesidades elementales.

➤ **Factores de Arranque:**

Son sustancias que van a permitir a la bacteria en estudio, salir de su fase de latencia y comenzar su fase de crecimiento exponencial. Son fundamentalmente fuentes de energía “glucosa” que es utilizado por las bacterias.

➤ **Factores Inhibidores:**

Son componentes que van a impedir el crecimiento de algún tipo de microorganismo por bloqueo de sus procesos metabólicos. (20)

CAPITULO III: Materiales y Métodos

3.1. Lugar de Realización

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios H-102 y H-402 de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material Biológico

a) Hoja y Corteza de *Bixa orellana* (Achiote)

Como material de estudio, se utilizaron las hojas y corteza de *Bixa orellana* (Achiote).

b) Obtención de las Cepas

Las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, fueron obtenidas del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo- EsSALUD.

3.2.2. Material de Laboratorio

a) Material de Vidrio

- Bagueta
- Embudo
- Matraces (100mL, 250mL y 500mL)
- Pipetas (1mL, , 5mL y 10 mL)
- Placas Petri (100 x 15mm)
- Probetas (100mL)
- Tubos de ensayo (16x15mm y 13x100mm)

b) Equipos

- Esterilizador (UCSM)
- Autoclave (STURDY SA-260 MA)
- Balanza (Scout Pro OHAUS)
- Baño maría (Passed London)
- Bomba de vacío (Milipore Alto Rendimiento)
- Cocina eléctrica (UCSM)
- Incubadora (Proteus. Selecta)
- Moledora (Mulinex)
- Refrigeradora (SANSUNG WIDE DELUXE)
- Rota vapor (BUCHI)
- Micro pipeta (200 uL)

c) Otros Materiales

- Asa de Kolle
- Barbijos
- Cámara digital
- Espátula
- Frascos de vidrio color caramelo
- Gasa
- Gradilla

- Guantes quirúrgicos
- Hisopos
- Mechero Bunsen
- Papel filtro
- Papel Kraf
- Pinzas

d) Reactivos

- Ácido sulfúrico (Merck, Q.Proteus)
- Etanol al 99% (Diproquim, Q.Proteus)
- Cloruro de bario (Merck, Q.Proteus)

✓ Marcha Fitoquímica

- Anhídrido acético (Merck, Q.Proteus)
- Ácido sulfúrico (Merck, Q.Proteus)
- Ácido clorhídrico (Merck, Q.Proteus)
- Gelatina (UCSM H-102)
- Hidróxido de sodio NaOH 5% (UCSM H-102)
- Reactivo de Dragendorft (UCSM H-102)
- Shidona (UCSM H-102)
- Tricloruro Férrico (Merck, Q.Proteus)

✓ Batería para Coloración Gram

- Cristal Violeta, Solución de Yodo, Alcohol-acetona y Safranina.

e) Cepas Microbianas

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Proteus mirabilis*
- *Pseudomona aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Nutritivo (HIMEDIA)
- Agar Mueller Hinton (MH)
- Caldo Peptona
- Agar Manitol Salado
- EMB (Eosina Azul de Metilo)
- Agar SIM
- Agar TSI
- Agar LIA
- Agar Citrato de Simmons
- Agar Sangre

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Procesamiento del Material Vegetal

a) Recolección

Las hojas y corteza de ***Bixa orellana (Achiote)***, se recolectaron de forma semimanual a partir de las 10:00 hrs las cuales fueron empacadas adecuadamente en bolsas de polipropileno para su conservación, las que fueron trasladadas a la ciudad de Arequipa para su posterior utilización.

En la *Figura 5* se muestra la ubicación geográfica del lugar donde se realizó la recolección del material vegetal en estudio en el distrito de Tambopata, provincia de Tambopata, Departamento de Madre de Dios, se ubica en la región sur oriental del territorio peruano, entre las coordenadas geográficas 9°57' y 13°20', latitud sur, 68°39' y 72°31', longitud Oeste.



Figura 5. Ubicación geográfica del distrito de Tambopata, Provincia de Tambopata, Departamento de Madre de Dios.

b) Secado

El material fue dispuesto sobre papel kraf, tal como se observa en las Figura 6 y 7, para luego ser desecado a temperatura ambiente durante 1 semana en un lugar fresco, seco y protegido de la luz solar.



Figura 6: Hojas de *Bixa orellana* (Achiote).



Figura 7: Corteza de *Bixa orellana* (Achiote).

c) Fragmentación

El material vegetal desecado, se procedió a pulverizar en una moledora hasta la obtención de partículas uniformes, tal como se observa en la Figura 8.



Figura 8: Pulverización del Material Vegetal (hojas y Corteza) de ***Bixa orellana*** (Achiote).

d) Almacenaje

Las hojas y corteza pulverizadas fueron guardadas en frascos de vidrio ámbar rotulado y se conservaron en un ambiente fresco y seco, tal como se observa la Figura 9.



Figura 9: Almacenaje Vegetal (hojas y Corteza) de ***Bixa orellana*** (Achiote).

3.4.2. Método de Obtención del Extracto

El principio activo se encuentra concentrado en distintas partes de la planta, el objetivo es extraer estos principios activos y obtener un concentrado de las plantas medicinales, mediante la maceración del producto de la molienda de las plantas medicinales en el solvente (agua o alcohol).

a) Método de Infusión

➤ Procedimiento

Se pesó 20 g de muestra (hojas y corteza) previamente desecada y pulverizada. A 300 mL de agua en ebullición se agregó la muestra por analizar cada una en forma independiente e inmediatamente se retiró del fuego. Esta solución se dejó en reposo hasta que la infusión alcanzó la temperatura ambiente, tal como se observa en la Figura 10. El extracto resultante se filtró al vacío con la ayuda de papel Wathman.



Figura 10: Infusión de los Extractos hojas y Corteza de *Bixa orellana* (Achiote).

b) Método de Maceración

➤ **Procedimiento**

Se pesó 20 g de muestra (hojas y corteza) previamente desecada y pulverizada, se colocó en frascos de vidrio, seguidamente se añadió 300 mL del solvente (Etanol 96%) y se procedió a agitar por un período de 10 min. Luego se dejó reposar por una semana en un ambiente seco y lejos de la luz tal como se observa en la Figura 11, se procedió cada día agitar por un periodo de 10 min posteriormente se filtró al vacío con papel Wathman.



Figura 11: Maceración de los Extractos de hojas y Corteza de ***Bixa orellana (Achiote)***.

3.4.3. Concentración del Extracto

➤ Método de eliminación del solvente: Utilizando equipo de RotaVapor.

Un líquido entra en ebullición cuando al calentarlo su presión de vapor se iguala a la presión atmosférica. Con la ayuda del equipo de rotavapor se puede reducir la presión en el interior del balón con el objeto de que los componentes de la mezcla a separar destilen a una temperatura inferior a su punto de ebullición normal.

Se colocaron los extractos obtenidos (etanólicos y acuosos) en el balón rotatorio luego de dos horas se obtuvo un extracto de mayor concentración,⁷ tal como se observa en la Figura 12.



Figura 12: Equipo de Rota- vapor.

3.4.4. Determinación del Rendimiento de la Extracción

➤ **Método Gravimétrico.**

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

El porcentaje de rendimiento se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ RE} = \frac{\text{peso de extracto seco}}{\text{peso de materia seca}} \times 100$$

➤ **Procedimiento**

El extracto concentrado se colocó en un vaso precipitado previamente tarado y se llevó a baño maría hasta sequedad total a una temperatura de 35 a 45 °C, hasta peso constante, para finalmente ser pesado y determinar su porcentaje de rendimiento por diferencia de peso, tal como se observa en la Figura 13.



Figura 13: Extractos secos de hojas y Corteza de *Bixa orellana* (Achiote).

3.5. PROCESAMIENTO DE CEPAS EN ESTUDIO

3.5.1. Obtención de Cepas

Las cepas en estudio fueron 5 cepas: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, las cuales se obtuvieron del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo-ESSALUD.

3.5.2. Pruebas de Identificación para cepas Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomona aeruginosa*.

a) *Coloración Gram*

Procedimiento:

- Se colocó una azada de bacterias sobre una lámina portaobjetos limpia.
- Se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de cristal Violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el decolorante acetona- alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta (30 segundos).
- Se cubrió la superficie de la lámina con Safranina por 30 minutos y se procedió a lavar.
- Se secó al aire a temperatura ambiente.
- Se observó la preparación a 40x y posteriormente a 100x con aceite de inmersión.¹⁸

b) *Medio SIM*

Procedimiento:

El microorganismo en estudio, se siembra con una asa en punta por picadura en la columna del medio de cultivo. Incubar a 37° C por 24 horas. Observar si existe en el medio Movilidad, observar si existe la formación de un precipitado negro y agregar 3 gotas del reactivo de KOVACS, para ver la producción de indol. (18)

c) *Medio TSI*

Procedimiento:

Tomar una colonia de cultivo puro, aislada en un medio primario. Luego inocular por punción y estría e incubar a 37° C por 24 horas.

d) *Medio LIA*

Procedimiento:

Inocular con material de una colonia del organismo en estudio e inocular (3 punciones y 1 estria) e incubar a 37° C por 24 horas.

e) *Citrato de Simmons*

Procedimiento:

Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción. Incubar a 37°C durante 48 h (a veces se requiere incubación más prolongada).¹⁹

3.5.3. Pruebas de Identificación para la cepa Gram positivas *Staphylococcus aureus*.

a) *Coloración Gram*

Procedimiento:

- Se colocó una azada de bacterias sobre una lámina portaobjetos limpia.
- Se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de cristal Violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el decolorante acetona- alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta (10 segundos).
- Se cubrió la superficie de la lámina con Safranina por 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se secó al aire a temperatura ambiente.
- Se observó la preparación a 40X y posteriormente a 100X con aceite de inmersión, observándose colonias Gram positivas agrupadas en racimos.¹⁸

b) *Prueba de Catalasa*

Procedimiento:

Se realizó la prueba de catalasa a partir de las colonias que han desarrollado en el agar sangre para identificar d que genero se trate.

- Agregar en un alamina portaobjetos 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, suspender una colonia y observar una rápida aparición y producción de burbujas de gas o efervescencia siendo este un resultado positivo¹⁸ (Anexo n° 3)



c) *Prueba de Agar Manitol Salado*

Procedimiento:

Esta prueba fue realizada en agar manitol salado en la que se produce la degradación del carbohidrato manitol hasta ácido, hace virar el indicador de fenol a un color amarillo lo que lo diferencia de otros estafilococos.¹⁸

3.6. PRUEBA PRELIMINAR

3.6.1. Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por Método de Excavación-Cilindro- Placa Cultivo

A. Método de Difusión en Placa (Kirby-Bauer) (modificado)

En el método de Kirby-Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. El antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas de publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos.

a) Procedimiento de preparación de Extractos

A partir del extracto seco se procedió a la preparación de los 4 extractos a una concentración 500mg/mL. *Figura 14.*

- A = Extracto Acuoso (Corteza)
- B = Extracto Acuoso (Hojas)
- C = Extracto Etanólico (Corteza)
- D = Extracto Etanólico (Hojas)



Figura 14: Extractos acuosos y etanólicos de. *Bixa orellana*.

b) Preparación del Inoculo

Con un asa de kolle estéril, se seleccionó de 4 a 5 colonias de las placas de cada una de las cepas en estudio; para posteriormente ser diluidas en 10 mL de caldo peptonado, enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material bacteriano y luego retirar el asa de kolle. Como se observa en la Figura 15.



Figura. 15. Inóculos de bacterias en estudio.

La turbidez del medio debe ser semejante a la del tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland, la cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL. Anexo N° 1

c) Preparación para Determinar la Sensibilidad Antibacteriana (modificada)

Se prepararon placas contenido 20 mL de Agar Mueller Hinton para el test de sensibilidad, en seguida se sometieron a un control de esterilidad por incubación a 37°C por 24 h.

Luego fueron inoculadas, con ayuda de un hisopo estéril en forma horizontal de derecha a izquierda, en forma vertical de arriba hacia abajo, en el sentido de las agujas de reloj y en contra del sentido de las agujas del reloj, teniendo la precaución de no dejar algún espacio sin suspensión, con el inóculo preparado de la suspensión de cada bacteria en estudio equivalente a 10^6 UFC/ml, dejar el inóculo por 5 minutos.

Una vez realizada la siembra de bacterias se dividió cada placa en 4 partes iguales en las cuales se realizó un pozo en cada una de ellas para adicionar los extractos de *Bixa orellana* (3 repeticiones de cada extracto), dejar secar por espacio de 30 min antes de ser llevados a incubación por 24 h a 37 °C.

La lectura entre sí de cada placa, expresándolo en milímetros (mm), se hace preferentemente desde el exterior de la tapa, sin quitar la tapa.

3.7. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

A. Método de Dilución en Caldo

Fundamento:

Se basa en la sensibilidad del Microorganismo y la exposición de una serie de diluciones de cada agente antimicrobiano, después de lo cual se determina la concentración de la droga que inhibe el crecimiento bacteriano.

Procedimiento:

a) Preparación del Extracto Madre

Se prepara una solución madre con 5 g de *Bixa orellana* los cuales se diluyen en 10 mL de Tween 80 al 3%.

(Concentración = 500 mg/mL)

b) Preparación del Inoculo

Se tomó separadamente con una asa de kolle estéril, de 4 a 5 colonias de las placas de cada una de las cepas en estudio; para posteriormente ser diluidas en 10 mL de caldo peptonado, enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material bacteriano y luego retirar el asa de kolle. se observa en la figura 16.

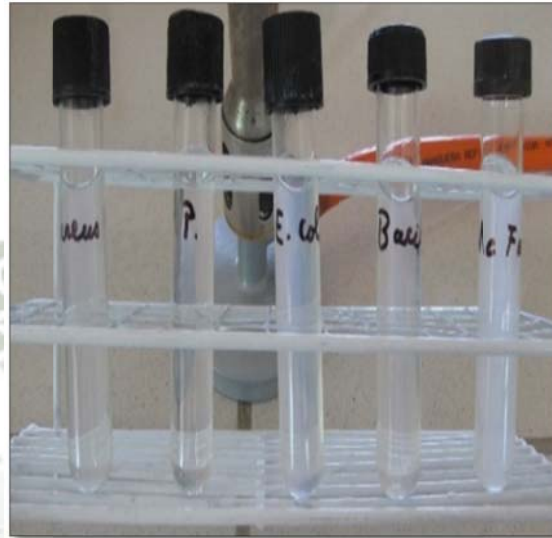


Figura 16: Inóculos de bacterias en estudio.

La turbidez del medio debe ser semejante a la del tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland, la cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL. Anexo N° 1

c) Procedimiento para determinar la CMI en Caldo Peptonado

Se realizó una dilución de 1:100 del inoculo y así se obtuvo una solución de 10^6 UFC/mL.

Es decir se hace una dilución tomando 0.1 mL del inoculo 10^8 UFC/mL y se agrega 9.9 mL de caldo peptonado, repitiéndose el procedimiento para cada una de las bacterias en estudio. Como se observa en las Figuras 6 y 7.

Se preparó una batería de 12 tubos estériles para cada bacteria, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 6.

Batería de tubos para el extracto Etanólico de Hojas.

Concentración del Extracto Madre 500mg/mL	Nº Tubos										Control (+)	Control (-)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extracto (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	--	--
Caldo Peptonado (mL)	--	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2
Inoculo 10 ⁶ (UFC/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
Concentración Final mg/mL	250	225	200	175	150	125	100	75	50	25	--	--

Tabla 7.

Batería de tubos para el extracto Etanólico de Corteza.

Concentración del Extracto Madre 600mg/mL	Nº Tubos										Control (+)	Control (-)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extracto (mL)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	--	--
Caldo Peptonado (mL)	--	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2
Inoculo 10 ⁶ (UFC/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
Concentración Final mg/mL	300	270	240	210	180	150	120	90	60	30	--	--

Se lleva a incubación a 37°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, observar la turbidez de los tubos para hallar el punto de ruptura, el tubo en el cual no se aprecia turbidez será considerado como la mínima concentración del extracto que se requiere para no producir el desarrollo bacteriano (CIM).

3.7.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

A. Método de Dilución en Placa

a) Fundamento

Es la menor concentración que mata totalmente 99.9% de bacterias en estudio. ¹⁸

b) Procedimiento

Se procedió a sembrar de todos aquellos tubos en los cuales no se observa turbidez, el sembrado se realizó en placas conteniendo agar Nutritivo.

Se incubaron a 37°C por 24 horas y se observa el crecimiento bacteriano en las placas, luego se procede a indicar el punto de ruptura en las placas donde hubo crecimiento y donde no hubo crecimiento.

3.8. ANALISIS FITOQUIMICO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS Y ACUOSOS DE *Bixa orellana* (Achiote)

3.8.1. Marcha Fito química Preliminar

Se realizó la marcha fitoquímica preliminar para determinar cualitativamente los componentes que pudieran estar presentes en el extracto obtenido de hojas y corteza de *Bixa orellana* (Achiote).

Para esto se realizaron las siguientes reacciones:

a) **Taninos:** Reacción con Gelatina.

➤ **Procedimiento**

Se tomó 1 mL del extracto correspondiente (etanólico y acuoso), en un tubo de ensayo y se le añadió 1mL de gelatina, y se agito suavemente.

b) Compuestos fenólicos: Reacción con tricloruro Férrico (Fe Cl_3).

➤ **Procedimiento**

Se tomó 1 mL del extracto correspondiente (etanólico y acuoso), en un tubo de ensayo y se le añadió gota a gota tricloruro férrico, y se agito suavemente.

c) Flavonoides: Reacción con Shinoda.

➤ **Procedimiento**

Al extracto correspondiente (etanólico y acuoso), se le colocó un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de ácido clorhídrico concentrado, y se agito suavemente.

d) Alcaloides: Reacción con Dragendorft.

➤ **Procedimiento**

En un tubo de ensayo se colocó el extracto correspondiente, (etanólico y acuoso), y se le añadió una pequeña cantidad del reactivo recientemente preparado, se agito suavemente.

e) Saponinas: Reacción con Agua Caliente.

➤ **Procedimiento**

Se tomó 1 mL del extracto correspondiente (etanólico y acuoso), en un tubo de ensayo y se le añadió 9 mL de agua caliente, se agito vigorosamente por 1 minuto.

3.9. METODOS ESTADISTICOS

Para el análisis de datos se realizó la técnica de análisis de varianza “ANOVA”. Para el tratamiento de los datos se partió de un modelo matemático unifactorial. Como prueba estadística de prueba se utilizó la distribución de probabilidad de Fisher con un nivel de confianza del 95%. Para reforzar la decisión tomada en el análisis de varianza, se realizó la prueba de especificidad de Tuckey.

CAPITULO IV: Resultados

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE *Bixa orellana* (Achiote)

Los resultados de la extracción son expresados en porcentaje de rendimiento, por lo cual se utilizó la Ecuación del punto 3.4.4 donde se relaciona el peso del extracto seco con el peso de la materia seca y se elaboró la Tabla 8.

Tabla 8.

*Porcentaje de rendimiento de los extractos de **Bixa orellana** (Achiote)*

<i>Método</i>	<i>Parte Vegetal</i>	<i>Tipo de Extracto</i>	<i>Peso Total de la materia seca pulverizadas (g)</i>	<i>Peso del Extracto Seco (g)</i>	<i>% Rendimiento</i>
<i>Maceración</i>	<i>Hojas</i>	<i>Extracto Etanólico</i>	20	3,00	15,02
	<i>Corteza</i>	<i>Extracto Etanólico</i>	20	0,80	4,00
<i>Infusión</i>	<i>Hojas</i>	<i>Extracto Acuoso</i>	20	3,55	17,78
	<i>Corteza</i>	<i>Extracto Acuoso</i>	20	2,1	10,50

Como se observa en la Tabla 8. En el método de maceración se obtuvo un mejor rendimiento en el extracto de hojas 15,02% en comparación al extracto etanólico de corteza 4,00% en cuanto al método de infusión también se sigue ese patrón de rendimiento de 17,78% para hojas y 10,50% para corteza de los extractos.

En la Figuras 17. Se observa el rendimiento de los extractos, métodos de extracción y tipo de solvente obtenidos de *Bixa orellana* (Achiote), mediante gráfico de barras.

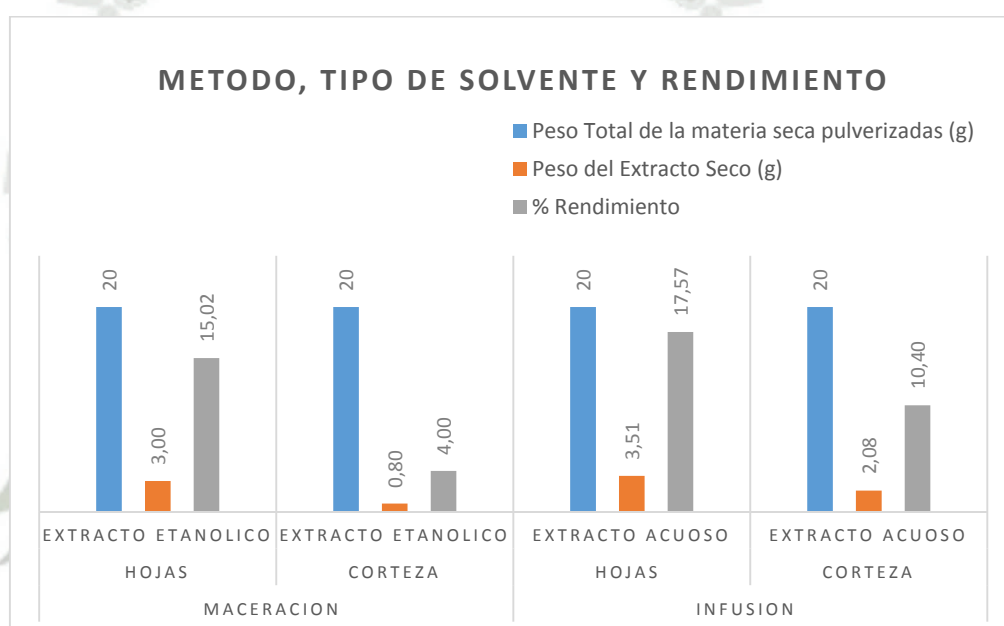


Figura 17. Método, Tipo de Solvente y Rendimiento de los Extractos de *Bixa orellana* (achiote).

El rendimiento de la extracción por el método de maceración para hojas, fue comparado con lo descrito por Contreras y col. quienes reportaron un rendimiento de 18,01% en comparación con el resultado obtenido. Por lo cual demostramos que el rendimiento encontrado en literatura por el método de maceración es mayor que nuestro rendimiento, esta variación se puede deber a la composición del material en estudio.

4.2. Resultados de las Pruebas de Identificación para las Cepas de, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 9.

Resultados de pruebas bioquímicas para la identificación de los microorganismos en estudio.

Pruebas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gram	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)	Cocos Gram (+)
TSI	A/A + -	A/A + -	K/A ++	K/K - -	No realizada
SIM	- + +	- + -	+ - +	- + +	No realizada
LIA H ₂ S	K/A -	K/K -	R/A -	K/K -	No realizada
Citrato	-	+	+	+	No realizada
Indol	+	+	-	+	No realizada
Catalasa	+	No realizada	No realizada	No realizada	+
Manitol Salado	No realizada	No realizada	No realizada	No realizada	+

En la tabla 9. Se muestra los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas de identificación de las bacterias en estudio como son: Tinción de Gram, TSI, SIM, LIA Citrato, Indol, Catalasa y Manitol.

Los resultados fueron comparados con tablas extraídas de literatura (18).

Por lo tanto se puede llegar a la conclusión que las cepas obtenidas del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo- EsSALUD corresponden a los microorganismos descritos en la tabla 9.

4.3. Prueba Preliminar

4.3.1. Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Excavación- Cilindro- Placa Cultivo.

Se procedió a realizar la medición de los halos generados por los extractos Tabla 10. De los diferentes extractos frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 10.

*Tipos de Extracto de **Bixa orellana** (achiote).*

Denominación	Material Vegetal	Disolvente
A	Corteza	Agua
B	Hojas	Agua
C	Corteza	Etanólico
D	Hojas	Etanólico

La concentración inicial del extracto madre fue de 500 mg/ml.

Tabla 11.

Tamaño de halos de Inhibición de los Extractos Frente a las bacterias en estudio.

BACTERIAS	EXTRACTOS (halos mm)			
	A	B	C	D
<i>Escherichia. coli</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	20,3	28

Como se observaron en la Tablas 11. Se muestra los valores de los halos de inhibición de los extractos en estudio frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

El método de Excavación- Cilindro- Placa Cultivo dio como resultados la no generación de halos de inhibición de nuestros extractos frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* , *Proteus mirabilis* y *Pseudomona aeruginosa*, por tal razón podemos confirmar que los extractos etanólicos y acuosos de hojas y corteza no poseen actividad antibacteriana frente a dichas bacterias; tal como fue descrito por Álvarez y col. (2007) de que los extractos de ***Bixa orellana* (Achiote)** no poseen actividad antimicrobiana ante las especies antes mencionadas. Ver resultados en la Figuras 18.

Para el caso de *Staphylococcus aureus* los resultados muestran la generación de halos de inhibición de los extractos etanólicos no obstante los extractos acuosos no generaron halos de inhibición; tal como describe Mendocilla Moisés, Lopez V. (2001) de que los extractos etanólicos de ***Bixa orellana* (Achiote)** solo poseen actividad antimicrobiana frente a dicha bacteria. Ver resultados en la Figura 19.

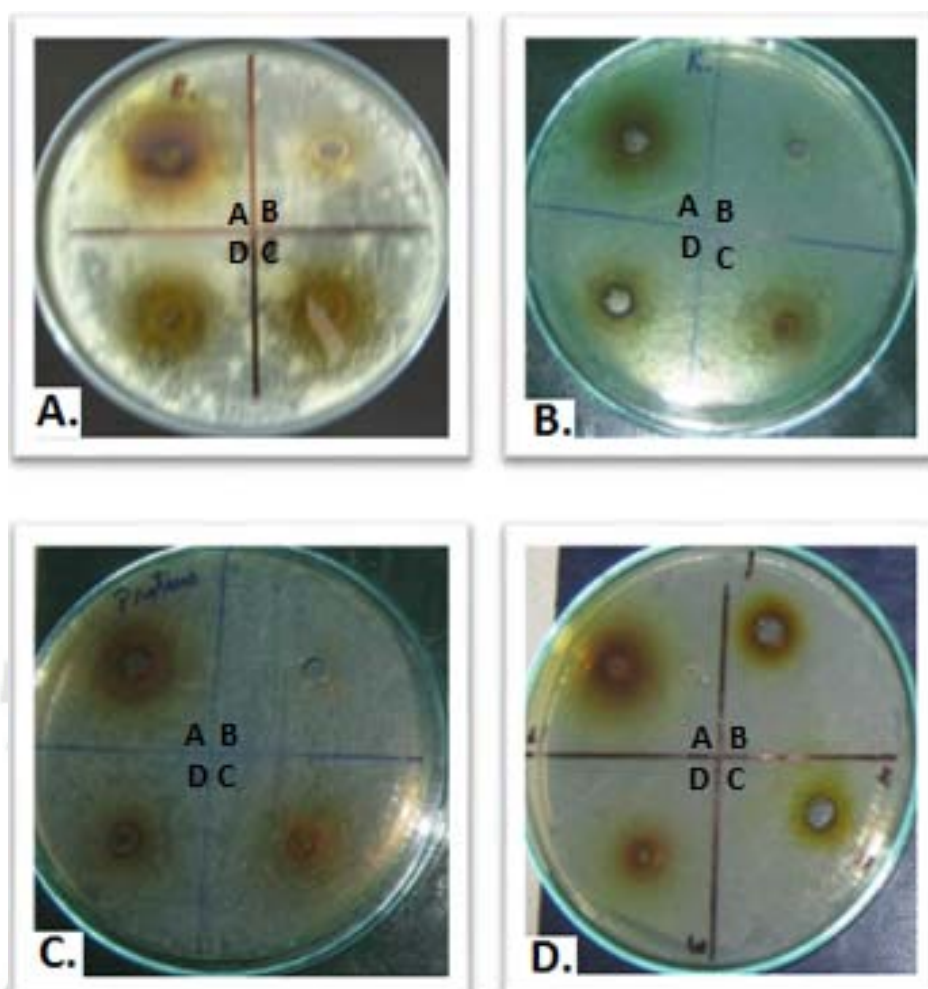


Figura. 18. A. Inhibición de los extractos frente a *Escherichia coli*, B. Inhibición de los extractos frente a *Klebsiella oxytoca*, C. Inhibición de los extractos frente a *Proteus mirabilis* Y D. Inhibición de los extractos frente a *Pseudomona aeruginosa*.

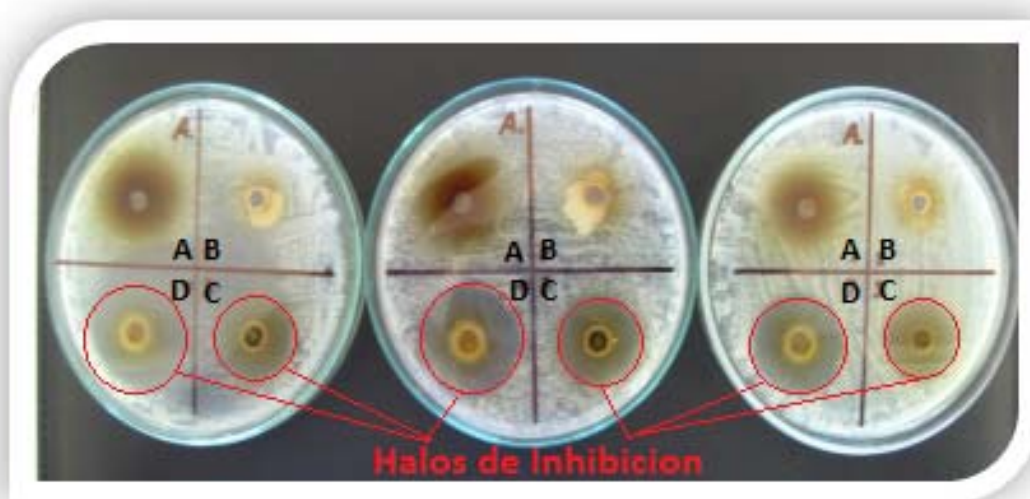


Figura. 19. Halos de inhibición generados por los extractos frente a *Staphylococcus aureus*.

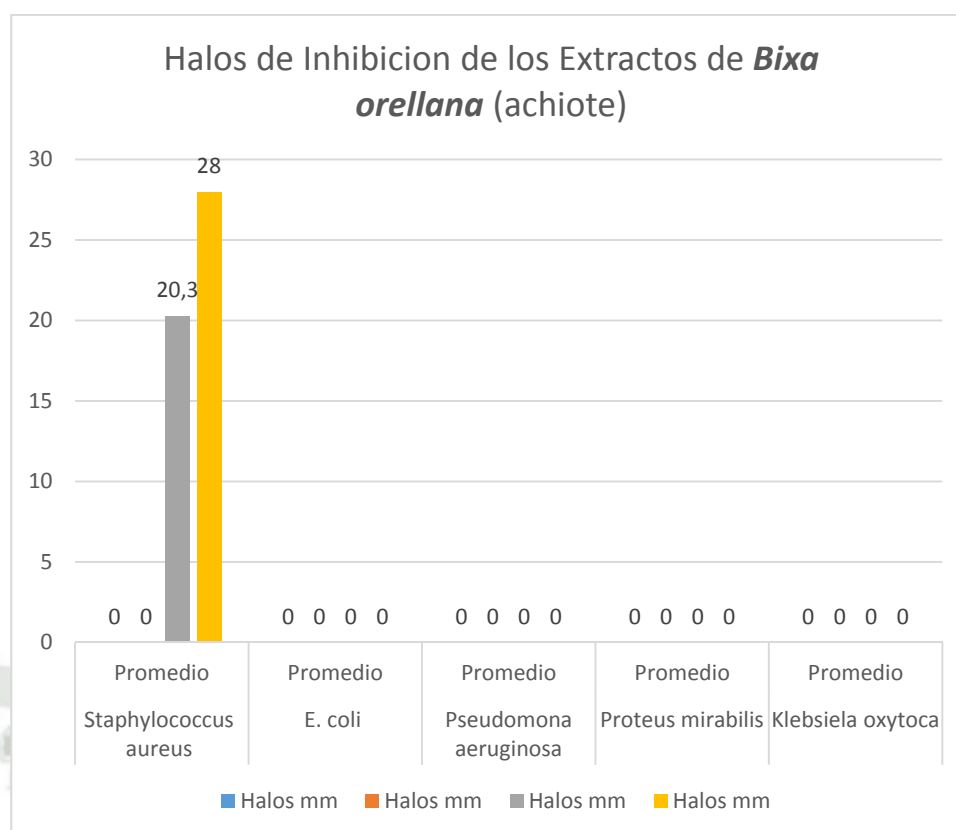


Figura 20. Tamaño de Halo de Inhibición del Crecimiento Bacteriano en Relación al tipo de extracto obtenido de *Bixa orellana* (Achiote).

De acuerdo a literatura López V. M. Se ha comprobado el efecto antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Bixa orellana* (Achiote) frente a *Staphylococcus aureus* como se observa en la Figura 20.

Los resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por medio de halos de inhibición, el extracto etanólico de hojas y corteza de nuestro estudio mostro actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 28mm y 20,3mm respectivamente, como se observaron en la Figura 19.

➤ **ANOVA Simple – Halos por EXTRACTOS *S. aureus***

Variable dependiente: Halos

Factor: EXTRACTOS (*S. aureus*)

Numero de observaciones: 12

Numero de niveles: 4

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 4 diferentes niveles de EXTRACTOS *S. aureus*.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinara si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, el análisis HSD le dirán cuales medias son significativamente diferentes de otras (anexo.5)

Como la Razón-F es mayor a F teórico se rechaza H_0 y se acepta la hipótesis H_1 . Puesto que el valor-Protéus de la Prueba- F es menor que 0.05, hay suficiente evidencia para aceptar la hipótesis alternativa, existe una diferencia significativa entre la media de halos entre los extractos, con un nivel del 95,0% de confianza. Al menos dos medias de los extractos son diferentes en cuanto al tamaño del halo de inhibición.

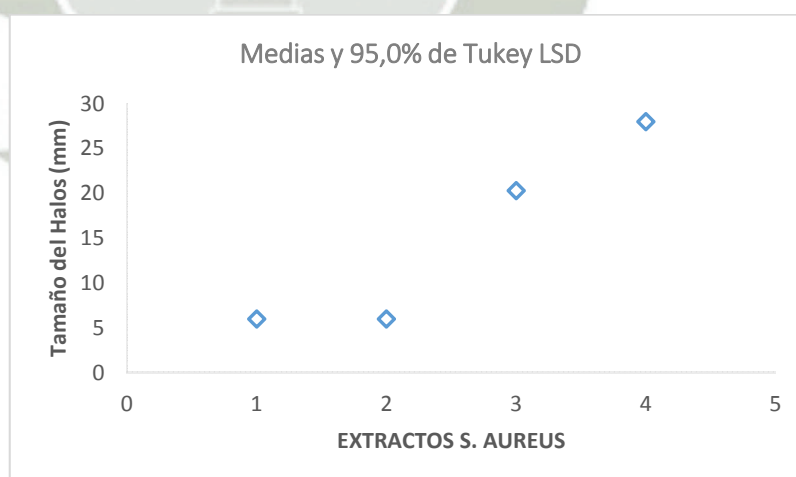


Figura 21. Comparación de los halos de inhibición (mm) producidos por la cepa de *Staphylococcus aureus* con Extractos de *Bixa orellana* (Achiote)

Al observar la Figura 21, indica que los extractos etanólicos muestran una diferencia estadísticamente significativa; que el mejor extracto para las cepa *Staphylococcus aureus* es el etanólico de hojas.

4.4. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

4.4.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

- a) Determinación de la CMI para *Staphylococcus aureus* del extracto Etanólico de hojas.

Se trabajó para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas, frente a 10 cepas de *Staphylococcus aureus* por el método de dilución en caldo. Este procedimiento se realizó como se indica en el punto 3.7.1.

Se preparó la batería de tubos, los cuales contenían las cepas de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 10^6 UFC/mL suspendidas en caldo peptonado a los cuales se les ha añadido el extracto etanólico de hojas a las diferentes concentraciones indicadas en la Tabla 12.

Tabla 12.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del EsSALUD.

Muestras Clínicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control (+)	Control (-)
Concentración Final (mg/mL)	250	225	200	175	150	125	100	75	50	25	--	--
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa I	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa II	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa III	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IV	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				175								
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VI	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VII	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VIII	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CIM						125						
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IX	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					150							

-: No creció

+: Creció

Se preparó la batería de tubos para determinar la CMI para las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio realizándose la comparación con una batería de tubos (blanco) debido a que el extracto etanólico de hojas posee color y se pudo generar error en la determinación visual del punto de ruptura. Como se detalla en la Figura 22.



Figura. 22. Batería de tubos de la cepa I de *Staphylococcus aureus* período de incubación.

Se observa en la Tabla 12 que 7 de 10 cepas de *Staphylococcus aureus* la Concentración Mínima Inhibitoria fue de 200 mg/mL, en las otras 3 cepas se observa que la CMI fue menor, debido a que son más sensibles al extracto en estudio.

Por lo cual la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el extracto etanólico de hojas frente a *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL debido a que es la concentración que inhibe el crecimiento en las 10 cepas en estudio.

- b) Determinación de la CMI para *Staphylococcus aureus* del extracto etanólico de corteza.

Se trabajó para hallar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de corteza, frente a 10 cepas de *Staphylococcus aureus* por el método de dilución en caldo. Este procedimiento se realizó como se indica en el punto 3.7.1.

Se preparó la batería de tubos, los cuales contenían las cepas de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 10^6 UFC/mL suspendidas en caldo peptonado a los cuales se les ha añadido el extracto etanólico de corteza a las diferentes concentraciones indicadas en la Tabla 13.



Tabla 13.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de corteza frente a frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del EsSALUD.

Muestras Clínicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control (+)	Control (-)
Concentración Final (mg/mL)	300	270	240	210	180	150	120	90	60	30	-	-
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa I	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa II	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa III	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IV	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa V	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					180							
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VI	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VII	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VIII	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CIM						150						
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IX	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					180							

-: No creció

+: Creció

Se preparó la batería de tubos para determinar la CMI para las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio realizándose la comparación con una batería de tubos (blanco) debido a que el extracto etanólico de corteza posee color y se pudo generar error en la determinación visual del punto de ruptura. Como se detalla en la Figura 23.

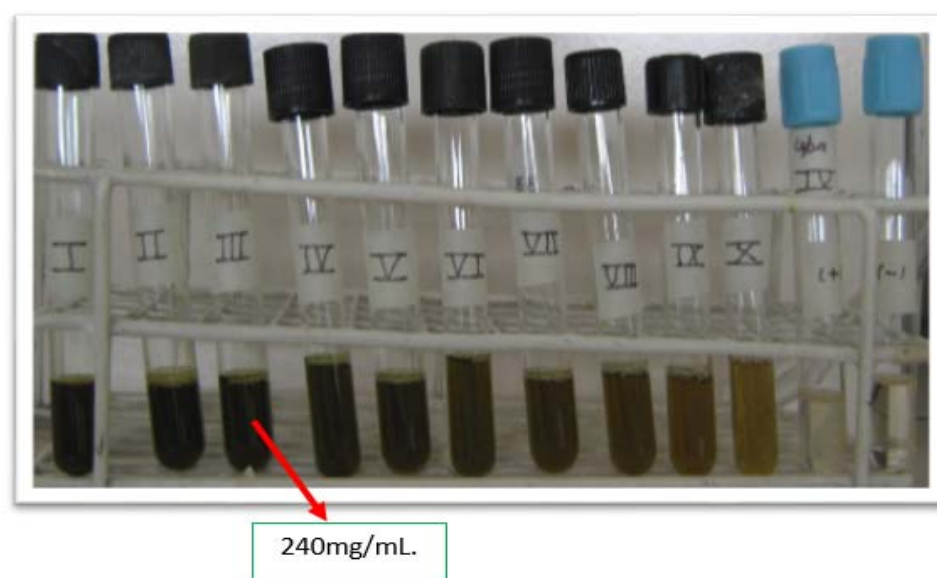


Figura.23. Batería de tubos de la cepa IV de *Staphylococcus aureus* período de incubación.

Se observa en la Tabla 13 que 3 de 10 cepas de *Staphylococcus aureus* la Concentración Mínima Inhibitoria fue de 240 mg/mL, en las otras 7 cepas se observa que la CMI fue menor, debido a que son más sensibles al extracto en estudio.

Por lo cual la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el extracto etanólico de corteza frente a *Staphylococcus aureus* fue de 240mg/mL debido a que es la concentración que inhibe el crecimiento de las 10 cepas en estudio.

4.4.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

- a) Determinación de la CBM para *Staphylococcus aureus* del extracto etanólico de hojas.

Para la determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se empleó el método de difusión en placa para las 10 cepas de *Staphylococcus aureus*; sembrando todos los tubos para determinar la CBM este procedimiento se realizó como se indica en el punto 3.7.2.



Tabla 14.

Concentración Mínima Inhibitoria (CBM) del extracto etanólico de hojas frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del EsSALUD.

Muestras Clínicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control (+)	Control (-)
Concentración Final (mg/mL)	250	225	200	175	150	125	100	75	50	25	--	--
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa I	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		225										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa II	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		225										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa III	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		225										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IV	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		225										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa V	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VI	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		225										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VII	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			200									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VIII	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CBM					150							
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IX	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		225										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa X	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM				175								

-: No creció

+: Creció

Después de determinar la CMI se procedió a la determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) realizando la siembra de toda la batería de tubos para las cepas obteniendo una CBM de 225mg/mL, como se observa en la Figura 24.

Los resultados de la Tabla 14. Obtenidos por nuestro estudio confirman la literatura obteniendo una CBM de 225mg/mL frente a las 10 cepas de *Staphylococcus aureus*.

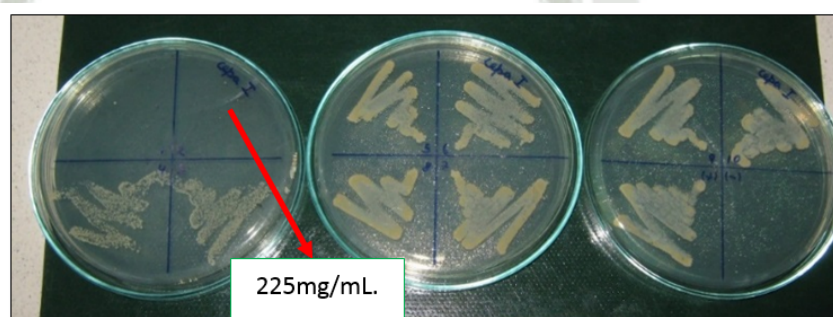


Figura. 24. Placas sembradas con los tubos de la cepa I de *Staphylococcus aureus* después del período de incubación.

Por lo cual la Concentración Bactericida Mínima (CBM) para el extracto etanólico de hojas frente a *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL debido a que es la concentración que mata el 99.9 % de las 10 cepas en estudio.

De acuerdo a lo descrito por Alvarez Privado, Christian Samuel. (2007) y Mendocilla moises, Lopez V.: (2001). El extracto Etanólico de hoja poseen actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

- b) Determinación de la CBM para *Staphylococcus aureus* del extracto Etanólico de corteza.

Para la determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) se empleó el método de difusión en placa para las 10 cepas de *Staphylococcus aureus*; sembrando todos los tubos para determinar la CBM este procedimiento se realizó como se indica en el punto 3.7.2.

Tabla 15.

Concentración Mínima Inhibitoria (CBM) del extracto etanólico de corteza frente a 10 muestras clínicas de Staphylococcus aureus procedentes del EsSALUD.

Muestras Clínicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control (+)	Control (-)
Concentración Final (mg/mL)	300	270	240	210	180	150	120	90	60	30	-	-
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa I	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa II	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa III	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IV	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM				210								
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VI	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM		270										
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VII	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa VIII	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CBM						150						
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa IX	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM			240									
Crecimiento Staphylococcus aureus Cepa X	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CBM				210								

-: No creció

+: Creció

Después de determinar la CMI se procedió a la determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) realizando la siembra de toda la batería de tubos para las cepas obteniendo una CBM de 270mg/mL, como se observa en la Figura 25.

Los resultados de la Tabla 15. Obtenidos por nuestro estudio confirman la literatura obteniendo una CBM de 270mg/mL frente a las 10 cepas de *Staphylococcus aureus*.

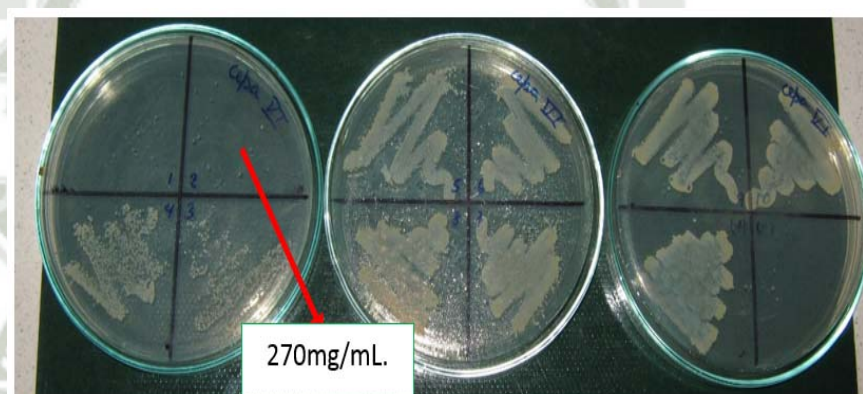


Figura.25. Placas sembradas con los tubos de la cepa VI de *Staphylococcus aureus* período de incubación después del periodo de incubación.

Por lo cual la Concentración Bactericida Mínima (CBM) para el extracto etanólico de hojas frente a *Staphylococcus aureus* fue de 270mg/mL debido a que es la concentración que mata el 99.9 % de las 10 cepas en estudio.

De acuerdo a lo descrito por Alvarez Privado, Christian Samuel. (2007) y Mendocilla moises, Lopez V.: (2001). El extracto Etanólico de hoja poseen actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

4.5. Análisis Fitoquímico de los Extractos Etanólicos y Acuosos de *Bixa orellana* (Achiote)

La identificación de los metabolitos secundarios de *Bixa orellana*. Se determinó según se indica en el punto 3.8.

Tabla 17.

Marcha Fitoquímica de los extractos en estudio.

MARCHA FITOQUÍMICA						
Ensayos	Reactivo	Extractos de <i>Bixa orellana</i>				Resultados
		Escherichia.A (Hojas)	Escherichia.A (Corteza)	Escherichia.E scherichia (Hojas)	Escherichia.Es cherichia (Corteza)	
TANINOS	Reacción de Gelatina	+	-	+	+	Blanco o Turbidez
		Precipitado		Precipitado	Precipitado	
COMPUESTOS FENOLICOS	Reacción con Tricloruro Férrico	+	+	+	-	Verde y Azul Intenso
		Azul intenso	Azul intenso	Azul intenso		
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	-	-	+	+	Amarillo, Rojo, Azul
				Azul	Amarillo	
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	+	+	-	-	Precipitado Anaranjado
		Precipitado	Precipitado			
SAPONINAS	Agua destilada	-	+	-	-	Espuma
			Espuma			

Leyenda:

- A = Escherichia.A (Hojas): Extracto Acuoso de Hojas.
- B = Escherichia.A (Corteza): Extracto Acuoso de Corteza.
- C = Escherichia.Escherichia (Hojas) : Extracto Etanólico de Hojas
- D = Escherichia.Escherichia (Corteza): Extracto Etanólico de Corteza.
- Presencia: +
- Ausencia: -

De acuerdo a lo descrito por Olga (1994), Lock de Ugaz, Sulca Villamarin, Tania Salome (2010) y Torres Vela, Fernando (2009), Los análisis preliminares fitoquímicos de los extractos naturales demuestran que poseen metabolitos secundarios como Flavonoides, Alcaloides, Compuestos Fenólicos, Saponinas y Taninos.

Los resultados obtenidos por nuestro análisis fitoquímicos preliminar demuestran que existe una variación de metabolitos secundarios dependiente del tipo de extracto y método de obtención del mismo.

De acuerdo a lo descrito por Olga (1994), Lock de Ugaz, Sulca Villamarin, tania Salome (2010). Algunos metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y compuestos fenólicos proporcionan la actividad anti microbiana a los extractos.

Mediante la marcha Fitoquímica que se realizó a los extractos acuosos y etanólicos de ***Bixa orellana (achiote)***; se observa la presencia de metabolitos secundarios como Taninos, Flavonoides, Alcaloides, Fenoles y Saponinas. Los extractos etanólicos de hojas y corteza con actividad antibacteriana poseen dos de los metabolitos secundarios que influyen en la actividad antibacteriana como son los flavonoides y taninos. El extracto etanólico de hojas posee también compuestos fenólicos que se considera el por qué tiene mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en comparación del extracto etanólico de corteza.

Los resultados obtenidos de los análisis demuestran que nuestros extractos que poseen actividad antimicrobiana poseen también dichos metabolitos relacionando así su actividad a su composición. Anexo 11.

CAPITULO IV: Conclusión y Recomendaciones

Conclusión

1. Se obtuvieron los extractos acuosos y etanólicos de hojas y corteza por los métodos de infusión y maceración, encontrándose diferencia en el rendimiento de cada extracto siendo el de mayor rendimiento el extracto acuoso de hojas con un rendimiento 17,57% seguido de los extractos etanólico de hojas con un rendimiento 15,02%, extracto acuoso de corteza con un rendimiento de 10,50% y por ultimo extracto etanólico de corteza con un rendimiento de 4,00%.
2. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante halos de inhibición de los diferentes Extractos frente a las diferentes Bacterias en estudio de los cuales se obtuvo que los extractos Etanólicos de Hojas y corteza solo presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 28 y 20,3 mm respectivamente. Los extractos acuosos no poseen ninguna actividad antimicrobiana frente a las bacterias en estudio.

3. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las cuales se obtuvo: para *Staphylococcus aureus* con extracto etanólico de hojas una CMI de 200 mg/ml y una CBM de 225 mg/ml; con el extracto etanólico de corteza una CMI de 240 mg/ml y una CBM de 270 mg/ml, lo cual nos indica que los extracto etanólico de hojas y corteza son eficaces frente a nuestra bacteria en estudio *Staphylococcus aureus*.
4. Mediante la marcha Fitoquímica que se realizó a los extractos acuosos y etanólicos de ***Bixa orellana (achiote)***; se observa la presencia de metabolitos secundarios como Taninos, Flavonoides, Alcaloides, Fenoles y Saponinas. Los extractos etanólicos de hojas y corteza con actividad antibacteriana poseen dos de los metabolitos secundarios que influyen en la actividad antibacteriana como son los flavonoides y taninos. El extracto etanólico de hojas posee también compuestos fenólicos que se considera el por qué tiene mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en comparación del extracto etanólico de corteza.

RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas para determinar la actividad antifúngica de los extractos Secos de *Bixa orellana* (achiote).
2. Efectuar pruebas “in vivo” para valorar la efectividad y toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de los extractos de *Bixa orellana* (achiote) como también poder determinar sus dosis terapéuticas para uso en la población.
3. Investigar el desarrollo de una forma farmacéutica para el tratamiento antimicrobiana con los extractos etanólicos secos de hojas y corteza de *Bixa orellana* (achiote).
4. Realizar pruebas con aceites esenciales obtenidos de hojas y corteza de *Bixa orellana* (achiote).
5. Evaluar costos de producción en la obtención, procesamiento y comercialización de los extractos etanólicos secos de hojas y cortezas o en su forma farmacéutica de *Bixa orellana* (achiote).

REFERENCIAS

1. **Alvarado Villanueva V., Moromi Nakata H. (2010).** “Plantas medicinales: Efecto antibacteriano in vitro de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman* var *truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica”. Sanmarquina {Internet}. 2010 {8 Noviembre 2007}; vol. 13(2):21-25. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2010_n2/pdf/a05v13n2.pdf
2. **Álvarez Privado, Christian Samuel. (2007).** “Determinación de la Actividad contra *Campylobacter jejuni* por extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales en región cálidas de Guatemala”. Guatemala. {Internet}. 2007 {mayo 2007}; vol. 1:1-63. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2566.pdf
3. **Alvarez Juan (2007),”** Modelo Insumo-Producto (Integración de la Matriz Insumo-Producto)” . México {Internet}. 2007 {2007}; vol. 1(1):1-470. Disponible en: http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%206_7.pdf
4. **Córdova Callo, Lizet Juliana.** “Extracto etanólicos, metanólicos, diclorometánicos y hexánicos de las semillas de *Carica papaya* L. “Papaya” para la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro frente a las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M. Arequipa; Tesis 2013.
5. **Casado S. Escherichia., Duran B. Proteus., Miro A. T., Paredes de la Sal A. J. (2012).** “Operaciones Básicas de Laboratorio”. Sanidad, Farmacia y Parafarmacia. Paraninfo {Internet}. Vol. 1(1):1-335. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=N4T1H-p8fvoC&pg=PA334&dq=%E2%80%9COperaciones+B%C3%A1sicas+de+Laboratorio%E2%80%9D.&hl=es&sa=X&ei=reSLUqebGYevsQT5lYGAAG&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=%E2%80%9COperaciones%20B%C3%A1sicas%20de%20Laboratorio%E2%80%9D.&f=false>

6. **Contreras R. Escherichia., Velasquez Proteus. J. (2002)** “Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión”. INS {Internet}. 2002 {actualizado 2002}; vol. 30:1-67. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf
7. **Catiana Zampini I., Cudmani N., Isla M. I. (2007).** “Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico- resistentes”. ISSN {Internet}. 2007 {Julio-septiembre de 2007}; vol. 41(3):1-10. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/535/53541313.pdf>
8. **Contreras Coronel, Nelson (2009).** “Extracción y caracterización de la oleorresina del orégano (*Origanum vulgare*)”. Pereira {Internet}. 2009 {actualizado 2009}; vol.:1-94. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1839/1/6650282S159.pdf>
9. **Castillo Machalskis I., Armas H. D., Malaver N. Núñez M. (2007).** “Actividad antibacteriana de extractos de hongos aislados de raíces del mangle *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en Venezuela.”. Biol. Trop. {Internet}. 2012 {actualizado septiembre- Diciembre 2007}; vol. 55 (3-4):761-765. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-7442007000300002&script=sci_arttext
10. **Caminada, AM (1998).** “análisis Fitoquímico y Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos de hojas de *Stachytarpheta Cayennensis* Yanahuactu en animales de experimentación”. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M Arequipa. Tesis; 2013
11. **Caceres Ramirez Proteus., Santos Rincon I. (2006).** “Efecto antibacteriano del extracto de la *Urtica ureas* L, “ortiga menor” in vitro frente a microorganismos Gram negativos presentes en infecciones urinarias. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M Arequipa. Tesis; 2006

12. **Delgado Muñoz Angela, Valderrama Duarte Carolina. (2012)** “Manual de procedimiento para la determinación de susceptibilidad antibiótica en patógenos de importancia hospitalario”. MNL-RO 1.5030.012{Internet}. 2012 {Agosto 2012}; vol. 00:1-30. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/Microbiologia/MANUAL%20DE%20HOSPITALARIO.pdf>

13. **García J.A., Picazo J.J.** “Compendio de Microbiología Médica” Universidad Católica de Santa María, Biblioteca.

14. **Galindo Sanabria A., López I. S., Gualdron R. (1997).** “Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia Salina* de plantas Colombianas”. Farm {Internet}. 1997 {20 de agosto 1997}; vol. 26:15-19. Disponible en: <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V26P15-19.pdf>

15. **Gonzales Villa, Ángela Andrea (2004)** “Obtención de aceites Esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas”. INS {Internet}. 2004 {actualizado 2004}; vol. 0:1-100. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>

16. **Gutierrez Ramirez L. A., Montoya Campuzano O. I., Ruiz Villadlego O. I. (2005).** “Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *Escherichia. coli*, *Salmonella sp.* Y *Listeria monocytogenes*”. CENIC {Internet}. 2005 {actualizado 2005}; vol35.:1-7. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525062>

17. **Gualtieri M., Villalta C., Guillen A. M., Lapenna Escherichia. (2004).** “Determinación de la actividad Antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta Indica A. Juss (Neem)*”. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel {Internet}. 2004 {actualizado Enero 2004}; vol. 35(1)6:1-10. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-04772004000100003&script=sci_arttext

18. **Herrera C. Carlos y Valdivia V. Luciano; Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro de jabón con propóleos en Staphylococcus aureus.** Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M Arequipa. Tesis; 2013
19. **Joklin Wolfgangk.** “Zinsser Microbiología” Universidad Católica de Santa María. Biblioteca.
20. **Jave Marquez, Jesús Mercedes.** “Prácticas de Microbiología I”. Universidad Católica de Santa María, U.C.S.M, Arequipa; 2009 y 2005.
21. **López Ferrer C., Sánchez Dirzo M., Arrieta Báez D., Ramon García J. (2010).** “Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de Salvia amarissima Ort”. Dialnet {Internet}. 2010 {Diciembre 2010}; vol. 9:1-10. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3705814>
22. **Mendocilla Moisés, López V. M..** “Monografías de Plantas Medicinales”. BVS {Internet}. 2001 {actualizado 2001}; vol. 1:1-405. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>
23. **Martínez Aguilar Y., Rodríguez Soto F., Saavedra Almeida M. (2012).** “Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hojas de Anacardium occidentales L. (marañón)”. Cubana de Plantas Medicinales {Internet}. 2012 {actualizado Octubre - Diciembre 2012}; vol. 17(4)6:1-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000400004&script=sci_arttext
24. **Morales M., Ornelas Velazquez O., Nuño Liga N. (2006).** “Actividad antimicrobiana del extracto fluido de la planta Gnaphalium spp (gordolobo)”. Episteme {Internet}. 2006 {actualizado Octubre - Diciembre 2006}; vol. 8:1-10. Disponible en: http://www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero8y9-06/jovenes/a_gordolobo.asp

25. **M. Paz, Arraiza Bermúdez (2004).** “Obtención de Materia Prima”. Open Course Ware {Internet}. Disponible en: http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/material-de-clase?set_language=en
26. **Ministerio del Ambiente. (2004).** “Fabricación de Productos farmacéuticos, Sustancias químicas medicinales y Productos Botánicos”. Ministerio de Ambiente Ecuador {Internet}. 2013 {actualizado 2013}; Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART3.pdf>
27. **Mora May Gabriel.(2007).**”Manual para la Producción del Achiote (Bixa orellana)” Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas.
28. **Olga, Lock de Ugaz.** “Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales”. Editor. Pontificia Universidad Católica del Perú. Vol. 2. Perú; 1994.
29. **Pérez J. Escherichia., Gustavo I. M., Acosta S. M. (2007).** “Actividad antibacteriana de extracto de Phenax rugosus y Tabebuia chrysantha”. Biosalud {Internet}. 2007 {actualizado 8 Agosto 2007}; vol. 6:1-10. Disponible en: http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%206_7.pdf
30. **Osorio Durango, Edison Javier (2009).** “Aspecto Básicos de Farmacognosia”. {Internet}. 2005 {Septiembre 2009}; vol. 1:1-83. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>
31. **Ponce H Escherichia., Velasco A. Proteus., Flores G. Escherichia., Genevieve B. (1998).** “Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de plantas medicinales utilizadas por la etnia tacana”. Biofarbo {Internet}. 1998 {actualizado Diciembre 1998}; vol. 6:1-6. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa98060604.pdf>

32. **Pino O., Snchez Y., Rojas M. M., Abreu Y., Correa T. M. (2012).** “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L.”. PROTECCION VEG {Internet}. 2012 {actualizado Septiembre – Diciembre 2012}; vol. 27(3):181-187. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522012000300007&script=sci_arttext
33. **Rivas M., Miliwebsky Escherichia., Deza N. (2007).** “Manual de procedimientos Diagnostico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a Partir de especímenes clínicos”. Salm Surv {Internet}. 2007 {actualizado 2007}; vol.:1-122. Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=NmZogH4P%2Bmk%3D&tabid=120&mid=460&language=en-US>
34. **Romero Cabello, Raúl.(2007)** “Microbiología y Parasitología Humana”. Bases etiológicas de enfermedades infecciosas y parasitarias”. Panamericana {Internet}. 2007 {actualizado 2007}; vol. 3:1-1725. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=Wv026CUhR6YC&pg=PP3&lpg=PP3&dq=Microbiolog%C3%ADa+y+Parasitolog%C3%ADa+Humana%E2%80%9D.+Bases+etiol%C3%B3gicas+de+enfermedades+infecciosas+y+parasitarias&source=bl&ots=n4vtrFAMMc&sig=v7Hk1p2vcKHAKi3UAE0p8tPQSaE&hl=es&sa=X&ei=4eCLUoF-5-CwBKGagNAH&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q=Microbiolog%C3%ADa%20y%20Parasitolog%C3%ADa%20Humana%E2%80%9D.%20Bases%20etiol%C3%B3gicas%20de%20enfermedades%20infecciosas%20y%20parasitarias&f=false>
35. **Salva truchos Foro** {Internet}. El Salvador, 2009 {actualizado 19 de Octubre de 2009}; Disponible en: <http://www.salvatruchos.com/foro/index.php?topic=2880.0>

36. **Sulca Villamarin, Tania Salome. (2010).** “ Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens* (Botoncillo), *Urtica dioica* (Ortiga negra) y *Sonchus oleraceus* (Kana yuyo), plantas registradas en la parroquia la esperanza- Imbabura, sobre *staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *candida albicans*, causantes de enfermedades bucofaringeas”. {Internet}. 2007 {12 de Octubre 2010}; vol. 1:1-205. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2648/1/T-ESPE-030037.pdf>
37. **Sharapin, Nikolai (2000).** “Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos”. Revista de Fitoterapia {Internet}. 2000 {actualizado 2000}; vol. 1(3):197-203. Disponible en: http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF1_3_MATPRIMVEG.pdf
38. **Shiva Ramayoni, Carlos Martin. (2007).** “Estudio de la Actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento”. {Internet}. 2007 {11 de Julio del 2007}; vol. 0:1-184. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5606/cmsr1de1.pdf;jsessionid=2D6069F02E390BC7C0BC997C74A58638.tdx2?sequence=1>
39. **Talavera S.M., Vilca C.A.** “Obtención del extracto de propóleo con acetato de etilo y determinación de su actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*”. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M Arequipa. Tesis; 2007.
40. **Torres Tovar, Humberto (2006)** “Guía de Prácticas de Farmacognosia”. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M Arequipa. 2006
41. **Torres Vela, Fernando.** “Guía de Prácticas de Farmacognosia II”. Universidad Católica de Santa María, U.C.S.M, Arequipa; 2009.

42. **Torres V.F., Pino F.A.** “Guía de Prácticas de Farmacognosia I”. Universidad Católica de Santa María, U.C.S.M, Arequipa; 2008.
43. **Valdivia Ugarte, Jaime Enrique** “Evaluación de la Actividad Antipirética de los Extractos secos de las Hojas de Perezia Multiflora (ESCORZONERA) en animales de experimentación. Arequipa-2013”. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica U.C.S.M Arequipa. Tesis; 2013.



ANEXO N° 1: ESCALA DE MAC FARLAND

Preparación del Estándar N° 5 de la Escala de Mac Farland

a) Composición

BaCl ₂	+	H ₂ SO ₄	→	BaSO ₄
0.5 ml	+	99.5 ml	→	Turbidez
0.05 ml	+	9.95 ml	→	10 ml

b) Preparación

La escala de Mac Farland, equivale a una concentración de 10⁸ UFC/ml. Se prepara añadiendo 0.5 ml de BaCl₂ 0.048 M a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36 N.

c) Cálculos

$$\text{H}_2\text{SO}_4 (0.36\text{N}) = \frac{0.36 \text{ eq}}{1\text{L}} * \frac{98.08 \text{ g}}{2 \text{ eq}} * \frac{1 \text{ ml}}{1.84 \text{ g}} * \frac{100 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{96 \text{ g}} = 9.99 \text{ ml/l}$$

Necesito 9.99 ml de H₂SO_{4cc}. Para preparar 1000 ml de H₂SO₄ 0.36 N.

$$\text{BaCl}_2 (0.048\text{M}) = \frac{0.048 \text{ mol}}{1\text{L}} * \frac{208.3 \text{ g BaCl}_2}{1 \text{ mol}} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 0.0099 \text{ g/l}$$

Necesito 0.0099 g de BaCl₂ para preparar 1 ml de BaCl₂ 0.048 M.

- ✓ En un tubo de ensayo colocar 10 ml de H₂SO₄ 0.36N y retirar 0.05 ml.
- ✓ Completar 0.05 ml con BaCl₂ 0.048M; agitar.
- ✓ La turbidez de ese tubo de ensayo es similar al tubo N° 5 de la Escala de Mac Farland, la que es equivalente a la concentración de 10⁸ UFC/ml del inoculo.



Escala de Mac Farland

ANEXO N° 2: MEDIOS DE CULTIVO

1. Mueller Hinton

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

➤ Fundamento

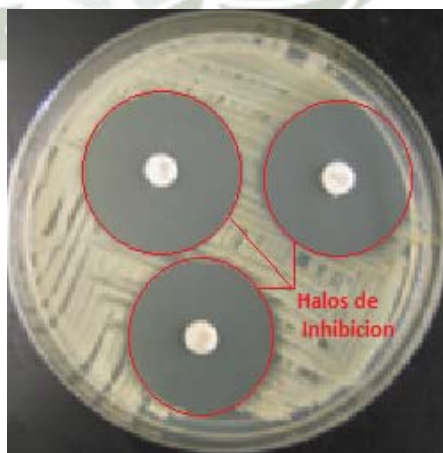
En la preparación de este medio es fundamental que las concentraciones de timina, timidina y ácido 4- amino benzoico, sean lo suficiente bajas para no inhibir la actividad antibacteriana de antibióticos y sulfamidas. Las dos primeras inhiben los antibióticos y el último las sulfamidas. El ensayo de sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico se puede realizar sobre placas de agar Mueller-Hinton por procedimientos de difusión, por diluciones seriadas o por técnicas turbidimétricas en el Mueller- Hinton.²

➤ Composición

FORMULA (por litro)	
Almidón	1.5g
Infusión de Carne (a partir de 300g)	2.0g
Peptona de Caseína Hidrolizada	17.5g
Agar	17.0g
pH final: 7.4 ± 0.2	

➤ Preparación

Suspender 38g (Agar) en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.



Prueba de sensibilidad a antibióticos. (Antibiograma)

2. Agar Sangre

Se emplea, añadiendo sangre o sangre cocida, para el cultivo y aislamiento de microorganismos exigentes, sobre todo patógenos y para su determinación. Si no se añade sangre, es adecuado como base para la preparación de otros medios especiales.

➤ Fundamento

Dada la excelente base nutritiva, permite el crecimiento de prácticamente todos los microorganismos que pudieran estar presentes. Si se añade sangre se pueden determinarlas distintas formas de hemólisis que pudieran tener lugar. Si se calienta se obtiene el agar Chocolate, también muy empleado. Por la adición de distintos antibióticos se obtienen medios con caracteres selectivos.²

➤ Composición

FORMULA (por litro)	
Infusión del Musculo Cardiac (a partir de 375g)	10.0g
Peptona de Carne	10.0g
Sodio Cloruro	5.0g
Agar	15.0g
pH final: 7.3 ± 0.2	

➤ Preparación

Suspender 40g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos (para cantidades de más de 1L). Para preparar placas de Agar sangre incorporar 5 a 8 % de sangre desfibrinada antes de distribuir en placa.



Agar Sangre determinando zona de Hemólisis.

3. Agar Manitol Salado

Se emplea para aislamiento selectivo y recuento de Estafilococos patógenos en productos lácteos, cárnicos, marinos y otros productos alimenticios. También se emplea con el mismo fin en productos farmacéuticos y cosméticos.

➤ Fundamento:

El efecto inhibidor se debe a la alta concentración de Sodio cloruro del medio. Con la fermentación de la D(-)- Manita se genera ácido que ocasiona el viraje del rojo de fenol al amarillo, permitiendo así una mayor claridad en el momento de establecer el diagnóstico, ya que la mayoría de los Estafilococos patógenos fermentan este azúcar.² Este medio aprovecha la capacidad de los estafilococos para desarrollar en alta concentración de cloruro de sodio, al 7,5%. El *S. aureus* en contraste con el *S. epidermidis* tiene la capacidad de fermentar el manitol con producción de ácido.

➤ Composición

FORMULA (por litro)	
Sodio Cloruro	75.0g
D(-)-Manita	10.0g
Extracto de Carne	1.0g
Mezcla de Peptonas	10.0g
Rojo de Fenol	0.025g
Agar	15.0g
pH final: 7.4 ± 0.2	

➤ **Preparación**

Suspender 111g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.



Resultados de la Prueba en Agar Manitol Salado.

4. EMB (Eosina azul de Metilo)

Se emplea para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes. Con este medio se puede identificar *Escherichia coli* y *Enterobacter*.

➤ Fundamento:

La eosina y el azul de metileno son productos que inhiben parcialmente el crecimiento de microorganismos Gram-positivos, entre ellos los estreptococcus fecales. Además la combinación de azul de metileno y la eosina permiten diferenciar los gérmenes lactosa positivos de los lactosa negativos.²

➤ Composición

FORMULA (por litro)	
Eosina amarillenta	0.4g
Azul de Metilo	0.065g
Lactosa	10.0g
Peptona de Gelatina	10.0g
di- Potasio Hidrogeno Fosfato	2.0g
Agar	15.0g
pH final: 7.1 ± 0.2	

➤ Preparación

Suspender 37.4g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobre calentar. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.



Determinación consumo de lactosa, *Escherichia coli* generación de brillo metálico.

5. Agar Nutritivo

Medio de cultivo para cualquier tipo de microorganismos, crecimiento en general.

➤ Fundamento:

Un cultivo general, se puede usar como medio enriquecido incorporando 10% fluidos biológico.²

➤ Composición

FORMULA (por litro)	
Peptic digest of animal tissue	5.0g
Extracto de carne	1.5g
Extracto de Levadura	1.5g
Sodio Cloruro	5.0g
Agar	15.0g
pH final: 7.4 ± 0.2	

➤ Preparación

Suspender 28g en 1L de agua destilada; agitar hasta disolución total.

Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.



Agar nutritivo cultivo en general.

6. Caldo Peptonado

Se emplea como diluyente en muestras alimentarias, aguas y materiales diversos. Para la realización de la prueba del Indol en aquellos microorganismos capaces de producirlos.

➤ Fundamento

La peptona tiene una elevada concentración de Triptófano, el cual es degradado a Indol por cierto número de microorganismos entre ellos *Escherichia. coli*. La detección de este producto se hace añadiendo el reactivo de KOVACS después de la incubación.

Este medio es adecuado para determinar los organismos Indol- positivos y puede utilizarse en lugar de los caldos triptófano. En usos generales se puede emplear para el cultivo de una gran variedad de microorganismos, siempre y cuando no presenten exigencias particulares.²

➤ Composición

FORMULA (por litro)	
Peptona	10g
Sodio Cloruro	5g
pH final: 7.2 $\pm$ 0.2	

➤ Preparación

Suspender 15g en 1L de agua destilada; agitar hasta disolución total.

Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.



Caldo Peptonado, identificación de Indol.

ANEXO N° 3: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

1. Medio TSI

➤ **Fundamento:**

Además este medio permite investigar la degradación de cualquiera de los 3 azúcares presentes (lactosa, sacarosa y glucosa), se forma ácidos que hacen virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo (inicialmente el color del medio es rojizo), en caso de no ocurrir degradación de los azúcares, se producirá una alcalinización virando el indicador hacia un color rojo acentuado.¹⁸

La degradación de la lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta) en la sacarosa en la parte intermedia y la glucosa en la parte profunda (taco) y en condiciones anaeróbicas.¹⁸

Determina la capacidad de un microorganismo de fermentar los hidratos de carbono presentes en el medio de crecimiento básico con producción o no de gas. La fermentación provoca acidificación del medio con viraje del indicador (rojo de fenol) al amarillo.

Permite detectar la producción del sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso.

➤ **Técnica:**

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37°C.
- Efectuar la lectura luego de 18-24 h de incubación.

➤ **Interpretación:**

Fermentación de azúcares:

Las reacciones que pueden observarse son:

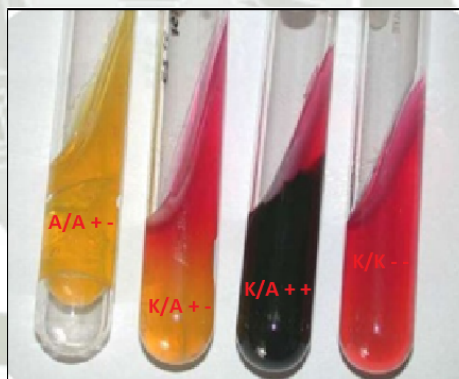
- Pico alcalino (rojo) / fondo alcalino (rojo). No hay fermentación de azúcares.
- Pico alcalino (rojo) / fondo ácido (amarillo). Glucosa fermentada. Lactosa y sacarosa no fermentadas.
- Pico ácido (amarillo) / fondo ácido (amarillo). Glucosa fermentada. Lactosa y/o sacarosa fermentadas.

Producción de gas:

- Se evidencia por la aparición de burbujas o fragmentación del medio.

Sulfuro de hidrógeno:

- Se evidencia por el ennegrecimiento del medio.¹⁹



Resultados de la Prueba TSI.

Tabla de Interpretación					
Símbolo		A/A + -	K/A + -	K/A ++	K/K - -
Interpretación	Lactosa	+	-	-	-
	Glucosa	+	+	+	-
	CO ₂	+	+	+	-
	H ₂ S	-	-	+	-

2. Medio Citrato de Simmons

➤ Fundamento

Determina si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, produciendo alcalinidad. El medio Citrato de Simmons contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, utiliza también las sales de amonio como su única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consiguiente alcalinidad. El indicador de pH usado es el azul de bromotimol, el cual en medio alcalino toma un color azul intenso, indicando una prueba positiva. El medio no inoculado tiene color verde.

➤ Técnica:

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37°C durante 48 h (a veces se requiere incubación más prolongada).

➤ Interpretación:

- Prueba positiva: desarrollo de color azul.
- Prueba negativa: el medio conserva el color verde original y hay ausencia de desarrollo bacteriano.¹⁹



Resultados de la Prueba Citrato.

3. Medio SIM

➤ **Fundamento:**

Este medio de cultivo permite comprobar la formación de sulfuro, la producción de indol y observar la movilidad.

Se evidencia la formación de ácido sulfhídrico por la formación de un precipitado negro. Esto se logra mediante las siguientes etapas:

Liberación de sulfuro a partir del tiosulfato por acción enzimática de la bacteria, acompañamiento del sulfuro con el ion hidrogeno para formar gas H_2S , detección del gas H_2S mediante sales de metales pesados con hierro, logrando la forma de sulfuro del hierro, que es un precipitado negro.

Los medios para detectar movilidad contienen concentraciones de agar 0,4% o menos. A mayor concentración del gel es demasiado firme para permitir la diseminación de los organismos.¹⁸

Permite detectar la producción de indol, producto de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El reactivo revelador (reactivo de Kovacs), formándose un complejo de color rojo.

Determina si el microorganismo es móvil por migración a partir del lugar de siembra y se disemina en el medio provocando turbidez.

➤ **Técnica:**

- Sembrar por punción única en la región central del tubo, utilizando una aguja recta hasta una profundidad de 2/3 del medio.
- Incubar a 37°C durante 18-24 h.
- Agregar 2 ó 3 gotas del reactivo de Kovacs para detección del indol.

➤ **Interpretación:**

Sulfuro de hidrógeno:

- Prueba positiva: Se observa ennegrecimiento del medio.

Indol:

- Prueba positiva: color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el medio.
- Prueba negativa: no hay modificación del color en la interfase del reactivo y el medio.

Movilidad:

- Prueba positiva: Se visualiza turbidez parcial o total del medio.
- Prueba negativa: Hay crecimiento bacteriano solamente en la línea de siembra.¹⁹



Resultados de la Prueba SIM.

4. Medio Lisina Hierro (LIA)

➤ **Fundamento:**

Este medio de diferenciación permite evidenciar la descarboxilación del aminoácido lisina, la desanimación del mismo y la producción de ácido sulfhídrico. Las reacciones anteriores se ponen de manifiesto mediante el viraje del indicador púrpura de bromocresol; y al formación de sulfuro de hidrógeno a partir del tiosulfato sódico, se manifiesta por la formación del sulfuro ferroso. (18)

Las decarboxilasas son un grupo de enzimas capaces de actuar sobre los grupos carboxilo de los aminoácidos produciendo aminas, de reacción alcalina. Cada una de las decarboxilasas es específica para un aminoácido.

La lisina puede ser descarboxilada transformándose en cadaverina. Esto produce un viraje del indicador púrpura de bromocresol al violeta. Como la descarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por fermentación de la glucosa.

Por este motivo este medio de cultivo sólo debe utilizarse para la diferenciación de cultivos que fermentan la glucosa.

Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje del medio al amarillo.

Este último, con la sal de hierro y por la influencia de oxígeno forma combinaciones pardo-rojizas en la región superficial del medio de cultivo.

Permite detectar la producción del sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso. (19)

➤ **Técnica:**

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37°C durante 18-24 h.

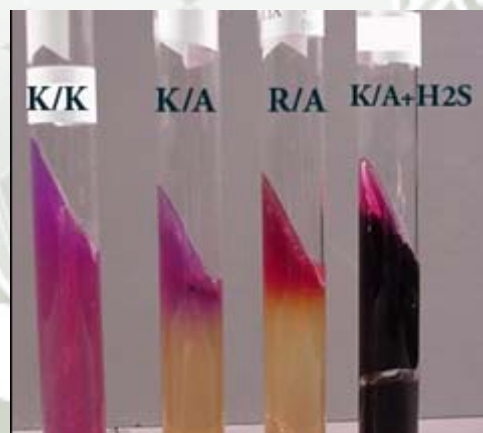
➤ **Interpretación:**

Decarboxilación de la lisina:

- Prueba positiva: pico violeta / fondo violeta
- Prueba negativa: pico violeta / fondo Amarillo

Desaminación de la lisina:

- Prueba positiva: pico pardo rojizo / fondo Amarillo *Sulfuro de hidrógeno:*
- Prueba positiva: Se observa ennegrecimiento del medio. (19)



Resultados de la prueba LIA.

Tabla de Interpretación					
Símbolo		K/K -	K/A -	R/A -	K/A +
Interpretación	Lisina	+	-	-	-
	Descarboxilasa	+	-	-	-
	Desaminasa	-	-	+	-
	H ₂ S	-	-	-	+

ANEXO N° 4: TINCION DE GRAM

➤ Fundamento

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos teicoicos: Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglicano (también conocido como mureína).

Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.

➤ Reactivos

A. SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA

Cristal violeta	1.0g
Alcohol 95°	20ml
Agua destilada	100ml

B. SOLUCION DE LUGOL

Yodo en cristales	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	100 ml

C. DECOLORANTE

Acetona	50 ml
Etanol	50 ml

D. SAFRANINA

Safranina	0.25 g
Alcohol 95°	10 ml
Agua destilada	100ml

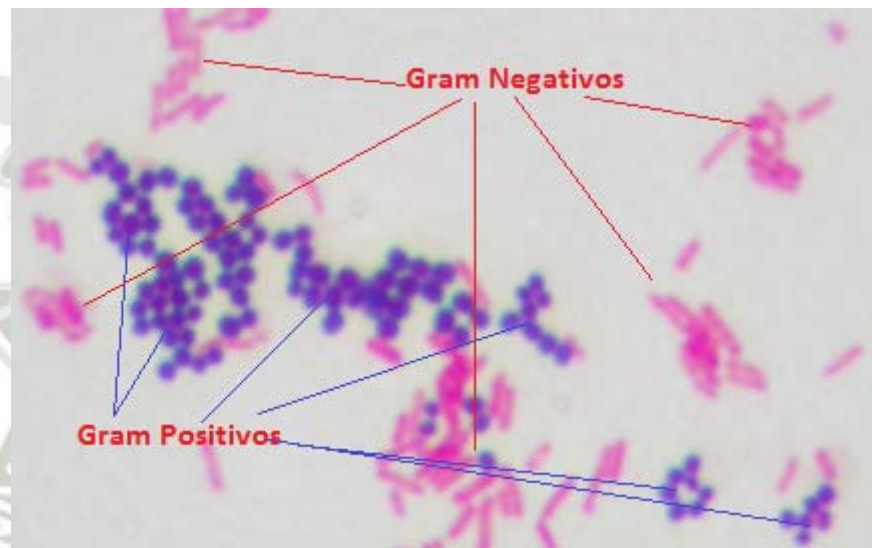
➤ **Procedimiento**

- Se colocó una azada de bacterias sobre una lámina portaobjetos limpia.
- Se dejó secar a temperatura ambiente o pasando por la llama suavemente para obtener la fijación del frotis, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de cristal Violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el decolorante acetona- alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta (30 segundos).
- Se cubrió la superficie de la lámina con Safranina por 30 segundos y se procedió a lavar.
- Se secó al aire a temperatura ambiente.
- Se observó la preparación a 40X y posteriormente a 100X con aceite de inmersión, observándose microorganismos Gram positivos y Gram negativos. (18)

➤ **Interpretación**

El cristal violeta actúa como un colorante primario, que se une a la pared celular bacteriana luego de un tratamiento con una solución débil de iodo (mordiente). Algunas bacterias debido a su naturaleza química de sus paredes celulares, poseen la capacidad de retener el cristal violeta, aun luego del tratamiento con un decolorante orgánico, tal como una mezcla de alcohol y acetona. Tales bacterias se denominan Gram positivas. Las bacterias Gramnegativas debido a su mayor contenido lipídico en su pared celular, pierden la coloración primaria del cristal violeta cuando son tratados con el decolorante. El colorante secundario o de contraste utilizado es la safranina.

Las bacterias Gramnegativos que han perdido el cristal violeta, aparece rojas o rosadas vistas al microscopio, habiendo fijado la safranina como contracolor a sus paredes celulares. Las bacterias aparecen de color azul, aunque el grado de absorción del colorante por los diferentes microorganismos es variable, y algunas estructuras como las esporas absorben el colorante con dificultad son así fácilmente diferenciables. (18)



Resultados de la Tinción de Gram 100x.

ANEXO N° 5: PRUEBA DE CATALASA

➤ Fundamento

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado (Fe^{+3}).

El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono.

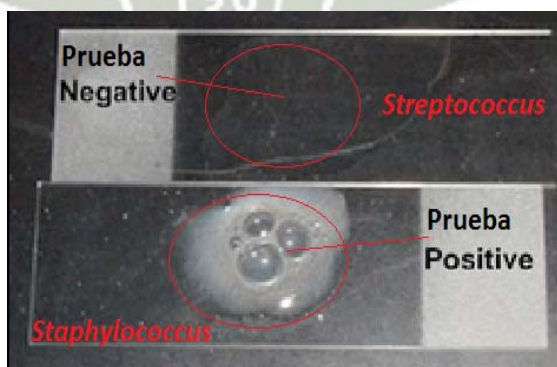


➤ Técnica

- Suspender el organismo y observar si hay aparición de burbujas debido al desprendimiento del oxígeno.

➤ Interpretación

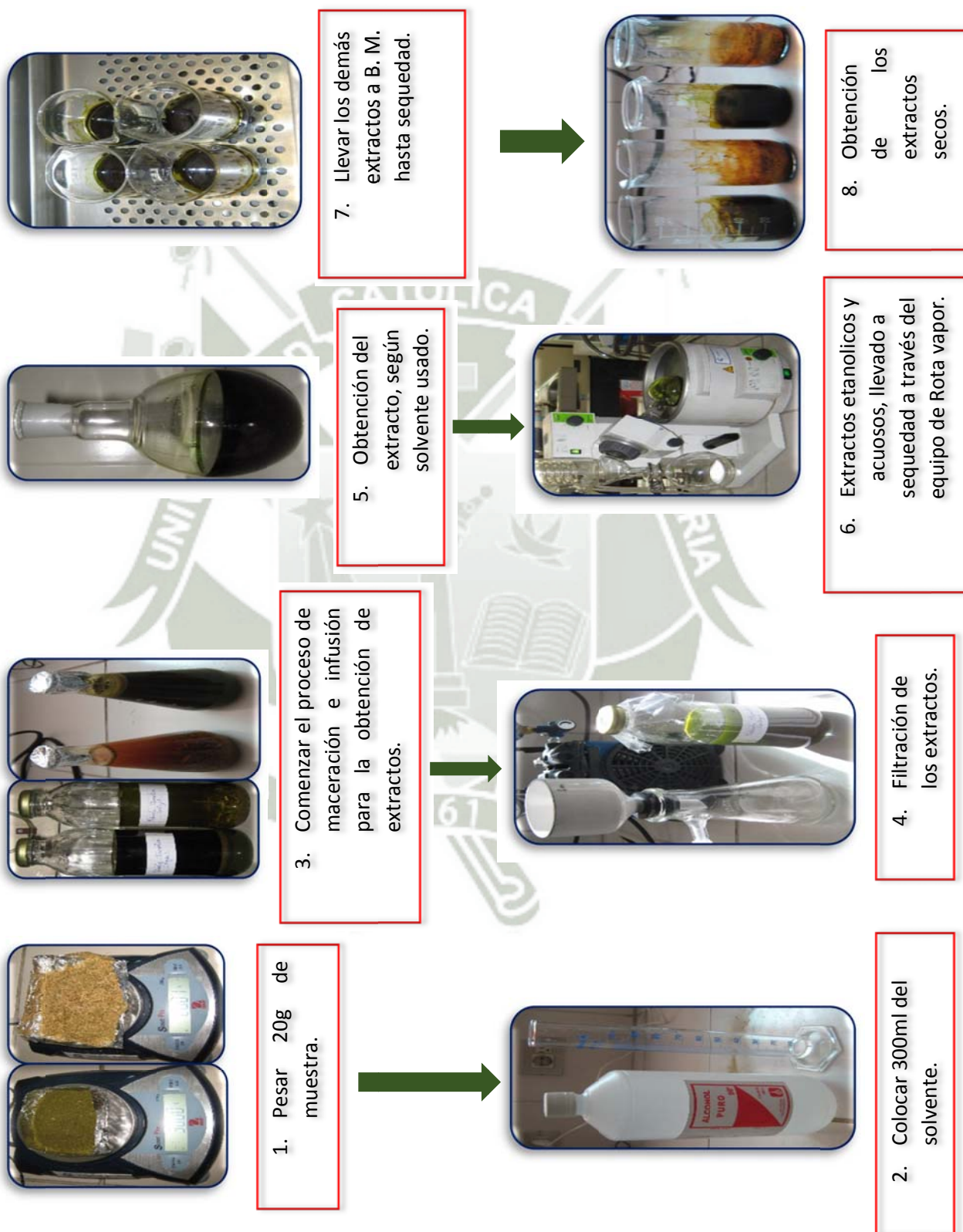
- La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva.
- Los *Staphylococcus* producen catalasa positiva lo cual los distinguen de los *Streptococcus* catalasa negativo.



Resultados de la Prueba de Catalasa.

ANEXO N° 6

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y CORTEZA DE *BIXA*
ORELLANA (ACHIOTE)



ANEXO N° 7: EXTRACTOS ACUOSOS Y ETANOLICOS DE *Bixa orellana* EN *Staphylococcus aureus*

Tabla ANOVA para halos por EXTRACTOS *S. aureus*

Fuente	G L	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Fc	Probabilidad	F teórico
Entre grupos	3	1078,25	359,416667	1078,25	9,11E-11	4,066
Dentro de grupos	8	2,66666667	0,33333333			
Total	11	1080,91667				

Como la Razón-F es mayor a F teórico se rechaza H0 y se acepta la hipótesis H1. Puesto que el valor-Protéus de la Prueba- F es menor que 0.05, hay suficiente evidencia para aceptar la hipótesis alternativa, existe una diferencia significativa entre la media de halos entre los extractos, con un nivel del 95,0% de confianza. Al menos dos medias de los extractos son diferentes en cuanto al tamaño del halo de inhibición.

Pruebas de Múltiple rangos para Halos por EXTRACTOS *S. aureus*

Método: 95,0 porcentaje Tukey LSD

EXTRACTOS <i>S. aureus</i>	Casos	Media (mm)	Grupos Homogéneos
A	3	6	x
B	3	6	x
C	3	20,3	x
D	3	28	x

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0. Por ello, podemos decir que el extracto Etanólico de hojas tiene mayor efecto frente a los demás extractos debido al tamaño del halo de inhibición.

ANEXO N°8:

Resultados de los Halos de Inhibición de las Bacterias en Estudio

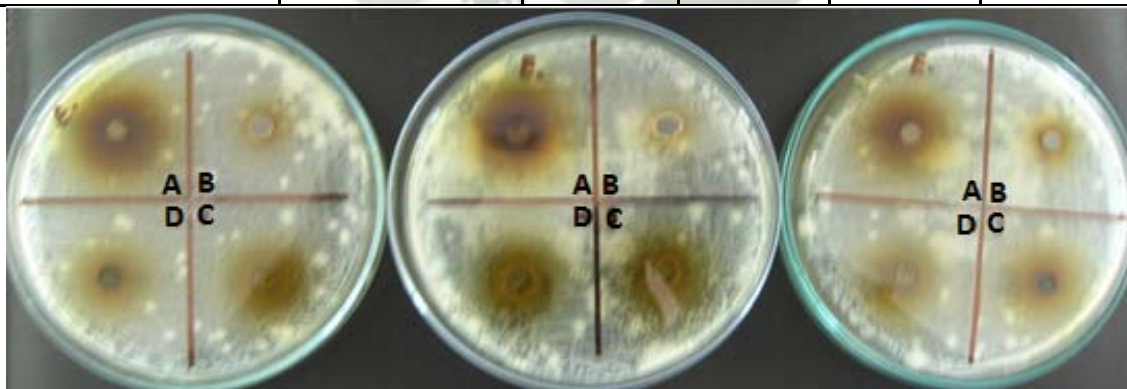
*Tipos de Extracto de **Bixa orellana** (achiote).*

Denominación	Material Vegetal	Disolvente
A	Corteza	Agua
B	Hojas	Agua
C	Corteza	Etanólico
D	Hojas	Etanólico

La concentración inicial del extracto madre fue de 500 mg/ml.

➤ Diámetro de Halos de Inhibición de los Extractos Frente a *Escherichia coli*.

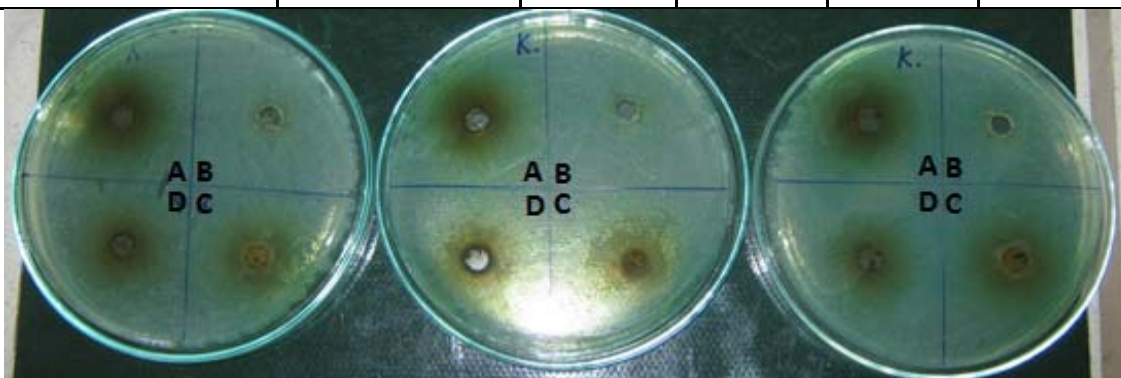
BACTERIAS	REPETICIONES	EXTRACTOS (halos mm)			
		A	B	C	D
<i>Escherichia. coli</i> 1	I	0	0	0	0
<i>Escherichia. coli</i> 2	II	0	0	0	0
<i>Escherichia. coli</i> 3	III	0	0	0	0



Repeticiones de la Inhibición de los extractos frente a *Escherichia coli*.

- Diámetros de Halos de Inhibición de los Extractos Frente a *Klebsiella oxytoca*.

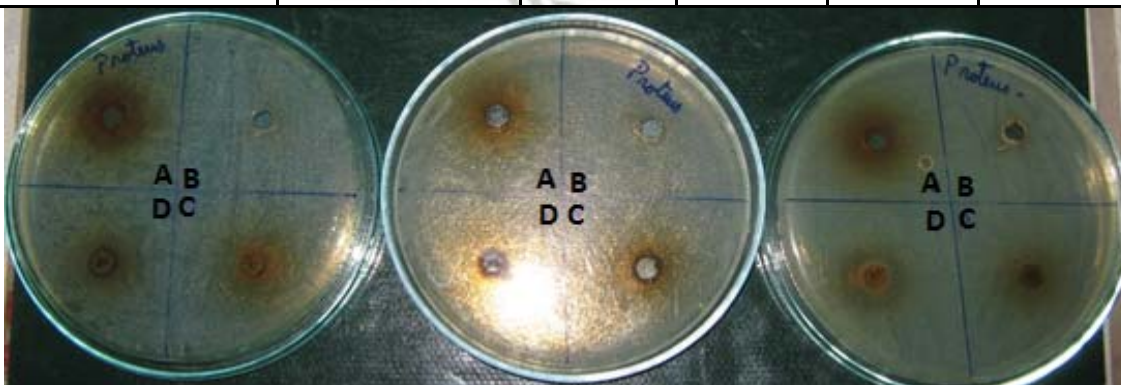
BACTERIAS	REPETICIONES	EXTRACTOS (halos mm)			
		A	B	C	D
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1	I	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> 2	II	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3	III	0	0	0	0



Repeticiones de la Inhibición de los extractos frente a *Klebsiella oxytoca*.

- Diámetro de Halos de Inhibición de los Extractos Frente a *Proteus mirabilis*.

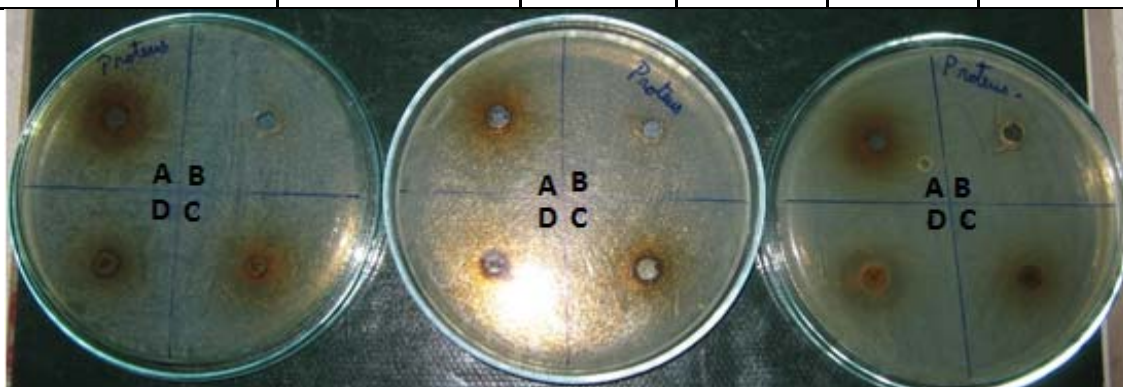
BACTERIAS	REPETICIONES	EXTRACTOS (halos mm)			
		A	B	C	D
<i>Proteus mirabilis</i> 1	I	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> 2	II	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> 3	III	0	0	0	0



Repeticiones de la Inhibición de los extractos frente a *Proteus mirabilis*.

- Diámetro de Halos de Inhibición de los Extractos Frente a *Pseudomona aeruginosa*.

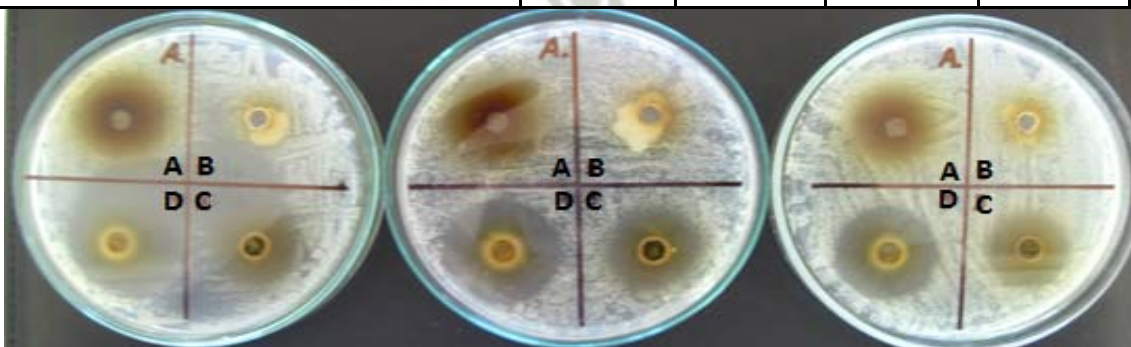
BACTERIAS	REPETICIONES	EXTRACTOS (halos mm)			
		A	B	C	D
Pseudomona 1	I	0	0	0	0
Pseudomona 2	II	0	0	0	0
Pseudomona 3	III	0	0	0	0



Repeticiones de la Inhibición de los extractos frente a *Pseudomona aeruginosa*.

- Diámetro de Halos de Inhibición de los Extractos Frente a *S. aureus*.

BACTERIAS	REPETICIONES	EXTRACTOS (halos mm)			
		A	B	C	D
S. aureus 1	I	0	0	20	27
S. aureus 2	II	0	0	20	29
S. aureus 3	III	0	0	21	28
Promedio		0	0	20,3	28



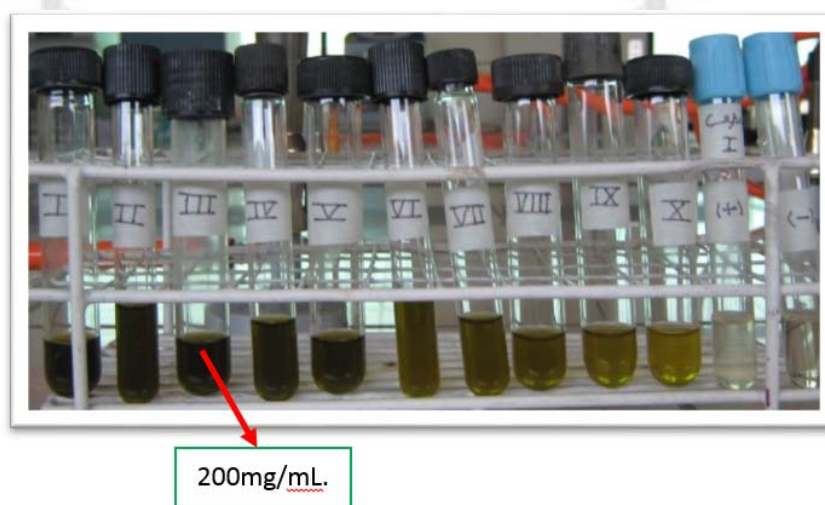
Repeticiones de la Inhibición de los extractos frente a *Staphylococcus aureus*.

ANEXO N° 9:

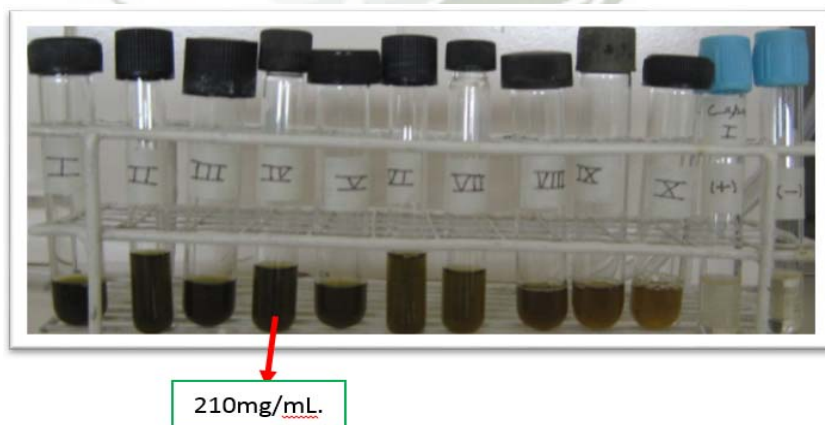
Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Staphylococcus aureus Cepa I

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



Punto de ruptura para la cepa I de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.



Punto de ruptura para la cepa I de *Staphylococcus aureus* fue de 210mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa II

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



200mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa II de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.

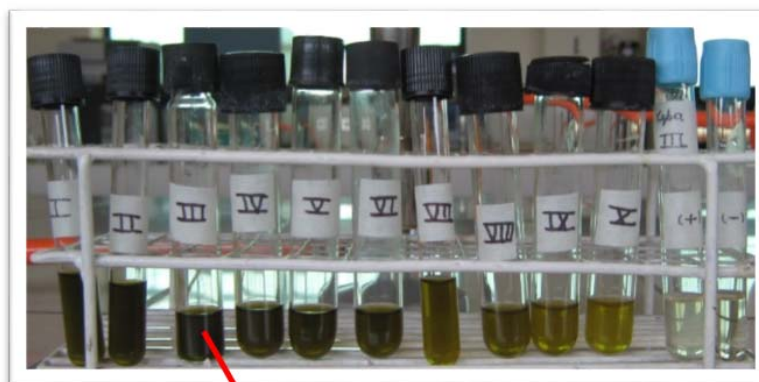


210mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa II de *Staphylococcus aureus* fue de 210mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa III

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



200mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa III de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.

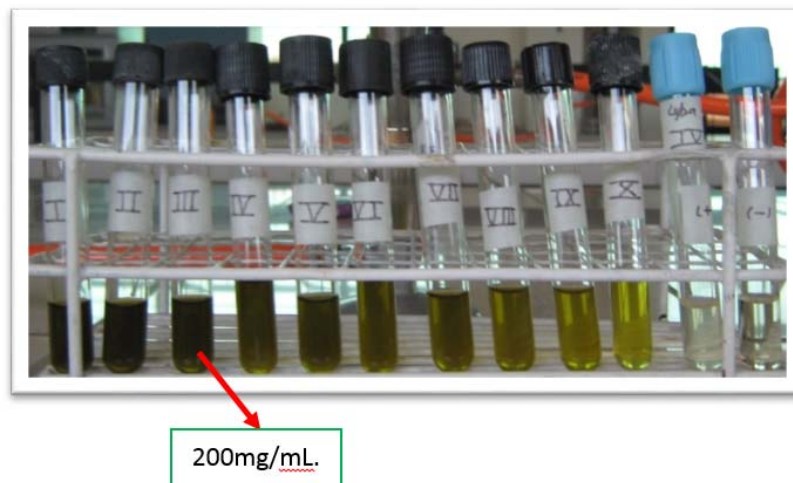


240mg/mL.

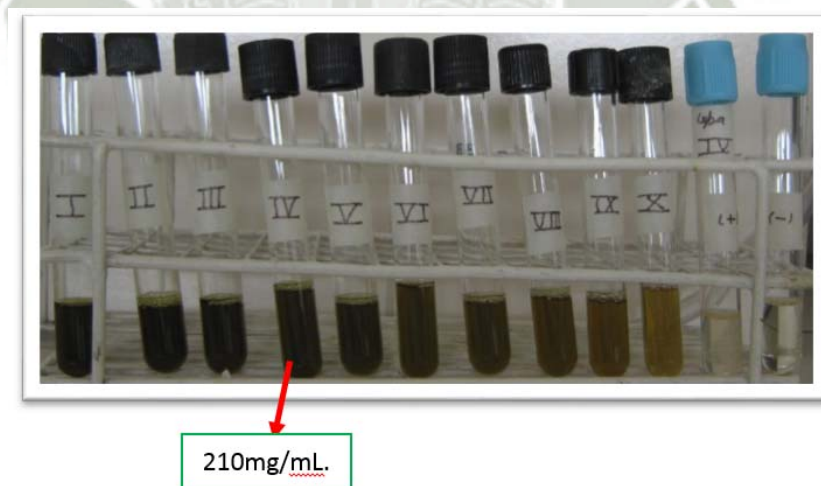
Punto de ruptura para la cepa III de *Staphylococcus aureus* fue de 240mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa IV

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



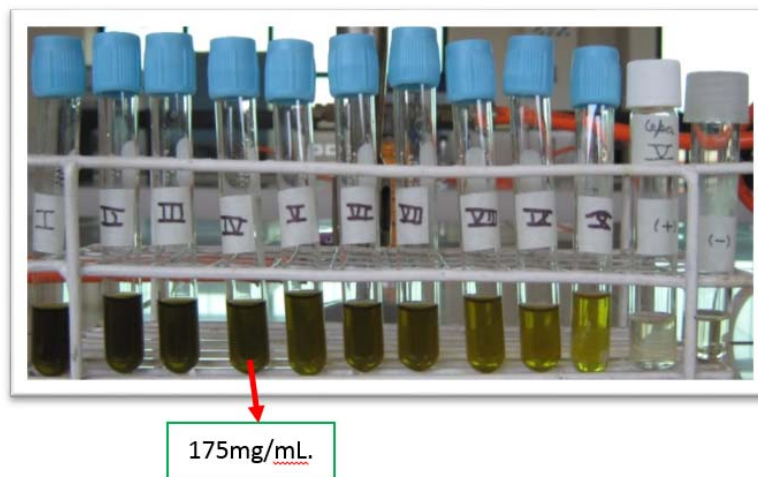
Punto de ruptura para la cepa IV de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.



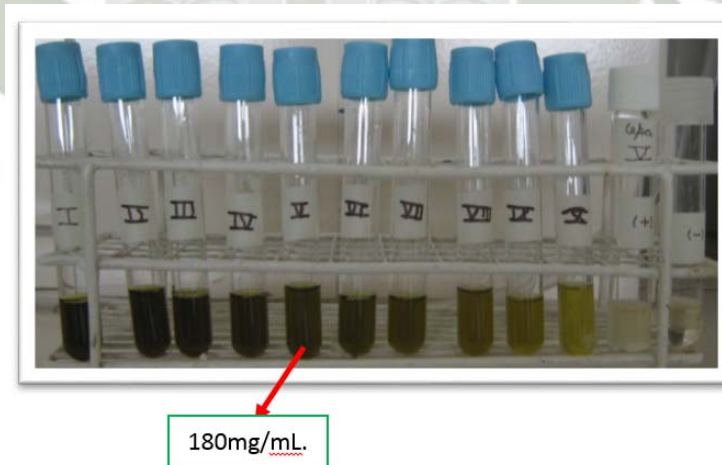
Punto de ruptura para la cepa IV de *Staphylococcus aureus* fue de 210mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa V

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



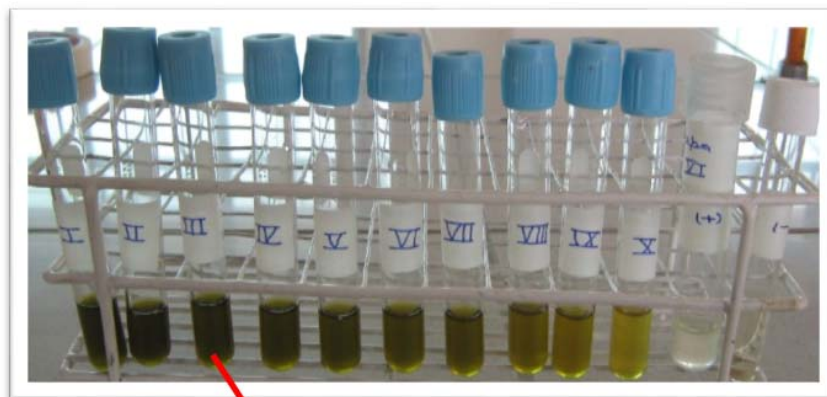
Punto de ruptura para la cepa V de *Staphylococcus aureus* fue de 175mg/mL para el extracto etanólico de hojas.



Punto de ruptura para la cepa V de *Staphylococcus aureus* fue de 180mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa VI

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



200mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa VI de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.

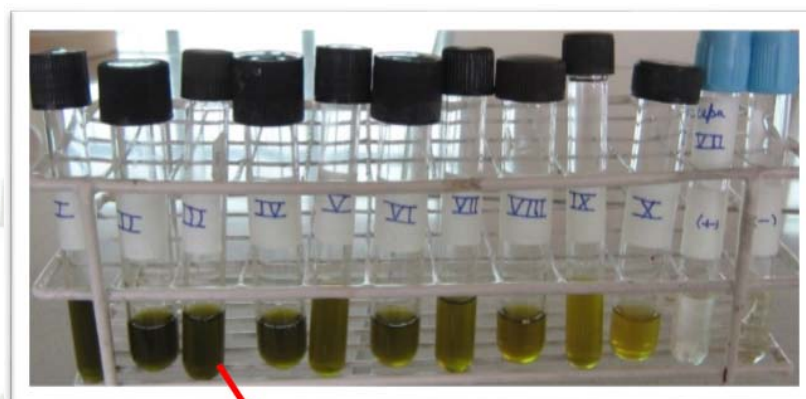


240mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa VI de *Staphylococcus aureus* fue de 240mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa VII

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



200mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa VII de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.



210mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa VII de *Staphylococcus aureus* fue de 210mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa VIII

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



125mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa VIII de *Staphylococcus aureus* fue de 125mg/mL para el extracto etanólico de hojas.



150mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa VIII de *Staphylococcus aureus* fue de 150mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa IX

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



200mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa IX de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas.

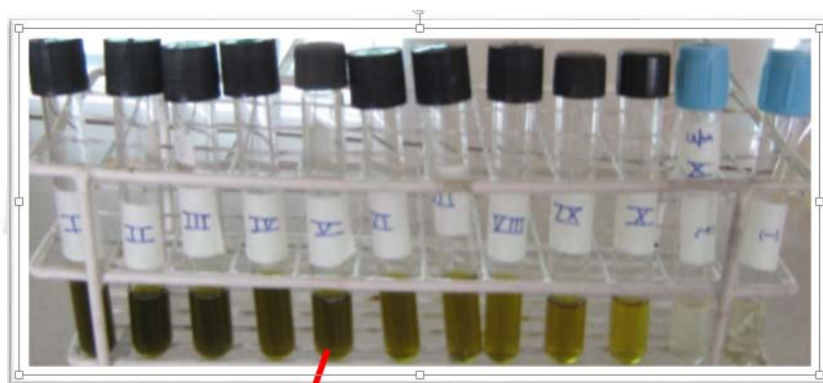


240mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa IX de *Staphylococcus aureus* fue de 240mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

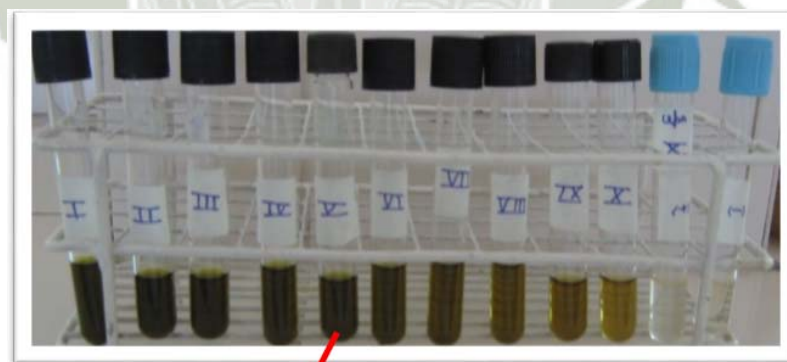
Staphylococcus aureus Cepa X

Luego de la preparación de la batería de tubos con caldo peptonado se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.



150mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa X de *Staphylococcus aureus* fue de 150mg/mL para el extracto etanólico de hojas.



180mg/mL.

Punto de ruptura para la cepa X de *Staphylococcus aureus* fue de 180mg/mL para el extracto etanólico de corteza.

Resultados de obtenidos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas frente a 10 muestras clínicas de *Staphylococcus aureus* procedentes del EsSALUD.

Muestras Clínicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(+)	(-)
Concentración Final (mg/mL)	250	225	200	175	150	125	100	75	50	25	--	--
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa I	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa II	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa III	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa IV	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				175								
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa VI	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa VII	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa VIII	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CIM						125						
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa IX	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			200									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					150							

-: No creció

+: Creció

Resultados de obtenidos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de corteza frente a frente a 10 muestras clínicas de *Staphylococcus aureus* procedentes del EsSALUD.

Muestras Clínicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(+)	(-)
Concentración Final (mg/mL)	300	270	240	210	180	150	120	90	60	30	-	-
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa I	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa II	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa III	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			240									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa IV	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa V	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					180							
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa VI	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			240									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa VII	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				210								
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa VIII	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CIM						150						
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa IX	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			240									
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					180							

:- No creció

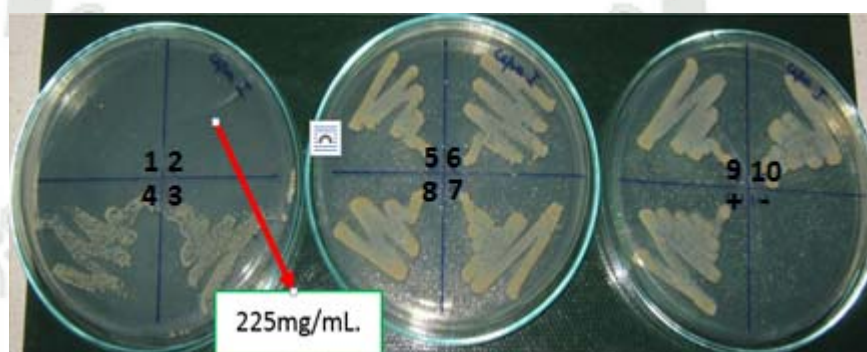
+: Creció

ANEXO N° 10:

Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CBM)

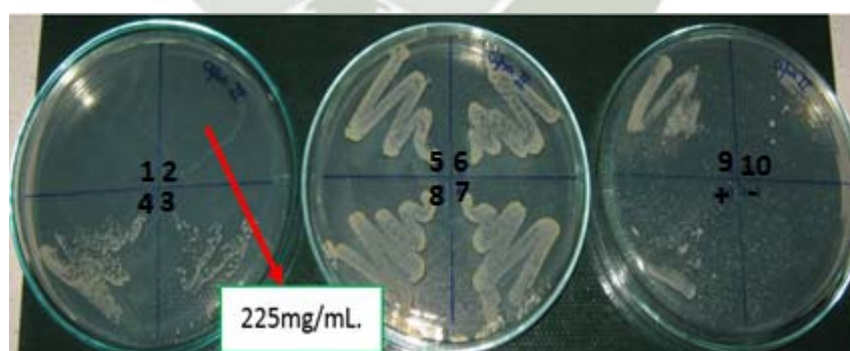
Luego de sembrar toda la batería de tubos en las placas que contenían Agar Muller Hinton se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.

Staphylococcus aureus Cepa I



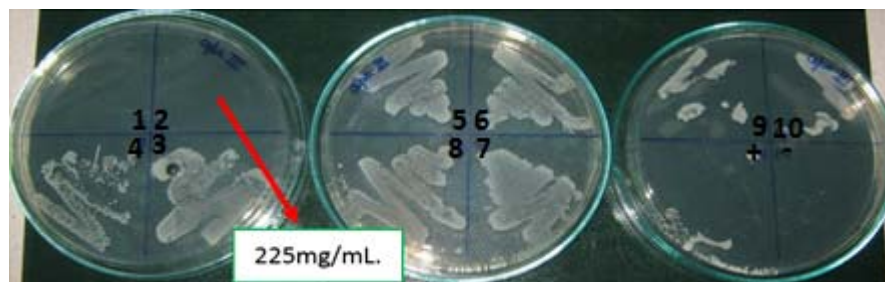
Concentración Bactericida Mínima de la cepa I de *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa II



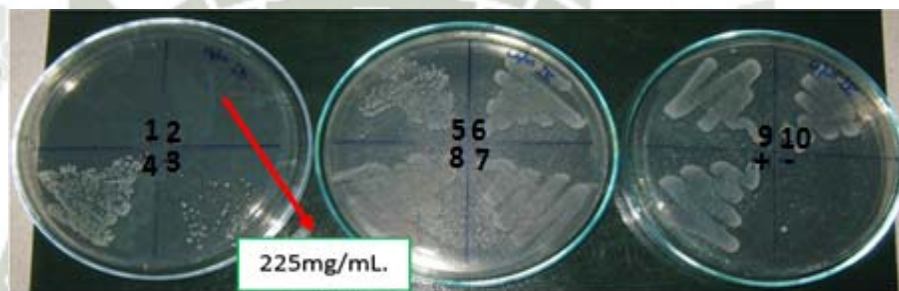
Concentración Bactericida Mínima de la cepa II de *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa III



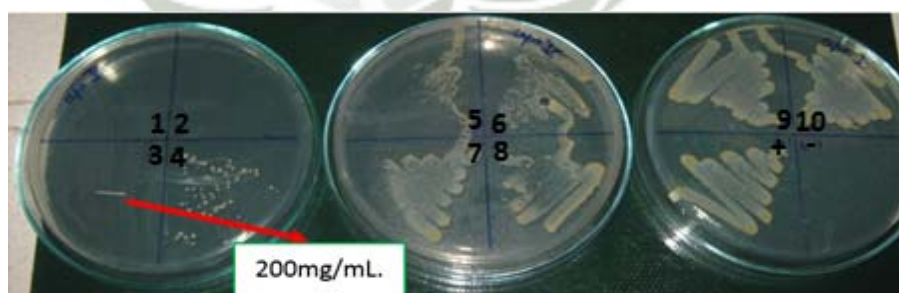
Concentración Bactericida Mínima de la cepa III de *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa IV



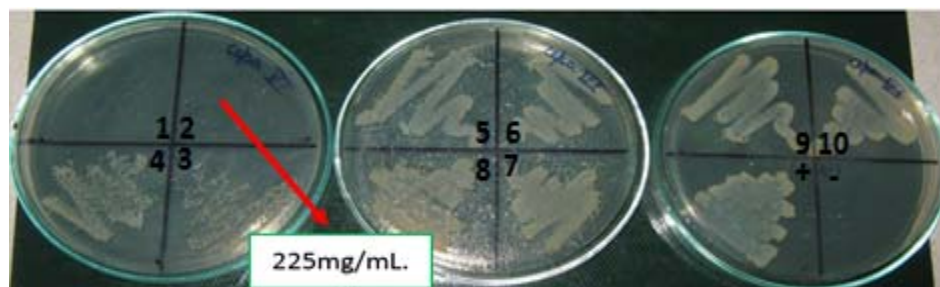
Concentración Bactericida Mínima de la cepa IV de *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa V



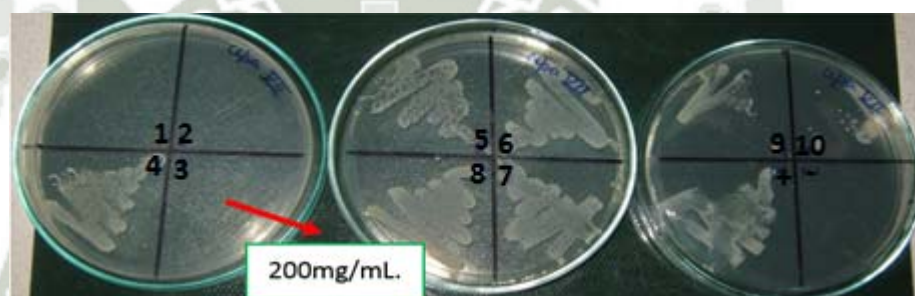
Concentración Bactericida Mínima de la cepa V de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa VI



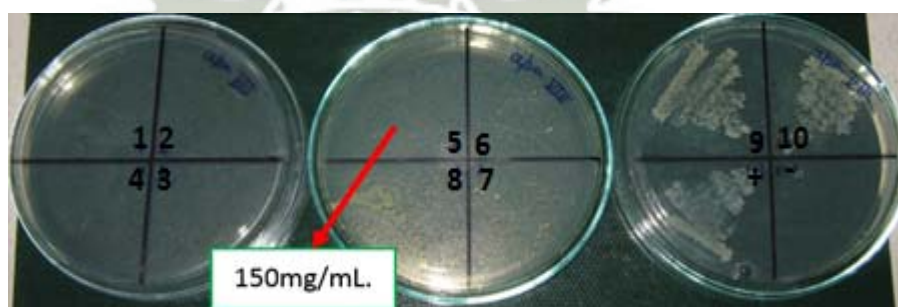
Concentración Bactericida Mínima de la cepa VI de *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa VII



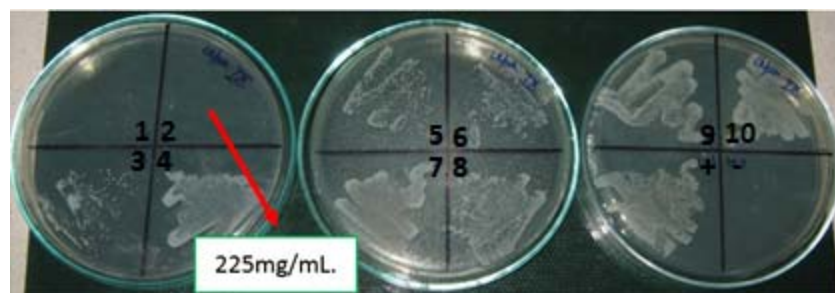
Concentración Bactericida Mínima de la cepa VII de *Staphylococcus aureus* fue de 200mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa VIII



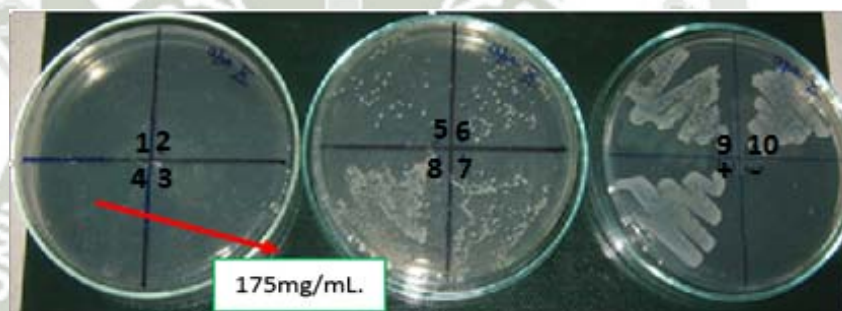
Concentración Bactericida Mínima de la cepa VIII de *Staphylococcus aureus* fue de 150mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa IX



Concentración Bactericida Mínima de la cepa IX de *Staphylococcus aureus* fue de 225mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

Staphylococcus aureus Cepa X



Concentración Bactericida Mínima de la cepa X de *Staphylococcus aureus* fue de 175mg/mL para el extracto etanólico de hojas del mismo modo se realizó para el extracto etanólico de corteza.

ANEXO N° 11: MARCHA FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS EN ESTUDIO

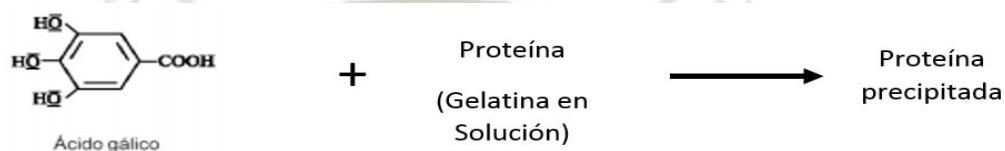
a) Análisis de Taninos:

Fundamento

Los taninos tienen la propiedad de precipitar las proteínas en solución.

Reacción con Gelatina

Los taninos se unen a las proteínas en este caso gelatina originando desde opalescencia blanca hasta precipitado.



Preparación del Reactivo

Reactivo de gelatina: 1 g de gelatina pura se hidrata con 100 ml de agua.

Interpretación

La reacción es positiva al dar un turbidez o precipitado de color blanco al extracto.

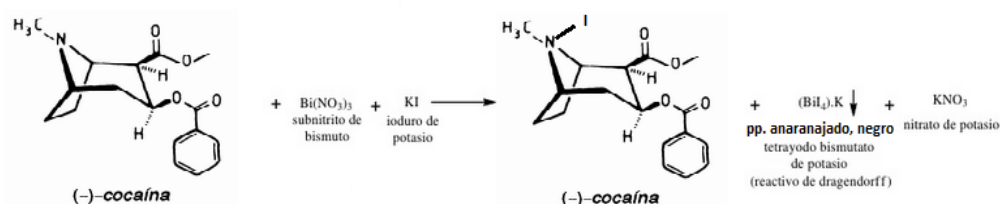


b) Análisis de Alcaloides:

Fundamento

Se basa en la reacción de alcaloides en medio básico para dar lugar a la formación de sales insolubles.

Reacción con Dragendorff



Preparación del Reactivo

Reactivo de Dragendorff: en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20 ml de ácido nítrico. En otro matraz colocar 27,2 g de yoduro de potasio con 50 ml de agua. Mezclar las dos soluciones y dejarlas en reposo durante 24 horas. Decantar la solución y aforar con agua a 100 ml.

Interpretación

La evidencia de contener alcaloides en los extractos es la generación de precipitados negro y naranja lo cual indica reacción positiva.

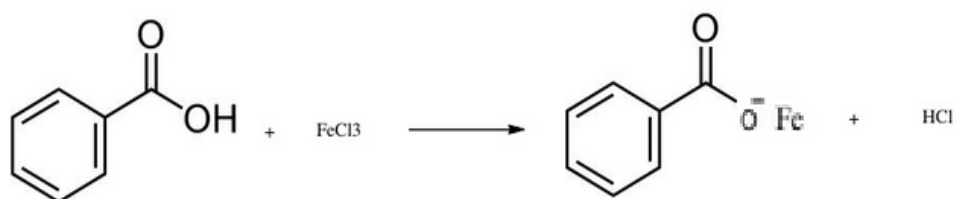


c) Análisis de Compuestos Fenólicos

Fundamento

Los fenoles al ser mezclados con sales férricas, reaccionan dando lugar a la formación de tanato férrico.

Reacción con Cloruro Férrico

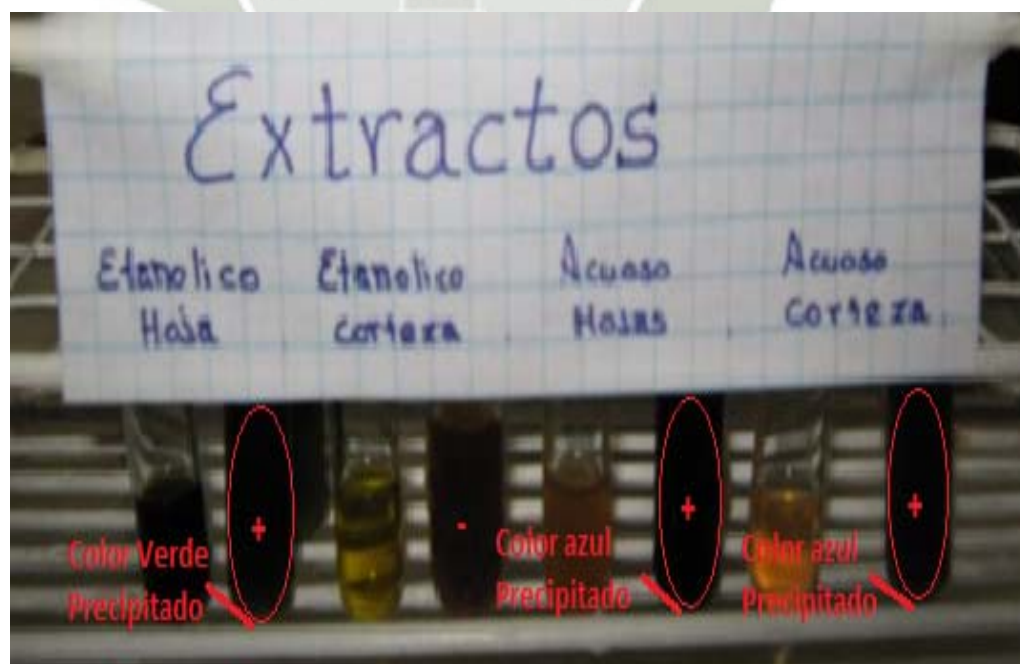


Preparación del Reactivo

Reactivo de Cloruro Férrico: Disolver 1.25 g de cloruro férrico en 25 ml de agua y aforar a 50 ml con alcohol metílico.

Interpretación

La reacción da lugar a coloraciones o precipitados de color verde y azul intenso.



d) Análisis de Saponinas:

Fundamento

Se basa en el poder tensioactivo disminuyendo la tensión superficial. Por lo tanto, al agitar sus soluciones, se formara una espuma abundante y relativamente estable se considera positiva la reacción.

Preparación del Reactivo

Reactivo: Agua caliente.

Interpretación

La reacción positiva se da por la formación de espuma sobrenadante.



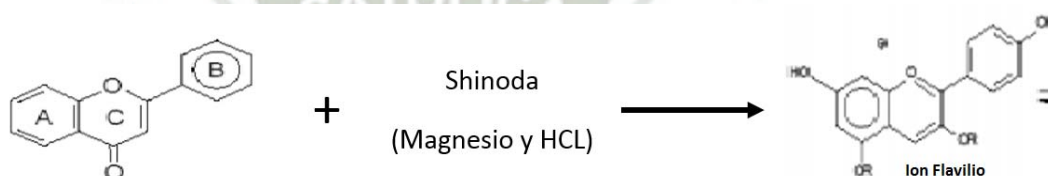
e) Análisis de Flavonoides

Fundamento

Se basa en la reducción del anillo quinólico para dar lugar a la formación de grupo OH con aumento de dobles enlaces y por consiguiente dar origen a coloración.

Reacción de Shinoda

El magnesio reacciona con HCL cc. El hidrogeno generado produce por reducción el ion flavilio (color rojo escarlata).



Preparación del Reactivo

Reactivos: Viruta de magnesio y Ácido clorhídrico concentrado.

Interpretación

La reacción positiva se evidencia por la generación de colores que van desde el rosado muy débil a rojo escarlata y naranja claro.



ANEXO N° 12:

PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE MICROROGANISMOS EN ESTUDIO

a) *Escherichia coli*

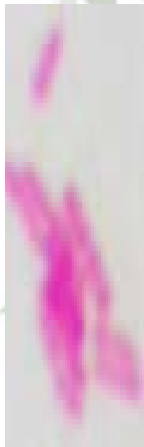
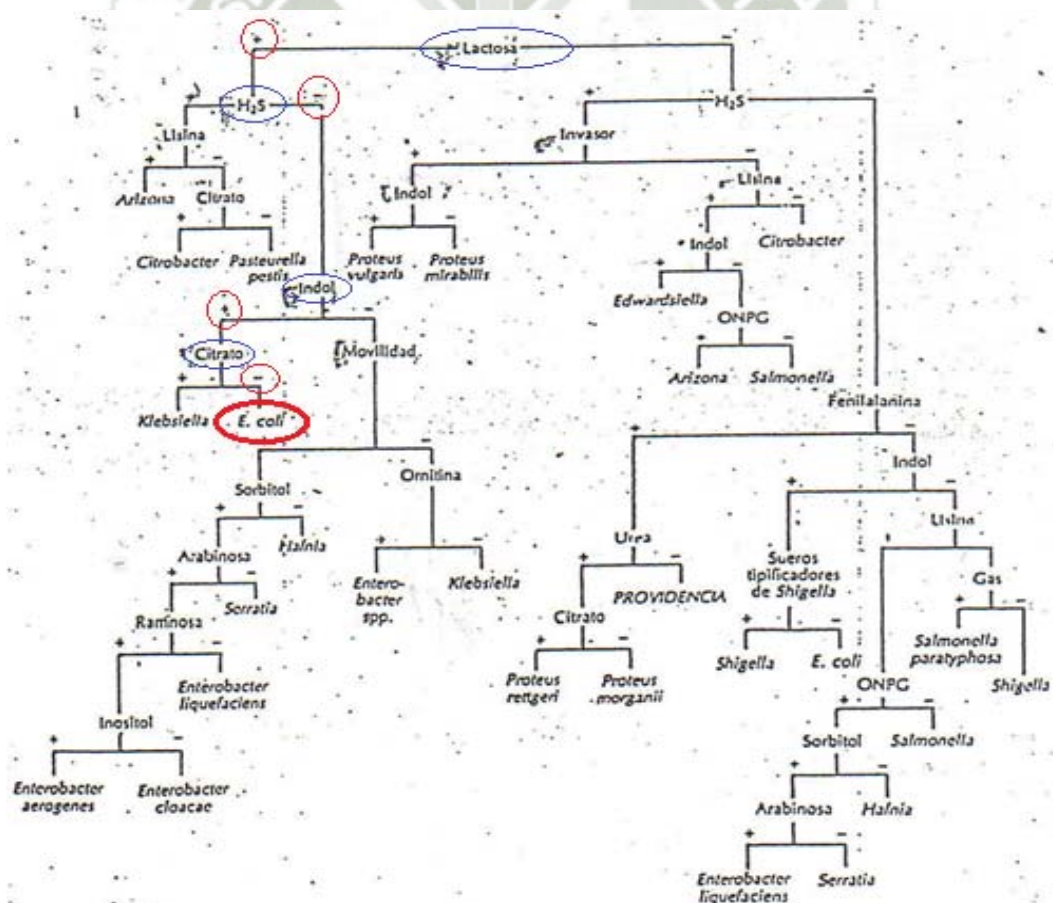
<u>Pruebas de Identificación</u>				
Tinción de Gram	Medio TSI	Medio SIM	Medio Citrato de Simmons	Medio Lisina Hierro (LIA)
				
Bacilos Gram -	A/A + -	- + +	-	K/A -

Tabla de Identificación de las Enterobacterias

GRUPO I HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVOS						GRUPO II HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVOS					
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)						ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
K/A	-	± δ +	K/K	-	Salmonella Typhi	K/A	-	-	K/A	- δ +	Shigella
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)						A/A δ K/A	-	-	K/K δ K/N	+	Escherichia
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	A/A δ K/A	-	-	K/A	- δ +	Enterobacter (*)
K/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Salmonella	A/A	-	-	K/K	-	Serratia
K/A δ A/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Arizona	K/A	-	-	R/A	+	Proteus
K/A δ A/A	2 +	- 4 +	K/A	-	Citrobacter	K/A	-	-	R/A	+	Providencia
K/A δ A/A	2 +	± +	R/A	- δ +	Proteus	A/A	-	-	A/A δ K/A	- δ +	Yersinia
K/A	2 +	4 +	K/K	+	Edwardsiella	AEROGENICOS (GAS POSITIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
A/A δ K/A	2 +	-	K/K δ K/A	+	Escherichia	A/A	4 +	-	K/K	- δ +	Klebsiella
A/A	4 +	-	K/K	- δ +	Klebsiella	A/A δ K/A	± +	-	K/K δ K/A	-	Enterobacter
A/A δ K/A	± +	-	K/K δ K/A	-	Enterobacter	K/A δ A/A	2 +	-	K/K	-	Serratia
K/A δ A/A	2 +	-	K/K	-	Serratia	K/A	(+)	-	K/A δ R/A	+	Proteus (*)
K/A	(+)	-	K/A δ R/A	+	Proteus (*)	K/A	+	-	K/A δ A/A	-	Paratyphi A (*)
K/A	+	-	K/A δ A/A	-	Paratyphi A (*)						

K = alcalino
A = ácido
R = rojo
N = neutro
- = enteropatógenos importantes.
(*) Ver texto

Tabla de Identificación de las Enterobacterias Mediante Diagrama de Ramificación



Mediante los resultados de las pruebas bioquímicas y el uso de las tablas, se confirmó la presencia de *Escherichia coli* en la muestra en estudio.

b) *Klebsiella oxytoca*

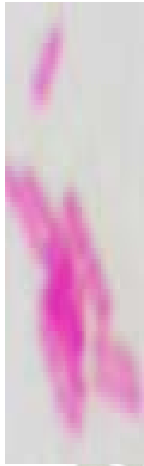
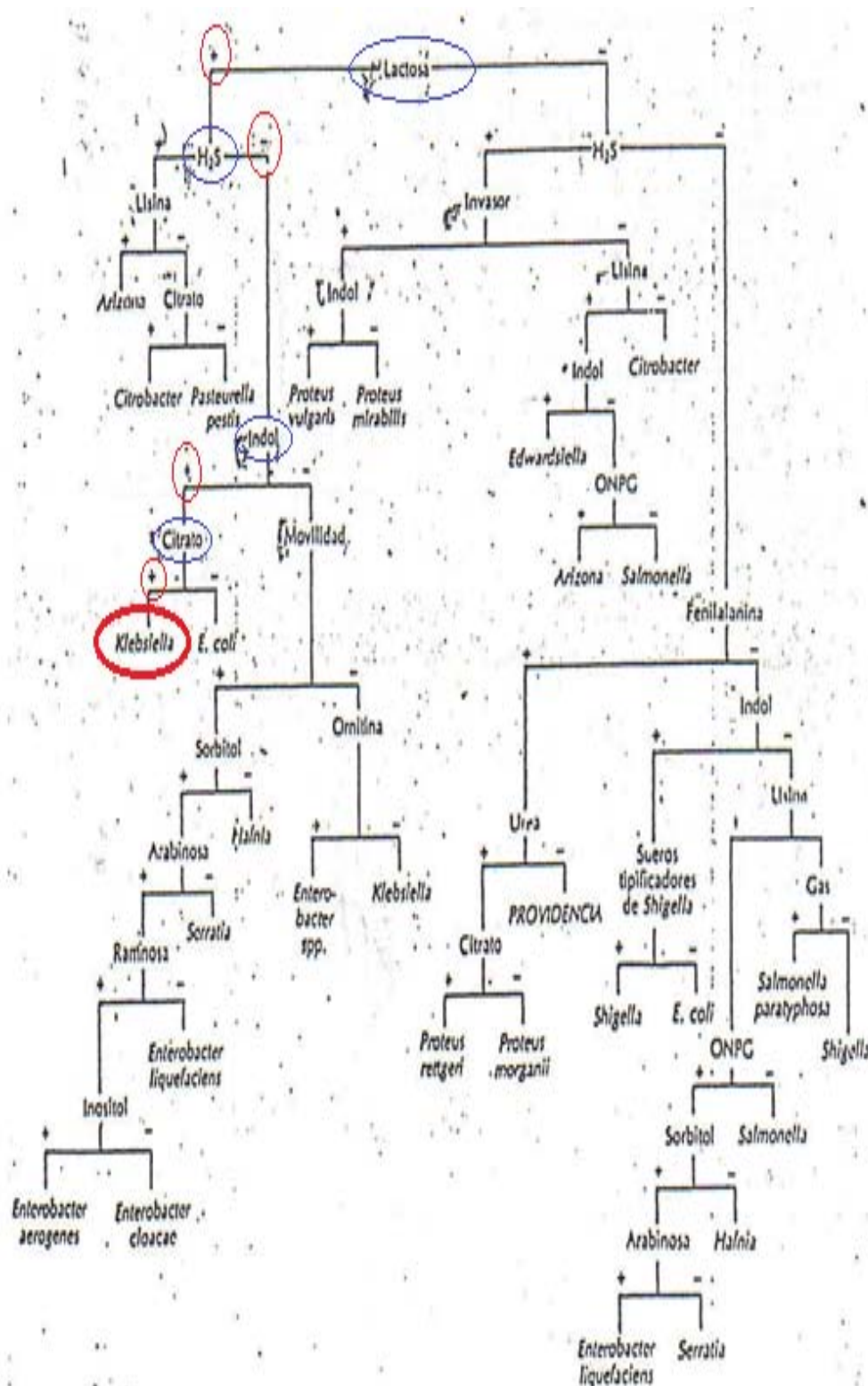
<u>Pruebas de Identificación</u>				
Tinción de Gram	Medio TSI	Medio SIM	Medio Citrato de Simmons	Medio Lisina Hierro (LIA)
				
Bacilos Gram -	A/A + -	- + -	+	K/K -

Tabla de Identificación de las Enterobacterias

GRUPO I HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVOS						GRUPO II HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVOS					
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)						ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
K/A	-	± ó +	K/K	-	Salmonella Typhi	K/A	-	-	K/A	- ó +	Shigella
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)						A/A ó K/A	-	-	K/K ó K/N	+	Escherichia
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	A/A ó K/A	-	-	K/A	- ó +	Enterobacter (*)
K/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Salmonella	A/A	-	-	K/K	-	Serratia
K/A ó A/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Arizona	K/A	-	-	R/A	+	Proteus
K/A ó A/A	2 +	- 4 +	K/A	-	Citrobacter	K/A	-	-	R/A	+	Providencia
K/A ó A/A	2 +	± +	R/A	- ó +	Proteus	A/A	-	-	A/A ó K/A	- ó +	Yersinia
K/A	2 +	4 +	K/K	+	Edwardsiella	AEROGENICOS (GAS POSITIVO)					
						TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
						A/A ó K/A	2 +	-	K/K ó K/A	+	Escherichia
						A/A	4 +	-	K/K	- ó +	Klebsiella
						A/A ó K/A	4 +	-	K/K ó K/A	-	Enterobacter
						K/A ó A/A	2 +	-	K/K	-	Serratia
						K/A	(+)	-	K/A ó R/A	+	Proteus (*)
						K/A	+	-	K/A ó A/A	-	Paratyphi A (*)

K = alcalino
 A = ácido
 R = rojo
 N = neutro
 (*) enteropatógenos importantes.
 (*) Ver texto

Tabla de Identificación de las Enterobacterias Mediante Diagrama de
Ramificación



Matriz en Damero para la Identificación de Enterobacterias por Especies

DIFFERENTIATION OF ENTEROBACTERIACEAE BY BIOCHEMICAL TESTS

	Enterobacter			Klebsiella			Serratia			Proteus		Providencia		Yersinia	
	Enterobacter	diversus	pneumoniae	oxytoca	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium	typhimurium
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmons' Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen Sulfide (TSI)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ECN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin (22°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine Decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine Dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidative Decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine Deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutanolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 (meta) Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Each reaction:
 + = 90% or more positive within 48 h.
 V = less than 90% positive within 48 h.
 - = no reaction.
 (N) = 90% or more positive between 2 and 7 days.
 (V) = more than 50% positive within 48 h.
 (N) = more than 50% positive in 2 to 7 days.
 This chart is designed to be a brief guide to the reactions of the more clinically important species of Enterobacteriaceae. Only 26 of the 100 or more species used to distinguish between species are listed. Specific biochemistries (e.g., urease, gelatinase, etc.) are not shown, for a more comprehensive reference the reader should consult special publications.

Mediante los resultados de las pruebas bioquímicas y el uso de las tablas, se confirmó la presencia de Klebsiella Oxytoca en la muestra en estudio.

c) *Proteus mirabilis*

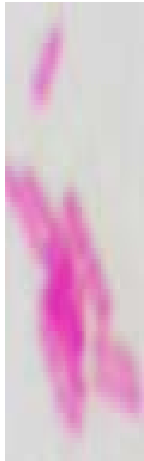
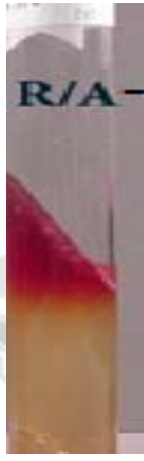
<u>Pruebas de Identificación</u>				
Tinción de Gram	Medio TSI	Medio SIM	Medio Citrato de Simmons	Medio Lisina Hierro (LIA)
				
Bacilos Gram -	K/A ++	+ - +	+	R/A -

Tabla de Identificación de las Enterobacterias

GRUPO I HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVOS						GRUPO II HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVOS					
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)						ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
K/A	-	± ó +	K/K	-	Salmonella Typhi	K/A	-	-	K/A	- ó +	Shigella
K/A ó A/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Arizona	A/A ó K/A	-	-	K/K ó K/N	+	Escherichia
K/A ó A/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Citrobacter	A/A ó K/A	-	-	K/A	- ó +	Enterobacter (*)
K/A ó A/A	2 +	±	R/A	- ó +	Proteus	A/A	-	-	K/K	-	Serratia
K/A	2 +	4 +	K/K	+	Edwardsiella	K/A	-	-	R/A	+	Proteus
						K/A	-	-	R/A	+	Providencia
						A/A	-	-	A/A ó K/A	- ó +	Yersinia
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)						AEROGENICOS (GAS POSITIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
A/A ó K/A	2 +	-	K/K ó K/A	+	Escherichia	A/A	4 +	-	K/K	- ó +	Klebsiella
A/A ó K/A	4 +	-	K/K ó K/A	-	Enterobacter	A/A ó K/A	4 +	-	K/K	-	Serratia
K/A	[+]	-	K/A ó R/A	+	Proteus (*)	K/A	+	-	K/A ó A/A	-	Paratyphi A (*)

K = alcalino

A = ácido

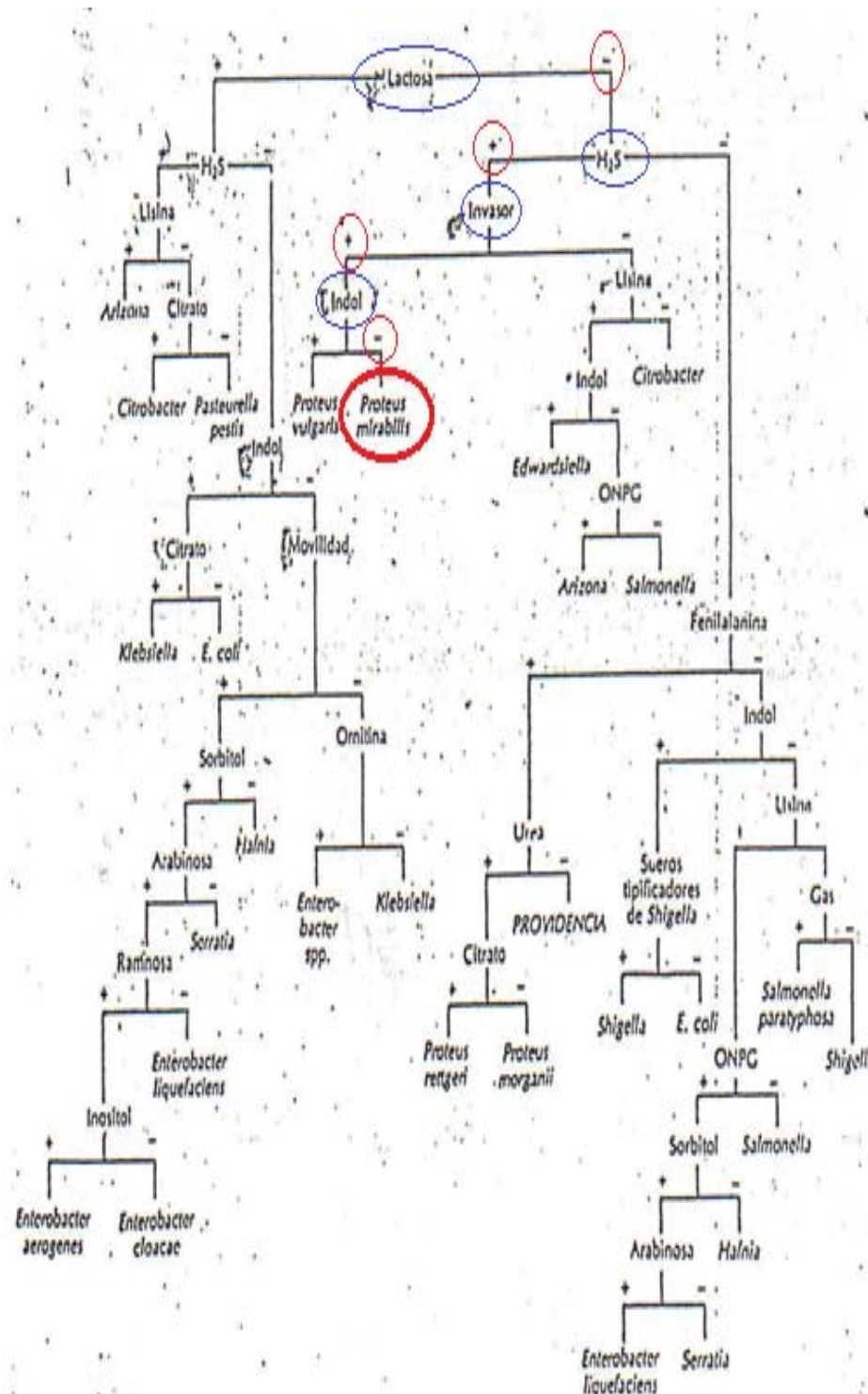
R = rojo

N = neutro

(*) enteropatógenos importantes

(*) Ver texto

Tabla de Identificación de las Enterobacterias Mediante Diagrama de
Ramificación

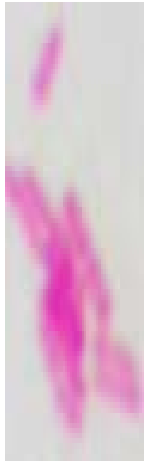


es académicos e investigativos

con fines académicos e investigativos

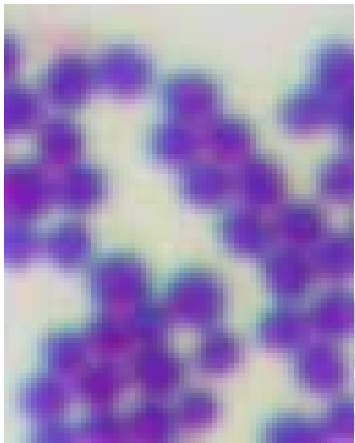
a con fines académicos e investigativos

d) *Pseudomona aeruginosa*

<u>Pruebas de Identificación</u>				
Tinción de Gram	Medio TSI	Medio SIM	Medio Citrato de Simmons	Medio Lisina Hierro (LIA)
				
Bacilos Gram -	K/K - -	- + +	+	K/K -

Mediante los resultados de las pruebas y de acuerdo a bibliografía, se confirmó la presencia de *Pseudomona aeruginosa* en la muestra en estudio.

e) *Staphylococcus aureus*

Tinción de Gram	Catalasa	Manitol Salado
		
Cocos Gram +	+	+

Mediante los resultados de las pruebas y de acuerdo a bibliografía, se confirmó la presencia de *Staphylococcus aureus* en la muestra en estudio.

ANEXO N° 13:

Proyección de la Producción de Hojas y Corteza de Bixa orellana (Achiote)

En la actualidad las hojas y corteza de las ramas de Bixa orellana (Achiote) no son utilizadas adecuadamente ya que en el proceso de poda quedan en el campo como parte de abono. Mediante este estudio se da un valor agregado a dichos recursos ya que podrán ser utilizados en la producción de extractos etanólicos secos con propiedad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* causante de infecciones de la piel.

Rendimiento de Hojas y Corteza de Bixa orellana (Achiote)

Materia Fresca	Humedad	Materia Seca
1 Kg. de Hojas.	40%	600g. de Hojas.
1 Kg. de Corteza.	50%	500g. de Corteza.

Producción de Hojas y Corteza por Árbol de Bixa orellana (Achiote)

En vista de que el achiote forma su producción en las yemas terminales es esencial el manejo de podas por lo cual se recomienda realizar dos tipos de poda (Poda de Resepa y Poda de Mantenimiento) los mismos que se realizan antes y después de la floración y maduración del fruto respectivamente.

Tipos de Poda	Hojas		Corteza	
	Frescas	Secas	Frescas	Secas
Poda de Resepa	8 Kg.	4.800 Kg.	----	----
2 Podas de Mantenimiento	20 Kg.	12.00 Kg.	10 Kg.	5.000 Kg.
Producción de un Árbol por Año	28 Kg.	16.800Kg.	10 Kg.	5.000 Kg.

Los datos recopilados en la tabla anterior fueron proporcionados por personas dedicadas a la poda de árboles frutas, dado que en la actualidad no hay datos del rendimiento de las podas de árbol de Bixa orellana (achiote). Asumiendo que por el tipo de árbol este es el rendimiento.

La producción de hojas secas es de 16.800 Kg. y de corteza seca es de 5.000 Kg. de los cuales se podrá obtener los Extractos Etanólicos de Hojas y Corteza Secos.

Rendimiento de los Extractos Etanólicos de Hojas y Corteza de Bixa orellana (Achiote) de un árbol por Año

Extracto Etanólico de Hojas Seco		Extracto Etanólico de Corteza Seco	
20 g. de Hojas Secas.	3 g. Extracto Etanólico Seco.	20 g. de Corteza Secas.	0.8 g. Extracto Etanólico Seco
16800 g. de Hojas Secas por Árbol.	2.520 Kg. de Extracto Seco.	5000 g. de Corteza Secas por Árbol.	200 g. de Extracto Seco.

Estos son los resultados obtenidos en el procesamiento de hojas y corteza recolectadas de un árbol por año 2.520 Kg de Extracto Etanólico de Hojas secos y 200 g. de Extracto Etanólico de Corteza.