

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y
ANTIFÚNGICA “IN VITRO” DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE *Cestrum
auriculatum* L'HÉR. “HIERBA SANTA” EN BACTERIAS PATÓGENAS
GRAMPOSITIVAS, GRAMNEGATIVAS Y HONGOS 2016**

Tesis presentada por los bachilleres:

CRUZ YMATA LIZBETH PATRICIA

ZAPATA MIRANDA EULOGIO

Para obtener el título profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA

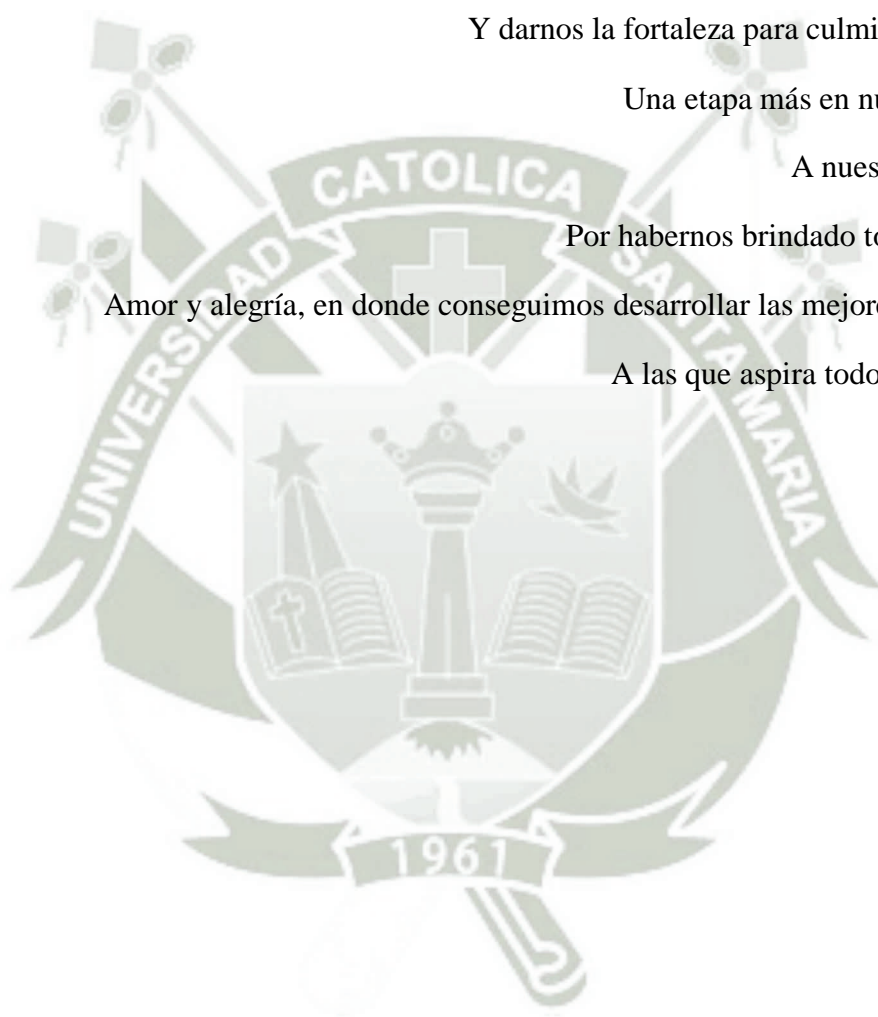
Mgter. JULITZA PAREDES FUENTES

AREQUIPA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

Principalmente a Dios por darnos la vida,
Guiar cada uno de nuestros pasos
Y darnos la fortaleza para culminar con éxito
Una etapa más en nuestras vidas.
A nuestras familias
Por habernos brindado todo el apoyo,
Amor y alegría, en donde conseguimos desarrollar las mejores cualidades
A las que aspira todo ser humano.



AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen por darnos esos padres tan maravillosos que son la razón de nuestro vivir y permitimos rodearnos de personas muy buenas.”

“Agradecemos de manera muy especial a nuestra asesora Mg. Julitza Paredes Fuentes por el apoyo incondicional que tuvo para poder realizar esta investigación en especial por su voluntad y mucha paciencia”

“A mis padres, Sara y Honorio, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación y me han apoyado en cada momento, en cada caída y en cada nuevo reto en mi vida.”

“A mi hermano Paul por su paciencia y sobre todo su apoyo emocional a lo largo de mi vida y en toda dificultad que tuve.”

EULOGIO ZAPATA MIRANDA

“A mis padres, Leonarda y Santos por su esfuerzo y sacrificio diario por que gracias a ellos he sabido seguir adelante y superar los obstáculos de mi vida”

“A mis hermanos gracias por el apoyo, cariño y por estar en los momentos más importantes de mi vida. Este logro también es de ustedes.”

“A mi esposo por sus palabras, su confianza y por su amor, brindándome el tiempo necesario para realizarme profesionalmente y a mi hijo por ser la razón de que me levante cada día para esforzarme por el presente y el mañana, eres mi principal motivación.”



LIZBETH CRUZ YMATA

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO I:	11
MARCO TEÓRICO.....	11
1.1. HIERBA SANTA (<i>Cestrum auriculatum</i> L'Hér)	12
• Generalidades	12
• Características morfológicas y geográficas.....	13
1.1.1. Descripción de género	13
1.1.2. Descripción de las especie	13
• Propiedades y usos	15
• Composición Química	16
• Distribución geográfica	17
• Historia.....	17
1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	17
• Extractos vegetales	18
• Tipos de extracción	18
• Cromatografía en capa fina.....	20
• Radicales libres	21
1.3. ANTIOXIDANTES.....	23
1.3.1. Clasificación.....	23
1.3.2. Mecanismo de acción	24
1.3.3. Capacidad antioxidante	25
1.3.4. Compuestos fenólicos.....	25
1.4. MICROORGANISMOS GRAMPOSITIVOS, GRAMNEGATIVOS Y HONGOS.	28
1.4.1. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS.....	28
1.4.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	28

1.4.1.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
1.4.2.	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	31
1.4.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	31
1.4.2.2.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	37
1.4.2.3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
1.4.2.4.	<i>Salmonella typhi</i>	40
1.4.3.1.	<i>Cándida albicans</i>	43
1.4.3.2.	<i>Microsporum sp.</i>	45
1.5.	AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	48
1.6.	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	48
1.7.	CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA	49
1.8.	CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA	49
1.9.	SENSIBILIDAD DEL MICROORGANISMO	49
CAPÍTULO II:		50
MATERIALES Y MÉTODOS.....		50
2.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	51
2.2.	MATERIALES.....	51
2.2.1.	Material biológico	51
2.2.1.1.	Especie Botánica.....	51
2.2.1.2.	Bacterias patógenas	51
2.2.1.3.	Hongos:	52
2.2.2.	Material de laboratorio	52
2.2.2.1.	Material de vidrio	52
2.2.2.2.	Equipos y aparatos de Laboratorio.....	52
2.2.2.3.	Otros accesorios.....	53
2.2.3.	Reactivos	54
2.3.	METODOLOGÍA	54
2.3.1.	Preparación y obtención de la muestra.	54
2.3.2.	Obtención del Extracto	58
2.4.	DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	60
2.5.	ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	60
2.5.1.	Corrida general	61

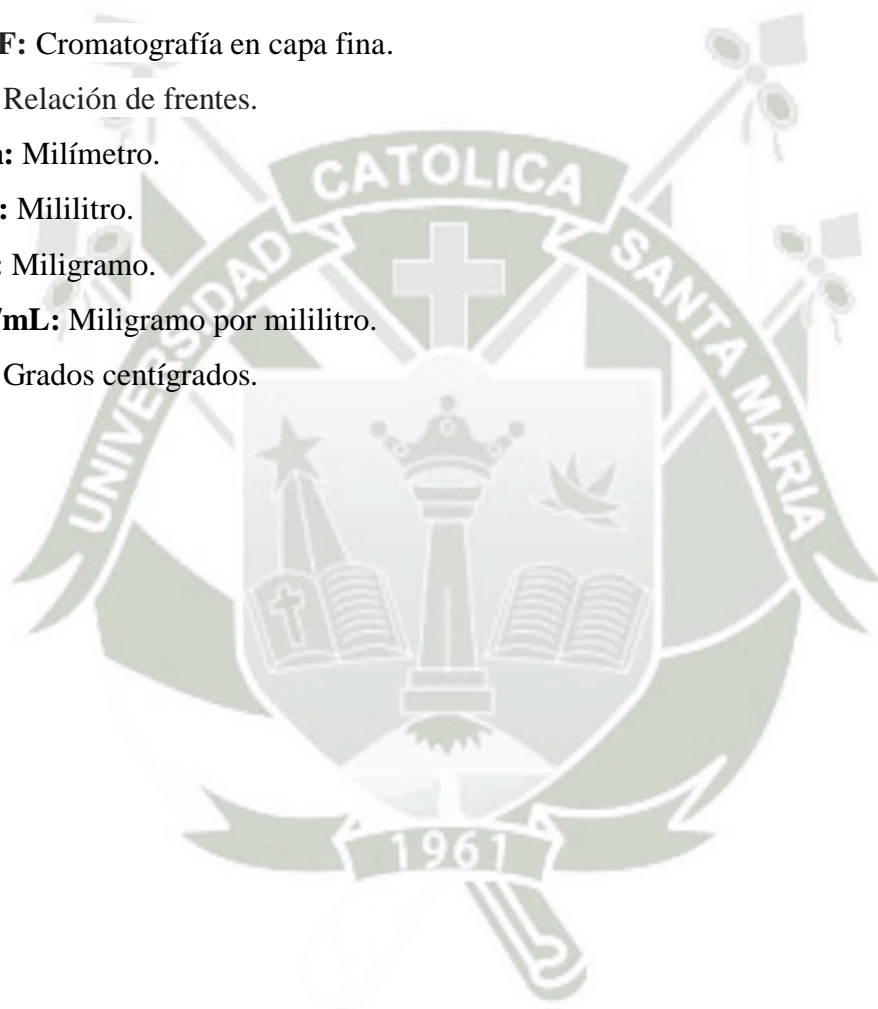
2.5.2.	Identificación de flavonoides	61
2.5.3.	Identificación de taninos.....	62
2.5.4.	Identificación de terpenos.....	62
2.5.5.	Identificación de alcaloides	63
2.6.	Ensayo y determinación de la actividad antioxidante	64
2.6.1.	Determinación de la actividad antioxidante por el método de Trolox.....	64
2.7.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico	67
2.7.1.	Método de Dilución en caldo.....	67
	• Metodología específica para el hongo filamentoso.....	70
2.8.	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida y Fungicida.....	71
2.9.	Determinación de la sensibilidad antimicrobiana y antifúngica.....	73
2.9.1.	Método de excavación placa-cultivo	73
CAPÍTULO III:.....		77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		77
3.1.	Rendimiento	79
3.2.	Estudio fitoquímico preliminar en cromatografía de capa fina del extracto alcohólico de <i>Cestrum auriculatum</i> L'Hér. "Hierba santa"	80
	• Cromatografía en capa corrida general	80
	• Cromatografía en capa fina flavonoides	81
	• Cromatografía en capa fina taninos.	83
	• Cromatografía en capa fina terpenos	84
	• Cromatografía en capa fina Alcaloides.....	85
3.3.	Determinación de la Actividad Antioxidante por el método DPPH.....	86
3.4.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	91
3.5.	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida y Fungicida.....	106
3.6.	Determinación de la sensibilidad antibacteriana y antifúngica	121
CAPÍTULO IV:.....		141
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS		141
CONCLUSIONES		142
SUGERENCIAS		144
REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS		145
ANEXOS		151

2.11.	Instrucciones.....	155
2.11.1.	Crecimiento	155
2.11.2.	Resultado.....	155
2.12.	Instrucciones.....	157
2.13.	Instrucciones.....	158



ABREVIATURAS

- **CMI:** Concentración mínima inhibitoria.
- **CMB:** Concentración mínima bactericida.
- **EROS:** Especies reactivas del oxígeno.
- **FE:** Fase estacionaria.
- **CCF:** Cromatografía en capa fina.
- **Rf:** Relación de frentes.
- **mm:** Milímetro.
- **mL:** Mililitro.
- **mg:** Miligramo.
- **mg/mL:** Miligramo por mililitro.
- **°C:** Grados centígrados.



RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la evaluación “in vitro” de la actividad antioxidante, así como la actividad antibacteriana y antifúngica in vitro del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” en bacterias patógenas Gram positivas: *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa* y Hongos: *Cándida albicans* y *Microsporum sp.*

Se obtuvieron muestras biológicas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba Santa” en el pueblo de Sogay, del distrito de Yarabamba, provincia de Arequipa; la planta fue sometida a una previa selección, lavado, secado y trituración en finas partículas para su posterior extracción. Las muestras pasaron por un proceso de extracción por el método de Soxhlet, usando como solvente alcohol.

En la determinación del rendimiento del extracto alcohólico, se obtuvo que por cada 40g de planta seca pulverizada presentó un rendimiento de 25.50%, además, se evaluó la presencia de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina, encontrado la presencia de flavonoides, terpenos, taninos, según su factor de referencia de acuerdo a bibliografía y por las variaciones de color en presencia del revelador y a luz ultravioleta se observó manchas de color celeste fluorescente a luz UV 365nm sin vapores de NH₃ que sugiere la presencia de flavonoides tipo flavonas, flavanonas, isoflavonas; para los taninos en presencia de su revelador se puede presumir su presencia, de acuerdo a su viraje de color marrón en presencia de cloruro

férrico, para el caso de terpenos con Rf desde 0.11 hasta 0.95 se puede presumir su presencia, debido a las manchas observadas violáceas a rosado por el resultado de la placa con respecto a su coloración y negativo para la presencia de los alcaloides por el resultado en la placa donde no se encuentra un viraje en el color.

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó una técnica espectrofotométrica por (DPPH) hallando como resultado, que el extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" posee actividad antioxidante, con un porcentaje de inhibición 47.09% de inhibición, obteniendo de este resultado 93.29 μ mol equivalente Trolox por gramos de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" revelando la presencia de compuestos fenólicos del extracto.

En la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en caldo para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomona aeruginosa* se obtuvo un CMI de 50mg/mL; frente *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* fue de 25mg/mL; frente a *Cándida albicans* fue de 25mg/mL y para *Microsporium sp.* Presento un CMI de 12.5mg/mL.

En la evaluación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* se obtuvo un CMB de 100mg/mL; frente a *Salmonella typhi* fue de 50mg/mL; frente a *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* fue de 25mg/mL. En la valoración de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) para *Cándida albicans* y *Microsporium sp.* Se obtuvo un CMF de 25mg/mL.

El estudio de la sensibilidad a través del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) para todos los microorganismos estudiados, presento una mayor sensibilidad para el dermatofito *Microsporium sp.* exponiendo una mayor sensibilidad con un halo máximo de 40mm, seguido por la levadura patógena *Cándida albicans* que también presenta mayor sensibilidad con el halo máximo de 25mm; las bacterias Gram positivas: *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* presentaron una menor sensibilidad con los halos máximos de 25 y 23mm respectivamente y las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*

Pseudomona aeruginosa revelaron una sensibilidad aun menor con un halo máximo de 14mm.

Se concluyó que el extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” presenta actividad antioxidante, así como actividad antibacteriana y antifúngica in vitro frente a bacterias patógenas Gram positivas, Gram negativas y Hongos.

Palabras clave: *Cestrum auriculatum* L'Hér., extracto alcohólico, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, actividad antifúngica.



ABSTRACT

The objective of this work was the evaluation "in vitro" of the antioxidant activity, as well as the antibacterial and antifungal activity in vitro of the alcoholic extract of the leaves of *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Holy herb" in Gram-positive pathogenic bacteria: *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*; Gram negatives: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* and *Pseudomona aeruginosa* and Fungi: *Candida albicans* and *Microsporium sp.*

Biological samples were obtained from *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" in the town of Sogay, district of Yarabamba, province of Arequipa; The plant was subjected to a previous selection, washing, drying and grinding in fine particles for later use. The samples underwent a process of extraction by the method of Soxhlet, using as alcohol solvent.

In the determination of the yield of the alcoholic extract, it was obtained that for each 40g of spray dried plant presented a yield of 25.50%, in addition, the presence of secondary metabolites by thin layer chromatography was evaluated, found the presence of flavonoids, terpenes, tannins, According to its reference factor according to bibliography and by the color variations in the presence of the developer and to ultraviolet light were observed spots of fluorescent celestial color in UV light 365nm without vapors of NH₃ that suggests the presence of flavonoids type flavones, flavanones, isoflavones ; For the tannins in the presence of its developer can be presumed its presence, according to its brown turn in the presence of ferric chloride, in the case of terpenes with R_f from 0.11 to 0.95 can be presumed its presence, due to the observed spots Violet to rosy by the result of the plate with respect to its coloration and negative for the presence of the alkaloids by the result in the plate.

For the determination of the antioxidant activity a spectrophotometric technique was used (DPPH) finding as a result, that the alcoholic extract of the leaves of *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Holy herb" possesses antioxidant activity, with a 47.09% inhibition, obtaining from this result 93.29µmol equivalent Trolox per grams of leaves of *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Santa Grass" revealing the presence of phenolic compounds in the extract.

In the evaluation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the broth dilution method for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* and *Pseudomona aeruginosa*, a MIC of 50mg / mL was obtained; Against *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* was 25mg / mL; Compared to *Candida albicans* was 25mg / mL and for *Microsporum sp.* I presented a MIC of 12.5mg / mL.

In the evaluation of the Minimal Bactericidal Concentration (CMB) for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomona aeruginosa*, a CMB of 100 mg / mL was obtained; Compared to *Salmonella typhi* was of 50mg / mL; Compared to *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* was 25mg / mL. In the evaluation of the Minimum Fungicide Concentration (CMF) for *Candida albicans* and *Microsporum sp.* A CMF of 25mg / mL was obtained.

The sensitivity study by means of the agar diffusion method (Kirby-Bauer) for all microorganisms studied, presented a greater sensitivity for the dermatophyte *Microsporum sp.* exposing a greater sensitivity with a maximum halo of 40mm, followed by the pathogenic yeast *Candida albicans* that also presents greater sensitivity with the maximum halo of 25mm; Gram positive bacteria: *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* showed lower sensitivity with the maximum halos of 25 and 23 mm respectively and Gram negative bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* *Pseudomona aeruginosa* revealed even lower sensitivity with a maximum halo of 14 mm .

It was concluded that the alcohol extract of *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Holy herb" exhibits antioxidant activity, as well as antibacterial and antifungal activity in vitro against Gram-positive, Gram-negative and Fungi pathogenic bacteria.

Key words: *Cestrum auriculatum* L'Hér., Alcoholic extract, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity.

INTRODUCCIÓN

El hombre desde tiempos antiguos ha ido creando condiciones de vida y uno de sus acomodamientos fue el atenuar enfermedades y mejorar su calidad de vida y es así que el hombre en su afán de curar enfermedades manipuló los recursos presentes a su alrededor y utilizó por primera vez las plantas en medios curativos, para diversas afecciones o cualquier otro padecimiento. Denominándose entonces como plantas medicinales a todas aquellas plantas o partes de ella y mediante cualquier tipo de preparación sean utilizadas como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal.⁶⁹

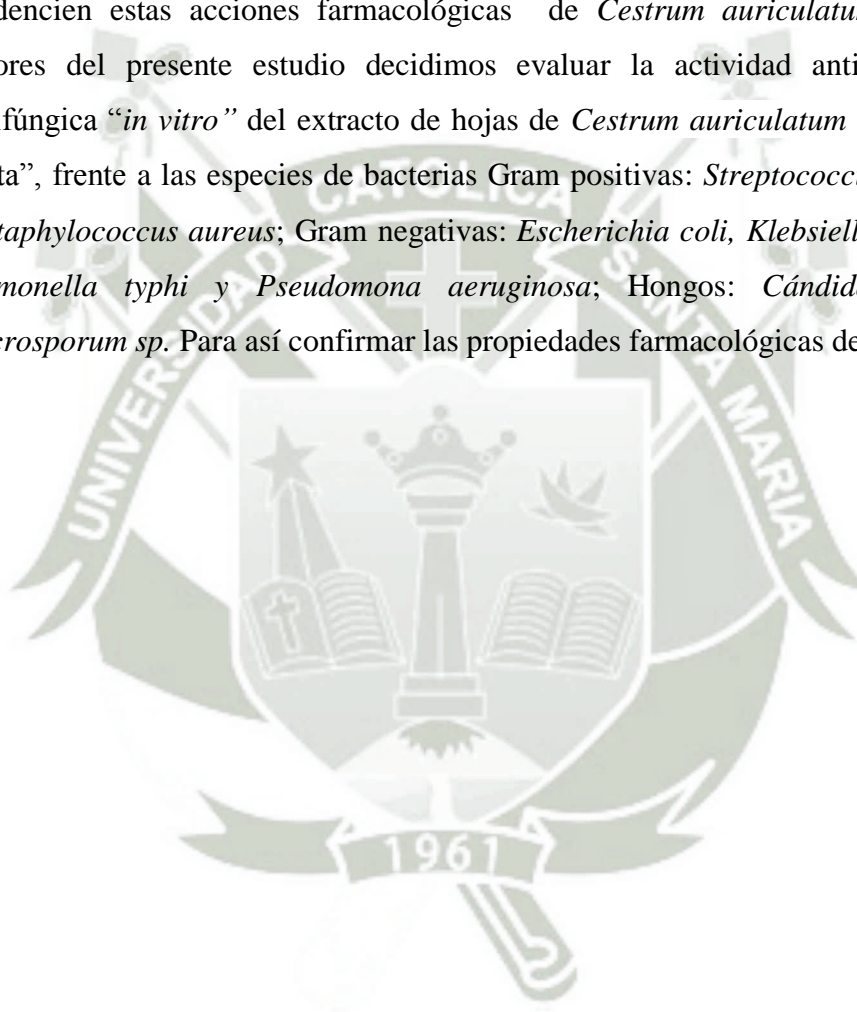
Desde aquellos tiempos la medicina no llegó alcanzar los progresos de la época actual, las curaciones se hacían a base de ciertos conocimientos empíricos con pura y exclusivamente hierbas vegetales. Sin embargo hoy en día se sigue utilizando estos métodos de curación indígena de nuestros pueblos sin la validación segura de una investigación.

Es así que la planta *Cestrum auriculatum* L'Hér. También conocida como “Hierba santa”, esta planta se desarrolla de manera silvestre y es cultivada en la costa, sierra y Amazonía de nuestro país, junto a los canales de riego entre 200 y 3,500 msnm. Esta especie constituye la vegetación de laderas arbustivas, cercanas a campos de cultivo. Es utilizada para aliviar ciertas afecciones del organismo por sus propiedades curativas y atribuyéndoles efectos antibacterianos y antiinflamatorios.³

En la actualidad en nuestras urbes se ha dejado de lado los beneficios de las plantas por la comodidad de los antibióticos y otras composiciones químicas de la medicina moderna pero esto trajo consigo un mal uso de estas alternativas terapéuticas. Provocando mecanismos de resistencia que consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana.

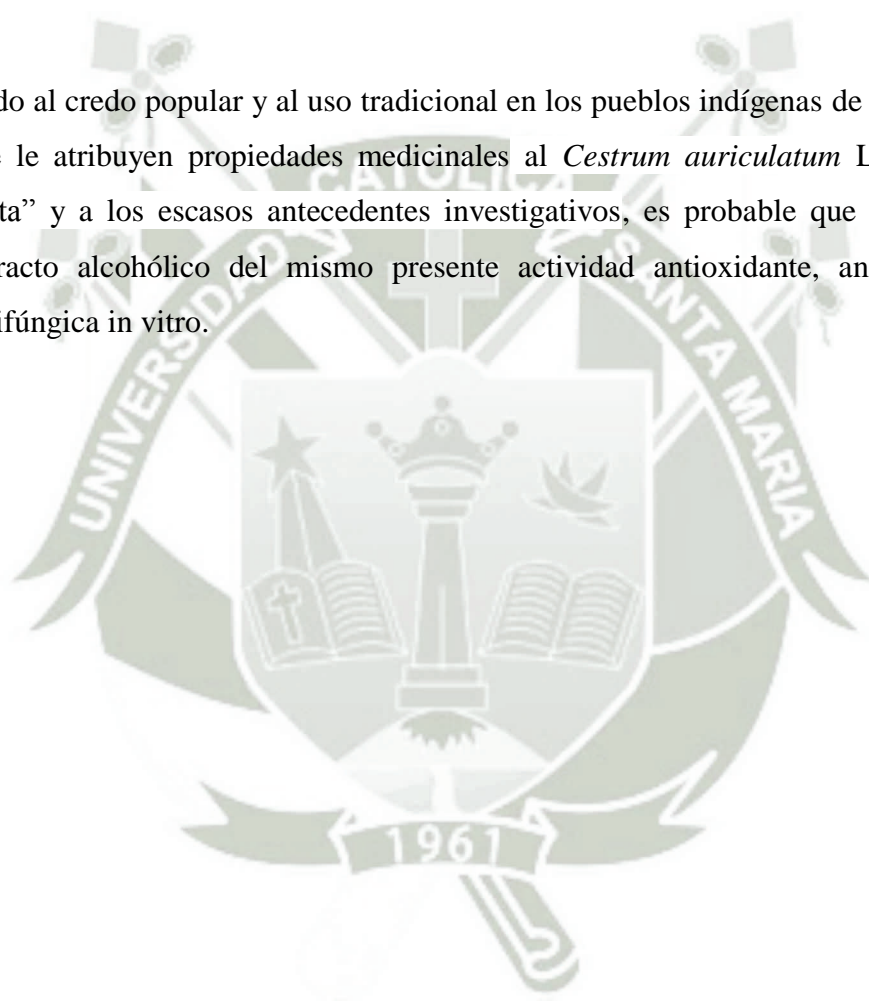
En el ámbito hospitalario son los focos de mayor incidencia de resistencia antibacteriana y antifúngica, mas en nuestro entorno regional, destacando la resistencia en bacterias y hongos oportunistas como *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans* es por eso la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas ya sea con plantas medicinales utilizadas directamente o el hallazgo de principios activos presentes en plantas aun sin estudiar.

En nuestro medio al haber encontrado pocos trabajos de investigación que evidencien estas acciones farmacológicas de *Cestrum auriculatum*, es que los autores del presente estudio decidimos evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica “*in vitro*” del extracto de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”, frente a las especies de bacterias Gram positivas: *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomona aeruginosa*; Hongos: *Cándida albicans* y *Microsporum sp.* Para así confirmar las propiedades farmacológicas de esta planta.



HIPÓTESIS

Dado al credo popular y al uso tradicional en los pueblos indígenas de nuestra sierra, que le atribuyen propiedades medicinales al *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” y a los escasos antecedentes investigativos, es probable que el estudio del extracto alcohólico del mismo presente actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica in vitro.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Evaluar la actividad antioxidante así como la actividad antibacteriana y antifúngica in vitro del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” en bacterias patógenas Gram positivas, Gram negativas y hongos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Obtener el extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante el método de Extracción Soxhlet y determinar el porcentaje de rendimiento.
2. Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante la realización de la técnica de cromatografía de capa fina (CCF).
3. Determinar la actividad antioxidante del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto obtenido de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” que presenten actividad inhibitoria positiva frente a las bacterias: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa* y los hongos: *Cándida albicans*, *Microsporium sp.*

5. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" que presenten actividad bactericida positiva frente a las bacterias: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa*.
6. Determinar la concentración mínima fungicida (CMF) de los extractos obtenidos de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" que presenten actividad fungicida positiva frente a los hongos: *Cándida albicans* y *Microsporum sp.*
7. Determinar la acción inhibitoria in vitro del extracto obtenido de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" contra las bacterias: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa* y los hongos: *Cándida albicans*, *Microsporum sp.*

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO



1.1. HIERBA SANTA (*Cestrum auriculatum* L'Hér)

- **Generalidades**

Esta planta de hojas perennes pegajosas, originaria en nuestro continente, recibió su significativo nombre de los sacerdotes españoles que quedaron impresionados con sus propiedades medicinales, conocidas desde las culturas pre incas y que constituyen un valioso aporte para la humanidad. Desde la época colonial se le consideró un regalo medicinal del cielo, lo que fue confirmado recientemente con las investigaciones científicas a sus componentes activos.^{1,2}

La familia Solanáceas, es moderadamente grande entre las que presentan plantas con flores, comprende aproximadamente 2300 especies¹. Está representada por árboles o arbustos, epífitas y algunas son hierbas perennes o anuales. Las hojas son alternas, usualmente simples y sus flores son bisexuales o rara vez unisexuales. Es cosmopolita y presenta casi una distribución mundial pero es principalmente tropical y subtropical, especialmente en el centro y sur de América con 63 géneros y 1200 especies. También hay una considerable representación en África tropical¹.

- **Clasificación taxonómica**

Según el Sistema Filogenético de Arthur Cronquist:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteroidea

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae Juss.

Género: *Cestrum*

Especie: *Cestrum auriculatum* L'Hér.

- **Características morfológicas y geográficas**

1.1..1. Descripción de género

El género *Cestrum*, se caracteriza por presentar hojas a menudo fétidas, inflorescencias terminales o axilares, paniculadas, racimosas o fasciculadas. Cáliz campanulado a tubular. Corola verde- amarillenta, amarilla, roja o púrpura. Con cinco estambres. Sus frutos son bayas jugosas. Semillas compresas.²

1.1..2. Descripción de las especie

- *Cestrum auriculatum* L'Hér.

Hierba de 2 m de altura. Tallo cilíndrico de 2,5 a 3mm de diámetro follaje densamente tupido. Ramas terminales flexibles verde oscuras. Hojas alternas pecioladas, peciolo cilíndricos de superficie glabra de 6,0-18,0 mm de longitud 1,0 mm de diámetro. Hojas con margen entero y por la base obtusa y por el ápice aguda con una longitud de 4,6 a 7,4 cm y de ancho 1,5 a 3,4 cm con superficie adaxial glabra y abaxial también glabra Inflorescencia en panículas corimbosas, terminales y axilares pedunculadas, pedúnculos finos y pubescentes. Su flor es escasamente pedicelada; cáliz ciatiforme pentadentado; corola infundiliforme, tubo de 5 – 8 mm de largo filiforme en la base baya ovada de 7-8 mm de longitud, de color negro de superficie lisa presenta de uno a cinco semillas por baya las semilla de color negro con superficie lisa y forma dura de 0,8 cm de longitud y 0,4 cm de ancho.^{2,3}

- **Nombre común:** “Hierba santa”

- **Distribución y ecología:** Desarrolla de manera silvestre o cultivada en la costa, sierra y Amazonía de nuestro país, junto a los canales de riego entre 200 y 3,500 msnm. Esta especie constituye la vegetación de laderas arbustivas, cercanas a campos de cultivo. Habitando junto a las especies, *Pennisetum clandestinum*, *Solanum phyllanthum*, *Jaltomata diversa*.³

- **Cultivo:** Se le cultiva en zonas de climas tropical y subtropical, en suelos de textura arenosa, areno-limosa y también en suelos arcillosos. Se propaga por semillas y estacas, pudiéndosele cultivar en cualquier época del año.⁴⁶

- **Dosis:** El té de Hierba santa podría ser preparado colocando una cucharadita de hojas machacadas en una taza de agua hirviendo y dejándolo reposar durante media hora. Sin embargo, muchos de sus componentes resinosos no se disuelven en agua y por esa razón las disoluciones medicinales con alcohol de Hierba santa son recomendables.⁴⁶

- **Seguridad:** La hierba santa está en la lista de la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable Food and Drug Administration, FDA, (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) como GRAS para su uso como saborizante de alimentos. No hay reportes de efectos secundarios significativos a excepción de la ocasional e inevitable reacción alérgica que puede producirse en cualquier sustancia. No obstante, la seguridad en niños pequeños, mujeres embarazadas o lactando, así como aquellos con enfermedad renal o hepática grave aún no ha sido determinada por esa entidad.⁴⁶



FIGURA N°1: *Cestrum auriculatum* L'Hér A. Inflorescencia y frutos, B. Inflorescencia, C. Hoja, D. Inflorescencia.

- **Propiedades y usos**

- **Medicinal:** La Hierba santa alivia el reumatismo, fiebre, cólicos, resfríos, sarampión, heridas de la piel, diarrea, bronquitis, insomnio y otitis. Además actúa contra el salpullido de bebés, hemorroides, estomatitis, dispepsia, caspa, inflamaciones bucofaríngeas, y sirve como emenagogo, astringente, sudorífico, vulnerario, sedante, analgésico muscular, depurativo y digestivo, algunas especificaciones³:

- Sedante: Tomar el cocimiento de las hojas.
 - Emenagogo: Tomar la infusión de las hojas.
 - Bronquitis: Tomar el cocimiento de las hojas.
 - Caspa: Aplicar la infusión de la planta en forma de lavados.
 - Dermatitis: Aplicar en forma de lavados la maceración acuosa de las hojas tiernas.
 - Diarrea: Tomar la infusión de las hojas.
 - Dispepsia: Tomar la infusión de hojas y flores.
 - Hemorroides: Aplicar en forma de baños de asiento la infusión de las hojas.
- Ornamental.
 - Mágico: Se le utiliza en ritos mágicos para los baños rituales.
 - Leña.
 - Tinte: Los frutos tiñen de azul o morado oscuros.
 - Agroforestería: Se le asocia al cultivo de especies arbustivas o herbáceas tales como la yuca, maíz, achiote, y otros.³

- **Composición Química**

Según Lucila pautrat *Cestrum auriculatum* presenta:

- Flavanonas
- Alcaloides
- Saponinas
- Digitotegina
- Solasodina
- Flavonas.
- Trazas de aceite esencial.
- Taninos, gomas, ácidos orgánicos (fórmico y acético).
- Resina.⁴⁶

- **Distribución geográfica**
 - Se desarrolla de manera silvestre o cultivada en la costa, sierra y Amazonía de nuestro país, junto a los canales de riego entre 200 y 3,400 msnm.
 - En el Perú, en los departamentos de Cusco (Valle del Urubamba), Huánuco (Tomaiquichua); Arequipa (Quequeña); Loreto (Iquitos y Yurimaguas); Junín y Pasco.⁴⁶

- **Historia**

Esta planta de hojas perennes pegajosas, originaria en nuestro continente, recibió su significativo nombre de los sacerdotes españoles que quedaron impresionados con sus propiedades medicinales, conocidas desde las culturas pre incas y que constituyen un valioso aporte para la humanidad.⁴⁸

Su fama curativa se plasmó en la guaracha que la legendaria cubana Celia Cruz hizo popular en gran parte de América Latina hace décadas cuando promocionaba toda una serie de hierbas curativas: “traigo Hierba santa pa’ la garganta, jechimón pa’ la hinchazón, ruda pal’ que estornuda, apazote para los brotes”.⁴⁶

1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para la obtención de una adecuada concentración de los principios activos de las plantas se realizan diversas operaciones mediante las cuales se extraen con solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la estabilidad y solubilidad que posean las sustancias.⁴⁷

Los métodos de extracción son los diversos procedimientos para la separación de sustancias que puedan disolverse en dos solventes no miscibles entre sí, así también estos permiten obtener los productos en formas farmacéuticas

adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que se recomiende.^{47, 56}

A partir de estos procedimientos se han perfeccionado técnicas extractivas que permiten obtener las sustancias activa en forma pura para la elaboración más sofisticada de medicamentos en forma de tabletas, líquidos, ungüentos, cápsulas, etc.⁴⁷

- **Extractos vegetales**

Los extractos son preparaciones de consistencia líquida (extractos fluidos y tinturas) o semisólida (extractos blandos o densos), o sólida (extractos secos), obtenidos a partir de drogas vegetales o tejidos animales en estado generalmente seco.

Los extractos son preparados por métodos apropiados usando etanol u otro solvente adecuado. Pueden ser mezclados diferentes fracciones de droga vegetal o tejido animal previo a la extracción. La droga vegetal o tejido animal a ser extraído debe someterse a un tratamiento preliminar, por ejemplo, inactivación de enzimas, molienda o trituración. Además, las materias indeseables deben ser eliminadas antes de la extracción.⁵⁴

- **Tipos de extracción**

- ❖ **Infusión:**

Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5%.⁵⁵

- ❖ **Maceración:**

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el menstuo constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el menstuo actúa simultáneamente sobre todas las porciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular.⁵⁵

❖ Percolación:

Es el método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana, USP XXX. Es un método que consiste en que el menstuo (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de menstuo acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva⁴. Éste tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el menstuo y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. “La percolación es el método extractivo menos adecuado en el caso de gran gelificación o si las drogas son muy voluminosas”.⁴

Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente. La droga se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte superior de la columna, atraviesa toda la zona donde se encuentra la droga con los principios activos, los va extrayendo y, por la parte inferior, se recogen los líquidos extractivos que contienen los principios activos. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas de la droga pero con un elevado consumo de disolvente.⁴

❖ Soxhlet:

El extractor Soxhlet o simplemente Soxhlet (en honor a su inventor Franz von Soxhlet) es un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, a través de un disolvente afín. Es un sistema de sistema sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un matraz de fondo plano, un cuerpo extractor y refrigerante.

En el cuerpo del extractor se coloca la droga, generalmente en vuelta en un material poroso que permita el contacto con el disolvente.

En el matraz de fondo plano se coloca el disolvente orgánico, se lleva a ebullición y los vapores del disolvente ascienden por el tubo lateral y llegan al refrigerante donde condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo extractor. Cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo, este se vacía por el sistema sifón lateral interno y desemboca en el matraz inferior. El disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior.⁴

- **Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica. La cromatografía etimológicamente proviene de la palabra CHROMA = color, y GRAPHOS = escritura, ya que se descubrió como una técnica de análisis químico utilizada para separar pigmentos vegetales.⁴⁷

Entre otras cosas permite:

- ❖ Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- ❖ Comparar muestras. Si dos muestras marchan igual en la placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, marchan distinto entonces no son la misma sustancia.
- ❖ Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (efluente o fase móvil).⁴⁷

A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.⁵⁵

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar.

Factor de referencia (RF): Es un número que permite identificar las sustancias considerando las distancias en un cromatograma, y con un método cromatográfico dado.

Rf = Distancia recorrida por el soluto

Distancia recorrida por la fase móvil

- **Radicales libres**

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media.⁵

La función que desarrollan los radicales libres presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes cito tóxicos.⁵

No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimio taxis. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalizas, pero que pueden participar en reacciones que

llevan a la elevación de los agentes pro oxidante y son las especies reactivas del oxígeno (EROS). Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias pro oxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO)•
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Anión Superoxido (O₂⁻)
- Oxígeno singlete (1 O₂)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono.⁶

A concentraciones elevadas pueden dañar reversible e irreversiblemente los constituyentes celulares, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos, por lo tanto pueden alterar la actividad celular, funcionamiento de membrana, metabolismo o expresión genética.⁵⁷

ESTRÉS OXIDATIVO:

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno.

Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos.⁶

1.3. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante puede ser definido, en el sentido más amplio de la palabra, como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.⁷⁴

Es aquella sustancia que presenta bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable (biomolécula) que retarda o previene su oxidación. Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres. Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas.⁶⁰

1.3.1. Clasificación

- Endógenos o Enzimáticos (son normalmente bio-sintetizados por el organismo)
 - Catalasa: una hemoproteína citoplasmática que cataliza la reducción H_2O_2 y O_2 .
 - Glutación Peroxidasa: cataliza la reducción de H_2O_2 y peróxidos orgánicos.
 - Superoxido desmutasa: cataliza la dismutación del radical peróxido en H_2O_2 .
- Exógenos o no Enzimáticos (a través de la dieta)

- Vitamina C: Es esencial para el funcionamiento normal de las células vivas y participa en muchas reacciones enzimáticas.
- Vitamina E: el alfa tocoferol es un inhibidor de radicales presentes en los sistemas biológicos y actúa como antioxidante previniendo la peroxidación lipídica.²⁶
- Carotenoides: son un amplio grupo de compuestos con diferentes estructuras y acciones biológicas. Son absorbidos y metabolizados de diferente manera. Como resultado los carotenoides puede competir o actuar sinérgicamente o con otros componentes en los alimentos.⁷

1.3.2. Mecanismo de acción

Los antioxidantes pueden actuar en diferentes niveles en el proceso oxidativo por lo cual se clasifican en primarios secundarios y terciarios.

- I. Primarios: evitan la formación de radicales libres, actúan en fase de iniciación, frenan la reacción en cadena de radicales libres especialmente las especies ERO. Se comportan como captadores como es el caso de Vitamina e, c, polifenoles o enzimas antioxidantes, con lo que indirectamente reducen el daño en el ADN y en membranas.²⁷
- II. Secundarios: interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las especies reactivas de oxígeno. De este modo, inhiben la generación ERO, impidiendo la activación metabólica de carcinógenos.
- III. Terciarios: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellas que se han estropeado. Modifican el potencial Redox sobre todo los antioxidantes hidrosolubles como la Vitamina C o polifenoles. El estado Redox regula la actividad de muchos factores de transcripción y puede tener un efecto positivo mejorando la eficiencia de la reparación del ADN.⁸

1.3.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides.⁸

Recientemente se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes, los compuestos fenólicos. Algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y polifenoles (aceitunas). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto y té. Por esta razón, la forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres es el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante, tales como los compuestos fenólicos.⁶⁰

1.3.4. Compuestos fenólicos

Se trata de un gran grupo de compuestos presentes en verduras y frutas, en los que ejercen una potente acción antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales. Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grandes grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante tanto de la dieta tanto humana como animal. Son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional. Se trata de sustancias químicas considerados metabolitos secundarios de las plantas con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos.⁵⁷

Los fenoles o compuestos fenólicos se oxidan con mucha facilidad experimentando la oxidación. Esto les confiere una cualidad especialmente antioxidante a fin de contrarrestar la oxidación producida por radicales libre, productos químicos, la luz, etc. por todo esto, la implicación de los compuestos fenólicos las defensas de las plantas es primordial. Algunos fenoles juegan también un papel fundamental en la tolerancia del estrés.⁵⁷

Estos compuestos fenólicos o metabolitos secundarios de las plantas están agrupados en cuatro clases principales:

- **Los terpenos:** Clase de fenoles en la que se encuentran pigmentos, aceites esenciales y hormonas
- **Los polifenoles:** Taninos, cumarinas, flavonoides, lignina y taninos
- **Los glicósidos:** Glicósidos y glucosinolatos y saponinas.
- **Los alcaloides:** Los llamados compuestos fenólicos tradicionalmente han sido considerados como anti nutrientes debido al efecto adverso de uno de sus componentes mayoritarios: los taninos, los cuales son una subdivisión de los polifenoles (uno de los subgrupos de los compuestos fenólicos). Los taninos y los flavonoides son los fenoles o compuestos fenólicos que más abundan.⁵⁷

Se pueden clasificar en base a su esqueleto químico:

- **Fenoles simples:**
 - ❖ Fenilpropanoides simples: que tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Ejemplos: ácido trans-cinámico, ácido p-cumárico, y sus derivados como el ácido cafeico.
 - ❖ Lactonas fenilpropanoides (o "ésteres cíclicos"), también llamadas cumarinas. También poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. Ejemplos: la umbeliferona (una cumarina

simple), el "psolaren" (una furanocumarina: cumarina a la que se adicionó un anillo furano).

- ❖ Derivados del ácido benzoico (el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono). Son formados a partir de fenilpropanoides a los que se les seleccionan dos carbonos de la cadena propánica. Ejemplos: la vainillina, el ácido salicílico.

○ **Fenoles complejos:**

- ❖ Lignanos: Son metabolitos secundarios de las plantas encontrados en una gran variedad de plantas que incluyen las semillas de lino, semillas de calabaza, semillas de ajonjolí, centeno, soya, brócoli, frijoles, y en algunas bayas. Aunque están ampliamente distribuidos en las citadas semillas, sus cantidades son muy reducidas, del orden de μg por cada gramo de producto seco.
- ❖ Flavonoides: Se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, y también en algunas algas Charophyta, y aunque todas las especies comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente.

En la actualidad, la capacidad nutricional de muchos alimentos está garantizada por la presencia de compuestos antioxidantes como polifenoles que se encuentran en abundancia en plantas, frutas y verduras. Los antioxidantes presentes en el cuerpo humano actúan como defensa frente a los radicales libres generados durante el metabolismo celular. La capacidad de polifenoles, flavonoides y otras moléculas para eliminar los radicales libres está conectada a la especificidad de su estructura química resultante de la presencia de anillos aromáticos.⁵⁷

1.4. MICROORGANISMOS GRAMPOSITIVOS, GRAMNEGATIVOS Y HONGOS.

1.4.1. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

1.4.1.1. *Streptococcus pneumoniae*

➤ Generalidades

El neumococo, *Streptococcus pneumoniae*, es un microorganismo patógeno capaz de causar en humanos diversas infecciones y procesos invasivos severos. Se trata de una bacteria Gram positiva de 1,2-1,8 μm de longitud, que presenta una forma oval y el extremo distal lanceolado. Es inmóvil, no forma endosporas, y es un miembro alfa-hemolítico del género *Streptococcus*.¹⁴

➤ Pruebas diagnósticas de laboratorio.

En el laboratorio se le identifica como cocos Gram positivos que crecen en cadenas y además que son catalasa-negativos. El *Streptococcus pneumoniae* sintetiza la toxina neumolisina la cual degrada la hemoglobina a un producto verdoso de degeneración; causa hemólisis α en agar de sangre, por lo que se le clasifica como α -hemolítico.

Estas cepas de neumococos en su mayoría (98%) son sensibles a etilhidrocupeina (optoquina) y además casi todas se disuelven por acción de sales biliares. Los principales componentes de su pared celular son el peptidoglicano y el ácido teicoico y la integridad de la pared está dada por la presencia de cadenas laterales peptídicas entrelazadas entre sí por acción de enzimas como las transpeptidasas y carboxipeptidasas. Estas enzimas son inactivadas por los antibióticos β -lactámicos.¹¹

➤ Patología

La mayor parte de las infecciones están producidas por la diseminación endógena desde la nasofaringe o la orofaringe colonizada en las regiones alejadas (por ejemplo, pulmones, senos, oídos, sangre y meninges). La colonización es más elevada en niños pequeños. Las personas con antecedentes de infección viral del tracto

respiratorio o de otras situaciones que puedan interferir con la eliminación de las bacterias de la vía respiratoria tienen riesgo aumentado de enfermedad pulmonar.¹¹

Otitis media y sinusitis: se cultiva líquido del oído extraído durante la otitis media aguda o líquido de un seno paranasal obtenido durante la sinusitis aguda. *S. pneumoniae* es el microorganismo obtenido con mayor frecuencia, o el segundo después del *H. Influenzae* no tipificable.¹¹

Tanto en adultos como en niños se identifican neumococos entre el 40-50% de los casos. Se piensa que la infección previa por un virus respiratorio o alergia contribuye de forma importante a estas infecciones neumococicas, provocando congestión.¹¹

➤ **Tratamiento**

La penicilina es el fármaco de elección para las cepas sensibles, aunque las resistencias son cada vez más frecuentes. Las cefalosporinas; la eritromicina, el cloranfenicol o la vancomicina se utilizan en pacientes alérgicos a la penicilina o para el tratamiento de las cepas a la penicilina resistentes.¹¹

1.4.1.2. *Staphylococcus aureus*

➤ **Generalidades**

Conocido como estafilococo áureo, o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella. *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 μM de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen

una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. *S. aureus* es un microorganismo Gram positivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos.¹⁵

➤ **Pruebas diagnósticas de laboratorio**

La microscopia es útil en las infecciones piógenas, pero en las infecciones del torrente sanguíneo o en las infecciones mediadas por toxinas. Los estafilococos crecen rápidamente cuando se cultivan en medios no selectivos. La detección de los antígenos estafilocócicos por serología tiene escaso valor. Se efectúa por tinción de Gram y cultivos microbiológicos. El material a cultivar puede estar constituido por aspirados de pus o tejidos, sangre u otros líquidos corporales que normalmente son estériles.¹⁶

➤ **Patología**

La ruptura de la piel o de las mucosas por traumatismos u operaciones puede dar origen a infecciones localizadas de la piel y de los tejidos blandos; en ocasiones los microorganismos invaden los linfáticos y la sangre y producen bacteriemia e infecciones diseminadas como la endocarditis, artritis, neumonía y abscesos profundos. Este microorganismo puede afectar tanto a pacientes inmunocompetentes (en los que produce infecciones de la piel y tejidos blandos), como a individuos con una disminución de las defensas a causa de operaciones, quemaduras, adicción a drogas intravenosas o dispositivos médicos, como por ejemplo catéteres intravenosos. Tres toxinas producidas por *S. aureus* pueden causar tres síndromes clínicos: intoxicación alimentaria estafilocócica, síndrome de la piel escaldada estafilocócica y síndrome del shock tóxico.¹⁵

La intoxicación alimentaria estafilocócica se debe a la ingestión de alimentos que contienen enterotoxina B termoestable preformada. La toxina no se produce en el tracto gastrointestinal. Entre 2 y 8 horas después de la ingestión el paciente comienza a presentar náuseas, vómitos y diarrea. La característica es que el paciente no presenta fiebre y la infección se autolimita. El síndrome de la piel escaldada estafilocócica, afecta con más frecuencia a los lactantes y a los niños pequeños. Suele comenzar con un eritema perioral y un rash sensible al tacto, similar a un

eritema solar que se disemina por todo el cuerpo por dos a tres días. La enfermedad es causada por cepas *S. aureus* productora de toxina (exfoliatina) y comienza con una infección cutánea localizada. La fiebre y la leucocitosis suelen ser leves y habitualmente hay recuperación. El síndrome del shock tóxico es un trastorno multisistémico producido por cepas de *S. aureus* productora de toxina. La gran mayoría de los casos se observa en mujeres durante la menstruación y se asocian con el uso de tampones y un aumento del desarrollo de *S. aureus* intravaginal con producción aumentada de toxinas. El 20% de los casos se presenta en mujeres que no están menstruando, en hombres y en niños y ha sido relacionado con infecciones localizadas por *S. aureus* tales como abscesos, osteomielitis, infecciones posquirúrgicas y neumonía pos influenza.¹⁶

➤ **Tratamiento**

Los antibióticos de elección son la oxacilina (u otras penicilinas resistentes a la penicilinas) o vancomicina para las cepas resistentes a oxacilina. El tratamiento es sintomático en los pacientes con intoxicación alimentaria (aunque se debe identificar el origen de la infección para establecer las medidas preventivas adecuadas). La curación adecuada de las heridas y el uso de desinfectantes ayuda a prevenir las infecciones. El lavado de manos y la cobertura de la piel expuesta ayuda al personal sanitario a prevenir la infección o la extensión a otros pacientes.¹¹

1.4.2. BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

1.4.2.1. *Escherichia coli*

➤ **Generalidades**

Cada año, centenares de miles de personas se enferman a causa de la *Escherichia coli* (*E. coli*) patógena, y cientos de ellas fallecen. En los últimos años ha habido un aumento de los brotes de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y se han registrado millares de casos esporádicos de colitis hemorrágica (diarrea sanguinolenta), algunos de los cuales provocan el síndrome urémico hemolítico (SUH) que puede llegar a ser mortal. Los brotes de STEC han tenido un efecto

significativo en los sistemas de atención sanitaria y en la producción y el comercio agropecuarios en muchos países del mundo.⁵¹

E. coli es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua. La mayoría de las *E. coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural. Diferentes cepas de *E. coli* son patógenos gastrointestinales graves para los seres humanos, y algunas también son patógenos para animales jóvenes destinados a la producción de alimentos. Las *E. coli* patógenas se distingue de otras *E. coli* por su capacidad de provocar enfermedades mediante mecanismos genéticamente controlados, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huéspedes, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos. La *E. coli* tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y bacteriófagos, como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos.⁵⁰

Se cree que estos elementos genéticos contribuyen a la aparición de agentes patógenos con mayor virulencia, supervivencia ambiental y persistencia en los sistemas alimentarios Tipos de *E. coli* patógena y síntomas en los seres humano.

Las bacterias *E. coli* patógenas se dividen en seis grupos o variedades, según los mecanismos comunes de patogenicidad y síndromes clínicos: *E. coli* Shigatoxigénica (STEC) o *E. coli* verotoxigénica (ECVT), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteropatogénica (ECEP), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD).⁵¹

Las características de las variedades no son exclusivas y pueden ser compartidas por más de un grupo.

En general, el período de incubación de la enfermedad de *E. coli* en los seres humanos oscila entre tres y ocho días, con la aparición de una variedad de síntomas gastrointestinales que van desde la diarrea leve hasta la diarrea sanguinolenta, la mayoría de las veces sin fiebre. Las personas y los animales infectados (con síntomas

o sin ellos) pueden diseminar hasta 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces.⁵¹

➤ **Morfología**

Escherichia coli pertenece a las enterobacterias, una familia de bacterias compuesta por numerosas especies de bacterias Gram negativas. Morfológicamente, las colibacterias son bacilos rectos generalmente flagelados periticos y, por tanto, móviles. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos. Catalizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden utilizar urea ni citratos. No se forma hidrógeno sulfúrico. El rango de crecimiento se sitúa entre 4 y 46°C. Al igual que las restantes enterobacterias, las colibacterias son resistentes a las sustancias tensioactivas. La compleja estructura antigénica se basa en antígenos O, K y H. Los antígenos O son lipopolisacáridos (LPS), componentes estructurales de la membrana externa. Una estructura química diferente de LPS corresponde a una distinta especificidad serológica.

Las cepas de bacterias que poseen el antígeno O forman colonias brillantes sobre medios de cultivo sólidos, por lo que se denominan formas S. Los antígenos K son componentes capsulares. Sin embargo, no todas las cepas llevan antígenos K. Las cepas de esta estructura antigénica suelen ser más bien tóxicas y resistentes a la fagocitosis. Las colonias de las cepas bacterianas con mucha sustancia capsular tienen un aspecto mucoso. Las proteínas de los flagelos constituyen antígenos H.⁵¹

➤ **Pruebas diagnósticas de laboratorio**

Un examen físico puede mostrar aumento del tamaño del hígado o del bazo y puede haber cambios anormales en el sistema nervioso. Los exámenes de laboratorio mostrarán signos de anemia hemolítica e insuficiencia renal aguda.

Un conteo sanguíneo completo (CSC) puede mostrar:

- Conteo de plaquetas más bajo (trombocitopenia)
- Descomposición de los glóbulos rojos

- Anemia por la pérdida de glóbulos rojos (anemia hemolítica)
- Conteo de glóbulos blancos elevado

Se pueden realizar otras pruebas:

- Prueba de hacer fecales (laboratorios) es igual a coliforme fecal (se fermenta lactosa) ácido más gas en 48 horas a 35 °C.
- IMVIC = Su resultado es Indol (+), Rojo Metilo (+), Voges Proskauer (-), Citrato (-).
- Prueba de Ureasa: su resultado es Negativo (color amarillo).
- Es una bacteria que en agar TSI se obtiene el siguiente resultado:
- Es A/A eso significa que es ácido/ácido y que todo el tubo queda de color amarillo ya que fermenta glucosa, lactosa y sacarosa.
- En producción de gas es positivo eso significa que tiene facilidad para romper el medio.
- En producción de ácido sulfhídrico es negativo esto quiere decir que el medio no debe quedar de color negro.
- En agar LIA se obtiene el siguiente resultado: El color del pico es púrpura al igual que el color de la base del tubo (todo el medio es de color púrpura), esto nos indica que no hubo cambio en el medio, por lo tanto la descarboxilación de la lisina es positivo.
- En el medio MIO se obtiene el siguiente resultado: La movilidad es positiva.
- La prueba de indol es positiva, esto quiere decir que al agregarse una gota del reactivo de Kovac's o de Erlich en la superficie del medio se forma un círculo de color rojo.
- La ornitina descarboxilasa es positivo eso quiere decir que el medio mantiene su color (es morado).
- En el medio SIM se obtiene el siguiente resultado: La movilidad es positivo.
- La prueba de indol es positiva, esto quiere decir que al agregarse una gota del reactivo de Kovac's o de Erlich en la superficie del medio se forma un círculo de color rojo.⁵⁰

➤ Patología

Escherichia coli es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Estas bacterias pueden ser móviles (la mayoría) o inmóviles, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano. Infecciones entéricas causadas por *Escherichia coli* enterotoxígeno.⁵⁰

Es una de las causas más frecuentes de deshidratación por diarrea en niños de menos de dos años y es la principal causa de la diarrea del viajero, que en general se desarrolla en un individuo por lo demás sano proveniente de un país industrializado que visita regiones tropicales o subtropicales caracterizadas por condiciones de higiene deficientes. En general, los síntomas tienden a ser leves, con diarrea acuosa. Ocasionalmente los síntomas pueden ser más graves, con fiebre, escalofríos y vómitos.⁵⁰

La enterotoxina estimula la secreción masiva de líquido por las células mucosas. Se supone que la ausencia de gastroenteritis entre los residentes adultos de áreas asociadas a la diarrea del viajero se debe a su exposición previa a estos antígenos de colonización y al desarrollo de una inmunidad humoral apropiada.⁵¹

➤ Tratamiento

La gran mayoría de las infecciones del tracto urinario (I.T.U) se deben a gérmenes provenientes de la flora intestinal. La *Escherichia coli* (*E. coli*) es el microorganismo que con mayor frecuencia ocasiona infecciones del tracto urinario y se le considera responsable del 90 % de todas las infecciones urinarias, por lo que el principal tratamiento está destinado para esta afección.⁵¹

• Quinolonas

El ácido pipemídico integra la primera generación de quinolonas y es útil para el tratamiento de IU bajas. Las fluoroquinolonas (FQ: norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacina) son antibióticos bactericidas, muy activos contra *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gramnegativos. Ciprofloxacina es la FQ más activa contra *P. aeruginosa*. Tienen buena actividad contra *Staphylococcus spp.*, aunque son poco activos frente a otros cocos Gram positivos. Adquieren buena concentración en los

tejidos, incluyendo próstata y penetran dentro de las células. Su buena absorción digestiva permite administrarlos por v.o. una vez obtenida la mejoría por vía i.v. Norfloxacin se prefiere para IU bajas porque adquiere buena concentración en orina, aunque baja en sangre y es de menor costo que ciprofloxacina. Las quinolonas son eventualmente utilizables en la embarazada, después del 2º trimestre, cuando lo exige la resistencia del germen a los betalactámicos.⁹

- **Aminoglucósidos.**

Son antibióticos bactericidas, especialmente activos frente a bacilos gramnegativos. Se los puede usar en monoterapia para tratar IU. Potencian a las amino penicilinas cuando se tratan infecciones por *Enterococcus spp.* Se los usa durante breves períodos por sus potenciales efectos tóxicos, especialmente durante el embarazo. Cuando se administra la dosis diaria total en una sola vez aumenta su eficacia y disminuye su toxicidad, a la vez de verse facilitada su administración.⁹

- **Amino penicilinas/inhibidores de la betalactamasa (IBL).**

Aunque pueden ser útiles contra enterobacilos (*E. coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella pneumoniae*), el nivel de cepas resistentes no permite usarlos en forma empírica, sino después de conocida la sensibilidad del germen. Son útiles en la embarazada por carecer de efectos tóxicos para el feto.⁹

- **Cefalosporinas.**

Las de primera generación (cefalexina, cefradina) son activas contra enterobacilos sensibles. Por el alto nivel de resistencias que han adquirido estos gérmenes, no se las incluyen en los planes empíricos de tratamiento. Son útiles cuando se conoce que el agente es sensible y en la embarazada porque no son tóxicas para el feto.⁹

Las de segunda generación (cefuroxime, cefuroxime-axetil) y las de 3ª generación (ceftriaxone y cefotaxime) tienen una actividad antibacteriana similar frente a los microorganismos que con mayor frecuencia producen IU.⁹

Para racionalizar el uso de las cefalosporinas, evitar sobreinfecciones y desarrollo de resistencias, debieran usarse las de 2ª generación para infecciones leves o moderadas y las de 3ª generación para infecciones más graves y bacteriémicas. Ceftazidime

debiera reservarse para *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos resistentes a los antibióticos ya mencionados.⁹

- **Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX).**

Aunque por el alto nivel de cepas resistentes no está indicado para un tratamiento empírico, es muy útil cuando se conoce que el germen es sensible, pues los elimina del reservorio de origen (vagina) con lo que se disminuye el riesgo de recaídas.⁹

1.4.2.2. *Pseudomona aeruginosa*

➤ **Generalidades**

Pseudomonas y otros bacilos no fermentadores constituyen un complejo conjunto de patógenos oportunistas de plantas, animales y el ser humano. Para complicar la comprensión de estos microorganismos, la clasificación taxonómica ha sufrido numerosos cambios en los últimos años. Los miembros de este género son ubicuos y se encuentran en el suelo, en los compuestos orgánicos de la descomposición, en la vegetación y en el agua. Por desgracia, se encuentran en todo el ambiente hospitalario, en reservorios húmedos como los alimentos, las flores cortadas los lavabos, los baños, los equipos de diálisis y terapia respiratoria e incluso en las soluciones desinfectantes. Es raro que las personas sean portadoras dentro de la flora microbiana normal, salvo en los pacientes hospitalizados y en anfitriones inmunodeprimidos ambulatorios.¹⁰

➤ **Morfología**

Es una bacteria flagelada con forma de bastoncillo, que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es una bacteria muy extendida, y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas, ya que sus necesidades alimenticias son mínimas, aunque las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos.

En los seres humanos puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano.¹⁰

➤ **Pruebas diagnósticas de laboratorio**

Crecen con facilidad en los medios normales de laboratorio, este se identifica por las características de sus colonias (p. ej., hemolíticas, pigmento verde, olor de uva) y por pruebas bioquímicas (p. ej., reacción positiva de la oxidasa, utilización oxidativa de hidratos de carbono).¹¹

➤ **Patología**

Es muy poco frecuente que la *Pseudomona aeruginosa* produzca trastornos en personas sanas. La enfermedad se origina como resultado de alteraciones en las defensas normales del huésped. Esto puede suponer la pérdida de protección que proporcionan las membranas mucosas o la piel, como ocurre con la "otitis externa". Sus mínimas necesidades de nutrición, adaptabilidad y relativa resistencia a los antibióticos permiten a esta bacteria sobrevivir cerca de su anfitrión. Las infecciones por *Pseudomona aeruginosa* son graves, especialmente cuando existe bacteriemia. Ésta suele presentarse en pacientes con enfermedad grave de base, larga estancia hospitalaria y uso previo de antibióticos.⁵⁰

Al parecer la lesión inicial provocada por la *P. aeruginosa* al epitelio respiratorio y otras mucosas está mediada por Pili o fimbrias y por un exopolisacárido mucoide conocido como alginato. Existen receptores de estas adhesinas en las células epiteliales. El microorganismo produce diversas enzimas extracelulares como la proteasa alcalina, elastasa, fosfolipasa, citotoxina y exoenzimas A y S la alteración de los tejidos del huésped por estos productos bacterianos extracelulares crea las condiciones necesarias para la proliferación e invasión bacteriana y la consiguiente destrucción del tejido.¹¹

➤ **Tratamiento**

Con frecuencia es necesaria la combinación de antibióticos (p.ej., aminoglucósido y β -lactámicos). La monoterapia es generalmente ineficaz y puede seleccionar cepas resistentes. Los esfuerzos para controlar las infecciones que se adquieren en el

hospital se deben concentrar en prevenir la contaminación de los equipos médicos estériles y las infecciones nosocomiales. El uso innecesario de antibióticos de amplio espectro puede seleccionar microorganismos resistentes para esta especie.¹¹

1.4.2.3. *Klebsiella pneumoniae*

➤ Generalidades

Posee una capsula prominente que confiere el aspecto mucoides a las colonias aisladas y la mayor virulencia de los microorganismos en vivo. Es una especie de bacteria cuya variedad más conocida es la *Klebsiella pneumoniae*. La *Klebsiella* está presente de forma natural en algunos órganos como el tubo digestivo o los pulmones, pero su acción está bien controlada por el organismo, por lo que hay ausencia de infección.¹⁰

En un organismo sin respuesta inmunitaria, es decir, cuyas defensas inmunitarias están disminuidas o que presenta otro problema intercurrente, esta bacteria puede volverse "agresiva" y ser responsable de anginas, de infecciones pulmonares, a veces de infecciones urinarias o de infecciones más generalizadas.¹⁰

➤ Pruebas diagnósticas de laboratorio

Son bacterias Gram negativas, la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el agar MacConkey donde las colonias son de color rosado y en el medio Kligler o TSI donde son Ácido/Ácido, es decir fermentador de la lactosa más producción de gas; y en la fermentación acetónica o prueba de Voges Proskauer son positivos.¹¹

➤ Patología

Estas especies pertenecientes a los *Klebsiella*, están en todas partes. Y cuando se vuelven patógenos, estas bacterias se encuentran especialmente en los tractos respiratorio, intestinal y urogenital. Las enfermedades causadas por *Klebsiella*, incluyen la neumonía (una enfermedad inflamatoria de los pulmones), infecciones del tracto urinario (ITU), la espondilitis anquilosante (artritis

inflamatoria degenerativa), septicemia (inflamación del cuerpo entero) e infecciones suaves del cuerpo en los seres humanos.⁵⁰

Klebsiella pneumoniae, como el propio nombre sugiere, esta cepa del género *Klebsiella* causa la neumonía en los seres humanos, y la enfermedad se denomina la neumonía por *Klebsiella*. Además de las pulmonares, las infecciones en las zonas intra abdominales y del tracto urinario también se reportan. De hecho, es la segunda más patógeno virulento, al lado de *E. coli*, que causa infección del tracto urinario. Normalmente afecta a las personas con el sistema inmunológico bajo, como a los pacientes hospitalizados, pacientes diabéticos y personas con enfermedades pulmonares crónicas.

También, las personas que se entregan al consumo excesivo de alcohol, son las más propensas a las infecciones de *K. pneumoniae*, que otras.¹¹

➤ **Tratamiento**

No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactámicos y carbapenemos independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): agentes no beta-lactámicos.

Los esfuerzos para controlar las infecciones que se adquieren en el hospital se deben concentrar en prevenir la contaminación de los equipos médicos estériles y las infecciones nosocomiales. El uso innecesario de antibióticos de amplio espectro puede seleccionar microorganismos resistentes para esta especie.¹¹

1.4.2.4. *Salmonella typhi*

➤ **Generalidades**

Salmonella, es un grupo de bacterias similares, aunque no idénticas. El género *Salmonella* es de taxonomía difícil, modificada en estos últimos años por el aporte de estudios moleculares de homología de ADN que han clarificado el panorama taxonómico de las enterobacterias.⁵²

Estas bacterias llevan el nombre del científico que las descubrió. La mayoría de los componentes de estas bacterias son idénticos, y al nivel del ADN, son entre 95% y

99% idénticos. Como su nombre indica *Salmonella entérica* están involucrados en la causa de las enfermedades de los intestinos (medios entéricos relacionados con el intestino). Los tres principales serotipos de *Salmonella entérica* son *Typhimurium*, Enteritidis y *S. typhi*. Estas distinciones se están diseñadas para ayudar a los científicos a distinguir entre bacterias similares en las investigaciones científicas y cuando se discute de la genética.⁵²

La *Salmonella typhi* es un bacteria que se transmite por medio de alimentos o agua contaminados con materia fecal y orina de personas portadoras. Es resistente a bajas temperaturas lo que le permite transmitirse a través de alimentos conservados a bajas temperaturas. La fiebre tifoidea o fiebre entérica es causada por *Salmonella Typhi* de la que el ser humano es el único portador. Es una enfermedad infecciosa intestinal, grave y aguda que constituye un problema severo de salud pública en casi todo el mundo, aunque su incidencia ha disminuido en países con mejores niveles de higiene y saneamiento ambiental.⁵²

➤ **Pruebas diagnósticas de laboratorio**

Se efectúa por aislamiento del germen a partir de la sangre y de las heces, o bien por la demostración de anticuerpos (Ac) en el suero mediante técnicas de aglutinaciones.⁷⁵

▪ **Hemocultivo**

El hemocultivo es fundamental para el diagnóstico en el periodo de invasión. En la primera semana de enfermedad el 85-90 % de resultados son positivos.⁵²

▪ **Mielocultivo**

El mielocultivo o cultivo de médula ósea es el examen que tiene mayor sensibilidad y especificidad (100 %) para el diagnóstico en cualquier etapa de evolución de la enfermedad, pues tiene el más alto porcentaje de captación del bacilo en una sola muestra (más del 90 %), además no existen riesgos al puncionar la cresta ilíaca o el esternón.⁵²

- **Coprocultivo**

La fiebre tifoidea no siempre se acompaña de diarrea. El germen se elimina por las heces. La positividad es muy alta en las 2-4 semanas, permaneciendo positivo en portadores crónicos. Un solo coprocultivo negativo no descarta la enfermedad, pues las salmonellas se eliminan de manera intermitente. Después de la primera semana de enfermedad, se recomienda hacer un coprocultivo y no hemocultivo, ya que en esta etapa el bacilo se excreta en grandes cantidades en materias fecales.⁵²

- **Serología**

Para demostrar la presencia de Ac en el suero del enfermo a partir de la primera semana de enfermedad. Widal aplicó el fenómeno de la aglutinación al diagnóstico de las enfermedades infecciosas, a propósito precisamente de la fiebre tifoidea.⁵²

- **Técnica de Widal**

La aglutinación se considera como una reacción en 2 etapas. Cuando se añade el Ag al suero se produce una combinación fisicoquímica en la que el Ac se fija a la superficie del Ag; va seguido de una aglutinación en presencia de solución salina. El grado de aglutinación depende de la composición de la solución salina y de la temperatura de la reacción.¹¹

- **Patología**

Las bacterias del tipo *Salmonella typhi* o bacilo de Eberth, y *Salmonella paratyphi* A, B o C. ingresan por vía digestiva y llegan al intestino, pasando finalmente a la sangre, causando una fase de bacteriemia hacia la primera semana de la enfermedad. Existe una alta probabilidad de adquirir la enfermedad con inóculos (cantidad de bacterias adquiridas en un momento), superiores a 10^6 y especialmente desde 10^9 bacterias. Las Salmonellas penetran por la boca llegan al intestino delgado y se multiplican durante un periodo de incubación de 3 a 4 días implantándose en las vellosidades del íleon. A través de las placas de Peyer llegan al epitelio intestinal. A continuación se desplazan e invaden los folículos linfoides intestinales reproduciéndose en su interior. A través de los monocitos llegan a los vasos linfáticos mesentéricos, desplazándose al torrente sanguíneo.¹²

➤ Tratamiento

Comúnmente se han utilizado antibióticos como la ampicilina, el cloranfenicol, el trimetoprim-sulfametoxazol, y la ciprofloxacina para tratar la fiebre tifoidea en los países desarrollados, y así se ha reducido la tasa de mortalidad al 1 por ciento de los casos. Debido a la resistencia que está desarrollando la *Salmonella typhi* a estos medicamentos, se está considerando el uso de otros antibióticos, como la fleroxacina.

13

A causa del riesgo de deshidratación causado por las diarreas, también es recomendable reponer los electrolitos por vía intravenosa. También se recomienda suministrar a los enfermos dieta blanda. Es básica la detección precoz para realizar el aislamiento entérico, que consiste en lavar aparte la ropa y los útiles de vajilla utilizados por el enfermo, sumergiéndolos en una solución con 200 mililitros de lejía por cada cinco litros de agua o, si se dispone de lavadora y lavavajillas, utilizar un programa de lavado con temperaturas superiores a 80 °C. El tratamiento debe hacerse siempre bajo supervisión médica. El antibiótico más utilizado es el cloranfenicol. Dada su toxicidad en España, se utiliza más frecuentemente el cotrimoxazol o la ampicilina. La amoxicilina se reserva para las mujeres embarazadas.¹³

1.4.3. HONGOS

1.4.3.1. *Cándida albicans*

➤ Generalidades

Es un hongo diploide habitualmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Tiene una función relevante en la digestión de los azúcares, mediante un proceso de fermentación. Se manifiesta de forma diferente según su localización. En los pacientes inmuno competentes (cuyo sistema de defensa funciona correctamente, contrariamente a los pacientes inmunocomprometidos) aparece como un afta o llaga en la boca, enrojecimientos y picazón en la piel (sobre todo en las zonas de los pliegues, las áreas cálidas y húmedas favorables para el desarrollo de la levadura), pequeñas inflamaciones locales como uretritis genital en el hombre o vulvo- vaginitis con prurito y pérdidas de color blanquecino en las mujeres. En pacientes inmunocomprometidos, el hongo

crece especialmente en la boca y el esófago y es responsable de trastornos de la deglución y dolores en la zona del esófago.¹⁴

➤ **Pruebas diagnósticas de laboratorio**

Se hará un examen pélvico, el cual puede revelar:

- Hinchazón y enrojecimiento de la piel de la vulva, en la vagina y el cuello uterino.
- Manchas blancas y secas en la pared vaginal.
- Fisuras en la piel de la vulva.

Se examina una pequeña cantidad de flujo vaginal usando un microscopio (llamado montaje en fresco o examen de hidróxido de potasio [KOH]).

Algunas veces, se toma un cultivo cuando la infección no mejora con tratamiento o reaparece muchas veces. El médico puede ordenar otros exámenes para descartar otras causas de los síntomas.¹¹

➤ **Patología**

Se manifiesta de forma diferente según su localización. En los pacientes inmunocompetentes (cuyo sistema de defensa funciona correctamente, contrariamente a los pacientes inmunocomprometidos) aparece como un afta o llaga en la boca, enrojecimientos y picazón en la piel (sobre todo en las zonas de los pliegues, las áreas cálidas y húmedas favorables para el desarrollo de la levadura), pequeñas inflamaciones locales como uretritis genital en el hombre o vulvo-vaginitis con prurito y pérdidas de color blanquecino en las mujeres. En pacientes inmunocomprometidos, el hongo crece especialmente en la boca y el esófago y es responsable de trastornos de la deglución y dolores en la zona del esófago.¹¹

➤ **Tratamiento**

Según la extensión de la infección y el estado general del paciente, se decide un tratamiento tópico o sistémico así, tópicamente se puede emplear clotrimazol al uno

por ciento, miconazol, ketoconazol, sertocanazol, terbinafina o naftilina. Los tratamientos sistémicos más frecuentemente empleados son itraconazol o fluconazol. El pronóstico es bueno, y son curativos tanto los tratamientos tópicos como sistémicos. Sin embargo, si los factores predisponentes de estas micosis no se corrigen es posible otra nueva infección. Es pues, necesario aplicar el tratamiento lo más pronto posible.¹¹

1.4.3.2. *Microsporum sp.*

➤ Generalidades

La piel es el órgano principal de localización de las infecciones micóticas en el hombre, siendo estas infecciones clasificadas en superficiales y profundas, las micosis superficiales están limitadas a 0,1 y 0,7 mm de la superficie externa de la piel; estos hongos se denominan "dermatofitos" y la patología que ellos producen se llama "dermatofitosis".¹⁰

La incidencia de la dermatofitosis aumenta desde hace años en todo el mundo y muchas veces la adquisición de conocimientos imprescindibles sobre el tema se dificulta por la existencia de diversas tendencias para su estudio. Hay dermatólogos que plantean su estudio por el organismo causante trazando luego su espectro patógeno, al igual que se hace en el resto de enfermedades infecciosas, más no tienen mucho éxito, pues cada especie tiende a producir su rasgo clínico propio, muy a menudo varias de ellas provocan erupciones idénticas, complicando aún más el estudio de esta patología.¹⁰

Microsporum es un género de hongos causantes de la tiña de la cabeza, tiña corporis, (dermatofitosis) entre otras micosis. Es un hongo filamentosos queratinofílicos incluido en el grupo de los dermatofitos.¹⁰

➤ Morfología

Microsporum forma tanto macroconidios como microconidias, las macroconidias hifas son hialinas, multiseptada, variable en forma, fusiforme, en forma de huso, de entre 7 y 20 por 30 a 160 um de tamaño. Sus características de forma, tamaño y de la pared celular son características importantes para la identificación de especies. Las

microconidias son hialinas, unicelulares, piriformes o claviformes, de paredes lisas, de 2,5 a 3,5 por 4-7 um de tamaño y no para el diagnóstico de cualquier especie. La separación de este género de *Trichophyton* se basa esencialmente en la rugosidad de la pared celular macroconidial, aunque en la práctica a veces puede ser difícil de observar.¹¹

➤ **Pruebas diagnósticas de laboratorio**

La preparación microscópica directa en las lesiones de Herpes circinado se toman las escamas del borde activo o zona periférica de la lesión, en caso de lesiones de cuero cabelludo y otras zonas pilosas, tomar pelos afectados y escamas. Se utiliza para diagnosticar las dermatofitosis de piel, pelos, uñas, otras formas de diagnóstico son:

- **CULTIVO.** Es necesario para determinar exactamente el agente etiológico de una micosis y para la demostración de los hongos en los kerión. La incubación dura de una a tres semanas según el agente causal. Se hace en agar de Sabouraud.
- **HISTOLOGÍA.** Se realiza ante sospecha de una epidermofitosis negativa a la investigación microscópica directa y al cultivo. Se solicita tinción PAS. Las esporas y micelios se colorean de rojo.
- **SEROLOGÍA.** Se han desarrollado métodos serológicos para algunas infecciones por hongos, por ejemplo la prueba indirecta de hemaglutinación por *Cándida Albicans* en la que la disminución de títulos de anticuerpos sirve para controlar el éxito de un tratamiento.¹¹

➤ **Patología**

Las micosis en general presentan un modelo que incluye dos factores básicos para su desarrollo, el hospedador (medio del microorganismo) y el huésped (microorganismo). El hospedador, quien presenta factores intrínsecos y extrínsecos, tiene una resistencia inespecífica que le otorga inmunidad natural llamada factor antidermofítico, un factor sérico capaz de suprimir el crecimiento de dermatofitos y limitar las formas inflamatorias.¹¹

El factor antidermofítico está asociado a una transferrina insaturada y al capturar el hierro, necesario para la adaptación de los dermatofitos al estrato córneo, suprime su crecimiento. Así mismo, la inmunidad del individuo depende de factores nutricionales, nivel de inmunidad, factores hormonales, edad, sexo conservación del pH, ácidos grasos y continuidad de las barreras naturales. Una vez que el patógeno ha superado la inmunidad natural del huésped ayudado por los factores predisponentes se produce la proliferación del mismo. El síntoma de mayor importancia y característico de las tiñas es el prurito (intenso picor), esto se debe a la parasitación del estrato córneo y la producción de metabolitos tóxicos por los dermatofitos patógenos.^{11, 52}

➤ **Tratamiento**

El tratamiento de las diferentes manifestaciones dermatomycóticas se hará con terapia tópica y/o sistémica, de acuerdo con la localización y extensión de las lesiones, grado de inflamación y al agente causal, recurriendo, en caso de inflamación severa, a aplicaciones locales de soluciones muy diluidas de permanganato de potasio (1:20,000), solución de Burrow, infusiones de té o manzanilla, llegando, de ser necesario, al uso, por corto tiempo, de cortico terapia tópica o sistémica y si hay infección secundaria a terapia antibacteriana sistémica, con derivados sulfamidados o antibióticos que no sean penicilina y sus derivados.⁵³

Estas medidas deben preceder al tratamiento específico antimicótico. Para lesiones hiperqueratósicas es importante asociar queratolíticos en forma de crema o ungüento de ácido salicílico al 5%. Existen en el mercado presentaciones medicamentosas con asociaciones de corticoides, antimicóticos y antibióticos antibacterianos de uso tópico que son útiles, deben usarse por corto tiempo (no más de 10 días) precediendo a la terapia específica. Tener cuidado con el uso prolongado de este recurso que, además de no curar la micosis pueden ocasionar severo daño, con producción de estrías en la piel delgada de los pliegues. La medicación específica antimicótica tópica inicialmente se manejaba con fórmulas magistrales, soluciones yodo-yoduradas acuosas (lugol dermatológico), colorantes como la violeta de genciana al 1 ó 2 % (sobre todo para levaduras), tintura de Castellana y sulfuro de selenio para la pitiriasis versículo, entre otras.^{11, 53}

1.5. AGENTES ANTIBACTERIANOS

Cuando un medio de cultivo contiene un principio activo antibacteriano, deben diferenciarse dos efectos; efecto bactericida, cuando las bacterias mueren; y efecto bacteriostático, cuando las bacterias sobreviven, pero no proliferan. Si la multiplicación bacteriana no se modifica a pesar de la acción de un fármaco antibacteriano, existe resistencia de las bacterias. Esta resistencia puede deberse a que un tipo de bacterias, a causa de sus propiedades metabólicas, sea naturalmente insensible a dicha sustancia.¹⁰

1.6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Es definida como la menor concentración del antibiótico que inhibe el desarrollo in vitro de las bacterias. Se define también como la concentración inhibitoria mínima del antibiótico que se debe lograr en el sitio de la infección para que el desarrollo bacteriano sea potencialmente inhibido. Generalmente son aconsejables concentraciones mayores de la CMI, dado que otros factores tales como la unión del antibiótico a proteínas séricas o la presencia de inhibidores tisulares, pueden reducir la acción del antibiótico. Una ventaja de la prueba de CMI es que puede ampliarse para determinar la Concentración Bactericida Mínima del antibiótico.¹⁰

Se utiliza el método por dilución en caldo es la base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad. Se colocarán concentraciones decrecientes del extracto en diluciones 1:2 en tubos que contengan caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El agente antimicrobiano se preparará en una solución madre concentrada y luego se diluirá hasta obtener las concentraciones apropiadas.¹⁷

Un tubo de caldo se mantendrá sin inocular como control negativo de crecimiento y otro con inóculo, pero sin extracto como control positivo. Luego de la incubación adecuada (24h) se observará la turbidez de los tubos que indicará el desarrollo bacteriano.

El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir el desarrollo bacteriano, la concentración de extracto esencial en que se presente ausencia en el crecimiento detectada por la falta de turbidez (igualando al control negativo) será designada como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).¹⁸

1.7. CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Es la menor concentración que mata totalmente la bacteria en estudio. En la práctica, los médicos utilizan los valores del CMB para tratar a los pacientes con enfermedades infecciosas cuya defensa del huésped puede estar significativamente disminuida, sobre todo en pacientes que reciben terapia anticancerosa o inmunosupresora.¹⁹

1.8. CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA

Es la menor concentración que mata totalmente el hongo en estudio. En la práctica, los médicos utilizan los valores del CMF para tratar a los pacientes con enfermedades infecciosas cuya defensa del huésped puede estar significativamente disminuida, sobre todo en pacientes que reciben terapia anticancerosa o inmunosupresora ya que los hongos patógenos oportunistas aprovechan esas condiciones.

1.9. SENSIBILIDAD DEL MICROORGANISMO

Ante una enfermedad transmisible, la identificación de un patógeno específico es de suma importancia para el epidemiólogo de un hospital o el trabajador de salud público. La identificación de un microorganismo que ha sido aislado en una muestra clínica a menudo beneficia al paciente al identificar en forma precisa una enfermedad hasta entonces incierta y ayuda a la elección inicial de la terapia con antibióticos.¹⁰



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en la provincia de Arequipa, la muestra vegetal fue obtenida en la zona de monte rivero del anexo de Sogay, del distrito de Yarabamba, en el mes de mayo del año 2016 y los ensayos se ejecutaron en el laboratorio de farmacognosia (H-103, 104) de la Universidad Católica de Santa María y en los laboratorios de microbiología de la Universidad Nacional de San Agustín Arequipa.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material biológico

2.2.1.1. Especie Botánica

- Hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”

2.2.1.2. Bacterias patógenas

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomona aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Salmonella typhi*
- *Pseudomona aeruginosa*

2.2.1.3. Hongos:

- *Cándida albicans*
- *Microsporum sp.*

Las bacterias patógenas y los hongos fueron obtenidos del laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín.

2.2.2. Material de laboratorio

2.2.2.1. Material de vidrio

- Baguetas
- Matraces de vidrio 100, 500 y 1000 mL.
- Placas Petri de vidrio de 100mm x 15mm
- Probeta graduada de: 50 y 100mL
- Tubos de ensayo
- Fiolas (5,10, 25, 100, 250 mL)
- Beakers (50, 100, 250, 1000 mL)
- Tubos Eppendorf (1.5 mL)
- Celdas espectrofotométricas
- Placas Petri
- Vasos de precipitado
- Pipetas graduadas (1, 2, 5, 10 mL)
- Frascos Ámbar de 100, 250, 1000 mL

2.2.2.2. Equipos y aparatos de Laboratorio

- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Contómetro de colonias.
- Estufa-esterilizadora.
- Estufa-incubadora.
- Mechero Bunsen
- Micro pipetas de 1000 μ l, 100 μ l, 50 μ l
- Refrigeradora.
- Cámara Cromatográfica de Capa Fina
- Lámpara de luz Ultra violeta
- Equipo de extracción Soxhlet

2.2.2.3. Otros accesorios

- Algodón estéril
- Asa de Kohl
- Cámara fotográfica
- Espátulas
- Gasas estériles.
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes quirúrgicos estériles.
- Lápiz marcador
- Papel filtro rápido
- Papel filtro Whatmann Nro. 1 de 1 mm de espesor
- Guantes de látex
- Hisopos estériles
- Regla o vernier
- Papel aluminio
- Plumón marcador
- Mascarilla

2.2.3. Reactivos

- Éter de petróleo
- Agua destilada
- Agar Mueller Hinton
- Agar Triptosa
- Agar Micobiotico
- Caldo Peptonado
- Caldo Sabouraud
- Radical 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
- Acetato de etilo
- Cloroformo
- Cloruro férrico
- Cloruro de aluminio
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Tolueno
- Reactivo Trolox
- Reactivo DPPH
- Alcohol metílico calidad
- Alcohol etílico 96°
- Reactivo de Dragendorff

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Preparación y obtención de la muestra.

- **Recolección del material vegetal:**

Las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Hierba santa” fue recolectada en horas de la mañana en el anexo de Sogay, del distrito de Yarabamba, provincia de Arequipa,

región Arequipa. Con las coordenadas de $16^{\circ} 34' 5.50''$ latitud sur. $71^{\circ} 26' 21.14''$ longitud oeste, a la altitud de 2460 m.s.n.m. El material vegetal fue seleccionado teniendo en cuenta la consistencia y vigorosidad de la planta.



FIGURA N°2. : Mapa de ubicación de la zona de muestreo en el pueblo tradicional de Sogay.

○ **Selección**

Luego de recolectar el material biológico se procedió a seleccionar las hojas que se encontraban en buen estado y eliminándose las hojas dañadas, partidas, marchitas, y podridas, seguidamente fueron lavadas con agua destilada, para arrastrar impurezas como polvo, residuos extraños y ectoparásitos.



FIGURA N°3: Hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

○ **Estabilización y Dsecación**

Con el propósito de inactivar enzimas que pueden provocar un deterioro enzimático afectando la estabilidad de sustancias activas presentes en las hojas, se procedió a la estabilización del material fresco en la estufa a 80°C por un tiempo de 4 a 5 minutos. Finalmente para poder ser desecado completamente, se dejó a las hojas a temperatura ambiente durante 5 días, en un ambiente cerrado protegido de la luz y los rayos solares, bien aireado para así asegurar una buena conservación de la planta, para su posterior trabajo en el laboratorio.

○ **Molienda y almacenamiento.**

Una vez obtenidas las hojas secas se las pasó por un tamiz de 16/1. 25mm tamaño de poro, para evitar cualquier partícula adicional que haya podido contaminar las hojas; luego se realizó la trituración en un mortero de porcelana, en donde se trituro la mayor cantidad de material vegetal, adicionalmente con el fin de obtener un tamaño fino adecuado, se usó un molino extractor de cuchillas, con el cual, a través de moliendas repetidas se lograría un grado de pulverización moderado y homogéneo con el propósito de incrementar la superficie de contacto

para el momento de la extracción con el solvente facilitando de esta manera la obtención de los principios activos. Este material se conservó en envase de vidrio de boca ancha con cierre de tapa. Disponiéndose en el envase debidamente rotulado para su posterior uso de las hojas.

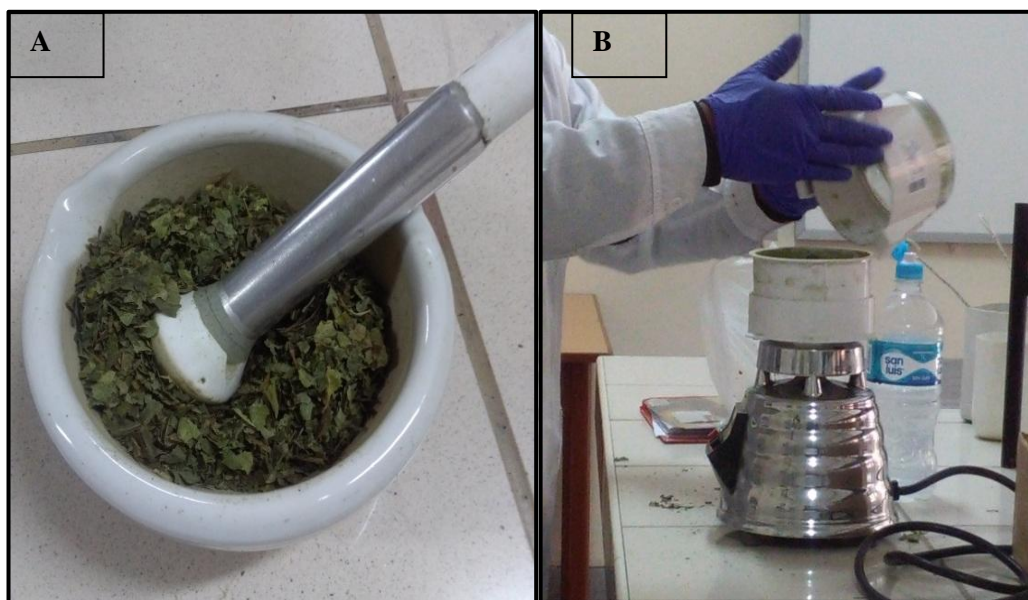


FIGURA N°4: Molienda de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

A: Trituración por mortero, **B:** Pulverización por molienda de cuchillas.



FIGURA N°5: Pulverización de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

2.3.2. Obtención del Extracto

○ **Extracto etanólico por Soxhlet:**

- **Método:** extracción con disolvente continuo por Soxhlet
- **Fundamento:**

Se fundamenta en la extracción continua de una muestra por medio de un solvente apropiado a ebullición, este es un sistema cerrado porque permite el flujo de solvente en ciclos. El equipo Soxhlet consta de tres partes: un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón donde se coloca el solvente y se somete a ebullición; la segunda parte consta de un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro; finalmente la tercera parte es un refrigerante o también llamado condensador el cual es el que recibe los vapores del solvente que viene desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente, entrando en contacto con el material vegetal. Cuando el soporte que mantiene el material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa espontáneamente un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continua la ebullición, cada llenada de solvente en el soporte de muestra es un ciclo y puede repetirse varios ciclos hasta el agotamiento de la muestra.²⁰

▪ **Procedimiento :**

Para la extracción se procedió a pesar y empaquetar 20 gramos de material vegetal desecado y pulverizado en hojas de papel filtro llamados cartuchos y fueron colocados en el extractor, seguidamente se colocaron en el balón del equipo de extracción 250 mL de alcohol al 96% como solvente. Se procedió a armar el equipo de Soxhlet para iniciar los ciclos continuos hasta el agotamiento del material vegetal por el solvente. Este proceso de extracción se mantuvo aproximadamente 6 horas.

Finalmente transcurrido este lapso de tiempo se desarmó el equipo dejando previamente que enfrié, obteniéndose el extracto alcohólico.



FIGURA N°6: Extracción por Soxhlet de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

- **Obtención del extracto alcohólico seco a partir del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.:**

- **Método:** Evaporación
- **Fundamento:**

Se basa en la obtención del extracto seco a partir de la separación del exceso de solvente y del principio activo aplicándose una temperatura adecuada.⁵⁵ Para ello se somete el extracto a Baño María, hasta la evaporación total del solvente, quedando suspendido en el fondo del recipiente el principio activo que se desea obtener.

- **Procedimiento:**

Obtenido el extracto por el método de Soxhlet se colocó en un vaso precipitado previamente pesado, seguidamente se llevó a baño maría a

60°C para la evaporación del solvente hasta la aparición del residuo con peso constante. La obtención del extracto de aspecto pastoso por estar constituido de principios activos mucilaginosos, grasas y aceites vegetales, se procedió a realizar lavados con hexano para la extracción de mucilagos, aceites, grasas por un lapso de 5 minutos y posteriormente fue llevado a estufa a 25°C para su evaporación completa. Al término del cual se procedió a determinar el porcentaje del rendimiento del extracto seco. Almacenado y protegido para evitar su contaminación. El procedimiento de Extracción se realizó por triplicado y se promediaron para los valores de rendimiento obtenidos en dichas extracciones.

El porcentaje de rendimiento se determinó por diferencia de pesada y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RENDIMIENTO} = \frac{\text{Peso de extracto seco}}{\text{Peso de planta seca}} \times 100\%$$

2.4. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Se realizó un análisis organoléptico del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Para este análisis se toma en cuenta los siguientes caracteres: color, sabor, olor y aspecto, además, de la medición del ph mediante un pH-metro.

2.5. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Como fase estacionaria FE se empleó placas de sílicagel y las medidas de 30 x 20cm, de una placa entera de sílica se dividieron en 20 plaquitas de 3x10 cm y en cada una de ellas se trazó 1cm en la parte horizontal del borde superior e inferior. Luego se procedió a realizar los sembrados correspondientes del extracto a cada placa utilizando capilares para dicha operación, finalmente se colocó las placas sembradas en los diferentes solventes para el estudio de los diversos componentes

presentes, en algunos casos se utilizaron compuestos reveladores y el uso de la lámpara de luz ultravioleta. Finalmente se determinó los valores de RF para cada componente identificado.

2.5.1. Corrida general

Fase móvil: Acetato de etilo: metanol: agua (97:11:8)

Fase estacionaria: Placa de sílicagel 3x10 cm con bordes marcados superior e inferior para realizar el sembrado usando capilares.

Muestra: Se tomó el extracto alcohólico con capilares para el sembrado con mucho cuidado y limpieza, se realizó una siembra en banda por de 3 a 7 veces.

Desarrollo: La placa sembrada se colocó en una cubeta hasta que el solvente ascienda hasta 1cm del borde superior

Detección: Se retiró la placa de la cubeta y se reveló con una solución de vainillina 1% y ácido sulfúrico al 5%, se dejó secar y se observó a UV 254 nm.

Determinación de RF: Para el cálculo de RF se observó las manchas características de los metabolitos secundarios existente en la parte superior de verde, amarillo y principalmente manchas de color marrón.

2.5.2. Identificación de flavonoides

Fase móvil: N-butanol: Ácido acético: agua (7:1.5:1.5)

Fase estacionaria: Placa de sílicagel 3x10 cm con bordes marcados superior e inferior para realizar el sembrado usando capilares.

Muestra: Se tomó el extracto alcohólico con capilares para el sembrado con mucho cuidado y limpieza, se realizó una siembra en banda por 5 a 8 veces.

Desarrollo: La placa sembrada se colocó en una cubeta hasta que el solvente ascienda hasta 1cm del borde superior

Detección: Se retiró la placa de la cubeta y se reveló con una solución alcohólica de cloruro de aluminio 1%, se dejó secar y se observó a UV 254 nm.

Determinación de RF: Para cálculo del RF se observó las manchas características que presentan los flavonoides, en este caso son las manchas de color azul revelado en la cámara ultravioleta.

2.5.3. Identificación de taninos

Fase móvil: Metanol: agua (80:20)

Fase estacionaria: La placa sílicagel 3x10 cm con bordes marcados superior e inferior para realizar el sembrado usando capilares.

Muestra: Se tomó el extracto alcohólico con capilares para el sembrado con mucho cuidado y limpieza, se realizó una siembra en banda por 4 a 7 veces.

Desarrollo: La placa sembrada se colocó en una cubeta hasta que el solvente ascienda hasta 1cm del borde superior

Detección: Se retiró la placa de la cubeta y se reveló con cloruro férrico 1% en agua, se seca y se observó a UV 254 nm.

Determinación de RF: Para cálculo del RF se observó las manchas características que presentan los taninos, en este caso son las manchas de color oscuro frente al revelador.

2.5.4. Identificación de terpenos

Fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo (90:10)

Fase estacionaria: Placa sílicagel 2x10 cm con bordes marcados superior e inferior para realizar el sembrado usando capilares.

Muestra: Se toma el extracto alcohólico con capilares para el sembrado con mucho cuidado y limpieza, se realizó una siembra en banda por 7 veces.

Desarrollo: La placa sembrada se colocó en una cubeta hasta que el solvente ascienda hasta 1cm del borde superior

Detección: Se retiró la placa, se seca al medio ambiente, se reveló con reactivo Lieberman Bourchad y se observó a UV 254 nm.

Determinación de RF: Para cálculo del RF se observó las manchas características que presentan los terpenos, en este caso son las manchas de color rosa, amarillo oscuro, fucsia y violáceo.

2.5.5. Identificación de alcaloides

Fase móvil A: Acetato de etilo: Metanol (80:20)

Fase estacionaria: Placa sílicagel 3x10 cm con bordes marcados superior e inferior para realizar el sembrado usando capilares.

Muestra: Se tomó el extracto alcohólico con capilares para el sembrado con mucho cuidado y limpieza, se realizó una siembra en banda por 8 veces.

Desarrollo: La placa sembrada se colocó en una cubeta hasta que el solvente ascienda hasta 1cm del borde superior

Detección: Se retiró la placa de la cubeta y se reveló con reactivo de Dragendorff, se seca y se observó a UV 254 nm.

Determinación de RF: Para cálculo del RF se observó las manchas características que presentan los alcaloides, en este caso frente al revelador no presento variación.



FIGURA N°7: Corrida en placa de sílicagel del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

2.6. Ensayo y determinación de la actividad antioxidante

2.6.1. Determinación de la actividad antioxidante por el método de Trolox.

Este método espectrofotométrico es muy empleado para determinar la actividad inhibitoria de radicales libres, el monitoreo de la decoloración de una solución del radical 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La reducción del radical se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica.

En su forma radical, el DPPH• absorbe a 517 nm (color púrpura) y cuando sufre reducción por un antioxidante, su fundamento consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración dada. En consecuencia, la disminución de la absorbancia de la solución de DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales libres.²⁶

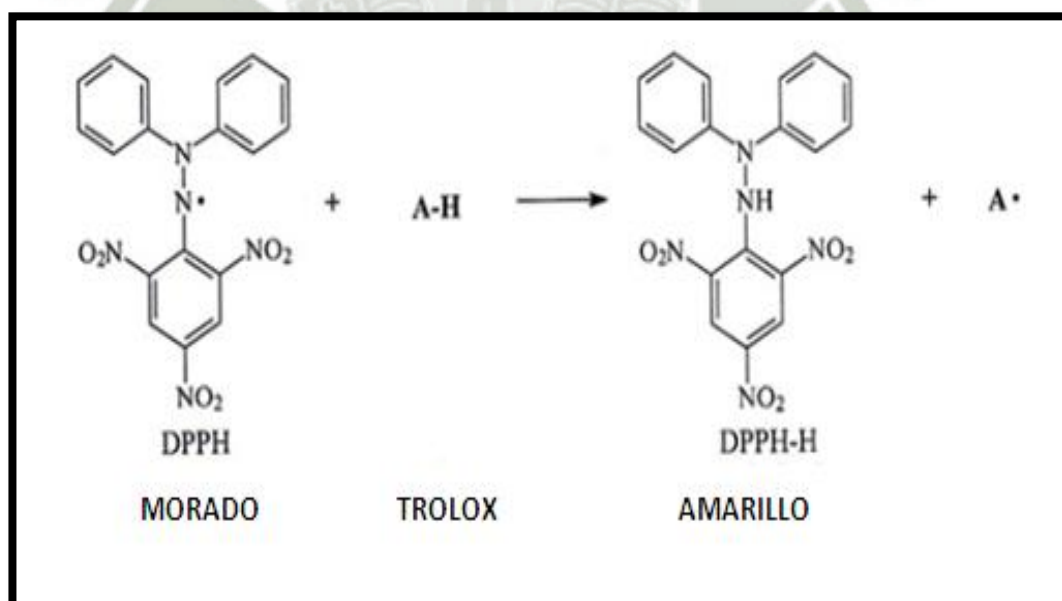


FIGURA N°8: Reacción por el reactivo de DPPH frente a Trolox

- **Solución de Trolox (curva de Calibración)**

Se pesó 12.53 mg de reactivo de Trolox con 10 ml de etanol en una fiola. Para su primera disolución seguidamente se llevó a un volumen de 50 ml, obteniendo una solución madre de 1 mM. A partir de estas soluciones se preparó los 10 diferentes estándares de Trolox en etanol (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μM).

TABLA N° 1. Preparación de los estándares de Trolox

	St 1	St2	St3	St4	St5	St6	St7	St8	St9	St10
Solución de Trolox (mL)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4	4.5	5
Etanol (mL)	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5
Concentración (μM)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000

- **Solución DPPH**

Se preparó la solución de DPPH en una fiola a una concentración de 0.1 mM en Etanol. Se pesó 3.90 mg de reactivo y se disolvió en 100 ml de solvente. (PMDPPH= 394.32 g/mol)

Se tomó 0.05 ml de cada estándar preparado, se adiciono 1 ml de solución de DPPH y 1 ml de etanol. Pasado los 30 minutos en oscuridad, las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 517 nm por espectrofotometría.

- **Ensayos con muestras**

Se tomaron 0.5 ml de solución del extracto, se adiciono 1 ml de solución de DPPH y 1 ml de etanol. Se homogenizo la muestra y se dejó reposar en la oscuridad. Pasado 30 minutos la muestra fue leída a una longitud de onda de 517 nm por espectrofotometría. Este procedimiento se realizó por triplicado.

TABLA N°2. Esquema del procedimiento para la determinación antioxidante por el método DPPH

Concentracion (μ M)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Estándares Trolox(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solución de DPPH 0.1mM (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Etanol 96° (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

TABLA N°3. Esquema del procedimiento para la curva de calibración

	1er Ensayo	2do Ensayo	3er Ensayo
Muestra (mL)	0.5	0.5	0.5
Solución de DPPH 0.1 mM (mL)	1.0	1.0	1.0
Etanol 96° (mL)	1.0	1.0	1.0

2.7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico

La evaluación de la CMI, se realizó por observación visual después de las 24 horas de incubación, la cual se tomó a partir del primer tubo que no presente turbidez.

2.7.1. Método de Dilución en caldo

Las pruebas de macro dilución en caldo, fueron usadas para determinar la concentración mínima inhibitoria antibacteriana necesaria para inhibir el crecimiento de un microorganismo.¹⁹

- **Preparación del inóculo:**

Se tomó 5 colonias de las Placas Petri conteniendo la bacteria a evaluar, para posteriormente ser diluidas en 5ml de caldo Peptona hasta alcanzar la turbidez equivalente a 0.5 de la Escala Mac Farland, la cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL. De esta solución se tomó 100 μ L y se inoculó en cada uno de los tubos.²⁶

- **Dilución del extracto alcohólico:**

En un tubo de ensayo se colocó 1400mg de extracto seco al cual se le agregó 7ml de caldo Peptona y se homogenizó, obteniendo una solución madre con una concentración de 200 mg/ml. Seguidamente se preparó una batería de 5 tubos, donde los 5 tubos contuvieron 1ml de caldo de Peptona cada uno, el 5to tubo se utilizó como control positivo de crecimiento.

Se tomó 1ml de la solución madre preparada y se colocó en el tubo 1 y de este se tomó un ml y se colocó al siguiente y así sucesivamente hasta el tubo 4, desechando el sobrante de este último tubo. De esta manera se obtuvo un rango de concentración de extracto de 100,50, 25, 12.5 mg/ml.

Para la determinación CMI se realizó un análisis cualitativo, el cual ha sido detallado en Tablas.

TABLA N°4: Valores tomados para el cálculo de la solución madre del extracto alcohólico

TUBO	CANTIDAD
Extracto alcohólico seco	1400 mg
Caldo Peptona	7000 μ L
Volumen final	7000 μ L
Concentración final	200mg/mL

TABLA N°5. Valores calculados para hallar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico para *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Cándida albicans*.

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	C
concentración (mg/mL)	100	50	25	12.5	0	0
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	C(+)	C(-)
Repeticiones	3	3	3	3	3	3
Extracto (μ L)- solución madre (200 mg/mL)	1000	500	250	125	-	1000
Caldo Peptona (μ L)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Volumen final (μ L)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Inoculo con la respectiva bacteria (100 μ L)	100	100	100	100	100	-

- **Unidad experimental:**

La unidad experimental fue de un tubo de ensayo de 13 por 100 mL, el cual contuvo, 1 mL del extracto alcohólico, 1 mL de caldo Peptona y finalmente 100uL del inoculo con las bacterias correspondientes.

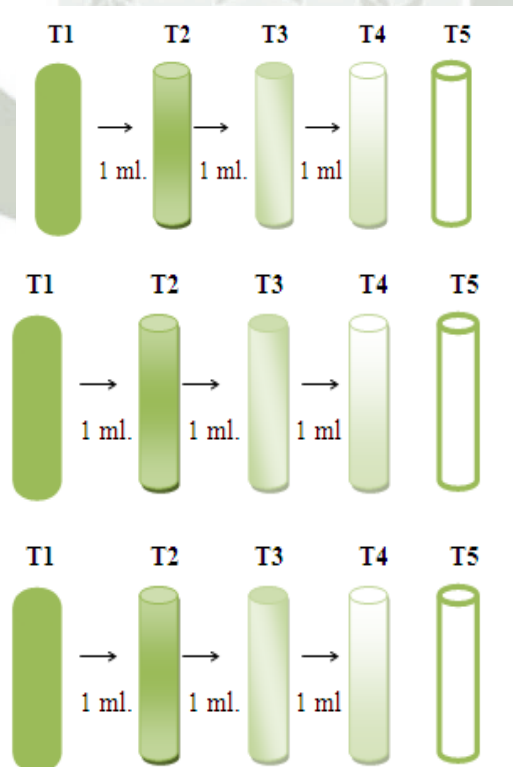
- **Tratamientos:** Para el extracto alcohólico:

- T1=100mg/mL extracto alcohólico
- T2=50mg/mL extracto alcohólico
- T3=25mg/mL extracto alcohólico
- T4=12.5mg/mL extracto alcohólico
- T5=control positivo
- T6=control negativo

Para el control negativo solo se utilizó un tubo general para cada repetición y no por cada microorganismo.

- **Repeticiones:** Se realizó 3 repeticiones por cada bacteria y levadura.

Croquis:



- **Evaluación y registro:**

Para determinar la CMI se incubó cada unidad experimental durante 24 horas a 37°C, finalizado este tiempo se observó la ausencia o presencia de la turbidez, tomando como CMI a la concentración en la cual el tubo incubado no presento turbidez.

- **Metodología específica para el hongo filamentoso**

Para el hongo *Microsporum sp.* Se realizó la siguiente modificación de la técnica realizada para las bacterias y la levadura. En la realización de la solución madre el único cambio en la metodología es que la solución se preparó con agua estéril ya no en caldo Peptona, el otro cambio ocurre en la preparación de la batería, ya que se va utilizar caldo Saboraud tanto para alcanzar la turbidez equivalente de 0.5 de la Escala Mac Farland y como base de la batería en lugar del caldo Peptona. Además se dejó la batería solo a temperatura ambiente no fue llevado a la incubadora y su evaluación fue después de 3 días.

TABLA N°6. Valores calculados para hallar el efecto inhibitorio antifungico del extracto alcohólico para *Microsporum sp.*

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	C
concentración (mg/mL)	100	50	25	12.5	0	0
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	C(+)	C(-)
Repeticiones	3	3	3	3	3	3
Extracto (µL)- solución madre (200 mg/mL)	1000	500	250	125	-	1000
Caldo Saboraud (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Volumen final (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Inoculo con el respectivo hongo (100 µL)	100	100	100	100	100	-

2.8. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida y Fungicida

Para determinar la CMB se procedió a sembrar en placa el contenido de todos los tubos que se trabajaron en la prueba de la CMI en caldo Peptona, seguidamente se llevó la placa a la incubadora.

Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida y Fungicida se realizó un análisis cualitativo.

- **Unidad experimental:**

La unidad experimental consto de una cuarta parte de una placa petri de 15x100mL, la cual contuvo aproximadamente 20mL de agar Triptosa y un inoculo de los tubos de CMI, sembrado por agotamiento.

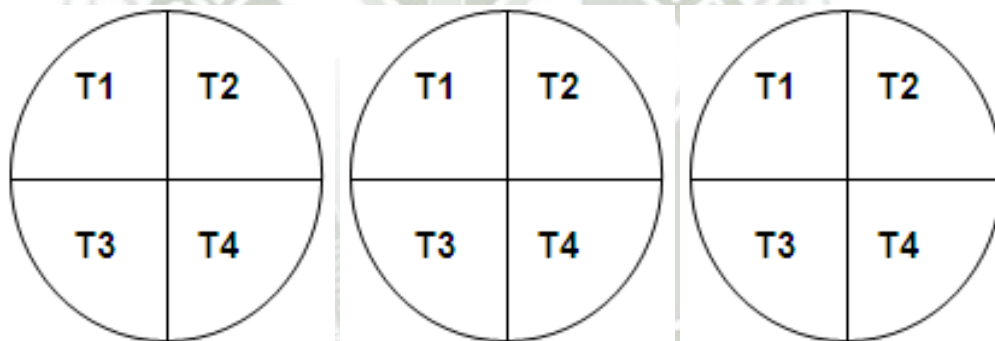
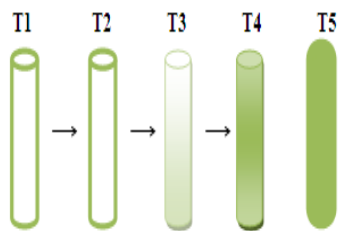
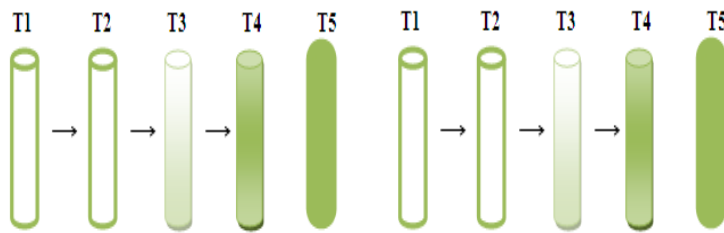
- **Tratamientos:**

- T1=100mg/mL extracto alcohólico
- T2=50mg/mL extracto alcohólico
- T3=25mg/mL extracto alcohólico
- T4=12.5mg/mL extracto alcohólico
- T5=control positivo

- **Repeticiones:**

Se realizaron 3 repeticiones por cada bacteria y levadura.

- **Croquis :**



- **Evaluación y registro:**

Para determinar la concentración mínima bactericida se incubó cada unidad experimental dentro de 24 horas a 37°C, finalizado este tiempo se observó la ausencia o presencia de crecimiento tomando como CMB a la concentración en la cual la placa incubada no mostro crecimiento.

- **Metodología específica para los hongos:**

La modificación en la metodología consistió en cambiar el agar de la placa de siembra, en lugar del agar Triptosa; para *Cándida albicans* se usó agar Saboraud y para el *Microsporium sp.* Se utilizó agar Micobiotico. La otra modificación

corresponde solo para *Microsporum sp.*, cambia el tiempo de crecimiento y el medio para este crecimiento; primero la placa ya sembrada por agotamiento se la dejo a medio ambiente para su incubación y se esperó hasta que *Microsporum sp.* Logré su crecimiento, aproximadamente de 7 a 9 días para hacer la lectura.

2.9. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana y antifúngica

Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana y antifúngica se utilizó el método Kirby Bauer modificada, sustituyendo el disco de papel por hoyos. En cada hoyo se colocó 50µL de extracto correspondiente y se realizó la evaluación luego de 24 horas de haber sido colocada en la estufa.²⁶

2.9.1. Método de excavación placa-cultivo

- **Preparación del inóculo**

Se tomó 5 colonias de las placas petri para posteriormente ser diluidas en 5mL de agar Muller Hinton hasta alcanzar la turbidez equivalente a 0.5 de la escala Mac Farland, la cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/ml.²⁶ Para la siembra se utilizó un hisopo estéril.

- **Medio de cultivo**

Se ha seleccionado como medio de cultivo estándar el agar Muller Hinton ya que este promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Él medio tendrá de alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.²⁶

- **Preparación de los hoyos**

En placas petri conteniendo agar Muller Hinton se perforaron los hoyos haciendo uso de una pipeta Pasteur estéril de 5mm de diámetro.²⁶

- **Reparto de extracto**

En cada hoyo se agregaron 50µl de las diferentes concentraciones 100,50,25,12.5 mg/ml de extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* disuelto en caldo Peptona a través de una solución madre, se dejó secar por 30 minutos a medio ambiente antes de ser llevadas a incubación por 24 horas a 37°C para realizar su respectiva lectura e interpretación.

- **Unidad experimental:**

La unidad experimental constó de una placa Petri de 15x100ml, la cual contendrá aproximadamente 20ml del respectivo agar, además de 4 hoyos de 5mm de diámetro el cual contuvo 50µl de extracto, y esta placa fue sembrada con un hisopo estéril con la respectiva bacteria.

- **Tratamientos:**

Extracto-alcohólico

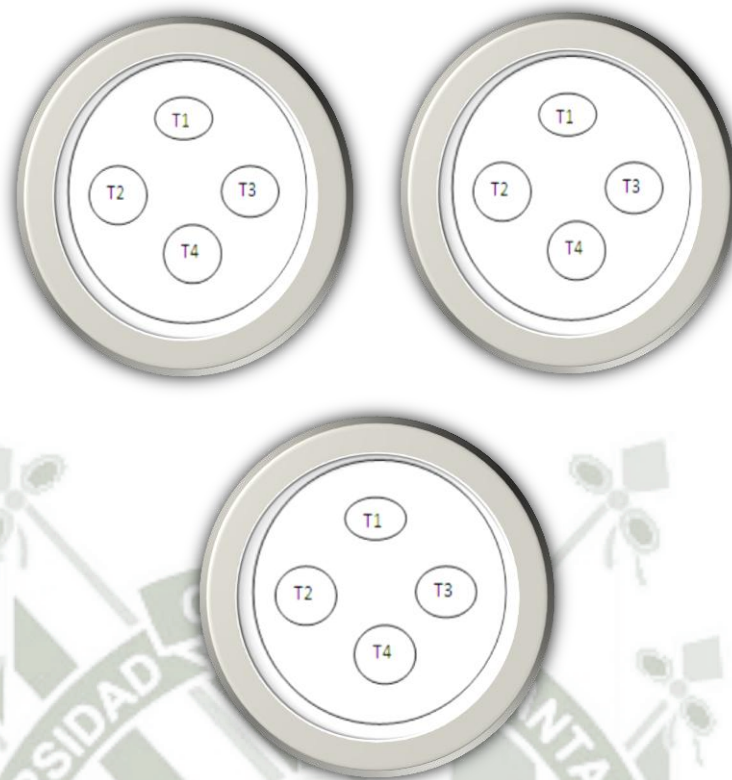
- T1=100mg/ml extracto alcohólico
- T2=50 mg/ml extracto alcohólico
- T3=25 mg/ml extracto alcohólico
- T4=12.5 mg/ml extracto alcohólico.

- **Repeticiones:**

Se realizaron 3 repeticiones por cada bacteria y levadura.

- **Croquis:**

Se realizaron en Placas Petri por cada bacteria en estudio de la siguiente forma:



- **Evaluación y registro:**

La sensibilidad antibacteriana se evaluó pasadas las 24 horas, donde se midieron los halos de inhibición con la ayuda de una regla, comparando las medidas registradas según su inhibición .

- **Metodología específica para los hongos**

La modificación en la metodología consistió en un cambio en la preparación del extracto ya que su dilución se realizó con agua estéril, luego se cambió el agar de la placa de siembra, en lugar del agar Muller Hinton; para *Cándida albicans* se usó agar Sabouraud y para el *Microsporium sp.* Se utilizó agar Micobiotico.

La otra modificación corresponde solo para *Microsporium sp.*, se hicieron los hoyos a la placa y se procedió a sembrar en la placa, se esperó hasta que el hongo tenga un mayor crecimiento de aproximadamente 3 días, recién se aplicó el extracto en sus diferentes concentraciones, la placa en todo momento se dejó a medio ambiente para

su incubación y se esperó hasta que *Microsporum sp.* logre su crecimiento total, aproximadamente de 7 a 9 días para la medida de los halos de inhibición.

2.10. ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS

2.10.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, prospectivo dado que permite establecer relaciones de causa a efecto. Además que usa un grupo experimental y de control, el investigador manipula el factor supuestamente causal, usa procedimientos al azar para la selección y asignación de sujetos y tratamiento.

2.10.2. ESTRATEGIA DE RECOLECCION

Recuento de unidades viables para el análisis microbiológico expresado en:

- **CMI:** Ausencia o presencia de turbidez
- **CMB:** Ausencia o presencia de Crecimiento
- **SENSIBILIDAD:** Medida del halo de inhibición

2.10.3. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza y por la prueba de “chi cuadrado” a un nivel de confianza del 95 %, utilizando el software Statgraphics Centurion XVII. Con el objetivo de determinar si existen diferencias en términos significativos y altamente significativos entre las concentraciones del extracto de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” sobre las bacterias y hongos patógenos.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS

En este capítulo se da a conocer los resultados obtenidos en la parte experimental desarrollando la metodología empleada en el capítulo anterior.

3.1. Obtención del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”.

Para la realización de esta investigación, se utilizaron las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”, que fueron llevadas a un proceso de desecación y pulverización, luego se procedió a la obtención del extracto alcohólico mediante el método de extracción Soxhelt, por ser una técnica que extrae un amplio rango de principios activos, evitando los inconvenientes principales de la extracción, como son tiempo y cantidad de disolvente consumido utilizado.

Los resultados que se observan en la Tabla N°7 son las características organolépticas del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”, siendo su aspecto líquido de color verde oscuro intenso por la presencia de la clorofila que es un pigmento verde las plantas, sabor amargo, olor característico de la planta y con ausencia de partículas extrañas. Se debe de indicar que los parámetros organolépticos no tienen estándares de referencia con los cuales se puede comparar, ya que estos tienen sus propias características dependiendo de cada especie. Además se encontró que el pH del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” a una temperatura de 20°C mediante el método instrumental directo fue de 5.15 que nos indica que nuestro extracto es un tanto ácido.

TABLA N°7. Características organolépticas del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”

PARÁMETROS	EXTRACTO
Aspecto	Líquido
Color	Verde oscuro
Olor	Sui géneris
Sabor	Amargo

3.1. Rendimiento

Una vez obtenida las hojas pulverizadas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”, se realizaron extracciones por el cual se empleó el método de extracción por Soxhlet. Se usó como solvente el etanol por su polaridad parecido al agua y grupo -OH (hidrófilo) disolviendo gran cantidad de sustancias polares. Aunque su parte hidrófoba lo cual es más grande puede disolver algunas sustancias no polares.

Los pesos del extracto etanólico seco se aprecia en la Tabla N°6 siendo un promedio de tres ensayos igual a 10.20g por cada 40g de planta seca pulverizada. Se obtiene un rendimiento de 25.50%. En comparación con el estudio realizado por Bornaz, N. (2007) donde estudio el “Efecto del extracto hidroalcoholico de la *Trapeolum tuberosum* “Mashua o Añu”, que trabaja con el mismo solvente que en nuestra investigación, encontró un rendimiento de 17.86% un porcentaje menor al obtenido en nuestra investigación, esto puede deberse a diversos factores, pero el más preponderante podría ser la variabilidad biológica y la diferencia de metabolitos secundarios que hay entre especies, además, que uso un método diferente para la concentración del extracto, el hace uso de lixiviación.

TABLA N°8. Resultados de la extracción por Soxhlet del *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”.

Ensayos	Peso obtenido g	% Rendimiento
Prueba N°1	10.27	25.68
Prueba N°2	11.57	28.93
Prueba N°3	8.76	21.90
PROMEDIO	10.20	25.50

3.2. Estudio fitoquímico preliminar en cromatografía de capa fina del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa".

Para evaluar la presencia de la mayoría de metabolitos secundarios en el extracto etanólico obtenido, se realizó un conjunto de pruebas preliminares basadas en el análisis por cromatografía en Capa fina; método que permite la separación e identificación de los principales componentes.

Mediante este estudio se podrá comprobar las posibles sustancias químicas presentes en la muestra. Cabe mencionar que las cromatografías realizadas no se utilizaron ningún tipo de Estándares de comparación, solo observando la corrida de cada muestra frente a los reveladores.

Según Villacís J, (2009) el extracto etanólico es el mejor método de extracción porque posee una mayor capacidad de extracción de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana, en su mayoría son compuestos con afinidad en solventes polares como lo es el etanol.

Los metabolitos secundarios son responsables de diversas acciones farmacológicas y una de ellas es la actividad antimicrobiana de los taninos, flavonoides y fenoles Valencia C. (1995), lo cual queda demostrado en investigaciones realizadas por Alzamora L. et al, (2001) y Añanca E. (2009).

- **Cromatografía en capa corrida general**

De acuerdo a la bibliografía revisada hay un sin número de fases móviles para utilizar en este ensayo, por lo que se decidió probar con la fase móvil: acetato de etilo: metanol: agua (97:11:8) una vez sembrada la muestra en respectivamente en la placa cromatográfica se puso en contacto con la fase móvil; transcurrida la corrida se esparció el revelador; con una solución de vainillina 1% y ácido sulfúrico al 5%, se dejó secar y se observó a UV 254 nm, obteniéndose en la placa de manchas de color verde, marrón oscuro a simple vista figura N°9, para la identificación de metabolitos secundarios.

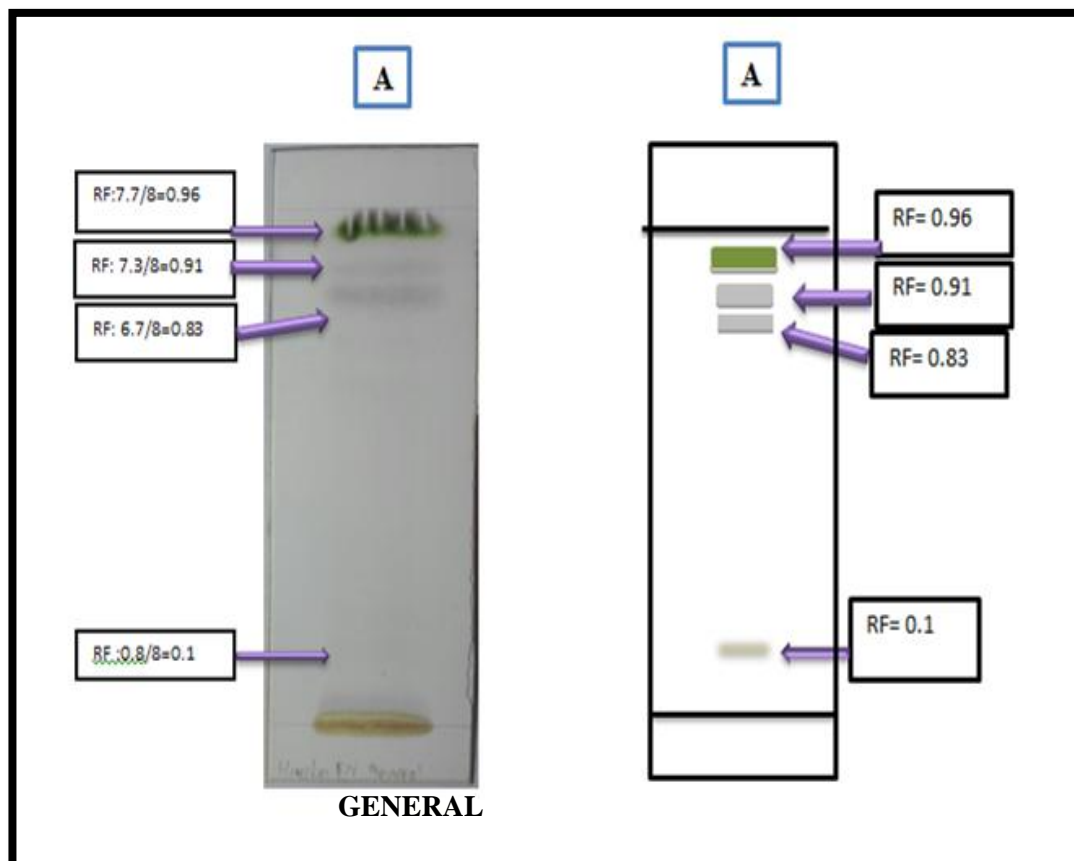


FIGURA N°9. Cromatografía de capa fina del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” para la identificación de metabolitos secundarios

A. Manchas a simple vista

Fase móvil A: Acetato de etilo: metanol: agua (97:11:8)

Revelador: Vainillina 1% y ácido sulfúrico al 5%

- **Cromatografía en capa fina flavonoides**

De acuerdo a la bibliografía revisada hay un sin número de fases móviles para utilizar en este ensayo, por lo que se decidió probar con la fase móvil: N-butanol: ácido acético: agua (7:1.5:1.5) una vez sembrada la muestra en respectivamente en la placa cromatográfica se puso en contacto con la fase móvil; transcurrida la corrida se esparció el revelador; obteniéndose en la placa de color amarillo y revelado a luz UV de onda larga manchas de color celeste fluorescente como se muestra en la figura

N°10, para la identificación de flavonoides. El resultado sugiere la presencia de flavonoides tipo flavonas, flavanonas, isoflavonas o flavonoles en el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”, ya que se puede observar sustancias que se han revelado durante el desarrollo de la Cromatografía. En esta cromatografía se usó la muestra de extracto alcohólico, empleando el reactivo revelador cloruro de aluminio al 1% la presencia de una mancha en la parte central superior con factor de referencia de la placa A: 0.92. Se presume la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y otras sustancias no identificadas.

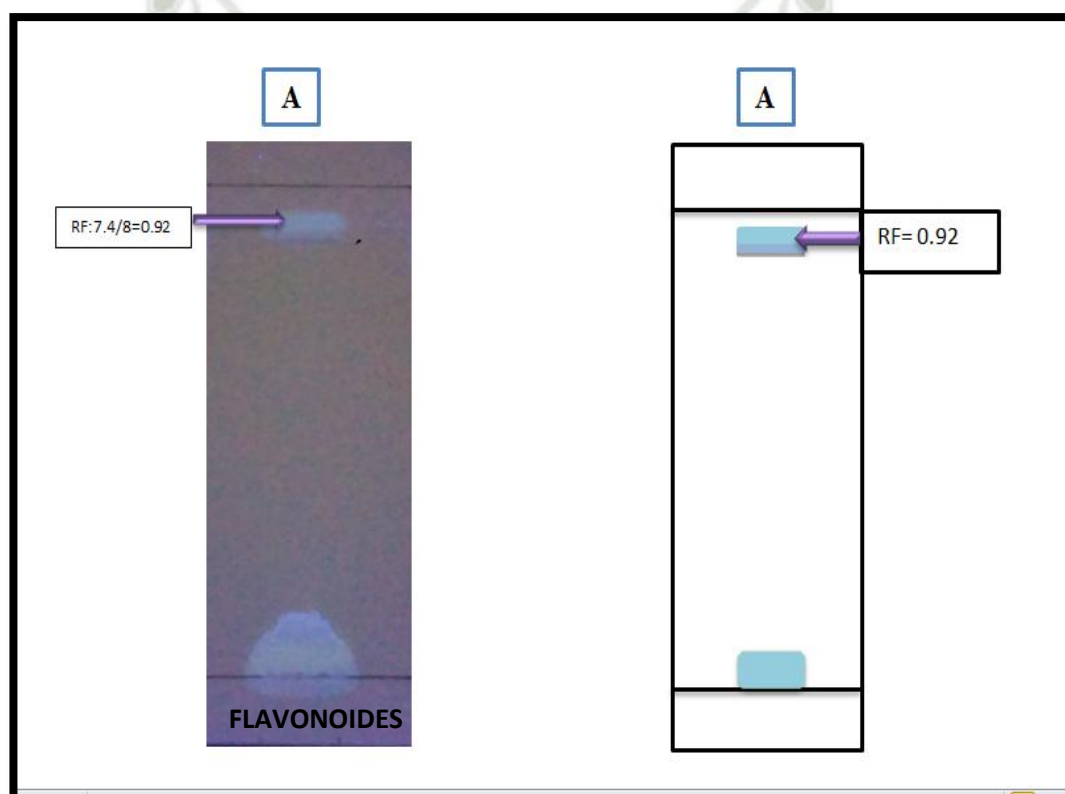


FIGURA N°10. Cromatografía de capa fina del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” para la identificación de flavonoides.

A. Mancha a luz ultra violeta 365 nm

Fase móvil A: N-butanol: Ácido acético: agua (7:1.5:1.5)

Revelador: Cloruro de Aluminio al 1%.

- **Cromatografía en capa fina taninos.**

Para la identificación de los compuestos fenólicos taninos en el extracto alcohólico existen diferentes fases móviles a utilizar se optó por usar la fase móvil para su identificación en el cromatograma; se utilizó: Metanol: agua (80:20), dando resultado que la fase móvil presenta con tres como se muestra en la Figura N°11. Usando como revelador cloruro férrico al 1%. El resultado sugiere la presencia de estos en el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”, ya que se puede observar manchas que se revelaron durante el desarrollo de la Cromatografía. La presencia de tres manchas en la parte central superior con factores de referencia. La placa A: no se encontró la presencia de ninguna mancha y la de placa B: 0.85, 0.68 y 0.33. Se presume la presencia de Taninos, compuestos fenólicos y otras sustancias no identificadas.

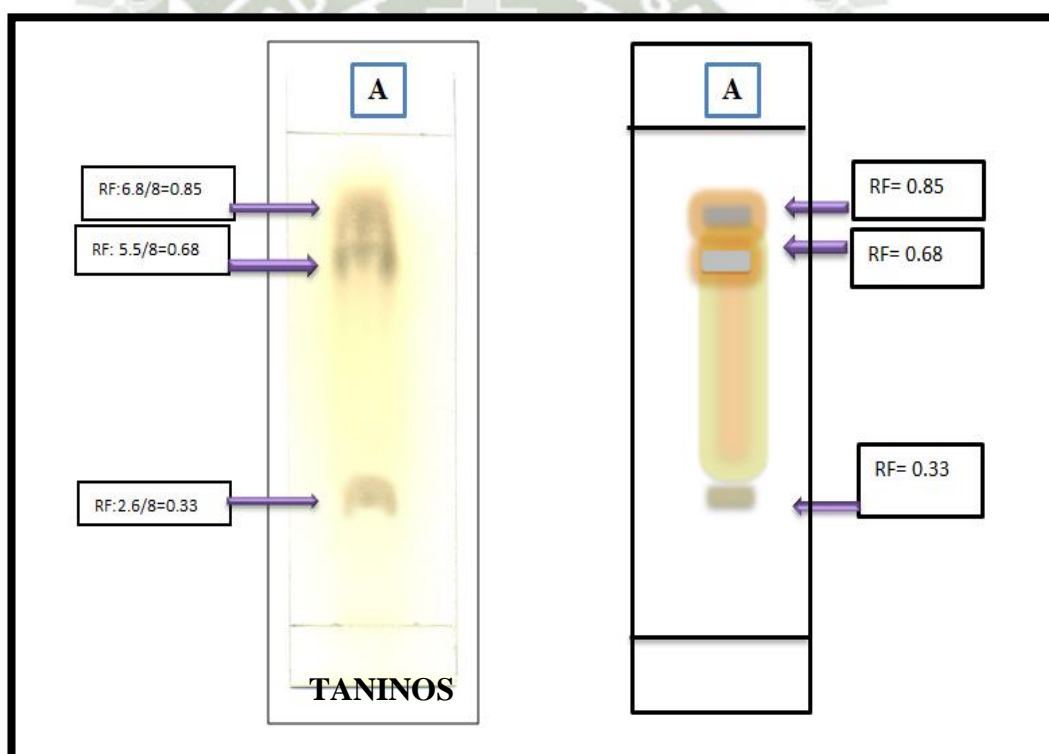


FIGURA N°11. Cromatografía de capa fina del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” para la identificación de taninos.

a. Mancha con revelador

Fase móvil: Metanol: agua: (80:20)

Revelador: Cloruro Férrico al 1%

- **Cromatografía en capa fina terpenos**

Para la identificación de terpenos usando el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* también se optó usar la fase móvil: Tolueno: Acetato de etilo (90:10), dando los siguientes resultados y empleando el revelador de Lieberman Bourchad como se muestra en la Figura N°12.

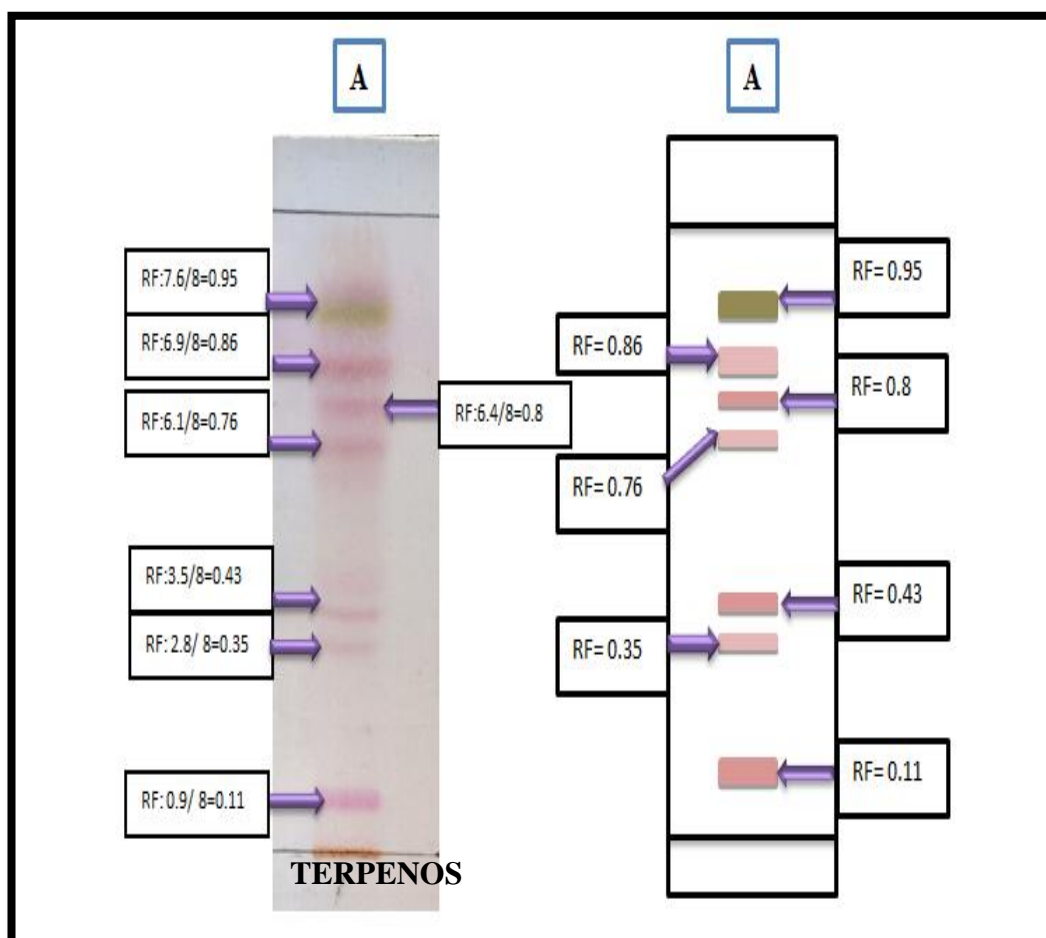


FIGURA N°12. Cromatografía de capa fina del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” para la identificación de terpenos.

a. Mancha con revelador

Fase móvil B: Tolueno: Acetato de etilo: Agua (90:10)

Revelador: Lieberman- Bourchad.

Para la identificación de terpenos del cual se sugiere la presencia de estos en el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum*, ya que se puede observar diferentes manchas marrones y rosadas características reveladas durante el desarrollo del Cromatograma en la parte central inferior y superior y con factores de referencia B: 0.95 0.86, 0.76, 0.8, 0.43 y 0.35. Se presume la presencia Monoterpenos y diterpenos por el viraje de su color y así también otras sustancias no identificadas.

- **Cromatografía en capa fina Alcaloides**

Para la identificación de los diferentes alcaloides existen diferentes fases móviles utilizadas por ser diversos los compuestos metabólicos para el desarrollo de estos se escogió usar la fase móvil empleada de Acetato de etilo: metanol (80:20) que se muestra en la Figura N°21.

El resultado presume la presencia de estos del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”, ya que se puede observar durante el desarrollo cromatográfico dos manchas características de estas sustancias que se puede observar a simple vista o también por luz UV a 254 nm.

En esta cromatografía se usó el reactivo revelador Reactivo de Dragendorff pero no hubo variación de color con las manchas observadas de acuerdo a bibliografía debería haber cambiado a color naranja dando como resultado negativo para alcaloides en este caso las hojas, pero en el fruto se puede encontrar según bibliografía la presencia de estos.



FIGURA N°13. Cromatografía de capa fina del Extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” para la identificación de alcaloides.

a. Mancha con revelador

Fase móvil A: Acetato de etilo: Metanol (80:20)

Revelador: Reactivo de Dragendorff.

3.3. Determinación de la Actividad Antioxidante por el método DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el método de DPPH, se basa en el uso del radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo de color violeta, que vira de color hasta amarillo ante la presencia de una sustancia antioxidante, este cambio es medido por espectrofotometría a 517 nm. Por diferencia de las absorbancias se determina el porcentaje de captación o de inhibición (% Inhibición). Para así conocer si el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa” tiene actividad antioxidante, se preparó una solución patrón de TROLOX de 1mM y una solución de DPPH de 0.1 mM ambas fueron preparadas en etanol y protegidos de la luz, para evitar alguna alteración. Seguidamente para la obtención del grafico de calibración se

preparó las soluciones a diferentes concentraciones en un rango entre 100 y 1000 [µmol/L] a partir de la solución madre (Trolox) completando la dilución con etanol, que reacciono con el reactivo DPPH, para dar distintas valores de absorbancia que pueden observarse en la siguiente tabla.

TABLA N° 9. Absorbancias para DPPH

La actividad antioxidante es expresada como el porcentaje de Inhibición o de captación del radical DPPH. En la siguiente Tabla N° 10 (anexos), se observan los valores obtenidos reemplazando la fórmula:

$$\% \text{ INHIBICION} = (1 - A_x/A_b) * 100$$

Dónde:

A_x= Absorbancia de la muestra A_b= Absorbancia de solución a Tiempo 0

TABLA N° 10. Datos de % INHIBICION para grafico de calibración

CONCENTRACION [µmol/L]	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
ABSORBANCIA PROMEDIO	0.48	0.46	0.42	0.39	0.37	0.34	0.31	0.27	0.23	0.21
% INHIBICION	9.16	13.39	19.78	25.03	29.40	35.65	42.22	48.55	55.49	60.36

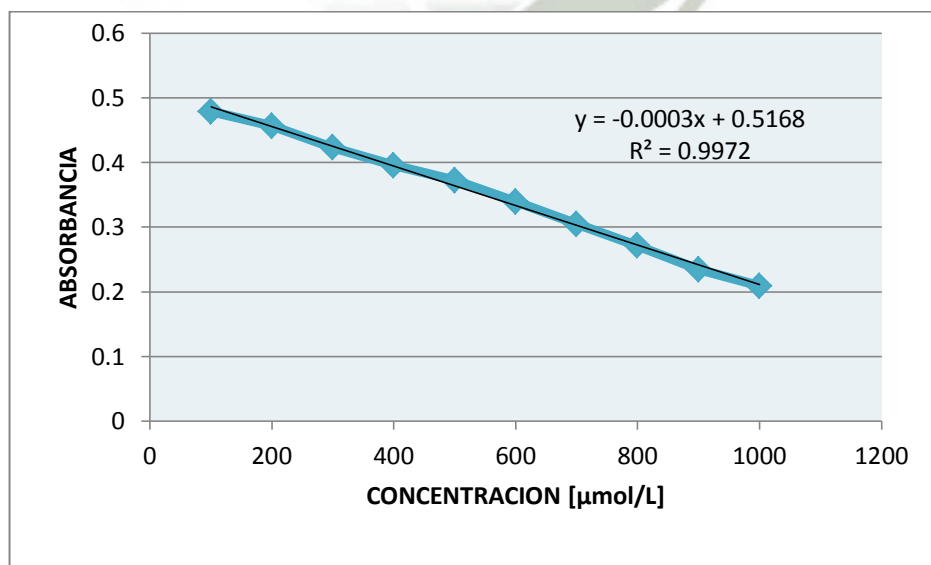
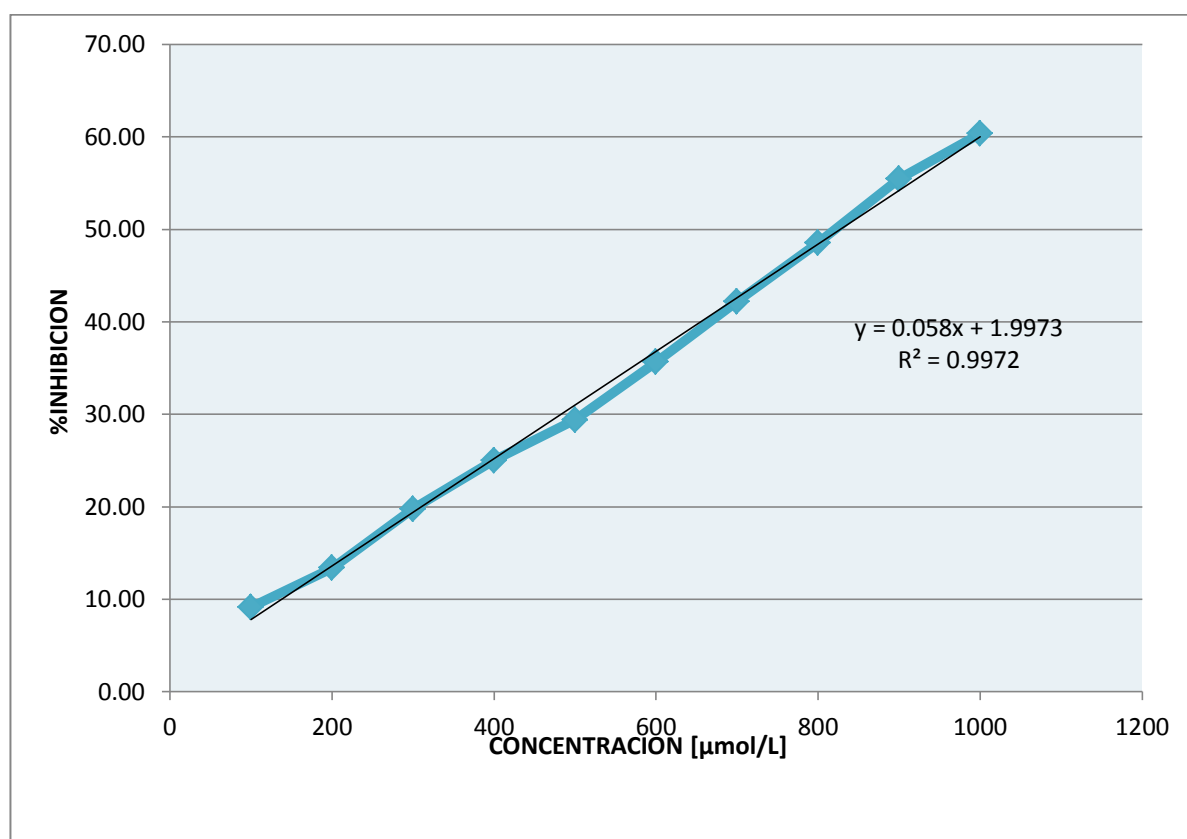


FIGURA N°14: Gráfico de Calibración con DPPH

En la Tabla N°10 observamos los datos de la gráfica de calibración en porcentaje de inhibición que se realizaron las pruebas por triplicado cada uno de ellos con coeficiente de relación y el promedio con resultados $r^2=0.997$ muy cercano a la unidad, lo que nos indica que es una buena relación entre las concentraciones trabajadas y que existe linealidad, estos resultados están convertidos usando la formula ya mencionada.

**FIGURA N°15:** Porcentaje de inhibición DPPH-Trolox

En la figura N°15 se observa la recta obtenida del porcentaje de inhibición frente a la concentración, obteniéndose en valor r^2 de 0.9972 cercano a la unidad, indicando linealidad, por lo tanto la ecuación con una pendiente (b) de 1.9973 y un intercepto (a) de 0.058 sirve de referencia para la realización de los cálculos correspondientes.



FIGURA N°16. Decoloración de la solución DPPH en presencia de Antioxidante.

Se observa en la Fig. N°21 como el color violeta de la solución de DPPH se va decolorando hasta llegar a un color amarillento que guarda relación inversa con la actividad antioxidante, es decir a mayor coloración menor actividad antioxidante y menor coloración violeta mayor actividad antioxidante. De acuerdo a los resultados del porcentaje de inhibición se indica la actividad antioxidante de la muestra; en la Tabla N°11 se observa que se realizó por triplicado la medición de la muestra del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" usando 0.2 gramos del extracto diluidos en 100 ml de etanol obteniendo una concentración del 0.2% del extracto.

TABLA N° 11. Porcentaje de inhibición de la muestra.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{mol/L}$)	ABS
749.65	0.281
754.14	0.279
756.27	0.278
PROMEDIO	0.279
% INHIBICIÓN	47.09

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó una técnica espectrofotométrica por (DPPH) hallando como resultado, que el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" posee actividad antioxidante, con un 47.09 % de inhibición obteniendo de este resultado 93.29 μmol equivalente Trolox por gramos de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba Santa" revelando la presencia de compuestos fenólicos del extracto.

El porcentaje de inhibición indica la actividad antioxidante de la muestra preparada al 2%, en la tabla se observa que se realizó por triplicado esta prueba dando como resultado que la muestra posee la actividad antioxidante más alta, con un % 47.09 el cual equivale a una concentración promedio de 100 μM de extracto puro y absorbancia promedio de 0.279, indicando una gran cantidad de compuestos fenólicos.

En comparación con el estudio realizado por Ramos, E. y col. (2008) donde estudio la "Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales Peruanas nativas e introducidas" encontrando en el extracto etanólico de canela la mayor capacidad antioxidante de su investigación con 97.59% de capacidad antioxidante, a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Nuestro resultado en comparación también presenta una gran capacidad antioxidante y ambos a la vez en comparación con el ácido ascórbico (vitamina C) que presento 92.82% en promedio.

Los resultados de la actividad antioxidante son expresados en porcentaje, indicándonos que existe una relación significativa entre la concentración y la capacidad antioxidante, como se puede ver también en nuestra investigación.

En el estudio realizado por Muñoz A. y col. (2007) al evaluar "la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales" concluye que la actividad antioxidante obtenida por el método DPPH esta correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos totales, siendo muy elevada para el Camú can, resultado que nos indica que nuestra planta en estudio presenta un gran contenido de compuestos fenólicos.

3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

TABLA N°12: Concentración Mínima Inhibitoria para *Streptococcus pneumoniae*.

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	-	+	+
CMI(2)	-	-	-	+	+
CMI(3)	-	-	-	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°12 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Streptococcus pneumoniae* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 25mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N° 24 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Streptococcus pneumoniae*, en comparación con los valores obtenidos por Gonzales, J. (2007) en su trabajo realizado empleando el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedell "chachacoma" donde obtuvo que para *S. pneumoniae* la CMI fue de 0.0125µl/mL., además de Pérez, et al. (2007) el cual evaluó el efecto antibacteriano producido por el extracto metanólico de *Phenax rugosus* obtuvo una CMI de 62ul/ml; Vilca, A. (2013) quien evaluó el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Glindelia tarapacaca* "chiri chiri" con un CMI de 6.25ul/mL siendo estos valores menores al obtenido en nuestro trabajo, aunque no se puede

establecer una comparación verdadera debido a la diferencia de las unidades en la concentración, pero en nuestra investigación se puede establecer que presenta un buen efecto a concentraciones bajas.

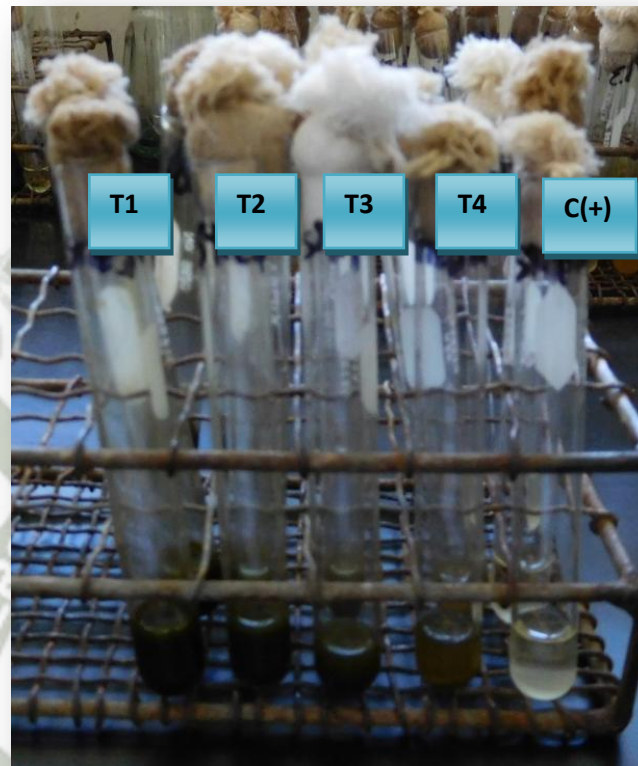


FIGURA N°17: CMI para *Streptococcus pneumoniae*.

TABLA N°13: Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus*.

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	-	+	+
CMI(2)	-	-	-	+	+
CMI(3)	-	-	-	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°13 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Staphylococcus aureus* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 25mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°18 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Staphylococcus aureus*, en comparación con los valores obtenidos de CMI por Pinto, X. (2007) el cual estudio la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a Gram positivas, donde detecto que la CMI fue de 3.12µL/mL. Así mismo Carvajal, C. y Quintero, M. (2012) en su estudio realizó empleando *Peperomiainae qualifolia* Ruiz & Pav. “Congona” su CMI fue de 31.25µL/mL, aunque no se puede establecer una comparación verdadera con nuestro trabajo debido a la diferencia de las unidades en la concentración, se puede establecer que nuestro extracto presenta un buen efecto a una baja concentración.

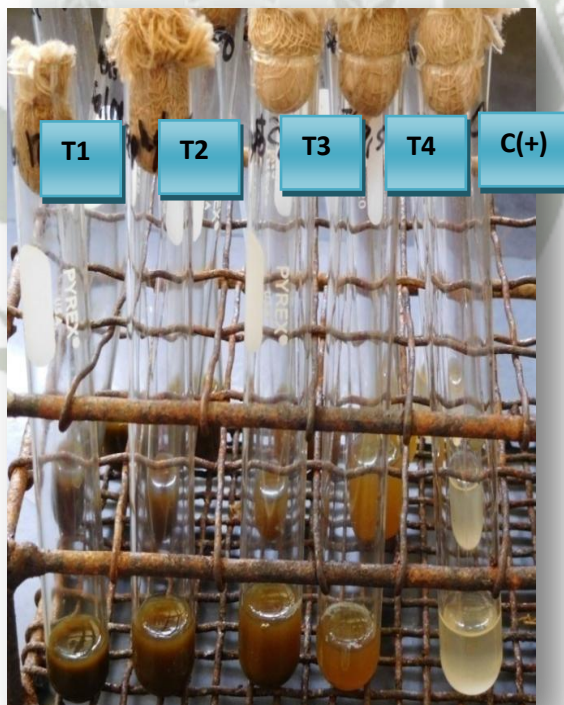


FIGURA N°18: CMI para *Staphylococcus aureus*.

TABLA N°14: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Cestrum auriculatum* L'HÉR. SOBRE LAS BACTERIAS GRAMPOSITIVAS.

GRAM	CEPA	CMI (mg/mL)	+	-	P(X)
+	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		control	3	0	0.00*
	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		control	3	0	0.00*

* (p<0.05)

En la Tabla N°18 se realizó un análisis de varianza para las tres repeticiones de cada concentración por cada cepa bacteriana indicando con “*” la significancia entre las tres repeticiones, además se halló que existe efecto estadístico significativo (p<0.05) en la Concentración Mínima Inhibitoria entre las distintas concentraciones presentadas del extracto de *Cestrum auriculatum* L'HÉR. “Hierba santa” sobre las bacterias Gram positivas *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.

TABLA N°15. Concentración Mínima Inhibitoria para *Escherichia coli*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	+	+	+
CMI(2)	-	-	+	+	+
CMI(3)	-	-	+	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°15 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Escherichia coli* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 50mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°19 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Escherichia coli* en comparación con los obtenidos por Bornaz, N. (2007) donde estudio el “Efecto del extracto hidro-alcohólico de la *Trapeolum tuberosum* “Mashua o Añu” frente a organismos uro patógenos” en este caso frente a *Escherichia coli* no encontró ningún efecto inhibitorio en ninguna de sus diluciones trabajadas; en nuestro trabajo si encontramos, esto puede deberse a una variabilidad de los metanolitos secundarios de cada planta; Pinto, X. (2007) el cual estudio la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “tomillo”; frente a *Escherichia coli* detecto que la CMI fue de 1.56uL/mL esto nos demuestra otra vez que dependiendo a los principios activos de cada planta se va encontrar un actividad antibacteriana , en nuestro caso lo atribuimos a los compuestos fenólicos presentes en nuestra planta como se puede observar en resultados anteriores.

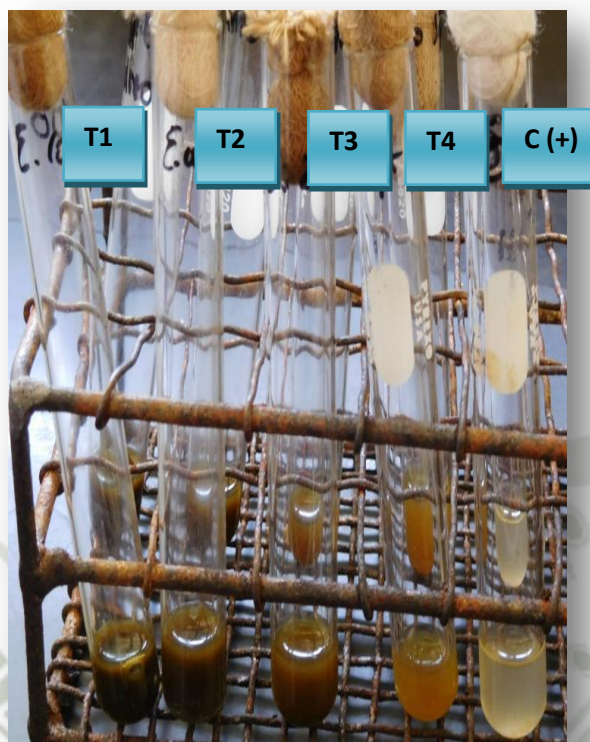


FIGURA N°19: CMI para *Escherichia coli*.

TABLA N°16: Concentración Mínima Inhibitoria para *Pseudomona aeruginosa*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	+	+	+
CMI(2)	-	-	+	+	+
CMI(3)	-	-	+	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°16 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Pseudomona aeruginosa* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 50mg/mL por ser la menor

concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°20 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Pseudomonas aeruginosa*, en comparación con los obtenidos por Larico, R. (2008) donde estudio “La evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” del *Alim sativum* Var. “Ajo” frente a bacterias Gram negativas multiresistentes aisladas de pacientes del hospital Goyeneche” en esta investigación frente a *Pseudomonas aeruginosa* fue de 500ug/ml una concentración menor a la de nuestra investigación, esto puede deberse a una variabilidad de los metabolitos de cada planta en el caso del *Alim sativum* Var. La presencia de la alicina un probado ya principio activo con gran actividad bactericida, en nuestro caso lo atribuimos a los compuestos fenólicos presentes en nuestra planta.

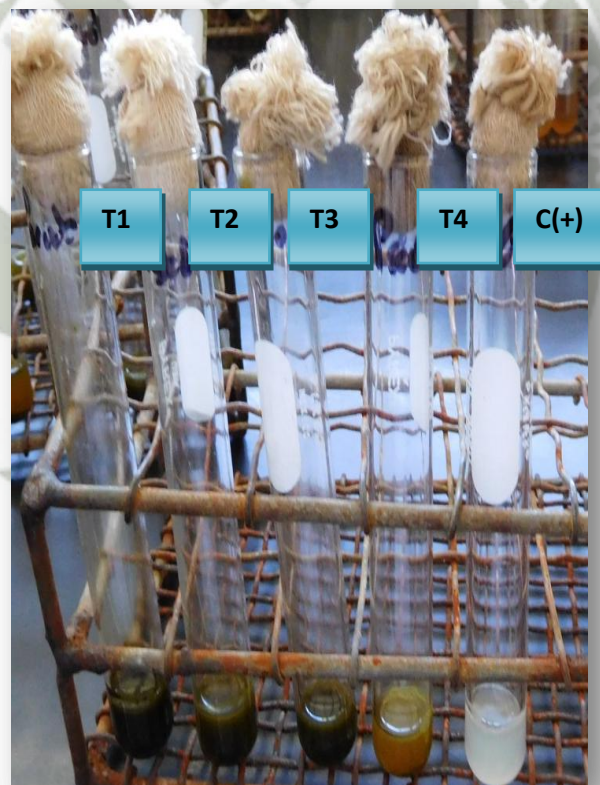


FIGURA N°20: CMI para *Pseudomona aeruginosa*.

TABLA N°17: Concentración Mínima Inhibitoria para *Klebsiella pneumoniae*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	+	+	+
CMI(2)	-	-	+	+	+
CMI(3)	-	-	+	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°17 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Klebsiella pneumoniae* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 50mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°21 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Klebsiella pneumoniae*, en comparación con los obtenidos por Romero, S. (1998) donde estudio “La evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” del *Taraxacum officinanle* Wiggers “Diente de León” en bacterias Gram negativas causantes de infecciones urinarias”, en esta investigación frente a *Klebsiella pneumoniae* fue de 45mg/mL similar a nuestra investigación. En otras investigaciones como Aragón, S. (1997), estudio “Efecto Antibacteriano de *Espera americana* en Bacterias Gram Negativas de Infecciones Urinarias” encontró inhibición a concentración de 200 mg/mL; también Carpio, M. (1996) estudio “Efecto Antibacteriano de *Plantago maior* y *Plantago lanceolata* en Bacterias Gram Negativas en Infecciones Urinarias” encontrando inhibición a concentración de 180mg/mL obteniendo concentraciones más altas que en nuestra investigación , esto

debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos que presenta nuestra planta en investigación en comparación a las plantas de las dos últimas investigaciones mencionadas.

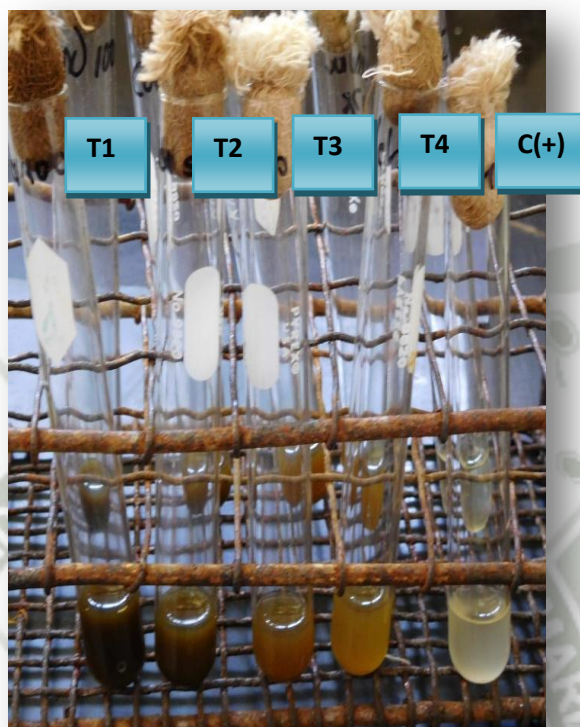


FIGURA N°21: CMI para *Klebsiella pneumoniae*.

TABLA N°18: Concentración Mínima Inhibitoria para *Salmonella typhi*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTRO
CONCENTRACIÓ N (mg/mL)	100	50	25	12,5	L
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	+	+	+
CMI(2)	-	-	+	+	+
CMI(3)	-	-	+	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°18 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Salmonella typhi* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 50mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°22 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Salmonella typhi*, en comparación con los obtenidos por Pinto, X. (2007) el cual estudio la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo”; frente a *Salmonella typhi* detecto que la CMI fue de 1.56uL/mL esto nos demuestra otra vez que dependiendo a los principios activos de cada planta se va encontrar un actividad antibacteriana distinta. Considerando la gran cantidad de compuestos químicos de diferentes grupos que podemos encontrar en los aceites esenciales es evidente que la actividad antibacteriana no se atribuye únicamente a un mecanismo de acción específico, sino a varios mecanismos Burt, (2004) como se observa en la investigación del *Thymus vulgaris* L. “Tomillo”, en nuestro caso lo atribuimos a los compuestos fenólicos presentes en nuestra planta.

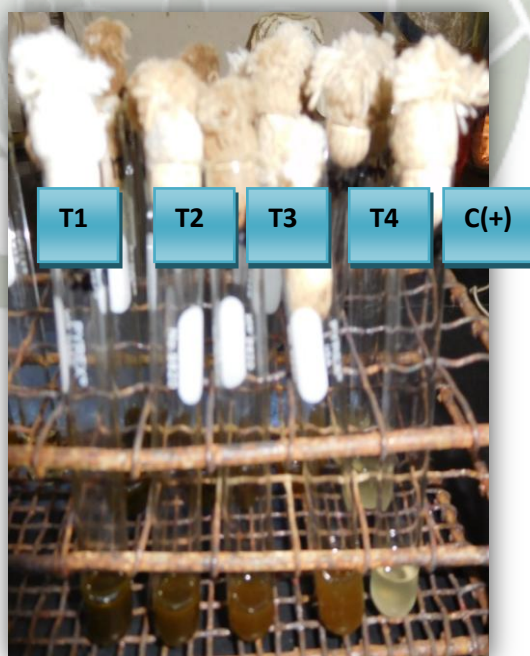


FIGURA N°22: CMI para *Salmonella typhi*.

TABLA N°19: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Cestrum auriculatum* L'HÉR. SOBRE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

GRAM -	CEPA	CMI (mg/mL)	+	-	P(x)
-	<i>Escherichia coli</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*
	<i>Salmonella typhi</i>	100	0	3	0.125
50		0	3	0.125	
25		3	0	0.00*	
12.5		3	0	0.00*	
Control		3	0	0.00*	

(p<0.05)

En la Tabla N°19 se realizó un análisis de varianza para las tres repeticiones de cada concentración por cada cepa bacteriana indicando con “*” la significancia entre las tres repeticiones, además se halló que existe efecto estadístico significativo (P<0.05)

en la Concentración Mínima Inhibitoria entre las distintas concentraciones presentadas del extracto de *Cestrum auriculatum* L'HÉR. “Hierba santa” sobre las bacterias negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*.

TABLA N°20: Concentración Mínima Inhibitoria para *Cándida albicans*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/ml)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	-	-	-	+	+
CMI(2)	-	-	-	+	+
CMI(3)	-	-	-	+	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°20 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Cándida albicans* en la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 25mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°23 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Cándida albicans*, presenta un buen resultado, ya que muestra que hasta una baja concentración, el extracto trabajado presenta una inhibición, lo que indica que los principios activos de nuestra planta como lo son la gran cantidad de compuestos fenólicos que se ven en manifiesto en su gran actividad antioxidante muestra actividad inhibitoria en hongos en este caso la levadura *C. Albicans*.

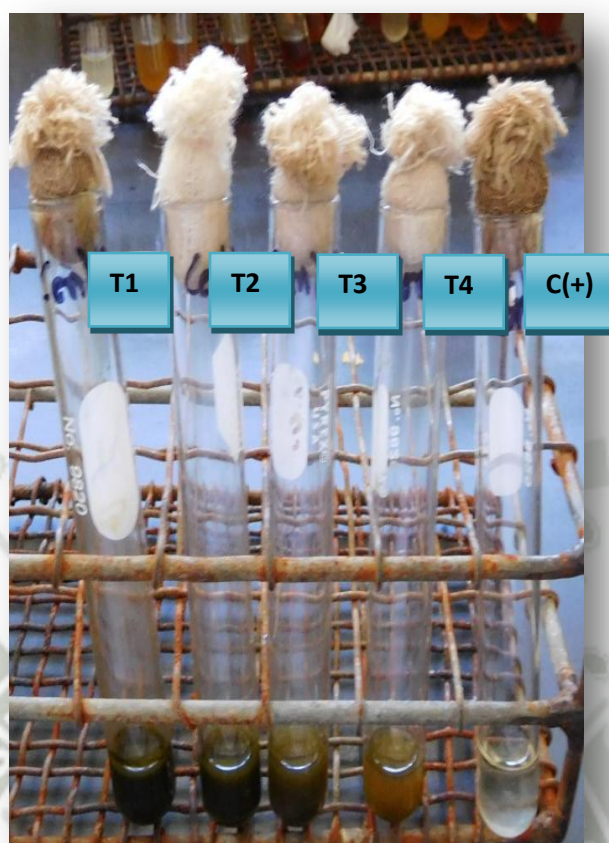


FIGURA N°23: CMI para *Cándida albicans*.

TABLA N°21: Concentración Mínima Inhibitoria para *Microsporium sp.*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTRO
CONCENTRACIÓ N (mg/mL)	100	50	25	12,5	L
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMI(1)	–	–	–	–	+
CMI(2)	–	–	–	–	+
CMI(3)	–	–	–	–	+

CMI: AUSENCIA DE TURBIDEZ (-) PRESENCIA DE TURBIDEZ (+)

En la Tabla N°21 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Microsporium sp.* En la que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es de 12.5mg/mL por ser la menor concentración en la cual no se presentó turbidez, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. En la figura N°24 se puede apreciar la batería de diluciones empleadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores determinados de CMI, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Microsporium sp.* Presenta un buen resultado, ya que muestra que hasta una baja concentración, el extracto trabajado presenta una inhibición, lo que indica que los principios activos de nuestra planta como lo son la gran cantidad de compuestos fenólicos que se ven en manifiesto en su gran actividad antioxidante y comparando con la CMI de *C. albicans* muestra mayor actividad inhibitoria en hongos que en la levadura.



FIGURA N°24: CMI para *Microsporium sp.*

TABLA N°22: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Cestrum auriculatum* L'HÉR.SOBRE HONGOS.

HONGOS	CEPA	CMI (mg/mL)	+	-	P(X)
<i>C. albicans</i>		100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		control		3	0
	CEPA	CMI (mg/mL)		-	P(X)
<i>Microsporium sp.</i>		100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	0	3	0.125
		control		3	0

* (p<0.05)

En la Tabla N°22 se realizó un análisis de varianza para las tres repeticiones de cada concentración por cada hongo indicando con “*” la significancia entre las tres repeticiones, además se halló que existe efecto estadístico significativo (p<0.05) en la Concentración Mínima Inhibitoria entre las distintas concentraciones presentadas del extracto de *Cestrum auriculatum* L'HÉR. “Hierba santa” sobre los hongos: *Cándida albicans*, *Microsporium sp.*

3.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida y Fungicida.

TABLA N°23: Concentración Mínima Bactericida para *Streptococcus pneumoniae*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	-	-	+	+
CMB(2)	-	-	-	+	+
CMB(3)	-	-	-	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°23 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Streptococcus pneumoniae* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 25mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. La figura N°25 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, realizados a partir de la CMI encontrada, para *Streptococcus pneumoniae*, en comparación con los valores obtenidos por Gonzales, J (2007) en su trabajo realizado empleando el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedell "chachacoma" donde obtuvo que para *S. pneumoniae* la fue de 0.025µL/mL. Asimismo Maizel, et al. (2009) en sus ensayos in vitro e in vivo de la actividad inhibitoria del extracto seco de *Eucaliptus spp.* Obtuvo un CMB de 0.313µL/mL; Vilca, A. (2013) quien evaluó el efecto antibacteriano del extracto hidroalcoholico de *Glindelia tarapacaca* "chiri chiri" con un CMB de 12.5uL/mL siendo estos valores menores al obtenido en nuestro trabajo esto podría deberse a la resistencia bacteriana,

además de observar que aquí si hay una correspondencia entre la CMI y la CMB no como en las Gram negativas donde se obtiene efecto solo con la mayor concentración en la CMB y con la menor para el CMI. Esta característica de las bacterias Gram positivas está dada por la gruesa capa de peptidoglicano que ofrece solo una pequeña resistencia a la difusión de pequeñas moléculas como los antibióticos y los metabolitos secundarios.

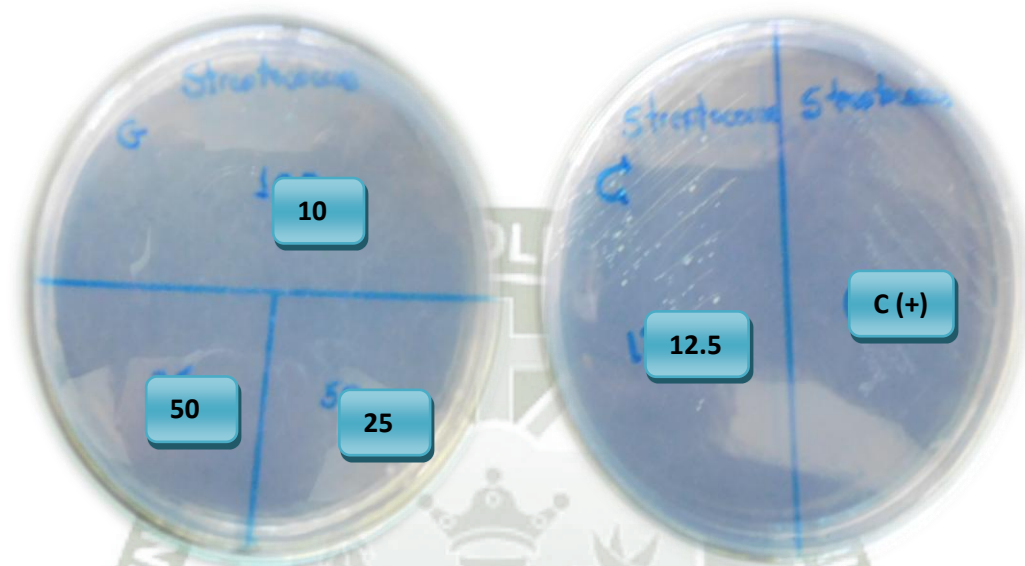


FIGURA N°25: CMB para *Streptococcus pneumoniae*.

TABLA N°24: Concentración Mínima Bactericida para *Staphylococcus aureus*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	-	-	+	+
CMB(2)	-	-	-	+	+
CMB(3)	-	-	-	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°24 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Staphylococcus aureus* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 25mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. La figura N°26 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, realizados a partir de la CMI encontrada, para *Staphylococcus aureus*, en comparación con los valores obtenidos de CMB por Pinto, X (2007) el cual estudio la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a Gram positivas, donde detecto que la CMB fue de 3.12µL/mL. Así mismo Vilca, A. (2013) quien evaluó el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Glindelia tarapacaca* “chiri chiri” con un CMB de 25uL/mL, siendo estos valores menores al obtenido con nuestro extracto a pesar de no poder hacer una comparación exacta ya que las concentraciones en estas investigaciones fue a una concentración v/v y nosotros p/v a pesar de eso la segunda investigación si presenta un valor también elevado según las concentraciones que trabajo.

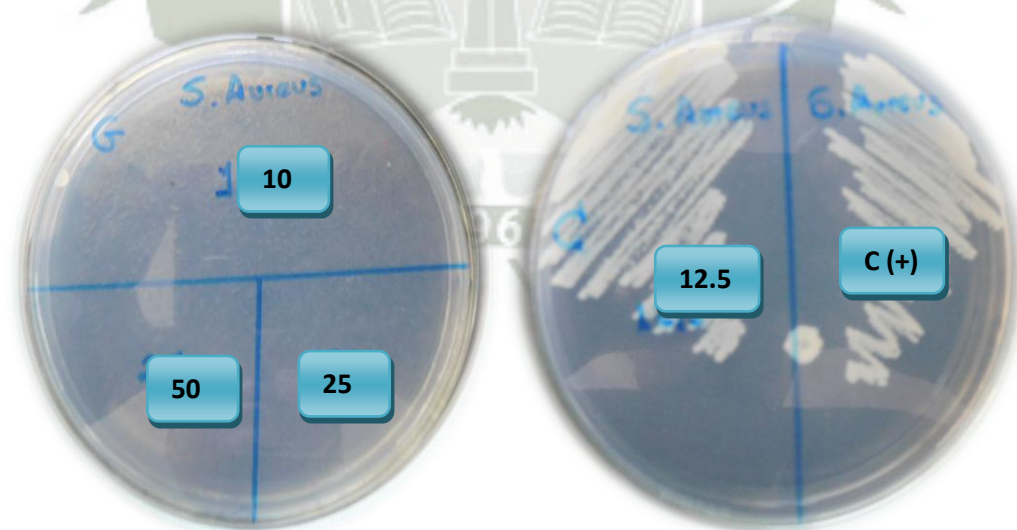


FIGURA N°26: CMB para *Staphylococcus aureus*.

TABLA N°25: CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Cestrum auriculatum* L'HÉR. SOBRE LAS BACTERIAS GRAMPOSITIVAS.

GRAM +	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		control	3	0	0.00*
	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		control	3	0	0.00*

* (p<0.05)

En la Tabla N°25 se realizó un análisis de varianza para las tres repeticiones de cada concentración por cada cepa bacteriana indicando con “*” la significancia entre las tres repeticiones, además se halló que existe efecto estadístico significativo (p<0.05) en la Concentración Mínima Bactericida y sus distintas concentraciones presentadas del extracto de *Cestrum auriculatum* L'HÉR. “Hierba santa” sobre las bacterias patógenas Gram positivas *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.

TABLA N°26: Concentración Mínima Bactericida para *Escherichia coli*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	+	+	+	+
CMB(2)	-	+	+	+	+
CMB(3)	-	+	+	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°26 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Escherichia coli* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 100mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. La figura N°27 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, realizados a partir de la CMI encontrada, frente a *Escherichia coli* en comparación con los resultados obtenidos por Bornaz, N. (2007) donde estudio el "Efecto del extracto hidroalcohólico de la *Trapeolum tuberosum* "Mashua o Añu" frente a organismos uro patógenos" no encontró ningún efecto inhibitorio en ninguna de sus diluciones trabajadas; en nuestro trabajo si encontramos, esto puede deberse a una variabilidad de los metabolitos de cada planta; Larico, R. (2008) donde estudio "La evaluación de la actividad antibacteriana "in vitro" del *Allium sativum* Var. "Ajo" frente a bacterias Gram negativas multiresistentes aisladas de pacientes del hospital Goyeneche" en esta investigación frente a *Escherichia coli* detecto que la CMB fue de 1000ug/mL esto nos demuestra otra vez que dependiendo a los principios activos de cada planta se va encontrar un actividad antibacteriana en este caso la alicina presenta una mejor actividad que los compuestos fenólicos de nuestra planta; al comparar con Juárez, I. (1989) que trabaja

con 40 cepas de *E. coli*, reporta un CMB de 100ug/mL con la misma planta de *Allium sativum* Var. “Ajo” esto debido a otro factor importante en la investigación como lo es la resistencia bacteriana, que estuvo presente más en una investigación que en la otra.

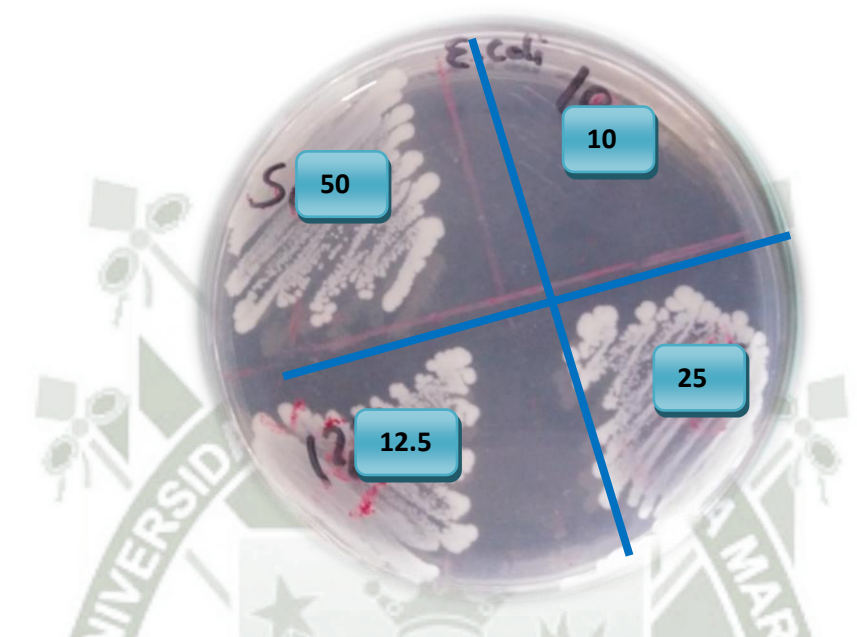


FIGURA N° 27: CMB para *Escherichia coli*.

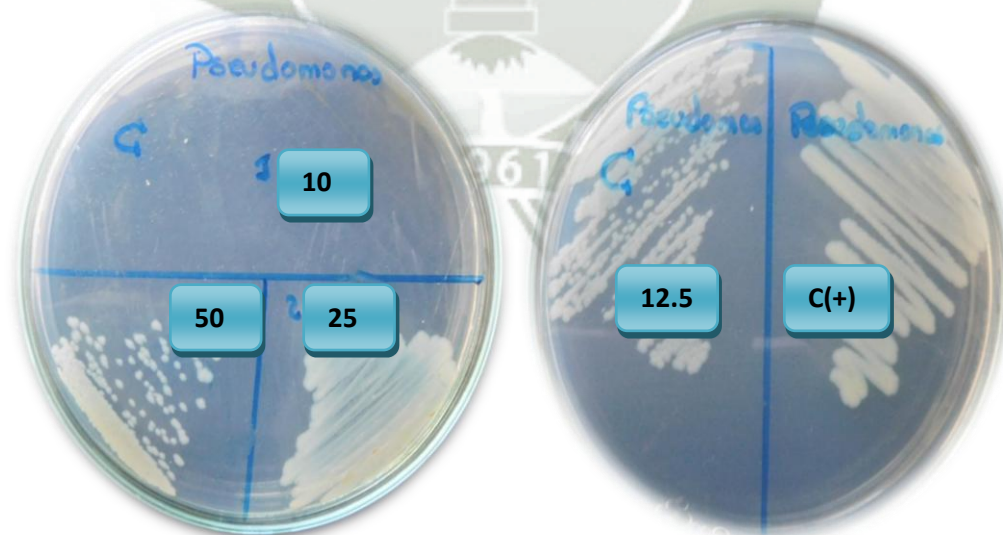
TABLA N°27: Concentración Mínima Bactericida para *Pseudomona aeruginosa*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	+	+	+	+
CMB(2)	-	+	+	+	+
CMB(3)	-	+	+	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°27 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Pseudomona aeruginosa* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 100mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. La figura N°28 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, realizados a partir de la CMI encontrada, frente a *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con los obtenidos por Larico, R. (2008) donde estudio “La evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” del *Allium sativum* Var. “Ajo” frente a bacterias Gram negativas multiresistentes aisladas de pacientes del hospital Goyeneche” en esta investigación frente a *Pseudomonas aeruginosa* fue de 1000ug/mL una concentración menor a la de nuestra investigación, esto puede deberse a una variabilidad de los metabolitos de cada planta en el caso del *Allium sativum* Var. La presencia de la alicina un probado ya principio activo con gran actividad bactericida, en nuestro caso lo atribuimos a los compuestos fenólicos presentes en nuestra planta. Además Bellido, L. (1992) reporta 200ug/mL estos resultados son más bajos a comparación de nuestra investigación y esto podría deberse a que en nuestra investigación se usó bacterias más resistentes.



FOTOGRAFIA N°28: CMB para *Pseudomona aeruginosa*

TABLA N°28: Concentración Mínima Bactericida para *Klebsiella pneumoniae*.

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	+	+	+	+
CMB(2)	-	+	+	+	+
CMB(3)	-	+	+	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°28 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Klebsiella pneumoniae* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 100mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. La figura N°29 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, realizados a partir de la CMI encontrada, para *Klebsiella pneumoniae*, en comparación con los obtenidos por las de más bacterias Gram negativas presenta la misma concentración, es decir solo nuestra mayor concentración trabajada presenta un efecto bactericida sobre las cepas bacterianas patógenas esto debido a que la pared bacteriana de las bacterias Gram negativas presentan una membrana externa de lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas, con selectividad específica evitando un efecto por agentes extraños como los metabolitos de nuestra planta en estudio.

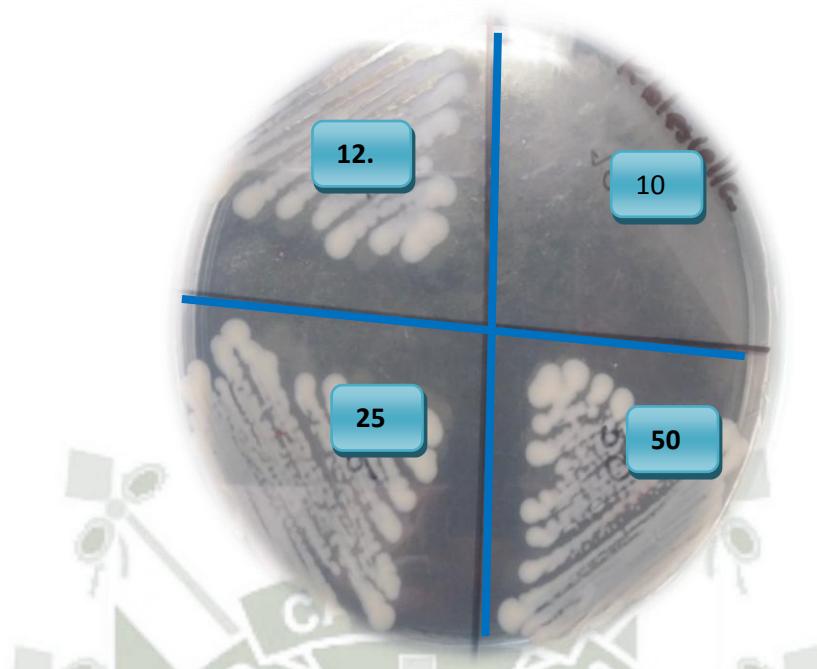


FIGURA N°29: CMB para *Klebsiella pneumoniae*.

TABLA N°29: Concentración Mínima Bactericida para *Salmonella typhi*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCIÓN	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	-	+	+	+
CMB(2)	-	-	+	+	+
CMB(3)	-	-	+	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°29 podemos observar cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Salmonella typhi* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 50mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas.

La figura N°30 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, realizados a partir de la CMI encontrada, para *Salmonella typhi*, en comparación con los obtenidos por Pinto, X. (2007) el cual estudio la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo”; frente a *Salmonella typhi* detecto que la CMB fue de 1.56uL/mL esto nos demuestra otra vez que dependiendo a los principios activos de cada planta se va encontrar un actividad antibacteriana distinta. Considerando la gran cantidad de compuestos químicos de diferentes grupos que podemos encontrar en los aceites esenciales es evidente que la actividad antibacteriana no se atribuye únicamente a un mecanismo de acción específico, sino a varios mecanismos Burt, (2004). Como se observa en la investigación del *Thymus vulgaris* L. “Tomillo”, en nuestro caso lo atribuimos a los compuestos fenólicos presentes en nuestra planta.

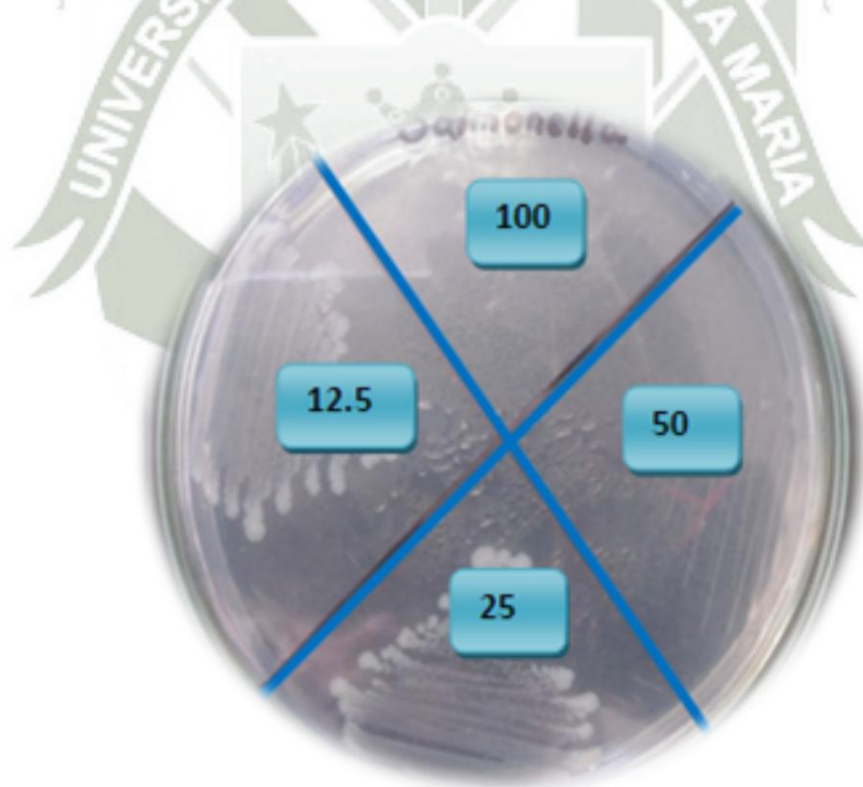


FIGURA N°30: CMB para *Salmonella typhi*

TABLA N°30: CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Cestrum auriculatum* L'HÉR. SOBRE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

GRAM -	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
	<i>Escherichia coli</i>	100	0	3	0.125
		50	3	0	0.00*
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*
	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	100	0	3	0.125
		50	3	0	0.00*
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*
	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	0	3	0.125
		50	3	0	0.00*
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00
	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
	<i>Salmonella typhi</i>	100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	3	0	0.00*
		12.5	3	0	0.00*
		control	3	0	0.00*

* (p<0.05)

En la Tabla N°30 se realizó un análisis de varianza para las tres repeticiones de cada concentración por cada cepa bacteriana indicando con “*” la significancia entre las tres repeticiones, además se halló que existe efecto estadístico (p<0.05) en la

Concentración Mínima Bactericida y sus distintas concentraciones presentadas del extracto de *Cestrum auriculatum* L'HÉR. “Hierba santa” sobre las bacterias negativas *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*.

TABLA N°31: Concentración Mínima Fungicida para *Cándida albicans*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACION (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCION	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	-	-	+	+
CMB(2)	-	-	-	+	+
CMB(3)	-	-	+	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°31 podemos observar cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Cándida albicans* en la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 25mg/ml luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las dos primeras repeticiones realizadas solo en la última repetición hay un crecimiento en la concentración de 25mg/mL. La figura N°31 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMF, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Cándida albicans*, presenta un buen resultado, ya que muestra que hasta una baja concentración el extracto trabajado presenta una inhibición lo que indica que los principios activos de nuestra planta como lo son la gran cantidad de compuestos fenólicos que se ven en manifiesto en su gran actividad antioxidante muestra actividad micotico en hongos en este caso la levadura *C. albicans*. El mecanismo de toxicidad fenólica que presenta nuestra planta frente a los hongos se basa en la

inhibición de enzimas fúngicas posiblemente a través de reacciones con un grupo sulfidrilo a través de interacciones no específicas con proteínas. Cowan, (1999).

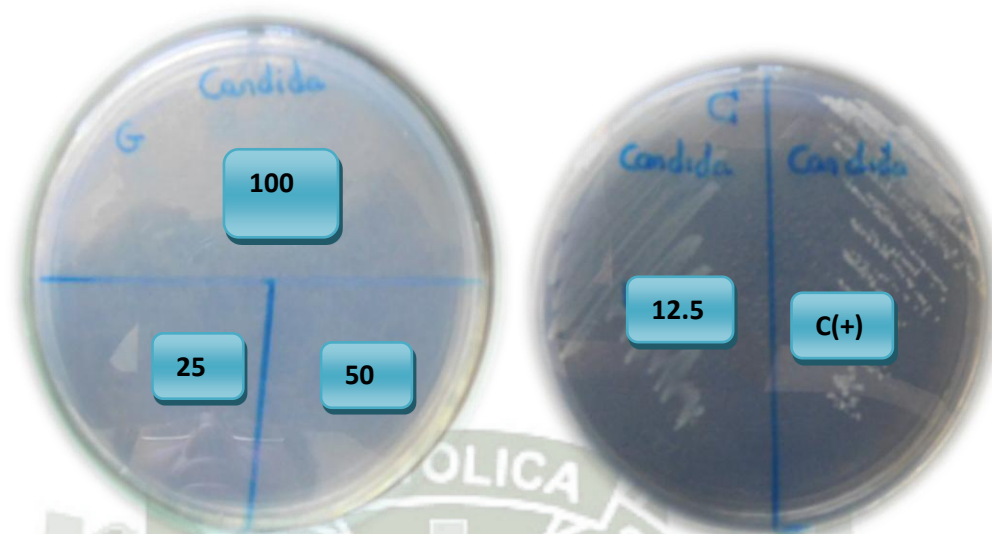


FIGURA N°31: CMB para *Cándida albicans*.

TABLA N°32: Concentración Mínima Fungicida para *Microsporium sp.*

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	CONTROL
CONCENTRACION (mg/mL)	100	50	25	12,5	
DILUCION	1/2	1/4	1/8	1/16	C (+)
REPETICIONES	3	3	3	3	3
CMB(1)	-	-	-	+	+
CMB(2)	-	-	-	+	+
CMB(3)	-	-	-	+	+

CMB: AUSENCIA DE CRECIMIENTO (-) PRESENCIA DE CRECIMIENTO (+)

En la Tabla N°32 podemos observar cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Microsporium sp.* En la que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue la de 25mg/mL luego de realizar el repique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas. La figura

N°32 corresponde al repique de las diluciones tras la incubación previa por 24h a 37°C.

Los valores determinados de CMB, empleando la metodología de dilución en caldo, para *Microsporium sp.*, presenta un buen resultado, ya que muestra que hasta una baja concentración el extracto trabajado presenta una inhibición lo que indica que los principios activos de nuestra planta como lo son la gran cantidad de compuestos fenólicos que se ven en manifiesto en su gran actividad antioxidante muestra actividad micótica en hongos en este caso *Microsporium sp.* El mecanismo de toxicidad fenólica que presenta nuestra planta frente a los hongos se basa en la inhibición de enzimas fúngicas posiblemente a través de reacciones con un grupo sulfhidrilo a través de interacciones no específicas con proteínas. Cowan, (1999).

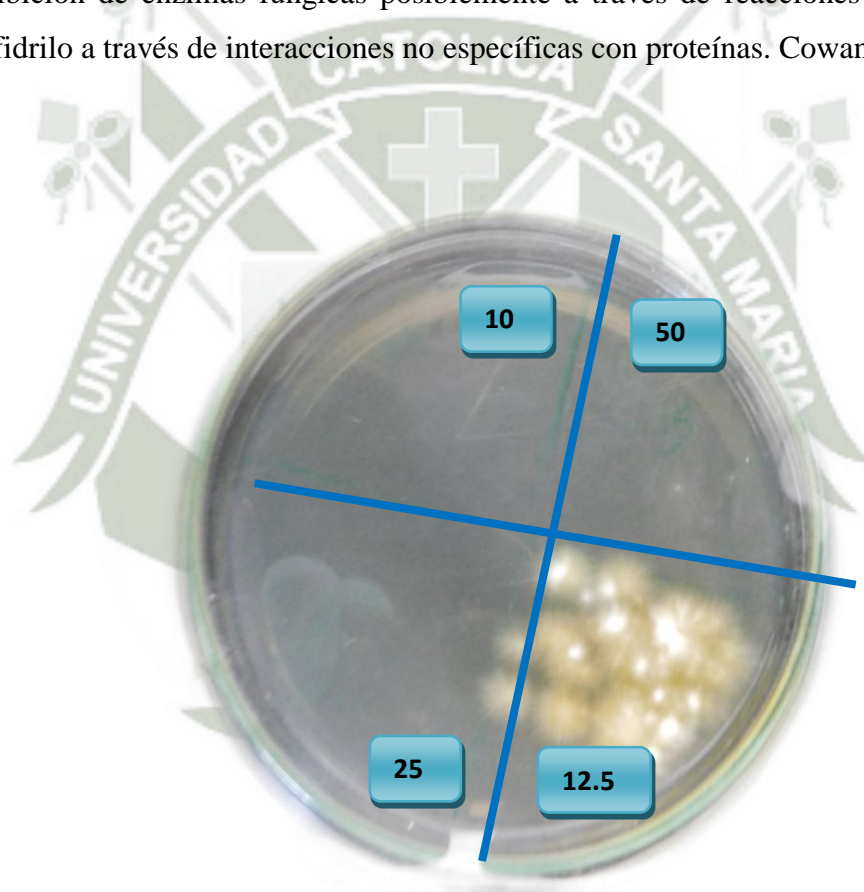


FIGURA N°32: CMB para *Microsporium sp.*

TABLA N°33: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Cestrum auriculatum* L'Hér. SOBRE HONGOS

HONGOS	CEPA	CMB(mg/mL)	+	-	P(X)
<i>Cándida albicans</i>		100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*
	CEPA	CMB (mg/mL)	+	-	P(X)
<i>Microsporum sp</i>		100	0	3	0.125
		50	0	3	0.125
		25	0	3	0.125
		12.5	3	0	0.00*
		Control	3	0	0.00*

* (p<0.05)

En la Tabla N°32 se realizó un análisis de varianza para las tres repeticiones de cada concentración por hongo indicando con “*” la significancia entre las tres repeticiones, además se halló que existe efecto estadístico (p<0.05) en la Concentración Mínima Bactericida entre las distintas concentraciones presentadas del extracto de *Cestrum auriculatum* L'HÉR. “Hierba santa” sobre los hongos: *Cándida albicans*, *Microsporum sp*.

3.6. Determinación de la sensibilidad antibacteriana y antifúngica

Para una mejor comprensión de los resultados de sensibilidad bactericida y fúngica se escogió el mayor halo en cada concentración de extracto y para cada cepa bacteriana y fúngica de las tres repeticiones realizadas.

TABLA N°34: Sensibilidad antibacteriana para *Streptococcus pneumoniae* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	25
50	22
25	20
12,5	16
CONTROL	0

La Tabla N°34 muestra la determinación de la sensibilidad antibacteriana para *Streptococcus pneumoniae* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar Muller Hinton. La figura N°33 se puede apreciar que con el extracto se presentó un halo inhibición de 25mm a una concentración de 100mg/mL , un halo de inhibición de 22mm a una concentración de 50mg/mL, un halo de inhibición de 20mm a una concentración de 25mg/mL y un halo de inhibición de 16mm a una concentración de 12.5mg/mL, indicando así que para las concentraciones de 100mg/mL, 50mg/mL son de mayor tamaño a diferencia de 25mg/mL, 12.5mg/mL menor tamaño.

Los valores de sensibilidad bacteriana fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Streptococcus pneumoniae*, en comparación con los valores obtenidos por Vilca, A. (2013) quien evaluó el efecto antibacteriano del

extracto hidroalcoholico de *Glindelia tarapacaca* “chiri chiri” mostrando que a concentración de 100 y 50uL/mL da unos halos de inhibición de 12 y 9mm respectivamente, siendo estos valores menores al obtenido en nuestro trabajo ya que nosotros obtenemos mejores halos de inhibición pero esto podría deberse a las concentraciones distintas que usamos.

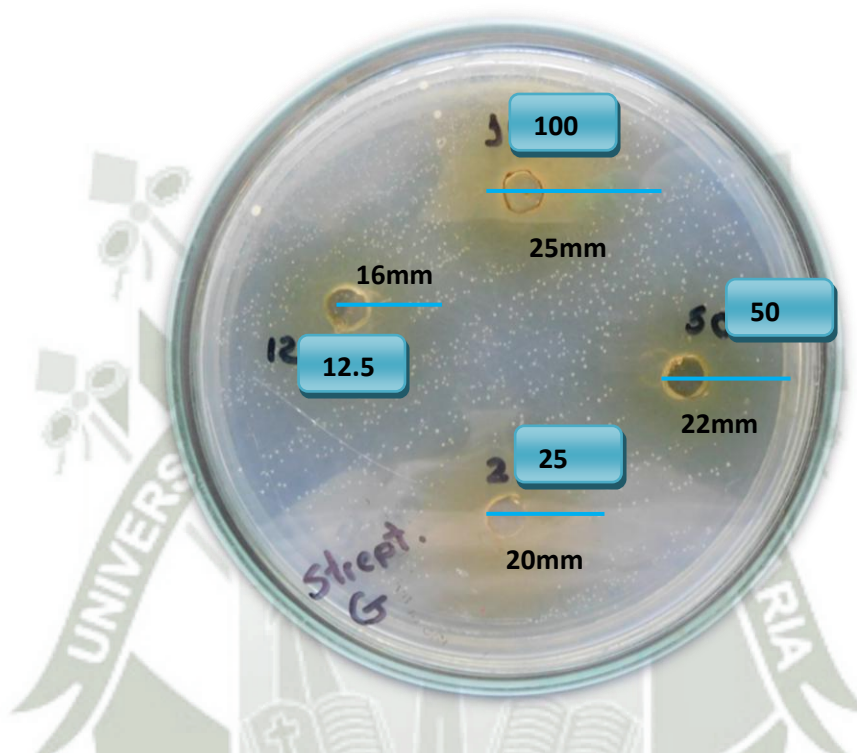


FIGURA N°33: Sensibilidad Antibacteriana de *Streptococcus pneumoniae*

TABLA N°35: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Cestrum auriculatum* L'Hér. SOBRE LA SENSIBILIDAD EN *Streptococcus pneumoniae*

	100		50		25		12.5	
	N°.	%	N°.	%	N°.	%	N°.	%
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	33.3
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	66.7
	3	100	3	100	3	100	0	0.0
TOTAL	3	100	3	100	3	100	3	100

$X^2=12.00$

$p<0.05$

La Tabla N°35, según la prueba de chi cuadrado ($X^2=12.00$) se muestra que la sensibilidad en *Streptococcus pneumoniae* por el efecto de las concentraciones de *Cestrum auriculatum* presento diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$).

Asimismo se muestra que con la concentración 100, 50, 25mg/mL de *Cestrum auriculatum* evidencio una sensibilidad en la bacteria *Streptococcus pneumoniae*.

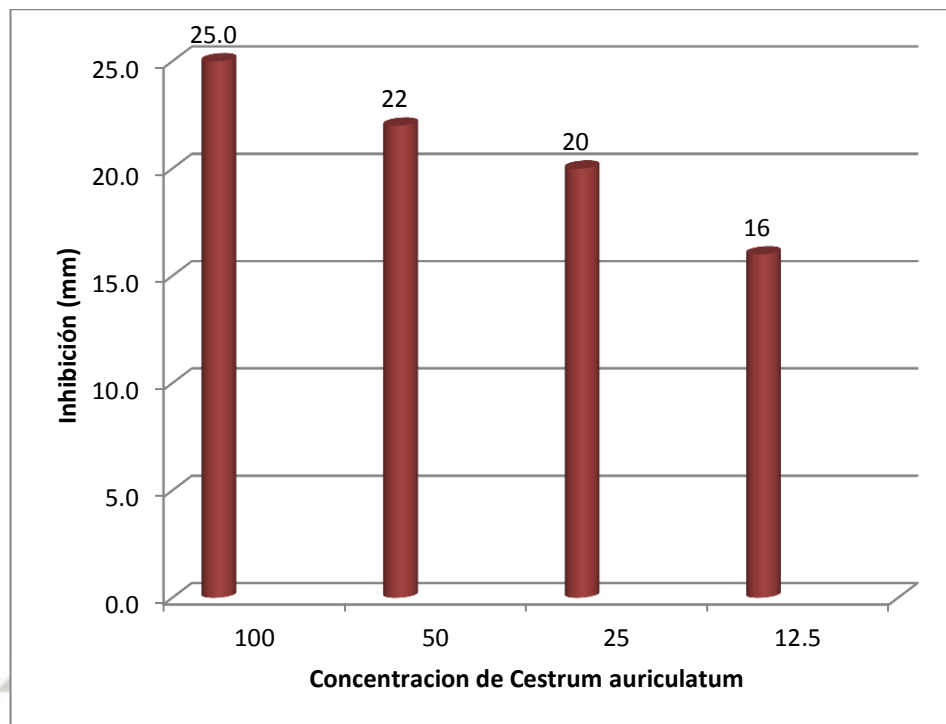


FIGURA N°34: Efecto del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" sobre el tamaño de halos de inhibición de *Streptococcus pneumoniae*.

La figura N°34: nos muestra que en las cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. "Hierba santa" frente a *Streptococcus pneumoniae* nos dan halos de inhibición intermedios y grandes, lo que nos indica que presenta una mayor inhibición con las mayores concentraciones de 100, 50, 25mg/mL y una menor inhibición en la última concentración.

TABLA N°36: Sensibilidad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	23
50	22
25	20
12,5	18
CONTROL	0

La Tabla N°36 muestra la determinación de la sensibilidad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar Muller Hinton. La figura N°35 se puede apreciar que con el extracto se presentó un halo inhibición de 23mm a una concentración de 100mg/mL, un halo de inhibición de 22mm a una concentración de 50mg/mL, un halo de inhibición de 20mm a una concentración de 25mg/mL y un halo de inhibición de 18mm a una concentración de 12.5mg/mL, indicando así que para las concentraciones de 100mg/mL, 50mg/mL, 25mg/mL muestran una mayor sensibilidad y 12.5mg/mL muestra una menor sensibilidad de acuerdo al tamaño de inhibición.

Los valores de sensibilidad bacteriana fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Staphylococcus aureus*, en comparación con los valores obtenidos por Vilca, A. (2013) quien evaluó el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Glindelia tarapacaca* “chiri chiri” mostrando que a concentración de 100 y 50uL/mL da unos halos de inhibición de 9 y 8mm respectivamente, siendo estos valores menores al obtenido en nuestro trabajo ya que nosotros obtenemos mejores halos de inhibición pero esto podría deberse a las concentraciones distintas que usamos ya que no poder hacer una comparación exacta ya que las concentraciones en estas investigaciones fue a una concentración v/v y

nosotros p/v a pesar de eso la segunda investigación si presenta un valor también elevado según las concentraciones que trabajo.

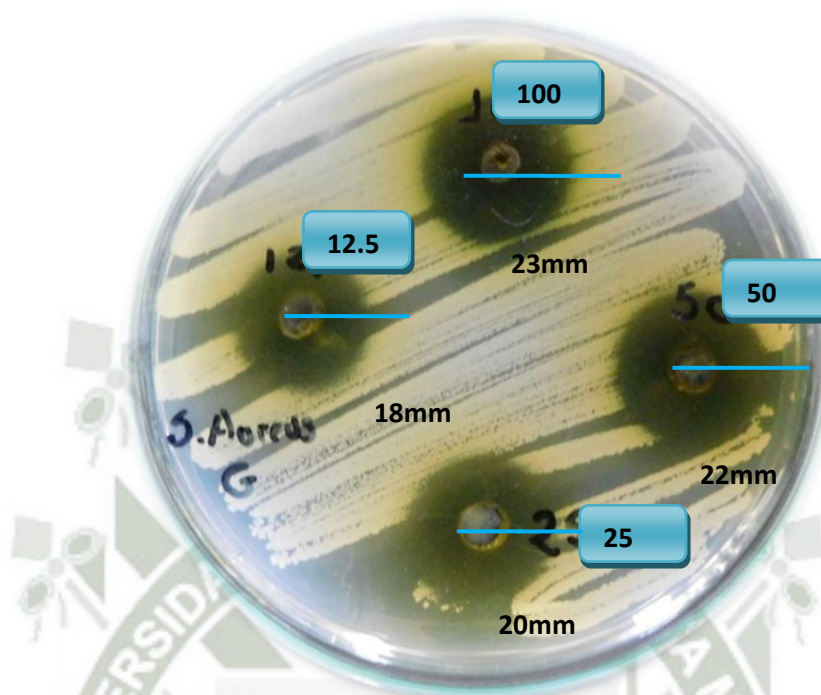


FIGURA N°35: Sensibilidad Antibacteriana de *Staphylococcus aureus*

TABLA N°37: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Cestrum auriculatum* L'Hér. SOBRE LA SENSIBILIDAD EN *Staphylococcus aureus*.

	100		50		25		12.5	
	N°.	%	N°.	%	N°.	%	N°.	%
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	1	33.3	3	100
	3	100	3	100	2	66.7	0	0.0
TOTAL	3	100	3	100	3	100	3	100

$\chi^2=12.00$ $p<0.05$

La Tabla N°37, según la prueba de chi cuadrado ($X^2=12.00$) se muestra que la sensibilidad en *Staphylococcus aureus* por el efecto de las concentraciones de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Presento diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$).

Asimismo se muestra que con la concentración 100, 50 y 25mg/mL de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Evidencio una sensibilidad en la bacteria *Staphylococcus aureus*.

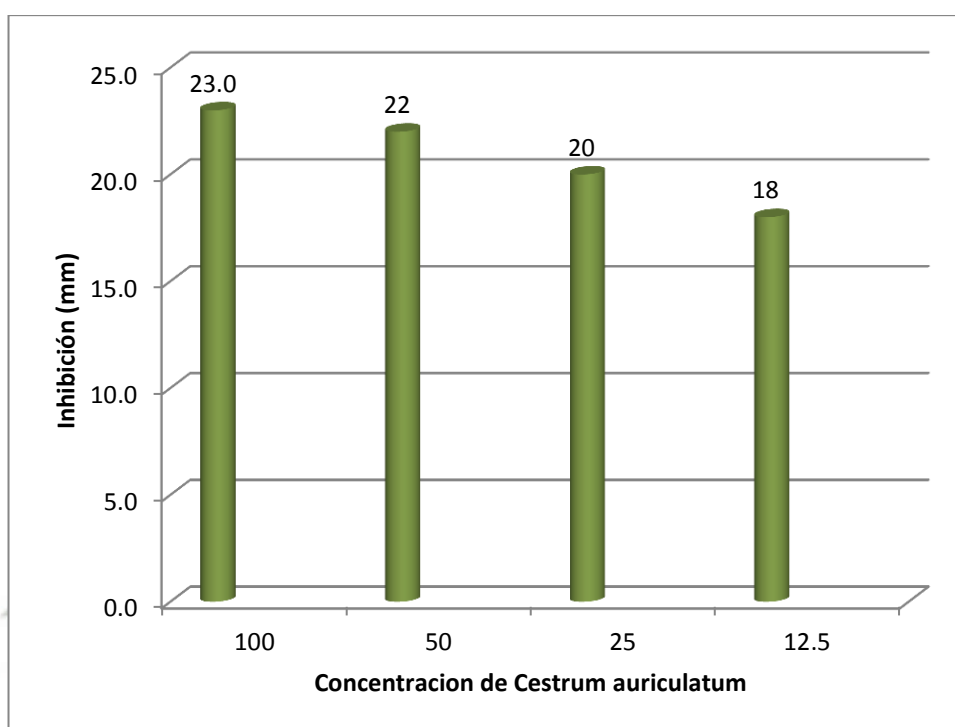


FIGURA N°36: Efecto del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” sobre el tamaño de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y su interpretación de sensibilidad.

La figura N°36: nos muestra que en las cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Staphylococcus aureus* nos dan halos de inhibición grandes, lo que nos indica que presenta una inhibición sensible con las mayores concentraciones de 100, 50 y 25mg/mL y una sensibilidad menor en la última concentración.

Al evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”, frente a *Escherichia coli*, *Pseudomona*

aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, se determinó que para *S. pneumoniae*, *S. aureus* muestra una sensibilidad más alta en comparación con las bacterias Gram negativas. En el caso de *S. aureus* y *S. pneumoniae* la característica de Gram positivas los vuelve generalmente más sensibles a la acción inhibitoria; esto puede deberse a su gruesa capa de peptidoglicano que ofrece solo una pequeña resistencia a la difusión de pequeñas moléculas como los antibióticos y los metabolitos secundarios identificados debido que actúa como una malla muy porosa; a esto se suma la membrana citoplasmática formada de fosfolípidos y proteínas que permitiría el paso de los metabolitos de tipo polar como flavonoides, taninos, alcaloides al interior de la célula bacteriana provocando su muerte Murray, et al. (2005).

Debemos recordar que la estructura celular de ambos grupos bacterianos es diferente y no solo en el número de capas que posee cada grupo haciendo más difícil el acceso de los compuestos hidrófobos, sino que además de la diferencia por la presencia de la membrana externa de lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas, las bacterias Gram positivas poseen una pared celular más gruesa, compuesta por peptidoglucano (o mureína como también se le denomina) la cual le confiere una serie de propiedades como son: la gran rigidez, contrarrestando las fuerzas osmóticas a que está sometido el citoplasma, soportando presiones de una 5-15 atmósferas. También se debe destacar que la pared celular es en general permeable sin selectividad específica, sin embargo la membrana externa bloquea el paso de moléculas relativamente grandes Jawetz, E., (2002).

Considerando la gran cantidad de compuestos químicos de diferentes grupos que podemos encontrar en los aceites esenciales es evidente que la actividad antibacteriana no se atribuye únicamente a un mecanismo de acción específico, sino a varios mecanismos Burt, (2004) primero degradando la pared celular, luego dañando la membrana citoplasmática y las proteínas siendo posible una interacción entre los compuestos lipófilos con la parte hidrofóbica de las proteínas modificando la actividad de las enzimas que regulan la energía o la síntesis de compuestos estructurales después ocurre la salida del contenido celular Juven et.al., (1994).

TABLA N°38: Sensibilidad antibacteriana para *Escherichia coli* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	0
50	0
25	0
12,5	0
CONTROL	0

La Tabla N°38 muestra la determinación de la sensibilidad antibacteriana para *Escherichia coli* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar Muller Hinton. La figura N°37 se puede apreciar que con el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” no presentó halo de inhibición en ninguna de sus concentraciones 100, 50, 25 y 12.5mg/mL.

Los valores de sensibilidad bacteriana fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Escherichia coli* en comparación con los obtenidos por Bornaz, N. (2007) donde estudio el “Efecto del extracto hidroalcoholico de la *Trapeolum tuberosum* “Mashua o Añu” frente a organismos uro patógenos” en este caso frente a *Escherichia coli* encontró que a la concentración de 144mg/mL mostro un halo de inhibición de 25mm; Aragón, S. (1997), estudio “Efecto Antibacteriano de *Ephedra americana* en Bacterias Gram Negativas de Infecciones Urinarias” encontró a 240mg/mL un halo de inhibición de 17.7mm; en nuestro trabajo no encontramos halos, esto puede deberse a una variabilidad de los metanolitos secundarios de cada planta, además que la concentración utilizada en esas investigaciones mencionadas son más altas de las que utilizamos nosotros en nuestra investigación.

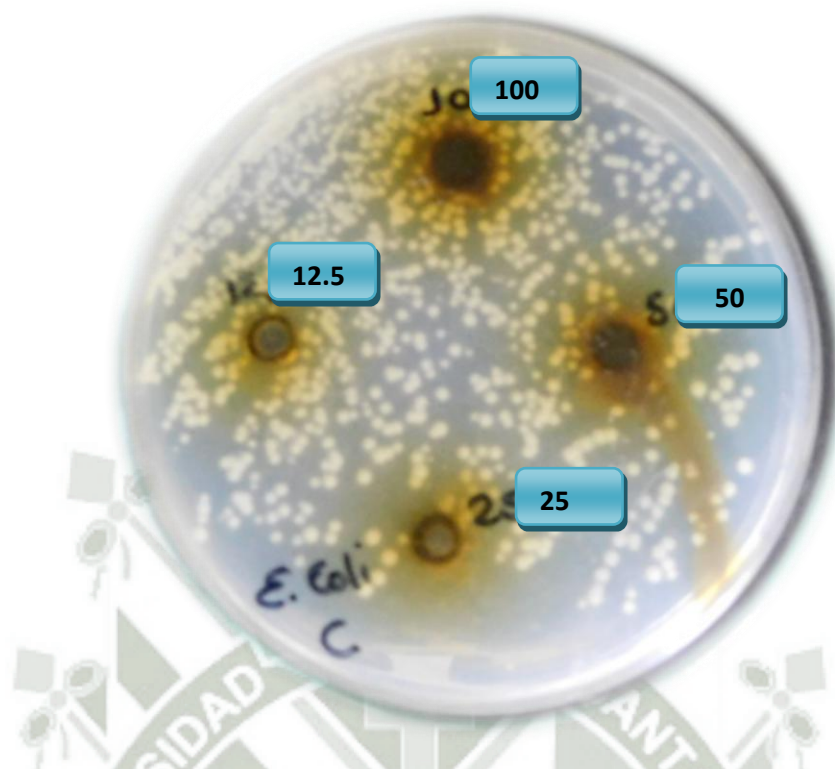


FIGURA N°37: Sensibilidad Antibacteriana de *Escherichia coli*

TABLA N°39: Sensibilidad antibacteriana para *Pseudomona aeruginosa* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	0
50	0
25	0
12,5	0
CONTROL	0

La Tabla N°39 muestra la determinación de la sensibilidad antibacteriana para *Pseudomona aeruginosa* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados

en placas petri con agar Muller Hinton. La figura N°38 se puede apreciar que con el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” no presentó halo de inhibición en ninguna de sus concentraciones 100, 50, 25 y 12.5mg/mL, estas no presentan sensibilidad.

Los valores de sensibilidad bacteriana fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Pseudomona aeruginosa*, en comparación con los obtenidos por Larico, R. (2008) donde estudio “La evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” del *Allium sativum* Var. “Ajo” frente a bacterias Gram negativas multiresistentes aisladas de pacientes del hospital Goyeneche” presentando que a concentración de 100uL/mL tiene un halo 19mm y a una concentración 60uL/mL un halo de 15.3mm, esta diferencia de resultados con nuestra investigación puede deberse a una variabilidad de los metabolitos de cada planta en el caso del *Allium sativum* Var presenta alicina un comprobado metabolito con actividad antibacteriana.

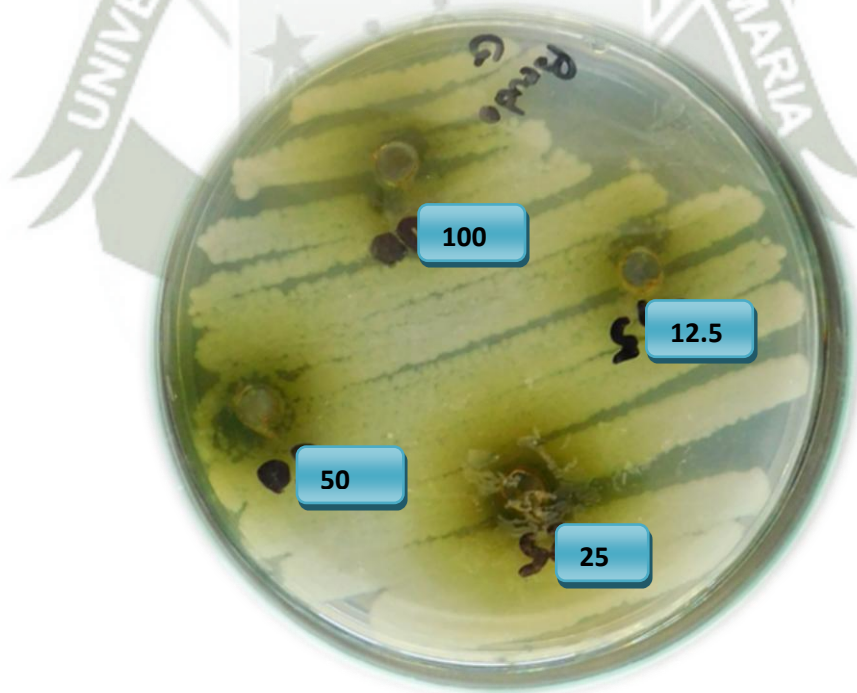


FIGURA N°38: Sensibilidad Antibacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*

TABLA N°40: Sensibilidad antibacteriana para *Klebsiella pneumoniae* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	0
50	0
25	0
12,5	0
CONTROL	0

La Tabla N°40 muestra la determinación de la sensibilidad antibacteriana para *Klebsiella pneumoniae* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar Muller Hinton. La figura N°39 se puede apreciar que con el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” no presentó halo de inhibición en ninguna de sus concentraciones 100, 50, 25 y 12.5mg/mL, muestran sensibilidad.

Los valores de sensibilidad bacteriana fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Klebsiella pneumoniae*, en comparación con los obtenidos por Romero, S. (1998) donde estudio “La evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” del *Taraxacum officinanle* Wiggers “Diente de León” en bacterias Gram negativas causantes de infecciones urinarias”, muestra que a 60 y 30mg/ml presenta halos de inhibición de 12.75 y 10.18mm respectivamente en nuestra investigación no encontramos la presencia de halos significativos, esto podría deberse a la mayor resistencia de la bacteria con la que trabajamos y a la diferencia de principios activos presentes en las plantas trabajadas.

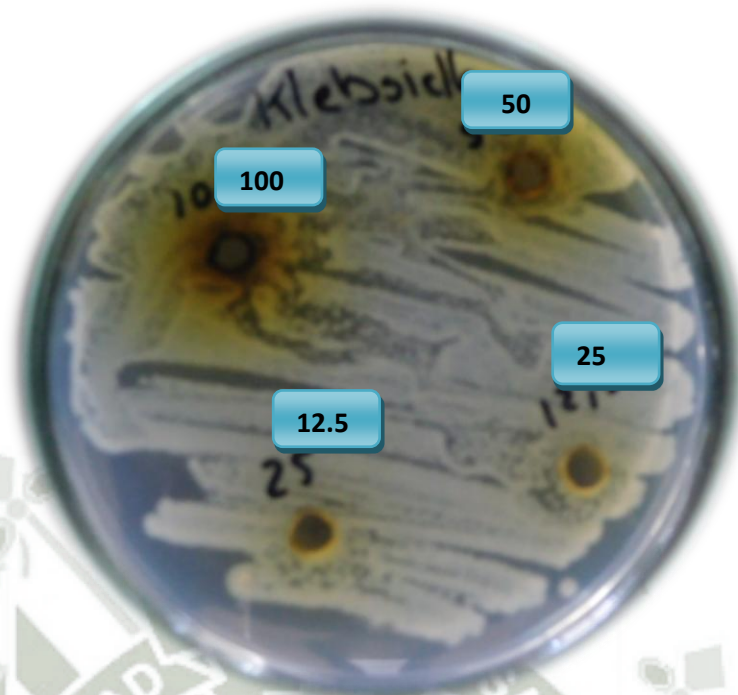


FIGURA N° 39: Sensibilidad Antibacteriana de *Klebsiella pneumoniae*

TABLA N°41: Sensibilidad antibacteriana para *Salmonella typhi* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	14
50	10
25	0
12,5	0
CONTROL	0

La Tabla N°41 muestra la determinación de la sensibilidad antibacteriana para *Salmonella typhi* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar Muller Hinton. La figura N°40 se puede apreciar que con el

extracto se presentó un halo inhibición de 14mm a una concentración de 100mg/mL, un halo de inhibición de 10mm a una concentración de 50mg/mL, indicando así que para las concentraciones de 100mg/mL, 50mg/mL muestran una sensibilidad límite y para 25mg/mL, 12.5mg/mL muestran una sensibilidad nula.

Los valores de sensibilidad bacteriana fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Salmonella typhi*, en comparación con los obtenidos por Pinto, X. (2007) el cual estudio la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo”; frente a *Salmonella typhi* detecto que la sensibilidad a una concentración de 50 y 25ug/mL presentan halos de inhibición de 44 y 42mm de diámetro respectivamente, esto nos demuestra otra vez que dependiendo a los principios activos de cada planta se va encontrar un actividad antibacteriana distinta.

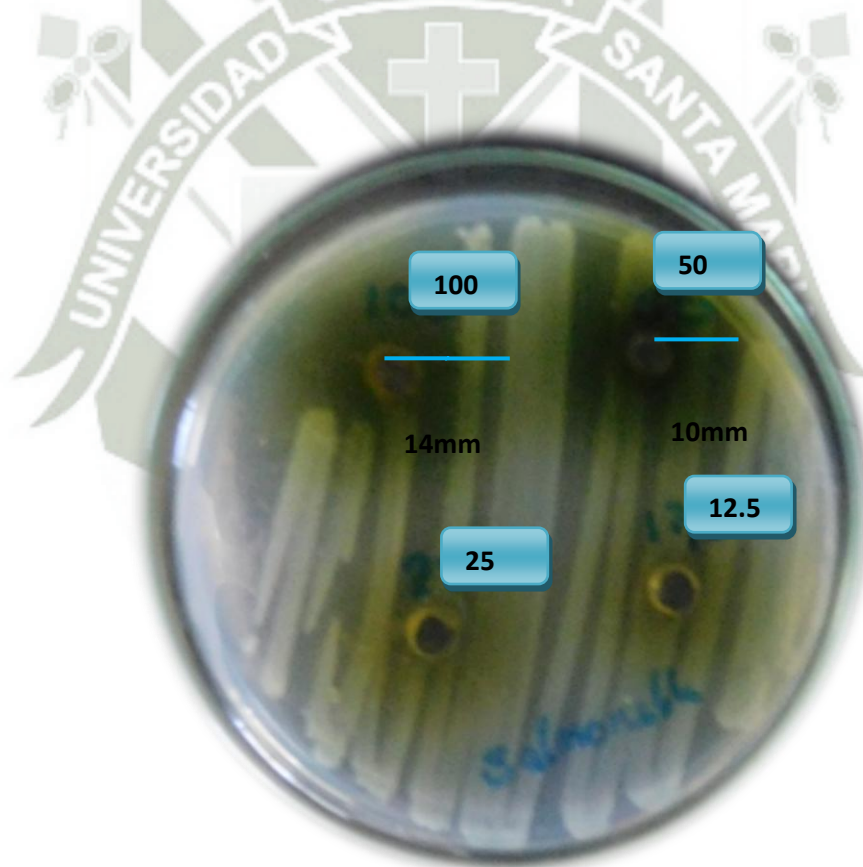


FIGURA N°40: Sensibilidad Antibacteriana de *Salmonella typhi*

TABLA N°42: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Cestrum auriculatum* L'Hér. SOBRE LA SENSIBILIDAD EN *Salmonella typhi*

	100		50		25		12.5	
	N°.	%	N°.	%	N°.	%	N°.	%
	0	0.0	0	0.0	3	100	3	100
	3	100	3	100	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	3	100	3	100	3	100	3	100

$\chi^2=12.00$ $p<0.05$

La Tabla N°42, según la prueba de chi cuadrado ($\chi^2=12.00$) se muestra que la sensibilidad a *Salmonella typhi* por el efecto de las concentraciones de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Presento diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$). Asimismo se muestra que con la concentración 100 ó 50mg/ml de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

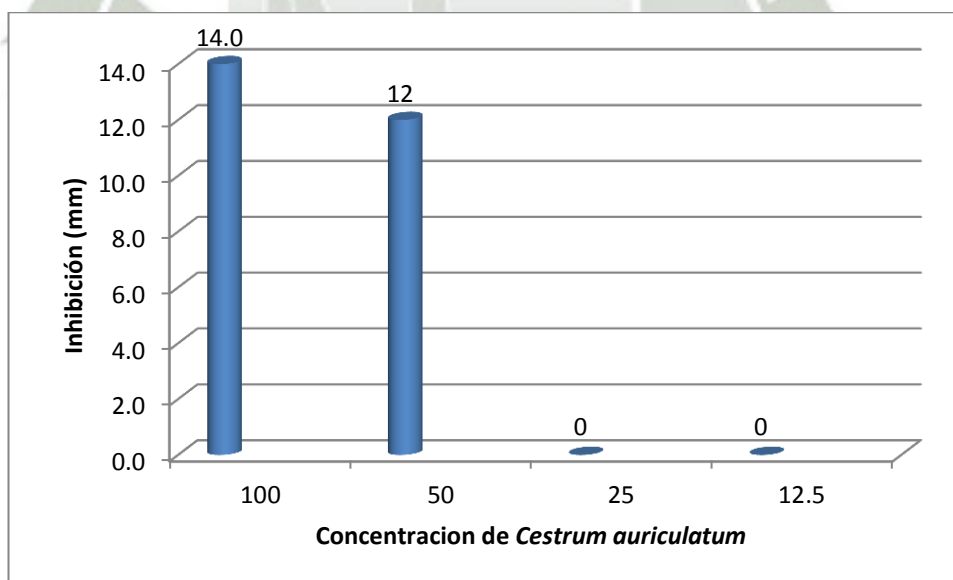


FIGURA N°41: Efecto del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” sobre el tamaño de halos de inhibición de *Salmonella typhi*

La figura N°41: nos muestra que en las cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Salmonella tify* nos dan halos de inhibición de menor tamaño, lo que nos indica que presenta una inhibición mayor en la concentración de 100 y 50mg/ml y no presenta sensibilidad en las demás concentraciones.

TABLA N°43: Sensibilidad antifúngica para *Cándida albicans* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	25
50	24
25	22
12,5	20
CONTROL	0

La Tabla N°43 muestra la determinación de la sensibilidad antifungica para *Cándida albicans* frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar sabouraud. La figura N°42 se puede apreciar que con el extracto se presentó un halo inhibición de 25mm a una concentración de 100mg/mL, un halo de inhibición de 24mm a una concentración de 50mg/mL, un halo de inhibición de 22mm a una concentración de 25mg/mL y un halo de inhibición de 20mm a una concentración de 12.5mg/mL, indicando así que para las concentraciones de 100mg/mL, 50mg/mL, 25mg/mL y 12.5mg/mL muestran una mayor sensibilidad. Los valores de sensibilidad antifúngica fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Cándida albicans*, presentó un buen resultado, ya que muestra que hasta una baja concentración el extracto trabajado presenta una inhibición, lo que indica que los principios activos de nuestra planta como lo son la gran cantidad de compuestos fenólicos que se ven en manifiesto en su gran actividad

antioxidante muestra actividad inhibitoria en hongos en este caso la levadura *C. albicans*.

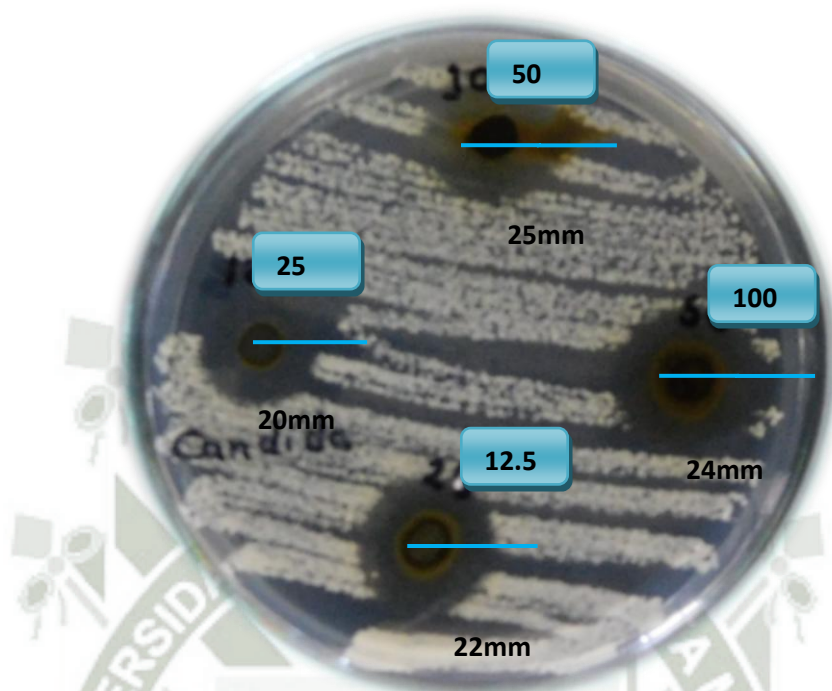


FIGURA N°42: Sensibilidad Antifúngica de *Cándida albicans*

TABLA N°44: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Cestrum auriculatum* L'Hér. SOBRE LA SENSIBILIDAD EN *Cándida albicans*.

	100		50		25		12.5	
	N°.	%	N°.	%	N°.	%	N°.	%
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	33.3
	3	100	3	100	3	100	2	66.7
TOTAL	3	100	3	100	3	100	3	100

$X^2=12.00$

$p<0.05$

La Tabla N°44, según la prueba de chi cuadrado ($X^2=12.00$) se muestra que la sensibilidad a *Cándida albicans* por el efecto de las concentraciones de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Presentó diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$).

Asimismo se muestra que con la concentración 100, 50,25 y 12.5mg/mL de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Evidencio una sensibilidad al hongo *Cándida albicans*.

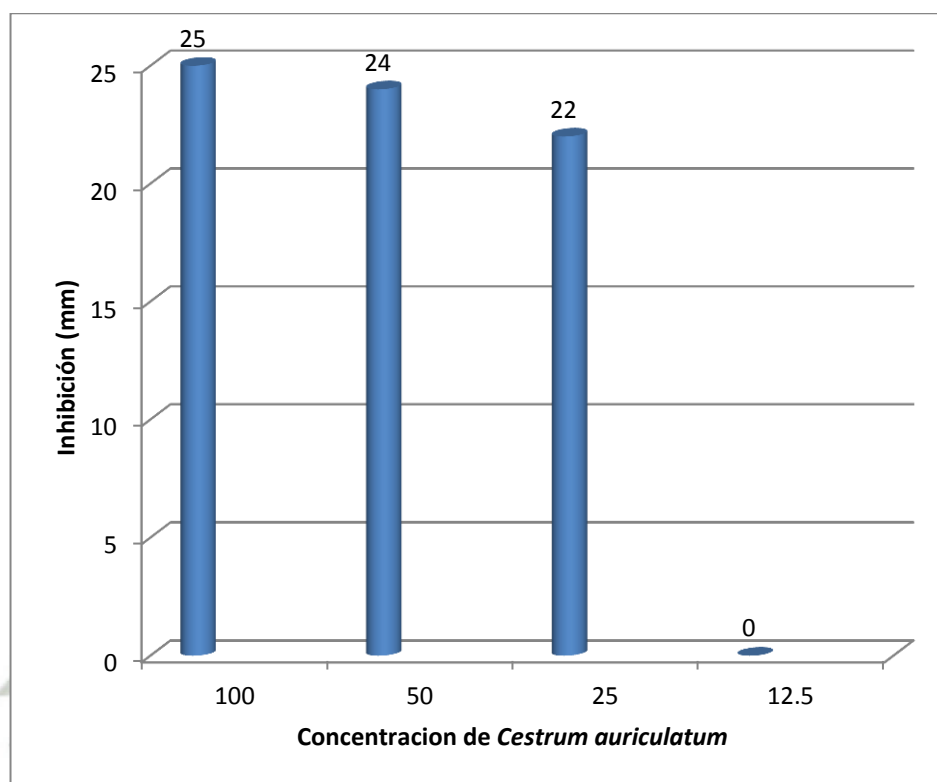


FIGURA N°43: Efecto del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” sobre el tamaño de halos de inhibición de *Cándida albicans* y su clasificación de sensibilidad.

La figura N°43: nos muestra que en las cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Cándida albicans* nos dan halos de inhibición de gran tamaño, lo que nos indica que presenta sensibilidad con todas las concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5mg/mL.

TABLA N°45: Sensibilidad antifúngica para *Microsporum sp.* Frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/mL)	DIAMETRO DEL HALO (mm)
100	38
50	34
25	30
12,5	26
CONTROL	0

La Tabla N°45 muestra la determinación de la sensibilidad antifúngica para *Microsporum sp.* Frente al extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” mediante los diámetros de sensibilidad promedio, en hoyos excavados en placas petri con agar micótico. La figura N°44 se puede apreciar que con el extracto se presentó un halo inhibición de 38mm a una concentración de 100mg/mL, un halo de inhibición de 34mm a una concentración de 50mg/mL, un halo de inhibición de 30mm a una concentración de 25mg/ml y un halo de inhibición de 26mm a una concentración de 12.5mg/mL, indicando así que para las concentraciones de 100mg/mL, 50mg/mL, 25mg/mL y 12.5mg/mL muestran sensibilidad.

Los valores de sensibilidad antifúngica fueron evaluados empleando el método de difusión Kirby-Bauer, para *Microsporum sp.* , presenta un buen resultado, ya que hasta una baja concentración el extracto trabajado presenta una inhibición, lo que indica que los principios activos de nuestra planta como lo son la gran cantidad de compuestos fenólicos que se ven en manifiesto en su gran actividad antioxidante muestra actividad inhibitoria en hongos en este caso la levadura *Microsporum sp.*

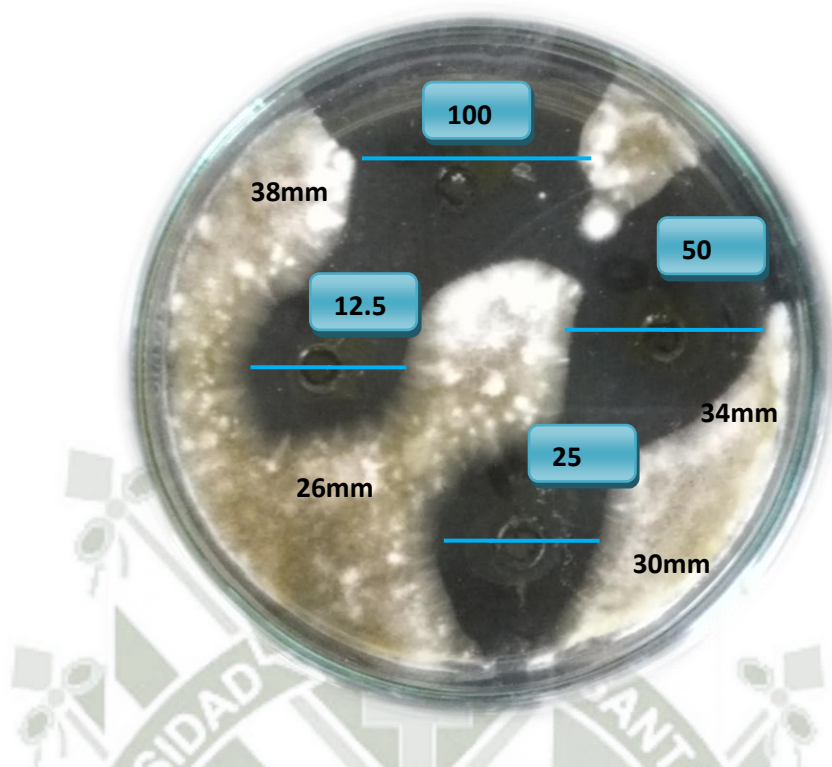


FIGURA N°44: Sensibilidad Fungicida de *Microsporium sp.*

TABLA N°46: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Cestrum auriculatum* L'Hér. SOBRE LA SENSIBILIDAD EN *Microsporium sp.*

	100		50		25		12.5	
	N°.	%	N°.	%	N°.	%	N°.	%
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	3	100	3	100	3	100	3	100
TOTAL	3	100	3	100	3	100	3	100

$X^2=0.00$

$p>0.05$

La Tabla N°46, según la prueba de chi cuadrado ($X^2=0.00$) se muestra que la sensibilidad en *Microsporium sp.* Por el efecto de las concentraciones de *Cestrum auriculatum* L'Hér. No presento diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$).

Asimismo se muestra que con las concentración de *Cestrum auriculatum* L'Hér. Evidencio una sensibilidad a *Microsporium sp.*

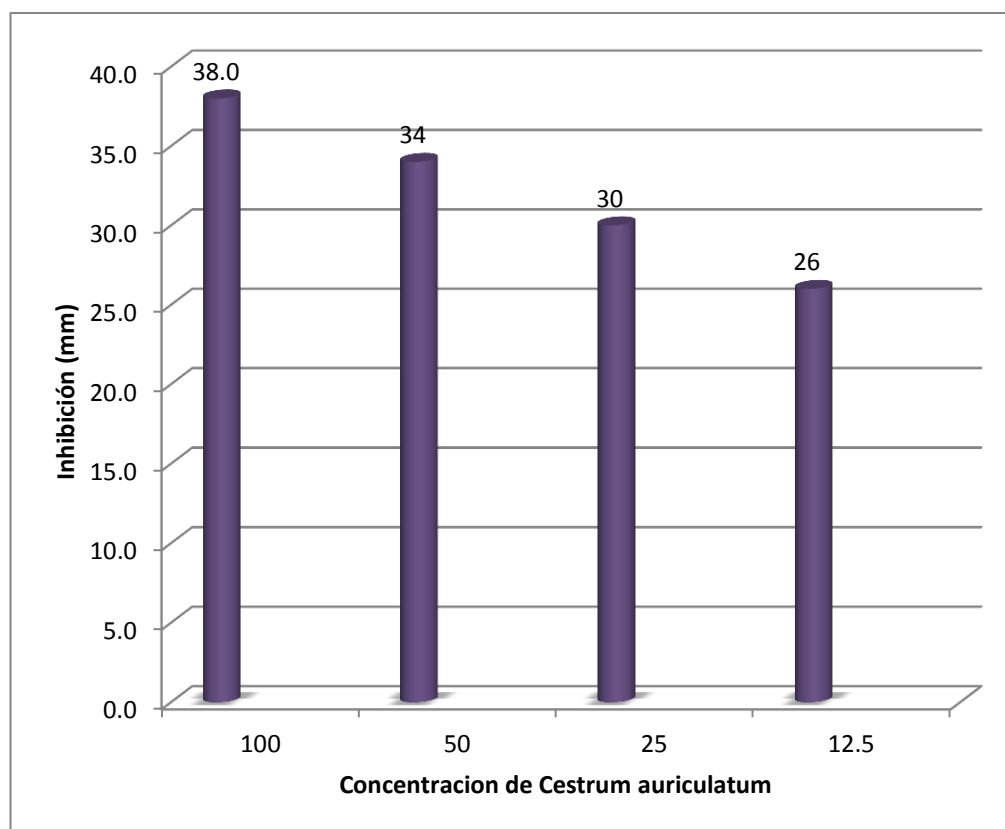


FIGURA N°45: Efecto del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” sobre el tamaño de halos de inhibición de *Microsporium sp.* Su interpretación de sensibilidad.

La figura N°45: nos muestra que en las cuatro concentraciones del extracto Alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” frente a *Microsporium sp.* Nos dan halos de inhibición grandes, lo que nos indica que presenta una mayor sensibilidad con todas las concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5mg/mL.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS



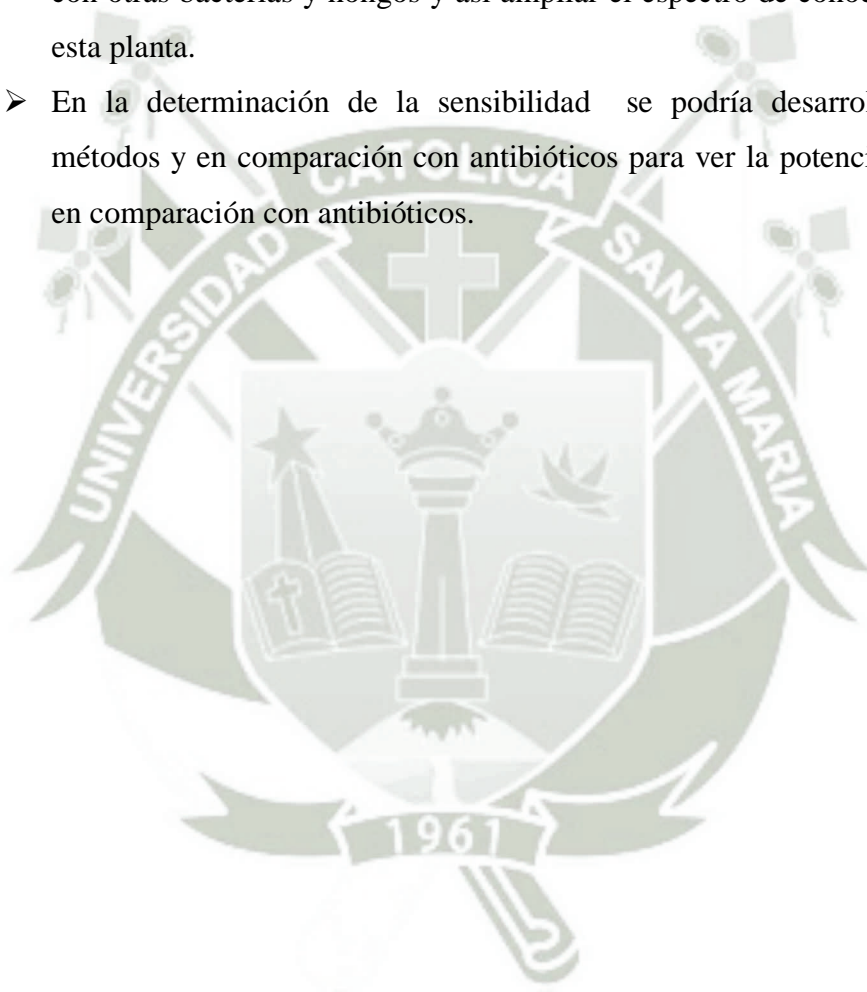
CONCLUSIONES

1. Se concluyó que el extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” presenta actividad antioxidante, así como actividad antibacteriana y antifúngica in vitro frente a bacterias patógenas Gram positivas, Gram negativas y Hongos.
2. Se determinó que por cada 40g de planta seca pulverizada se obtiene un rendimiento de 25.50 %. Mediante cromatografía en capa fina donde se confirmó la presencia de flavonoides con un RF de 0.92; para Taninos presento un RF entre 0.33 a 0.85; para terpeno con RF de 0.11 a 0.95 y para Alcaloides negativo en el extracto de hojas del extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa”.
3. Se obtuvo que el extracto alcohólico de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” posee actividad antioxidante alta, con un 47.09 % de inhibición y un resultado de 93.29 μ mol equivalente Trolox por gramos de hojas de *Cestrum auriculatum* L'Hér. “Hierba santa” para la muestra.
4. Se estableció que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hidro-alcohólico de hojas de *Cestrum hediondinum* Dun. “Hierba santa”, frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa* presento un CMI de 50mg/ml; frente *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* presento un CMI de 25mg/ml; frente a *Cándida albicans* un CMI de 25mg/ml, para *Microsporum sp.* presento un CMI de 12.5mg/ml.
5. Se estableció que la Concentración Mínima bactericida (CMB) del extracto hidro-alcohólico de hojas de *Cestrum hediondinum* Dun. “Hierba santa”, frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* presento un CMB de 100mg/ml; para *Salmonella typhi*, 50mg/ml; frente *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* su CMB fue 25mg/ml.

6. Se estableció que la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidro-alcohólico de hojas de *Cestrum hediondinum* Dun. “Hierba santa”, frente a *Cándida albicans* y *Microsporium sp.* presento un CMF de 25mg/ml.
7. Se determinó que la sensibilidad a través del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) de todos los microorganismos estudiados el grupo que presento una mayor sensibilidad fue el dermatofito *Microsporium sp.* destacando su halo de sensibilidad de 40mm como el mayor obtenido en la investigación a una concentración de 100mg/ml, seguidos por la levadura patógena: *Cándida albicans* con un halo de 25mm también a 100mg/ml, en bacterias Gram positivas: destaca la presencia de halos de 25mm para *Streptococcus pneumoniae* y una halo de 23mm sensibilidad para *Staphylococcus aureus* para ambos en sus mayores concentraciones 100mg/ml. Las bacterias Gram negativas: el halo más resaltante fue el de 14mm para *Salmonella typhi* a la concentración de 100mg/ml.

SUGERENCIAS

- Sería conveniente realizar estudios posteriores sobre la composición química exacta mediante técnicas más avanzadas, para establecer verdaderas relaciones con los principios activos y su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica.
- La actividad antibacteriana y antifúngica puede seguir siendo desarrollada con otras bacterias y hongos y así ampliar el espectro de conocimiento sobre esta planta.
- En la determinación de la sensibilidad se podría desarrollar por otros métodos y en comparación con antibióticos para ver la potencia de la planta en comparación con antibióticos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heywood *et al.* Recognized 506 families of flowering plants (rather more than in some other modern systems, e.g. 413 are recognized in the Angiosperm Phylogeny Group (APG) classification; APG III, 2009; Haston *et al.*, 2009); 106 of the families from. 2007.
2. Vásquez M.R.; Rojas, G.R.; Monteagudo, M.A.; Van Der Werff, H. & Ortiz, R. 2005. Flora vascular de la selva central del Perú: una aproximación de la composición florística de tres Áreas Naturales Protegidas. *Arnaldo* 12:112-125.
3. Sotta J. Plantas aromáticas y medicinales de la región Arequipa .Arequipa-Perú 2010.
4. Kuklinsky C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona 2003.
5. Maldonado O. Jiménez E. Bernabé M. Ceballos G. Méndez E. 96. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med UV.* Julio – noviembre. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. México. 2010.
6. Justo R. Gutiérrez V. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes *Rev. Cubana Med Milit* 2002;31(2):126-33
7. Avello M. Suwaslsky M. Radicales Libres, antioxidantes naturales y mecanismo de acción. *Atenea* 2006 II Pp. 161-172
8. Flores E. Determinación de la Actividad Antioxidante y su relación con los componentes Fenólicos presentes en el Alpechín.
9. Villarroel E. Navarro R. Andrade B, Marcano J. *Escherichia coli* identificadas en pacientes con infecciones urinarias: Sensibilidad antimicrobiana. *Rev. Soc. Ven Microbiology* 2002;:22
10. Koneman E. y col. *Diagnostico Microbiológico.* Editorial Panamericana Quinta Edición. Barcelona. España 2004.
11. Murray P. Baron E. Jorgensen J. Landry M. Pfaller M. *Manual of clinical microbiology.* Vol. 2. Edición N° 5. ASM Press Washington, D.C.:2008.

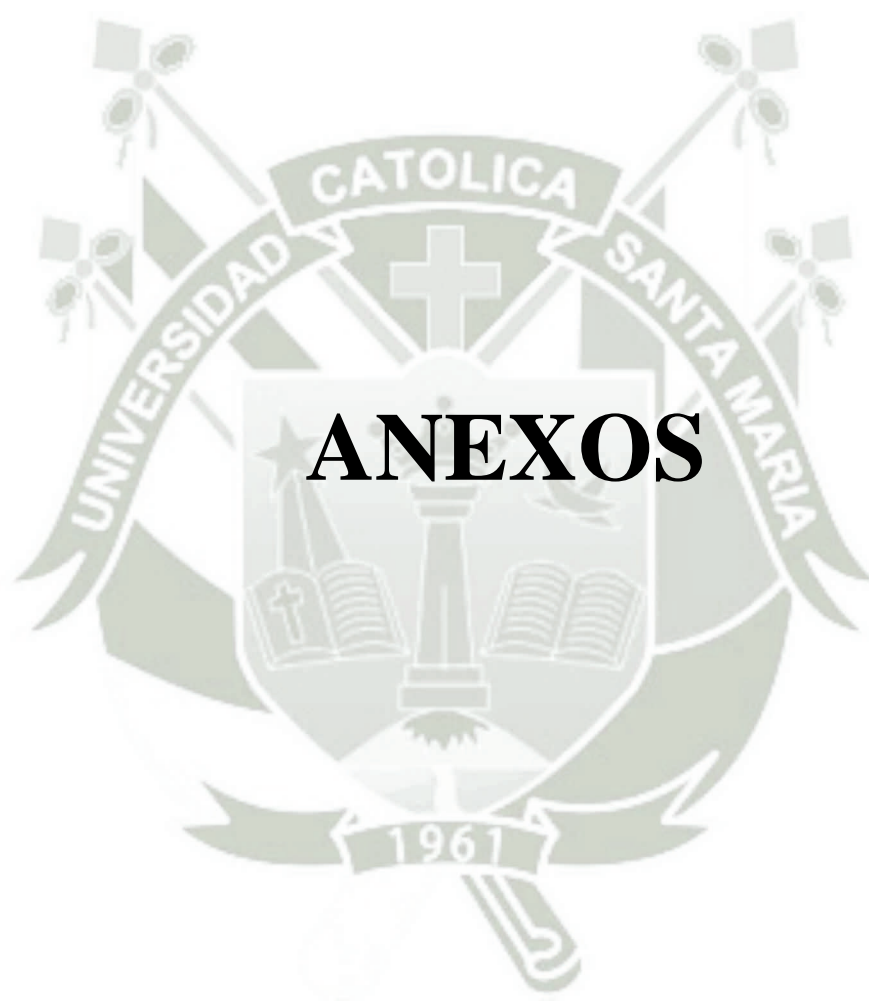
12. Romero R. *Salmonella*. Microbiología y parasitología humana. Ed. Médica Panamericana. ISBN 6077743542, 2007.
13. Venzmer G. Gran enciclopedia de la Salud Tifus, p. 394, BertelsmannVerlag 1965.
14. Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology 4th ed. McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9; 2004.
15. Hurtado M, Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. (HTML). Microbiologia (Venezuela: Scielo) 22 (2): 112-118. ISSN 1315-2556; 2002.
16. Willis H. Medicina para la práctica clínica. Editorial Médica Panamericana, 4ª. Edición, 1998.
17. Choquehuanca L. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Satureja boliviana* “Muña” frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru-2004.
18. Martínez J, Sulbaran De Ferrer B. y col. Antibacterial activity of mandarin essential oil, Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela, 2003.
19. Jave M. Guía de Práctica de Microbiología Farmacéutica II- Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad Católica de Santa María. Arequipa Perú.
20. Caldas A. Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. Universidad de Cuenca, Ecuador 2012.
21. Ardila D. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de las plantas *Annona muricata*, *Annona cherimola* y *Physalis peruviana*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias- Departamento de Microbiología Industrial. Bogotá, junio 2014.
22. González L. Efecto in vitro del aceite esencial del *Senecios graveolens* Wedell sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* B-hemolítico del grupo A y *Klebsiella pneumoniae*, Perú 2007.

23. Toribio M. Oriani S. Toso R. Tortone C. Fernandez J. Staphylococcus aureus sensible a extractos metabólicos obtenidos de plantas nativas de la provincia de la Pampa, Argentina. 2009. Cátedra de farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL. Pam.
24. Huapaya J. Florez M, Larrea C. Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de *Croton lechleri* “Sangre de grado”. Instituto de Investigación. Laboratorio de Microbiología. Universidad San Martín de Porres. Lima, Perú: 2005.
25. Durafford C. Lapraz J. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson S.A. Barcelona. 1983.
26. Pinto X. Actividad antibacteriana y antimicótica in vitro del aceite esencial de *thymus vulgaris* L. “tomillo” sobre bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, levaduras y hongos dermatofitos. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín Arequipa. Peru. 2007.
27. Desmarchelier C y Witting F. Sesenta plantas medicinales de la Amazonia peruana. 1a ed. Editorial Gráfica Bellido. Lima 2000. P.57-9
28. Rojas R. Bustamante J, Bauer I, Fernández J, Albán & O. Lock. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J. Ethnopharm. 88: 199-204.
29. Bruneton J. Farmacognosia plantas medicinales. Editorial Acribia S.A. edición Zaragoza España.
30. Aguado I. Estudio fitoquímico, determinación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de *Cestrum auriculatum* L. “Hierba santa”. 1997.
31. Lopez MJO. Calidad del Aceite de Oliva virgen extra oxidantes y función biológica Universidad de Granada 2005.
32. Bornaz N. Efecto del extracto hidro-alcohólico de la *Tropaelum tuberosum* “Mashua o Añu” in vitro frente a microorganismos uro patógenos”. Arequipa 2008.
33. Larico RL. Evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” del *Allium sativum* *Napuri* (ajo) frente a bacterias Gram negativas multiresistentes

- aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Goyeneche. Arequipa 2008.
34. Romero ST. Evaluación de la actividad antibacteriana “in vitro” de *Taraxacum officinale* Wiggers “Diente de león” en las bacterias Gram negativas causantes de infecciones urinarias. Arequipa 1998.
 35. Aragon S. Efecto antibacteriano de *Ephedra americana* H y B en Bacterias Gram Negativas de infecciones Urinarias. [Tesis presentada para optar el título profesional de biólogo UNSA] Arequipa 1997.
 36. Carpio M. Efecto antibacteriano de *Plantago major* y *Plantago lanceolata* en bacterias Gram Negativas en infecciones urinarias. Tesis presentada para optar el título profesional de BIÓLOGO. UNSA-Arequipa 1996.
 37. Carvajal C. Quintero M. Caracterización fotoquímica, actividad antimicrobiana y antimicótica del aceite esencial de congona (*Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.). Piiperacea. [Tesis previa a la obtención del Título del Ingeniero. Quito. 2012. 113-120p].
 38. Gonzales J. Efecto in vitro del aceite esencial del *Senecio graveolens* Wedell sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus B-hemolitico* del grupo A y *Klebsiella pneumoniae*. Perú 2007. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico].
 39. Mateos R, Soto M, Martínez M. Toxicidad de los extractos de *Erythrina americana*. Ciencia Ergo Sum, Vol. 7(2).2000.
 40. Mobot H. Missouri Botanical Garden. Trópicos. Saint Louis, Missouri 63110.2013. Disponible en Internet.
 41. Perez J. Isaza G. Acosta S. Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia crysantha*. Biosalud. Colombia. Volumen 6. 2007.59-68p.
 42. Bellido L. Delgado R. Determinación de la Sensibilidad in vitro de cepas de *Pseudomona aeruginosa* frente a *Allium sativum* (ajo) y antibióticos de marca. Tesis para optar el grado de Bachiller en farmacia y bioquímica. Universidad Católica de Santa María 1992.

43. Juárez I. Efecto antibacteriano del ajo. Estudio realizado in Vitro con 40 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infección urinaria. Facultad de Ciencias médicas. Universidad San Carlos Guatemala 1989.
44. Burt, S. Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in food. *Food Microbiol.* 34. 233-253; 2004.
45. Muñoz AM. Ramos-Escudero F. Alvarado-Ortíz C, Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Química Perú* 2007. 73 No 3 (142- 149).
46. Pautrat L. *et al* Manual de identificación de especies peruanas de flora y fauna silvestre susceptibles al comercio ilegal.
47. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales Departamento de Ingeniería Química abril de 2004.
48. Carrión A. García C. Preparación de extractos vegetales- Determinación de la eficiencia metódica. Recuperado el 16 de diciembre del 2016, de <http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/tq1005.pdf>
49. Ault A. *Techniques and Experiments for Organic Chemistry.* University Science Books. USA. 1998.
50. Aliaga ME. Morfología y estructura de las bacterias. Disponible en <https://medicinaupv.files.wordpress.com/2011/04/2-3-clase-morfologc3ada-y-estructura-de-laa-bacterias.pdf>
51. Ana M, García E, García A, Hernández J. Ruiz G, Yagüe J. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. *Rev. Esp Quimioter* 2011;24(2):57-66
52. Jurado R, Arenas C, Doblás A, Rivero A, Torre-Cisneros J. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine.* 2010;10(52):3497-501.

53. Angurell I. Operaciones básicas en el laboratorio de química. Departamento de Química Orgánica. Universidad de Barcelona. Disponible en http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/evaporacio_fona.html
54. Gonzales M. Caracterización fenotípica de cepas de *Escherichia coli* en pacientes pediátricos. Facultad de ciencias. Montevideo 2013.
55. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México, 1985. Disponible en http://fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wpcontent/uploads/2009/04/tp5_glicosidos_2009.pdf
56. Andrade W. Composición de los aceites esenciales de las hojas de *conyza Bonariensis*, *gnaphalium pellitum* y *achyrocline satureioides*, por CG-EM y Evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Departamento de Química Bogotá 2015.
57. Porras AP. *et al.* Importancia de los compuestos fenólicos en los alimentos. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de las Américas México 2009.
58. Puerta A. Mateos F. Enterobacterias. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. España. *Medicine*. 2010; 10(51): 3426-31. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
59. Daza RM. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud España*. Vol. 22N. o 3-1998. <http://www.mspsi.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
60. Maldonado O. *et al.* Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, México. *Rev. Med UV* Julio - Diciembre 2010.



ANEXO N°1

IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL



INSTITUTO CIENTIFICO MICHAEL OWEN DILLON (IMOD)
Investigación, Conservación, Educación y Transformación de Recursos

CONSTANCIA

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO CIENTÍFICO MICHAEL OWEN DILLON
IMOD, DE AREQUIPA

HACE CONSTAR:

Que, la muestra de planta presentada por el Sr. EULOGIO ZAPATA MIRANDA, para realizar su tesis: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIFUNGICA "in vitro" DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE *Cestrum auriculatum* "Hierba santa" EN BACTERIAS PATÓGENAS GRAM NEGATIVAS, GRAM POSITIVAS Y HONGOS 2016", fue recolectada en el Anexo de Sogay Distrito de Yarabamba, Provincia y Departamento de Arequipa, a los 16° 34' 5.50" LS-71° 26' 21.14" LO y a 2 460 m de elevación, corresponde a la especie *Cestrum auriculatum* L'Hér. (Solanaceae) y tiene la siguiente ubicación taxonómica:

Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Asterales
Orden: Solanales
Familia: Solanaceae
Género: *Cestrum*
Especie: *Cestrum auriculatum* L'Hér.

Se le expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Arequipa, 25 de mayo del 2016



Blgo. Ms. Cs Víctor Quipuscoa Silvestre
C. B. P. 2484

Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD)
vquipuscoas@hotmail.com

Dirección: Av. Jorge Chávez No. 610 Cercado, Arequipa - Perú
www.imod.org.pe - correo: imod.per@gmail.com

ANEXO N°2

IDENTIFICACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA ESPECIE VEGETAL



ANEXO N°3

REACTIVO DRAGENDORFF

Información fisicoquímica

Punto de ebullición 77 °C

Densidad 0.95 g/cm³ (20 °C)

Información de seguridad según el GHS

Pictogramas de peligro**Declaraciones de peligro**

H225: Líquido y vapores muy inflamables.

H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

H336: Puede provocar somnolencia o vértigo.

Consejos de precaución:

Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico

Información de almacenamiento y transporte

Almacenamiento Almacenar entre +15°C y +25°C.

Reactivo de Dragendorff según Munier y Macheboeuf para alcaloides.

Solución a; Se disuelve 0,85g de bismuto (III) nitrato básico en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua.

Solución b: Se disuelve 8g de yoduro potasio en 20 ml de agua.

Solución pulverizable: En caso necesario, se mezclan 5 ml de la solución a y 5 ml de la solución b, y se añade 20 ml de ácido acético glacial. La solución se completa con agua hasta 100 ml.

Su tratamiento ulterior es el calentamiento.

ANEXO N°4

CALDO PEPTONADO

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Fundamento

Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento. Si es utilizado como medio base para la fermentación de hidratos de carbono, se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono en cuestión.

Fórmula (en gramos por litro)		2.11. Instrucciones
Peptona de carne	10.0	Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Cloruro de sodio	5.0	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Siembra

Por inoculación directa del material en estudio.

Como diluyente: realizar las diluciones 1:10 y 1:100, dependiendo del uso que se le quiera dar.

Incubación

Aeróbica, a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Resultados

Microorganismos	2.11.1. Crecimiento
Escherichia coli ATCC 25922	Bueno
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Bueno
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Bueno
Control Negativo	
	2.11.2. Resultado
Medio sin inocular	Sin cambio

Características del medio:

Medio preparado: ámbar claro.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

ANEXO N°5

AGAR TRIPTOSA

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

Fundamento

La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Adicionado con 5-10 % sangre, se logra un medio enriquecido y adecuado para observar reacciones de hemólisis. Cuando se prepara como agar chocolate, es útil para el cultivo de *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae* y microorganismos exigentes similares.

Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

Instrucciones

Disolver 40 g de polvo deshidratado por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118-121°C. Preparación de la placa de Agar Sangre: añadir en forma aséptica un 5% de sangre estéril desfibrinada a temperatura ambiente, el agar debe estar a 45°C. Preparación de Agar Chocolate: después de añadir la sangre y agitando frecuentemente se mantiene el medio de cultivo a 80°C por 10 minutos hasta que adquiera un color pardo achocolatado.

Siembra

Por inoculación directa del material en estudio, sobre la superficie del medio de cultivo.

Incubación

Las condiciones de temperatura, tiempo y atmósfera de incubación, serán acuerdo al material a estudiar.

Características del medio

Medio preparado: ámbar.

Medio preparado con 5% de sangre: rojo cereza.

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

ANEXO N°6

CALDO SABOURAUD

Este medio, conocido también como medio de antibióticos N° 13, se usa para el aislamiento y cultivo de hongos y levaduras.

Fundamento

Las peptonas de carne y caseína suministran las fuentes de nitrógeno y carbono necesarios para el crecimiento de bacterias y hongos. La glucosa es la fuente de energía para aquellos organismos capaces de fermentarla.

Fórmula (en gramos por litro)		2.12. Instrucciones
Tripteína	5.0	Suspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Peptona de carne	5.0	
Glucosa	20.0	
pH final: 5.7 ± 0.2		

Siembra

Consultar referencias de métodos recomendados.

Incubación

En aerobiosis, a 22-25 °C y/o a 35-37 °C, preferiblemente con las tapas a rosca flojas. El tiempo de incubación será de hasta 28 días o dependerá del hongo que se esté buscando.

Resultados

El crecimiento se evidencia por la aparición de turbidez. Los subcultivos deben realizarse para obtener cultivos puros.

Microorganismos	Crecimiento
Cándida albicans	Bueno
Trichophyton mentagrophytes	Bueno

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

ANEXO N°7

AGAR SABOURAUD

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo, etc.). En el medio de cultivo, la pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias. Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Fórmula (en gramos por litro)		2.13. Instrucciones
Pluripeptona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

Siembra

Depende del uso, puede ser tanto en tubo como en placa. Consultar referencias de métodos recomendados.

Incubación

El tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se esté buscando aislar.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento
Saccharomyces cerevisiae	Bueno
Aspergillus niger	Bueno
Cándida albicans ATCC 10231	Bueno

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

ANEXO N°8

AGAR MICOBIOTICO

Se utiliza para el aislamiento selectivo de hongos patógenos a partir de materiales clínicos. El valor de los medios selectivos para el cultivo inicial de hongos patógenos ha sido demostrado por numerosos, este medio ha demostrado ser útil en el aislamiento de dermatofitos y otros hongos patógenos de muestras clínicas.

Principios del procedimiento

Las fuentes de nitrógeno, vitamina y carbono son proporcionadas por Enzymatic Digest of Soybean Meal in Mycobiotic Agar. La dextrosa es la fuente de carbohidratos. La cicloheximida suprime el crecimiento de hongos saprofitos. El cloranfenicol inhibe el crecimiento bacteriano. Agar es el agente solidificante.

Fórmula / litro

Digestión enzimática de la harina de soja	10 g
Dextrosa	10 g
Agar	15 g
Cicloheximida	0,5 g
Cloranfenicol	0,05 g
PH final: 6,5 \ pm 0,2 a 25°C	

La fórmula puede ajustarse y / o suplementarse según sea necesario para cumplir con las especificaciones de rendimiento.

Precauciones

1. Para uso en laboratorio.
 2. TÓXICO. Tóxico en caso de ingestión, inhalación o absorción a través de la piel. Irrita los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- Piel. Posible riesgo de daño al feto. Posible carcinógeno.

Direcciones

1. Suspender 35,5 g del medio en un litro de agua purificada.
2. Calentar con agitación frecuente y dejar hervir durante un minuto para disolver completamente el medio.
3. Autoclave a 121 ° C durante 10 minutos.

ANEXO N°9

ESCALA DE MC FARLAND

Los estándares de Mac Farland, preparadas con sulfato de bario, permiten la preparación de suspensiones de microorganismos con una determinada densidad bacteriana, su preparación requiere los siguientes pasos:

1. Preparación de una solución al 1% de cloruro de bario en agua destilada, para obtener una solución acuosa.
2. Preparación de ácido sulfúrico al 1% en agua destilada.
3. Preparar tubos de ensayo de igual tamaño y buena calidad estos deben estar muy limpios secos y esterilizados antes de su uso.
4. Mezclar ambas soluciones en las proporciones indicadas en la tabla adjunta, en los mismos tubos de vidrio que se van a utilizar para preparar las suspensiones bacterianas.
5. Sellar y etiquetar los tubos adecuadamente.
6. El patrón de turbidez de Mac Farland se prepara e otra serie de la siguiente manera:

Verter 0.6 ml de una solución de bario al 1% en una probeta graduada de 500 ml y se le añade ácido sulfúrico al 1% hasta la marca de 100 ml, esta solución puede conservarse en oscuridad a temperatura ambiente durante 6 meses.



TABLA: PREPARACION DE LOS TUBOS ESTÁNDAR DE MAC FARLAND

TUBO N°	CLORURO DE BARIO 1% (ml)	ACIDO SULFURICO 1% (ml)	DENSIDAD BACTERIANA APROX (millones por ml)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	0.10	9.0	3000

ANEXO N° 10

TABLA DE DATOS DE % DE INHIBICION DE ESTANDARES Y TROLOX

	100 [μmo l/L]	200 [μmo l/L]	300 [μmo l/L]	400 [μmo l/L]	500 [μmo l/L]	600 [μmo l/L]	700 [μmo l/L]	800 [μmo l/L]	900 [μmo l/L]	1000 [μmo l/L]	BLAN CO [μmo l/L]
ABS 1	0.475	0.451	0.415	0.388	0.365	0.338	0.299	0.275	0.238	0.203	0.525
ABS 2	0.483	0.462	0.433	0.401	0.383	0.341	0.309	0.268	0.227	0.212	0.53
ABS 3	0.479	0.457	0.421	0.397	0.369	0.339	0.306	0.271	0.239	0.212	0.527
PROM EDIO	0.479	0.457	0.423	0.395	0.372	0.339	0.305	0.271	0.235	0.209	0.527
DS	0.004	0.006	0.009	0.007	0.009	0.002	0.005	0.004	0.007	0.005	0.003
CV (%)	0.835	1.206	2.167	1.684	2.539	0.450	1.684	1.294	2.837	2.486	0.477

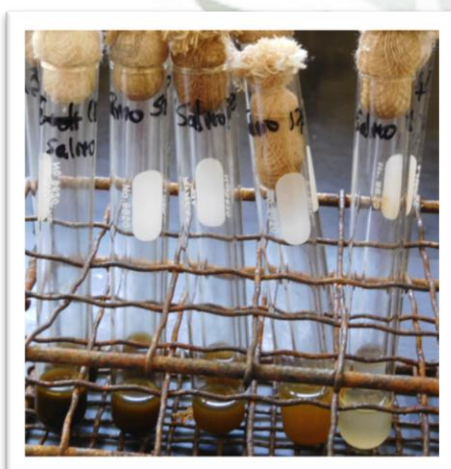
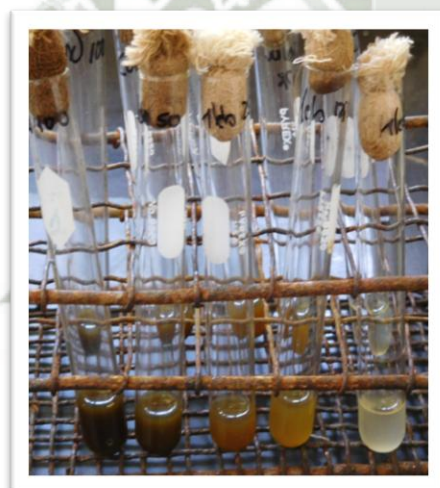
ANEXO N°11

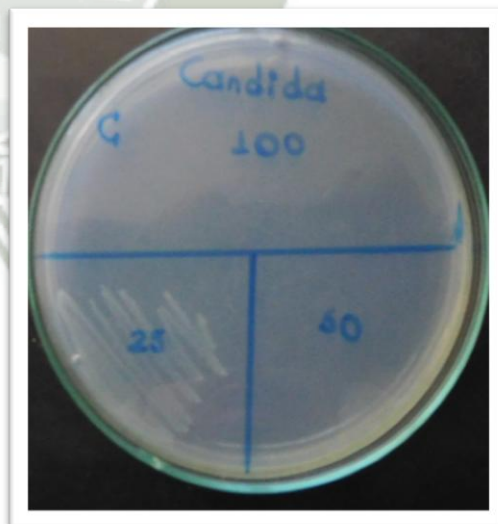
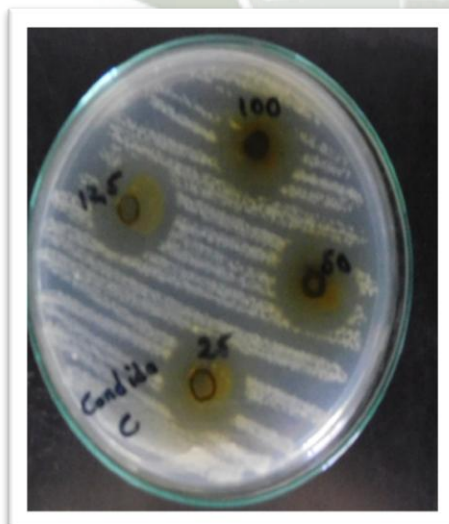
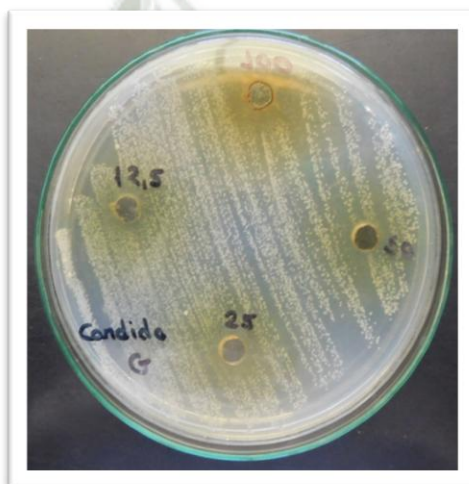
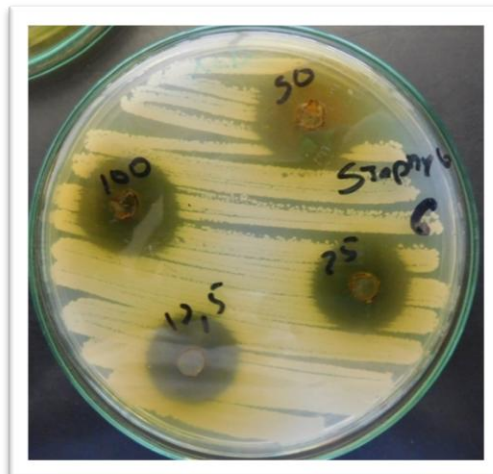
TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA (UNSA)

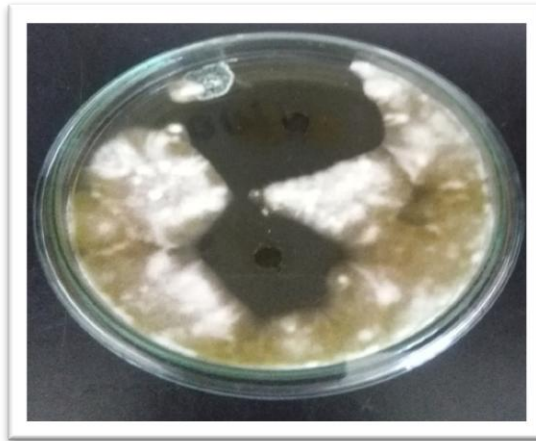


ANEXO N°12

IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

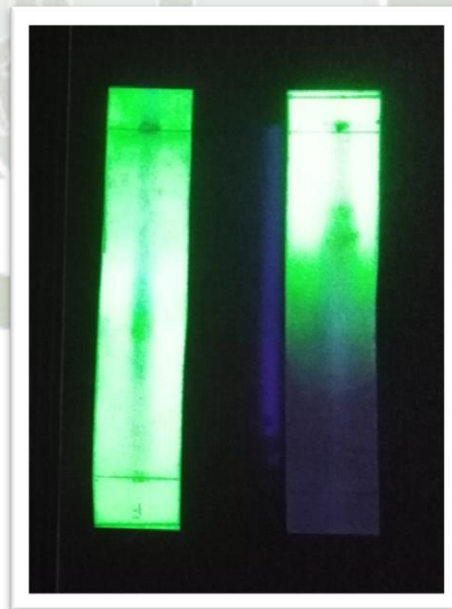






ANEXO N°13

TRABAJO EN EL LABORATORIO DE FARMACONOGSIA (H-303)



ANEXO N°14

TRABAJO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FARMACÉUTICO (H 304)

