

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

### ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



### DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE *Hederá Hélix* (Hiedra común) FRENTE A COLONIAS DE *Staphylococcus aureus*.

TESIS PRESENTADO POR EL BACHILLER:  
JOEL JOSIP CANALES PASTOR

Para optar el Título Profesional de:  
Químico Farmacéutico

ASESORADO POR:  
PhD. JOSE A. VILLANUEVA SALAS

AREQUIPA – PERÚ  
2016

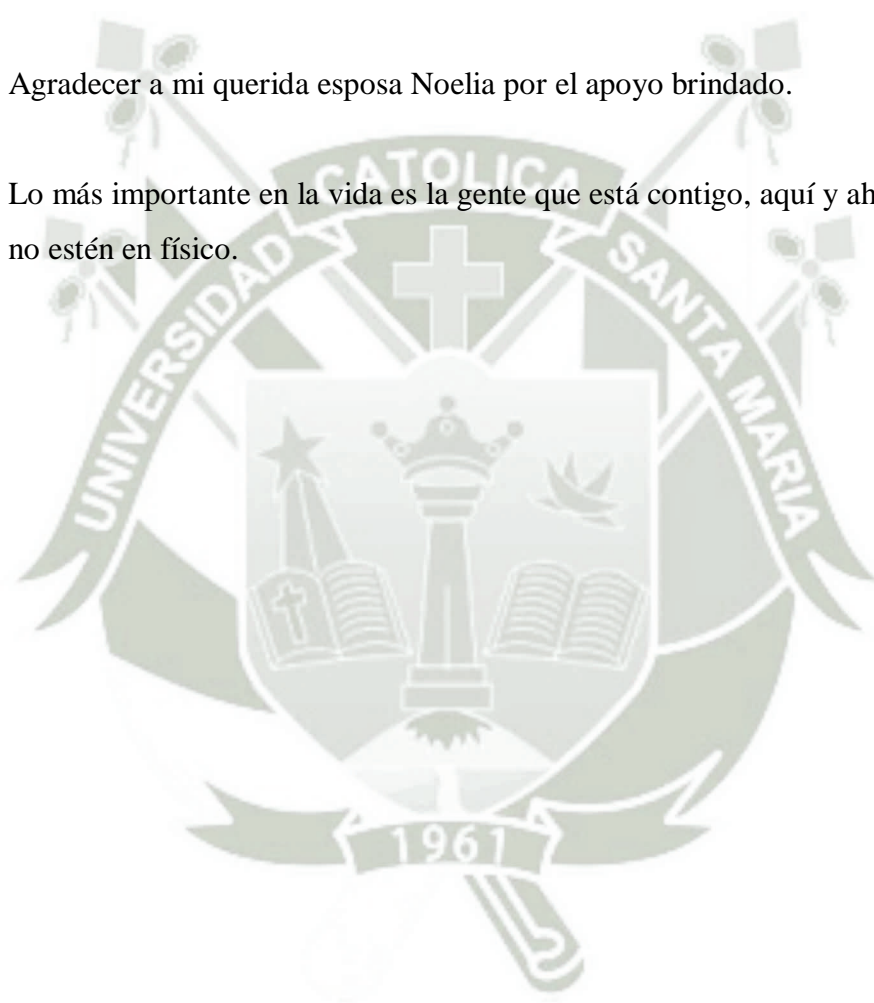
## AGRADECIMIENTO

El agradecimiento a Dios por brindarme la fuerza y la fortaleza necesaria para salir adelante y hacer realidad este sueño.

A mi madre y a mi tía Lorena por siempre creer en mí incondicionalmente y apoyarme siempre.

Agradecer a mi querida esposa Noelia por el apoyo brindado.

Lo más importante en la vida es la gente que está contigo, aquí y ahora aunque no estén en físico.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pg

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### RESUMEN

### SUMMARY

### INTRODUCCIÓN

### HIPÓTESIS

### OBJETIVO

<b>CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. HEDERÁ HÉLIX. (Hiedra común).....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Descripción botánica.....	1
1.3. Clasificación taxonómica.....	4
1.4. Distribución geográfica.....	5
1.5. Antecedentes terapéuticos medicinales.....	5
1.6. Composición química:.....	5
1.6.1. Marcha de fitoquímica.....	6
1.6.2. Saponósidos bidesmosídicos:.....	6
1.6.3. Terpenos.....	7
1.6.4. Flavonoides.....	8
1.6.5. Taninos.....	9
1.6.6. Trazas de emetina (alcaloide):.....	10
<b>2. MICROORGANISMO DE ESTUDIO CONCEPTOS Y</b>	
<b>GENERALIDADES. ....</b>	<b>12</b>
2.1. Concepto de efecto antibacteriano.....	12
2.2. Concepto de Antibacterial.....	12
2.3. Concepto de microorganismo.....	12
2.4. Descripción de bacteria.....	13
2.4.1. Bacterias Gram Positivas. <sup>(40)</sup> .....	13
2.4.2. Bacterias Gram Negativas.....	14
2.5. Staphylococcus aureus.....	15

2.6.	Características .....	15
2.7.	Identificación de laboratorio .....	15
2.8.	Enzimas .....	16
2.8.1.	Toxinas .....	17
2.8.2.	Enfermedades.....	18
<b>CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODO. ....</b>		<b>21</b>
<b>1.</b>	<b>LUGAR DE ESTUDIO. ....</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALES.....</b>	<b>21</b>
2.1.	Material Biológico .....	21
2.1.1.	Hederá Hélix .....	21
2.1.2.	Colonias utilizadas .....	21
2.2.	Material de laboratorio, equipo y reactivos .....	21
2.2.1.	Equipos .....	21
2.2.2.	Instrumentos.....	22
2.2.3.	Reactivos.....	22
2.2.4.	Batería para la coloración Gram: .....	23
2.2.5.	Medios de cultivos microbiológicos.....	23
<b>3.</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1.	Métodos de Extracción .....	23
3.2.	Método de Extracción por Soxhlet.....	24
3.3.	Identificación Cromatográfica. ....	24
3.4.	Método de separación e identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF) .....	24
3.4.1.	Fundamento.....	24
3.4.2.	Factor de referencia (Rf):.....	25
3.5.	TWEEN 20. ....	26
3.5.1.	Descripción .....	26
3.5.2.	Sinónimos .....	26
3.5.3.	Propiedades físicas .....	26
3.5.4.	Aplicación de Tween 20 .....	27
<b>4.</b>	<b>DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EN ESTUDIO .....</b>	<b>27</b>
4.1.	Procedimiento del material vegetal.....	27

4.1.1.	Recolección.....	27
4.1.2.	Estabilización .....	28
4.1.3.	Deseccación .....	28
4.1.4.	Molienda y almacenamiento .....	28
4.2.	Obtención de extracto por el método Soxhlet.....	28
4.3.	Determinación del rendimiento de la extracción mediante el Método gravimétrico .....	29
<b>5.</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ESTUDIO.....</b>	<b>30</b>
5.1.	Bacteria.....	30
5.2.	Procesamiento de la bacteria en estudio .....	31
5.2.1.	Obtención de la muestra. ....	31
5.2.2.	Conservación de la muestra. ....	31
5.2.3.	Pruebas de identificación para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	31
5.3.	Evaluación de la actividad Antimicrobiana <i>in vitro</i> :.....	35
5.3.1.	Determinación de la concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el Método de dilución en tubos. ....	35
5.3.2.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el Método de disolución en agar. ....	36
5.4.	Análisis Fitoquímico de los extractos etanólico, acetato de etilo y de hexano de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) .....	37
5.4.1.	Método de separación e identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF) .....	37
5.5.	Métodos estadísticos .....	39
5.5.1.	Medidas de Tendencia Central.....	40
5.5.2.	Medidas de Dispersión .....	40
5.5.3.	ANOVA (Análisis de Varianza): .....	40
5.5.4.	Prueba de especificidad: Test de Fisher .....	40
5.5.5.	Método de Bonferroni .....	41
5.5.6.	Prueba de Kruskal- Wallis. ....	41
	<b>CAPÍTULO III RESULTADO Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Obtención de extractos.....</b>	<b>44</b>
<b>2.</b>	<b>Determinación del rendimiento extracciones .....</b>	<b>47</b>

<b>3. Procesamiento de la bacteria en estudio. Pruebas de identificación para <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4. Evaluación del efecto antimicrobiana <i>in vitro</i> con los extractos etanólico, acetato de etilo y hexano de la <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). .....</b>	<b>57</b>
4.1. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos de etanol, acetato de etilo y Hexano de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). .....	68
4.2. Análisis Fitoquímico por Cromatografía de capa fina del extracto etanólico, hexano y acetato de etilo de la <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común). .....	78
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>95</b>
<b>SUGERENCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO N° 1 COLORACIÓN DE GRAM.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO N° 2 PRUEBA DE LA CATALASA.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO N° 3 PRUEBA DE LA COAGULASA .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO N° 4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AGAR MÜELLER HINTON .....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO N° 5 CALDO BHI (Infusión Cerebro Corazón) .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO N° 6 AGAR MANITOL SALADO .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO N° 7 ESCALA DE Mac FARLAND .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO N° 8 CONSTANTE DI ELÉCTRICA PARA LOS SOLVENTES.....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO N° 9 TABLA DE METABOLITOS SECUNDARIOS .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO N° 10 EQUIPOS UTILIZADOS .....</b>	<b>122</b>

## ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1.1	Clasificación taxonómica de la <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común) .....	4
Tabla 2.1	Solvente utilizados para las diferentes extracciones de acuerdo a su polaridad. ....	29
Tabla 2.2	Componentes de la Cromatografía de Capa Fina (CCF) para identificación de terpenos, taninos y alcaloides. ....	38
Tabla 3.1	Peso en mg de extracto seco de extracción de hojas y tallos de " <i>Hederá hélix L.</i> " (Hiedra Común) empleando diferentes solventes .....	47
Tabla 3.2	Determinación del rendimiento (%) de extracto seco de hojas y tallos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) empleando diferentes solventes. ....	47
Tabla 3.3	Resultados para <i>Staphylococcus aureus.</i> ....	57
Tabla 3.4	Prueba piloto para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común). ....	59
Tabla 3.5	Prueba piloto para determinar la acción bactericida el Tween 20.....	59
Tabla 3.6	Prueba piloto para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) con lincomicina y así compararlo con los extractos de la <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). ....	61
Tabla 3.7	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto etanólico de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	63
Tabla 3.8	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto de acetato de etilo de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	64
Tabla 3.9	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto de hexano de <i>Hederá hélix L.</i> (hiedra común). ....	66

Tabla 3.10	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los diferentes extractos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). .....	67
Tabla 3.11	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de etanol de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común) .....	69
Tabla 3.12	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de acetato de etilo de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común) .....	71
Tabla 3.13	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de hexano de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común) .....	73
Tabla 3.14	Resumen de la concentración bactericida mínima (CBM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	75
Tabla 3.15	Resumen de la concentración inhibitoria mínima (CIM) concentración bactericida mínima (CBM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano) de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). .....	76
Tabla 3.16	Resultados observados para la cromatografía de capa fina general con el extracto de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	79
Tabla 3.17	Resultados observados para la cromatografía de capa fina general con el extracto de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). .....	83
Tabla 3.18	Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de terpenos con el extracto de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común). .....	85
Tabla 3.19	Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de taninos con el extracto de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común). .....	87

Tabla 3.20	Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de taninos con el extracto de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común).....	89
Tabla 3.21	Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de alcaloides con el extracto de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común). ....	91

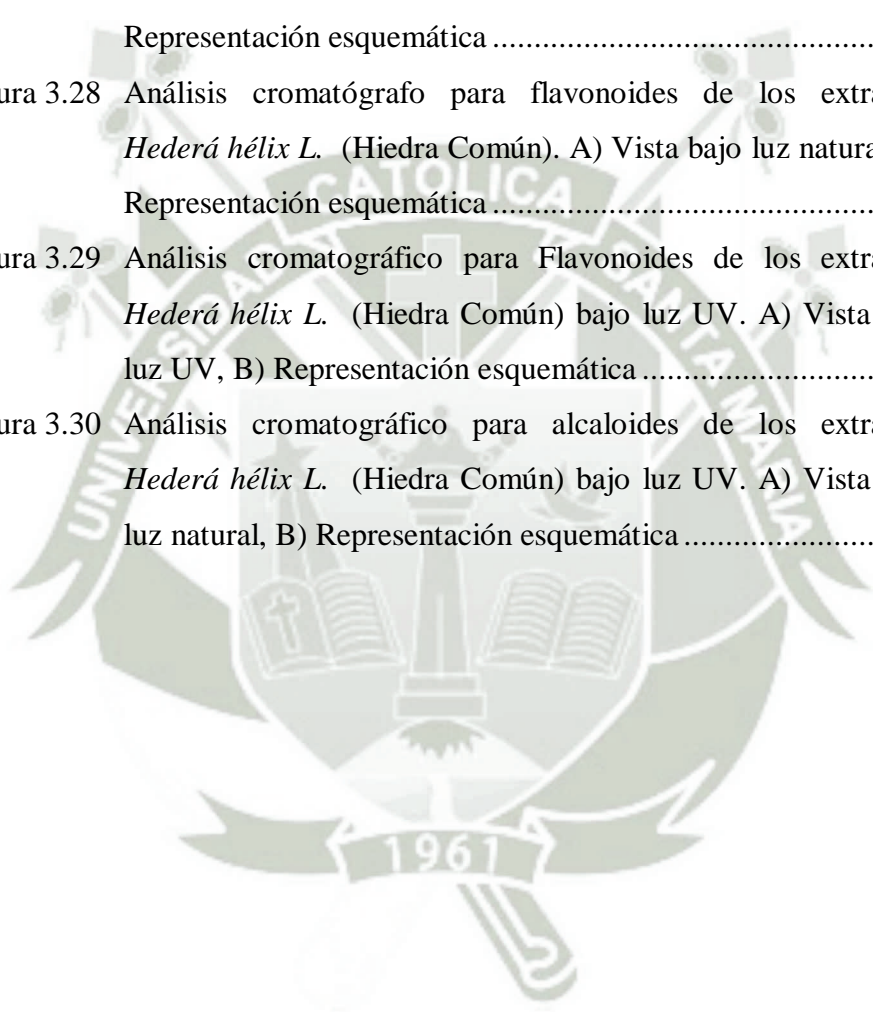


## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Pared celular de Gram Positivo.....	14
Figura 1.2	Pared celular de Gram Negativo .....	15
Figura 1.3	Semilla de La <i>Hederá hélix L.</i> ....	2
Figura 1.4	<i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	3
Figura 1.5	Hojas de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	3
Figura 1.6	<i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) .....	4
Figura 1.7	Estructura base de saponina <sup>(38)</sup> .....	7
Figura 1.8	Estructura Química del Isopreno <sup>(40)</sup> . .....	8
Figura 1.9	Estructura Química de los Flavonoides. ....	9
Figura 1.10	Estructura Química de los Taninos. ....	10
Figura 1.11	Estructura Química de Cumarina. ....	11
Figura 1.12	Estructura Química de Emetina .....	12
Figura 2.1	Diagrama explicativo para el cálculo de $R_f$ .....	26
Figura 2.2	Caldo BHI.....	32
Figura 2.3	Manitol positivo fermentador con presencia de “ <i>Staphylacoccus aureus</i> ”.....	33
Figura 3.1	<i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común) desecada.....	43
Figura 3.2	<i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra común) Molida .....	44
Figura 3.3	Equipo Soxhlet.....	45
Figura 3.4	Equipo de rota-vapor. ....	46
Figura 3.5	Diagrama de caja y bigotes para rendimiento de extracto seco de hojas y tallos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) empleando diferentes solventes.....	48
Figura 3.6	Aislado la bacteria en agar manitol salado en placa.....	51
Figura 3.7	Aislado las bacterias en agar manitol salado en tubos .....	52
Figura 3.8	Realización de la tinción Gram.....	53
Figura 3.9	Tinción de Gram para aislado bacteriano aumento 100x .....	53
Figura 3.10	Interpretación de resultado.....	55
Figura 3.11	Prueba de catalasa para aislado bacteriano para <i>Staphylococcus</i> <i>aureus.</i> ....	55

Figura 3.12	Pruebas de coagulasa para aislado bacteriano resultado positivo .....	56
Figura 3.13	Prueba piloto del Tween 20, el resultado es positivo hay crecimiento.....	60
Figura 3.14	prueba piloto con lincomicina, el resultado es que no hay crecimiento.....	62
Figura 3.15	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto etanólico <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común).....	63
Figura 3.16	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto de acetato de etilo <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) .....	65
Figura 3.17	Gráfico de medianas para CIM de extractos seco de hojas y tallos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) empleando diferentes solventes. ....	68
Figura 3.18	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto de hexano <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) .....	66
Figura 3.19	poder anti-bacterial de extracto de etanol <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). ....	70
Figura 3.20	Poder antibacterial de extracto de acetato de etilo <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). ....	72
Figura 3.21	poder antibacterial de extracto de hexano <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). ....	74
Figura 3.22	Grafico de medianas para CBM de extractos seco de hojas y tallos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) empleando diferentes solventes. ....	76
Figura 3.23	Análisis cromatográfico general de los extractos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). a) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática. ....	79
Figura 3.24	Análisis cromatográfico general de los extractos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) bajo luz UV. a) Vista bajo luz UV, b) Representación esquemática. ....	82

Figura 3.25	Análisis cromatográfico para terpenos de los extractos <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). a) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática .....	84
Figura 3.26	Análisis cromatográfico para terpenos de los extractos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) con luz ultra violeta de 254 nm. ....	85
Figura 3.27	Análisis cromatográfico para taninos de los extractos de <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). A) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática .....	86
Figura 3.28	Análisis cromatógrafo para flavonoides de los extractos <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común). A) Vista bajo luz natural, B) Representación esquemática .....	88
Figura 3.29	Análisis cromatográfico para Flavonoides de los extractos <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) bajo luz UV. A) Vista bajo luz UV, B) Representación esquemática .....	88
Figura 3.30	Análisis cromatográfico para alcaloides de los extractos <i>Hederá hélix L.</i> (Hiedra Común) bajo luz UV. A) Vista bajo luz natural, B) Representación esquemática .....	91



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
EtoAc	Acetato de etilo
H.Ac	Ácido acético glacial
HCl	Ácido Clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
Bu(OH)	Butanol
Cl <sub>3</sub> CH	Cloroformo
CCF	Cromatografía Capa Fina
EtOH	Etanol
ExEtOH	Extracto Etanólico
g	Gramos
NaOH	Hidróxido de sodio
$\lambda$	Longitud de onda
Me(OH)	Metanol
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
%	Porcentaje
KMnO <sub>4</sub>	Permanganato de potasio
pH	Potencial de hidrógeno
CeSO <sub>4</sub>	Sulfato de cerio
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto antibacteriano de la *Hederá hélix L.* (Hiedra común), dado que la medicina tradicional le otorga variedad de efectos beneficiosos a la salud humana. Para realizar el estudio se prepararon extractos utilizando, las hojas y el ápice de la planta.

Para la extracción de principios activos de la planta se usaron solventes de diferente polaridad: el etanol por ser polar, el acetato de etilo por ser medianamente polar y hexano por ser un solvente apolar, para proceder a realizar una prueba preliminar con los extractos se utilizó por el método de dilución en agar para determinar cual tenía mayor actividad antimicrobiana; siendo el extracto etanólico de la *Hederá hélix L.* (Hiedra común) el de mayor actividad.

La extracción se realizó por el método de soxhlet con etanol absoluto 99.7° G.R., obteniéndose el extracto etanólico con un porcentaje de rendimiento de 67.9% en promedio, con el acetato de etilo se encuentra un porcentaje de rendimiento en promedio de 50.9% y un rendimiento en el extracto de hexano de 45.8% en promedio. La cromatografía de capa fina demuestra la presencia de sustancias terpénicas, flavonoides y alcaloide como la cumarina. En el extracto de etanol, se pudo apreciar metabolitos como

El método para la determinación de la actividad antimicrobiana empleado fue el de dilución en caldo y por el método de dilución en agar. Se utilizó 10 colonias de *Staphylococcus aureus*, que fueron provenientes de pacientes ambulatorios con síntomas de faringitis en Arequipa.

Los resultados obtenidos indican una respuesta antibacteriana baja para *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto fue determinada la Concentración inhibitoria Mínima (CIM), cuyos valores fueron una CIM del extracto de etanólico fue 81 mg/ml, para el extracto de acetato de etilo es de 92 mg/ml y para el extracto de hexano fue de 96 mg/ml y las 10 colonias de *Staphylococcus aureus*, muestran que la bacteria es más susceptible al extracto etanólico, con una concentración bactericida mínima (CBM) 91 mg/ml en promedio, se observa que para el extracto de hexano es menos susceptible.

## SUMMARY

In the present paper It was investigated the antibacterial effect of *Hedera helix L.* (Common Ivy), since traditional medicine gives variety of beneficial human health effects.

For extraction it was used solvents of different polarity: ethanol being polar, ethyl acetate being moderately polar and hexane being an apolar solvent, to proceed to a preliminary test with the extracts by the method of agar dilution to determine what had higher antimicrobial activity; Being the ethanol extract of *Hedera helix L.* (Common Ivy) the highest activity.

Extraction was performed by the method of Soxhlet with absolute ethanol 99.7 ° GR, obtaining the ethanol extract with a percentage yield of 67.9% on average, with ethyl acetate is a percentage yield on average of 50.9% and a percentage yield in hexane extract of 45.8% on average. The thin layer chromatography shows the presence of terpene, flavoides and alkaloid substances like cumarine only in ethanol extract.

The method for determining the antimicrobial activity used was the broth dilution method and agar dilution dilution. It was used 10 strains of *Staphylococcus aureus*, which were from patients with pharyngitis in Arequipa.

The results indicate a low response to *Staphylococcus aureus* antibacterial. Therefore it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC), whose values were an MIC of ethanol extract of 81 mg / ml to ethyl acetate extract is 92 mg / ml and the hexane extract is 96 mg / ml and 10 colonies of *Staphylococcus aureus*, show that the bacterium is more susceptible to ethanolic extract, with minimal bactericidal concentration (MBC) 91 mg / ml on average. It is observed that for the hexane extract is less susceptible.

## INTRODUCCIÓN

Hay una gran incidencia de enfermedades bronquiales, en especial con “*Staphylococcus aureus*”; en la cual los médicos recetan a su paciente el uso de medicamentos comerciales para el tratamiento de dicha patología. En los últimos años se han empezado a recomendar remedios caseros y medicamento alternativos.

Este auge de la medicina natural ha incrementado en los últimos años, debido a esto ha aumentado el estudio de plantas medicinales, por tanto se está intensificando con el deseo de descubrir y crear nuevos antibióticos o terapias alternativas a las ya existentes, basándose en el uso tradicional que le dan los pobladores a diversas plantas.

Algunos pobladores usan la hiedra común o Hederá (también denominada *Hederá hélix L.* como nombre científico) y en la medicina actual la usan como expectorante y fluidificante de flema por sus propiedades, sobre todo a nivel bronquial. También en la medicina natural se conoce sus uso como vasoconstricción, anticoagulante, expectorante y antibiótico cutáneo en forma de emplasto. Hay que indicar que el uso como antibiótico no se ha demostrado en estudios anteriores.

Por tal motivo se realizó la presente investigación, para poder comprobar la acción antibacteriana ante infecciones bronquiales producida por *Staphylococcus aureus*, para usarlo como una posible opción de tratamiento natural.

## HIPÓTESIS

Se conoce que en la medicina tradicional existen antecedentes terapéuticos atribuidos a la planta *Hederá hélix L.* (Hiedra Común). Es posible que la obtención y aplicación del extracto con mayor porcentaje de rendimiento obtenido y con la mayor presencia de metabolitos de dicha especie vegetal, posea acción antibacteriana *In Vitro* frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*.

## OBJETIVO

1. Obtener el extracto de la *Hederá hélix L.* (hiedra común) utilizando los solventes, etanol, acetato de etilo y hexano, a su vez determinar los rendimientos de cada uno extractos para elegir el de mayor rendimiento.
2. Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto de la Hederá para hallar el mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.
3. Realizar las pruebas cromatográficas de capa fina a los extractos para determinar los principales componentes de *Hederá hélix L.* (hiedra común).

## CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

### 1. *HEDERÁ HÉLIX*. (Hiedra común).

#### 1.1. Generalidades

La “*Hederá hélix L*” es una planta trepadora de hojas perennes, que no se caen durante todo el año, es ampliamente utilizada con fines medicinales, con el cuidado de distinguirla de la venenosa que se encuentra en Europa y América. <sup>(1)</sup>

La hiedra es una planta relictica, quiere decir que no se encuentra en forma natural en otra parte del mundo y en la zona de origen está disminuyendo y uno de los escasos sobrevivientes en Europa. Se cree que su fácil dispersión por las aves la ayudó a colonizar de nuevo amplias zonas de donde había desaparecido durante las glaciaciones. (1,3) (41,42,43).

La familia Araliaceae consta de unos 60 géneros y 750 especies principalmente tropicales. En los países de Brasil, Ecuador, Argentina, Chile y Perú están presentes 5 géneros <sup>(41-42)</sup>

#### 1.2. Descripción botánica

La *Hederá hélix* es una planta rastrera y trepadora es originaria de las zonas templadas de África, Asia y Europa donde es originaria. Logra crecer hasta 30 metros de longitud, sus ramas flexibles posee unas raicillas que se aferran al suelo y árboles. Sus hojas lobuladas, alternas, son brillantes, correasas y llegan a poseer de 3 a 5 lóbulos en sus ramas infértiles. <sup>(33-40)</sup>

Sus flores son de color amarillo o verde que al madurar y el fruto pasa de un color violeta - azulado, las cuales agrupan en pedúnculos de forma regular y al mismo nivel. El fruto de esta planta son unas bayas de color oscuro violeta - azulado, las cuales tienen en su interior de 3 a 5 semillas envueltas en una sustancia jugosa. <sup>(10,20)</sup> Como se muestra en la figura 1.3. Hay que mencionar que “las semillas se usan también en

como tinte”.<sup>(20)</sup>



**Figura 1.1 Semilla de La *Hederá hélix L.***

La Hederá posee un tallo rastrero y un olor irritante y desagradable, aparte de estar teñida de un color verde grisáceo. Alcanza los 60cm de altura, y está provista de hojas glaucas reniformes y de margen festoneado, siendo estas de color verde con matices púrpuras.<sup>(29)</sup>

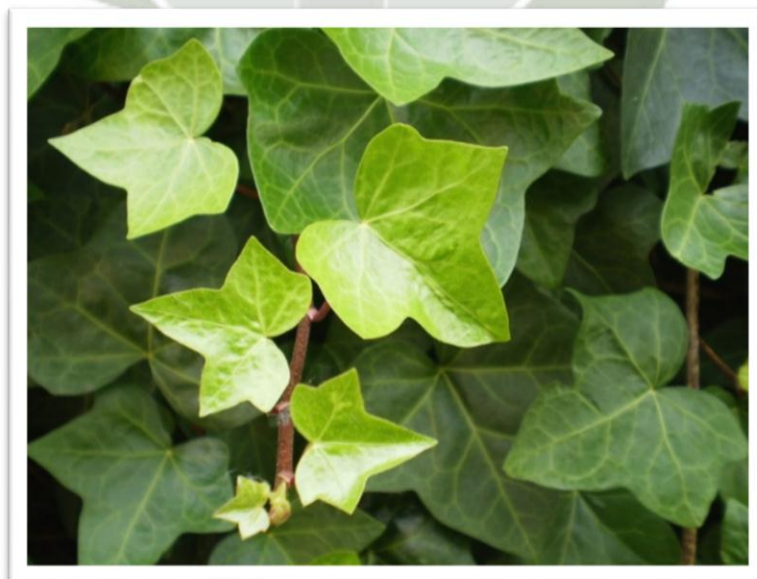
Las hojas tienen dos tipos de ramas, unas fértiles y otras estériles, que se distinguen fácilmente por la forma de sus hojas. Las hojas estériles son lobuladas con tres o cinco lóbulos y un nervio central que llega al extremo de cada uno de ellos; las hojas fértiles son ovaladas con un solo nervio central, y no pueden trepar tanto.<sup>(1,20)</sup>

La hiedra es resistente ya que, tolera ambientes extremos, en climas cálidos es preferible mantener el suelo húmedo los primeros años de vida. La poda se debe realizar en los meses de marzo o julio.<sup>(7)</sup>

Las flores se distribuyen en tríos, son de color violeta-azulado, fragante y con una cima muy contraída y de forma globosa. Ver figuras 1.1,<sup>(44)</sup>



**Figura 1.2 *Hederá hélix L.* (Hiedra Común)**



**Figura 1.3 Hojas de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común)**



**Figura 1.4** *Hederá hélix* L. (Hiedra Común)

### 1.3. Clasificación taxonómica

La Hiedra Común o *Hederá hélix* L. presenta la siguiente clasificación taxonómica de acuerdo al sistema de Cronquis, 1981.

El nombre científico: *Hederá* proviene del latín *haerere*, que significa estar adosado, esto se debe a la propiedad de la planta de adherirse a las paredes de árboles y otras estructuras de soporte. <sup>(21)</sup>

**Tabla 1.1** Clasificación taxonómica de la *Hederá hélix* L. (Hiedra común) <sup>(18)</sup>

<b>Reino:</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino:</b>	Tracheobionta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	Apiales
<b>Familia:</b>	Araliaceae
<b>Subfamilia:</b>	Aralioideae
<b>Tribu:</b>	Schefflerieae
<b>Género:</b>	<b>Hederá</b>

#### 1.4. Distribución geográfica

La *Hederá hélix L.* (Hiedra común) es una especie botánica de hiedra originaria de los bosques húmedos del oeste, el centro y el sur de Europa, norte de África y Asia, desde la India hasta Japón. Pero gracias a su gran poder de adaptación están en todo el mundo. <sup>(28-29)</sup>

#### 1.5. Antecedentes terapéuticos medicinales.

Se le conocen diversas propiedades medicinales, pero entre las más importantes se puede detallar:

- Como expectorante: Esta planta resulta ser un magnifico expectorante, esto gracias a sus propiedades irritantes, pues aumenta la secreción bronquial. <sup>(40,41)</sup>
- Para alteraciones menstruales: Gracias a sus efectos clínicos y estrogenicos, sirve como reguladora de la función menstrual. Gracias a isoflavonas presentes en la *Hederá hélix L.* (Hiedra común). <sup>(40,42)</sup>
- Reumatismo: Por sus propiedades irritantes sobre la piel, suele reducir la sensibilidad nerviosa, lo cual es positivo para tratar los dolores reumáticos.
- Piel: algunos estudios demuestran sus cualidades para complementar las dietas, convirtiéndose en un agente tópico contra la celulitis. <sup>(1,5)</sup>
- Otros: parasítica, ya que tiene un efecto laxante e irritante por el contenido de sorbitol. <sup>(12,40,42)</sup>

#### 1.6. Composición química:

La *Hederá hélix L.* contiene saponósidos triterpénicos (2 a 6 %): heterócidos dihederagenima (hederacósido C, alfa-hederina) heterósidos del ácido oleanólico (hederacósido B y  $\beta$ -hederina), heterósidos de flavonoles (rutina, kenferol -3-rutinósido, flavonoles (quercetina). Cumarina (esculetina) trazas de emetina (alcaloide); poliacetilenos, falcarinona, falcarinol, esteroles, ácido cafeico y clorogénico, hidrocarburos sesquiterpénicos (germacreno,  $\beta$  -

elemeneno, elixina).<sup>(11-8)</sup>

Según estudios realizados en la Efedra americana de Lima-Perú, en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina encontraron en varias Plantas en el Perú donde encontraron la *Hederá hélix*, se encuentran los siguientes compuestos flavonoides kaemferol, rutina, Apigenina, hesperidina, quercetina, crisina, 5, 7, 3, 4-tetrahidroxi-6,4'-dimetoxi flavonol y 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi flavonona<sup>(3,27)</sup>

### 1.6.1. Marcha de fitoquímica.

Llamado también tamizado fitoquímico o (*screening fitoquímico*), es una de las etapas iniciales de la investigación de precipitados, coloraciones, etc.

Es el proceso por el cual se va logrando identificar de manera cualitativa la presencia de determinados grupos de constituyentes químicos de la planta, llamados metabolitos secundarios.<sup>(16)</sup>

La química de la especie *Hederá* ha sido investigada y los estudios fitoquímicas han conducido al aislamiento de numerosos compuestos fisiológicamente activos.<sup>(1,5)</sup> Estos son:

### 1.6.2. Saponósidos bidesmosídicos:

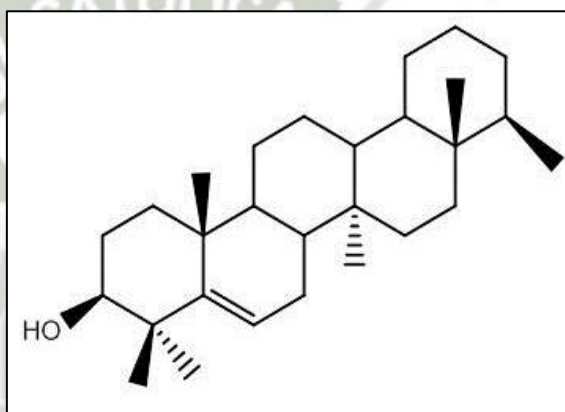
Denominados hederacósidos (el azúcar o azúcares se unen por dos puntos a la genina).

Los saponósidos o saponinas son heterósidos muy extendidos en el reino vegetal. Principalmente se caracterizan porque en contacto con el agua producen una espuma persistente, propiedad que se ha utilizado ampliamente en muchas partes del mundo. Además, las saponinas tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad de las paredes celulares y destruir los hematíes por hemolisis.<sup>(11-26)</sup>

Los saponósidos, también conocidos como saponinas, son heterópsidos que constan de una parte glucídica (con uno o más

azúcares) y de una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica, por tanto de carácter poco polar. Los azúcares más frecuentes constituyentes de los dos tipos de saponósidos son la glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa, y en los saponósidos triterpénicos también es frecuente el ácido glucurónico.

Los saponósidos se caracterizan por su capacidad, cuando se agita cualquier solución acuosa que los contenga, para producir espuma. La espuma se forma debido a que los saponósidos disminuyen la tensión superficial del agua, es decir, son tensio activos naturales. <sup>(1-6)</sup>



**Figura 1.5: Estructura base de saponina** <sup>(38)</sup>

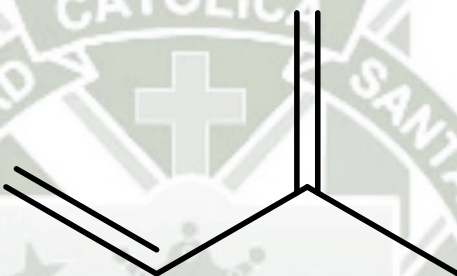
**Fuente:** *Chemsketch*.

### 1.6.3. Terpenos

Son moléculas muy abundantes en los vegetales. Es el metabolito secundario que forma una amplia y diversa familia de sustancias naturales, estos compuestos, proceden de la condensación, en número variable, de unidad isoprenicas (isopreno=metil2-butadieno), ver Figura 1.6; pero realmente los terpenos no derivan del isopreno ya que este nunca se ha encontrado como producto natural; siendo el verdadero precursor de los terpenos el Ácido Mevalónico, el cual proviene de Acetil CoA. En cualquier caso la división de la estructura de los terpenos en unidad de isopreno es útil y pragmática y se

emplea con mucha frecuencia. Los terpenos pueden contener desde una hasta ocho unidades isoprenicas y su clasificación se determina por el número de isoprenos que contiene: monoterpenos (2-isoprenos), diterpenos (4-isoprenos), triterpenos (6-isoprenos), tetraterpenos (8- isoprenos). Politerpenos (macromoléculas compuestas por un gran número de unidades de isopreno).

Estos compuestos se encuentran en todas partes: semillas, flores, hojas, raíces, madera de las plantas superiores, así como musgo, algas y líquenes. <sup>(3)</sup> Dan coloración a los órganos vegetales y participan en la síntesis de las vitaminas A, K y E. <sup>(3)</sup>



**Figura 1.6 Estructura Química del Isopreno<sup>(40)</sup>.**  
**Fuente:** *Chemsketch*.

#### 1.6.4. Flavonoides

Los flavonoides (o bioflavonoides), también conocidos como Vitamina P y citrina, son una clase de metabolitos secundarios de las plantas. De acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, que se pueden clasificar en:

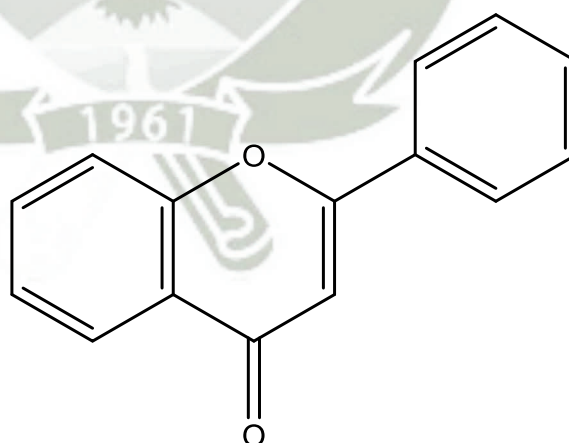
- Flavonoides: derivados de 2-phenylchromen-4-ona (2-fenil-1 ,4-benzopyrone) estructura (por ejemplo: la quercetina, rutina, canferol).
- Isoflavonoides: derivados de 3-phenylchromen-4-ona (3-fenil-1 ,4-benzopyrone) estructura
- Neoflavonoids: derivado de 4-phenylcoumarine (4-fenil-1 ,2-benzopyrone) estructura.

Las tres clases de flavonoides arriba mencionados son todos los compuestos de cetona, y como tal, son los flavonoides y flavonoles. Esta clase fue la primera que se denomina "bioflavonoides". Los flavonoides términos y bioflavonoides también han sido de manera más flexible utilizado para describir no cetona compuestos de polifenolpolihidroxi que se denomina más específicamente flavonoides, flavan-3-oles, o las catequinas (a pesar de las catequinas son en realidad un subgrupo de flavonoides).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas de cumplir con muchas funciones.

Los flavonoides son pigmentos vegetales más importantes para la coloración de las flores producen la pigmentación de color amarillo o rojo / azul en los pétalos para atraer animales polinizadores.

Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes de gran alcance, lo que significa que reducen la inflamación, promueven la salud de las arterias y ayudan a combatir el envejecimiento mediante la prevención y la reparación de daños celulares. Los flavonoides también pueden proteger contra la demencia, enfermedad de Alzheimer, y algunos tipos de cáncer. <sup>(9-10)(41)</sup>



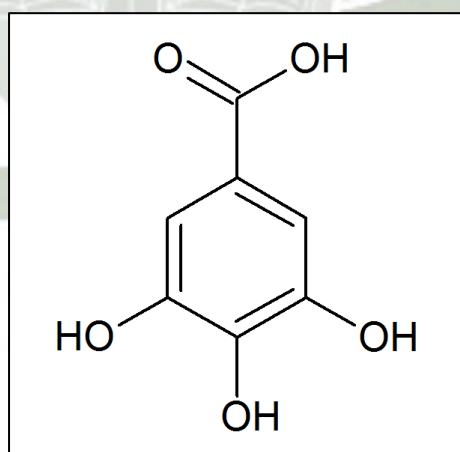
**Figura 1.7 Estructura Química de los Flavonoides.**  
**Fuente:** *Chemsketch*.

#### 1.6.5. Taninos

Los taninos son sustancias polifenolicos presentes en gran número de plantas productos del metabolismo secundario. Su carácter hidrosoluble permite que sea de fácil extracción y de utilidad en diversos usos en la industria química y farmacéutica. Sus propiedades son. <sup>(11,12)</sup>

- Astringentes.
- Hemostático local y cicatrizante.
- Antiséptico local.
- Antiinflamatorio y favorecedor del retorno venoso
- Antioxidante

Hay que recordar que en el mundo vegetal, los taninos, tienen la capacidad para proteger a la planta contra las heridas que sufren y también protegen la planta de los ataques exteriores, ya que resultan tóxicos para los microorganismos o algunos animales herbívoros que la consumen. <sup>(12)</sup> Algunos preparados ricos en taninos poseen una acción vasoconstrictora, como los hechos con hammamelis, y otros como el vino tinto. La estructura básica de los taninos se observa en la figura. (Ver Figura 1.8) <sup>(39,40)</sup>

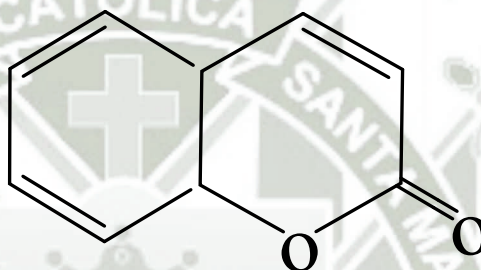


**Figura 1.8 : Estructura Química de los Taninos.**  
Fuente: Chems sketch.

#### 1.6.6. Trazas de emetina (alcaloide):

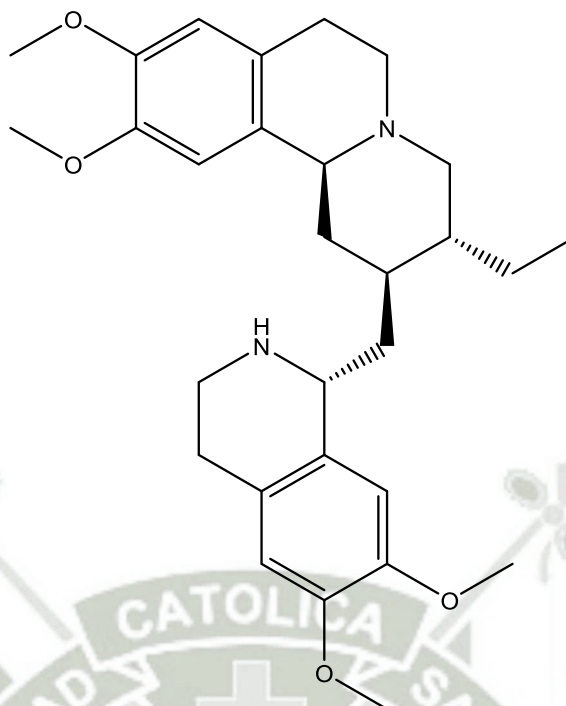
Es un compuesto químico que posee un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de aminoácidos, es aquel metabolito secundario de las plantas sintetizados generalmente, a partir de aminoácidos los alcaloides verdaderos derivan de un aminoácido, son por lo tanto nitrogenados. Poseen acción fisiológica intensa en los animales aun a bajas dosis con efectos psicoactivos, por lo que son muy usados en la medicina para tratar problemas en la mente y calmar el dolor. <sup>(25,27)</sup>

Se puede observar la estructura básica de la cumarina se observa (ver Fig.1.9)



**Figura 1.9: Estructura Química de Cumarina.**  
**Fuente:** Chems sketch.

Se puede observar la estructura básica de la emetina se observa (ver Fig.1.10)



**Figura 1.10: Estructura Química de Emetina**  
Fuente: Chemskech.

## 2. MICROORGANISMO DE ESTUDIO CONCEPTOS Y GENERALIDADES.

### 2.1. Concepto de efecto antibacteriano.

Proviene del adjetivo antibacteriano donde el fármaco es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos. Se clasifican otro sistema de clasificación, es por acción que realizan en el microorganismo. <sup>(25)</sup>

### 2.2. Concepto de Antibacterial.

Es un compuesto o sustancia que mata o hace más lento el crecimiento de bacterias, denota una gama más amplia de compuestos antibacterianos y los clasifica por la base de origen: químico, biosintética en semisintético natural y sintético. <sup>(25)</sup>

### 2.3. Concepto de microorganismo.

Los microorganismos son aquellos seres vivos más diminutos que

únicamente pueden ser apreciados a través de un microscopio. <sup>(13,14)</sup>

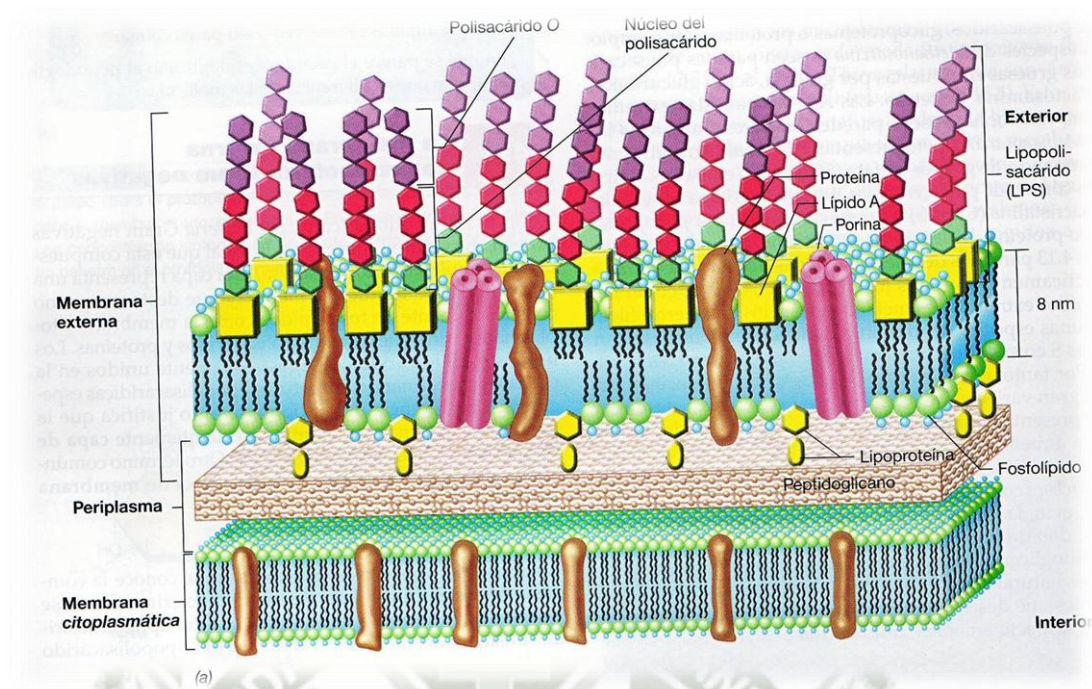
## 2.4. Descripción de bacteria

Se define como organismo microscópico unicelular, carente de núcleo, que se multiplica por división celular. Las bacterias son agentes causantes de numerosas enfermedades, las bacterias son los principales componentes del reino de las móneras, según su forma, las bacterias reciben un nombre distinto (cocos, bacilos, espiroquetas, vibriones) y se separan en dos grande grupos según la tinción Gram que son : Gram Positivas y Gram Negativas.<sup>(11)</sup>

### 2.4.1. Bacterias Gram Positivas. <sup>(40)</sup>

En microbiología, se denominan bacterias Gram positivas a aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de aquí el nombre de "Gram-positivas" o también "grampositivas". Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. <sup>(28)</sup>

La pared celular de las bacterias Gram positivas, tienen un grosor de casi 80 nanómetros y está compuesta principalmente de varias capas de peptidoglicano. De hecho, desde el 40% hasta más del 80% del peso seco de algunas paredes celulares, Gram positivas; están constituidas por peptidoglicanos. Atrapados dentro de esta matriz de peptidoglicanos, se encuentran una variedad de proteínas, polisacáridos y moléculas únicas denominadas ácidos teicoicos (Figura 1.11). <sup>(22)</sup>



**Figura 1.11: Pared celular de Gram Positivo**

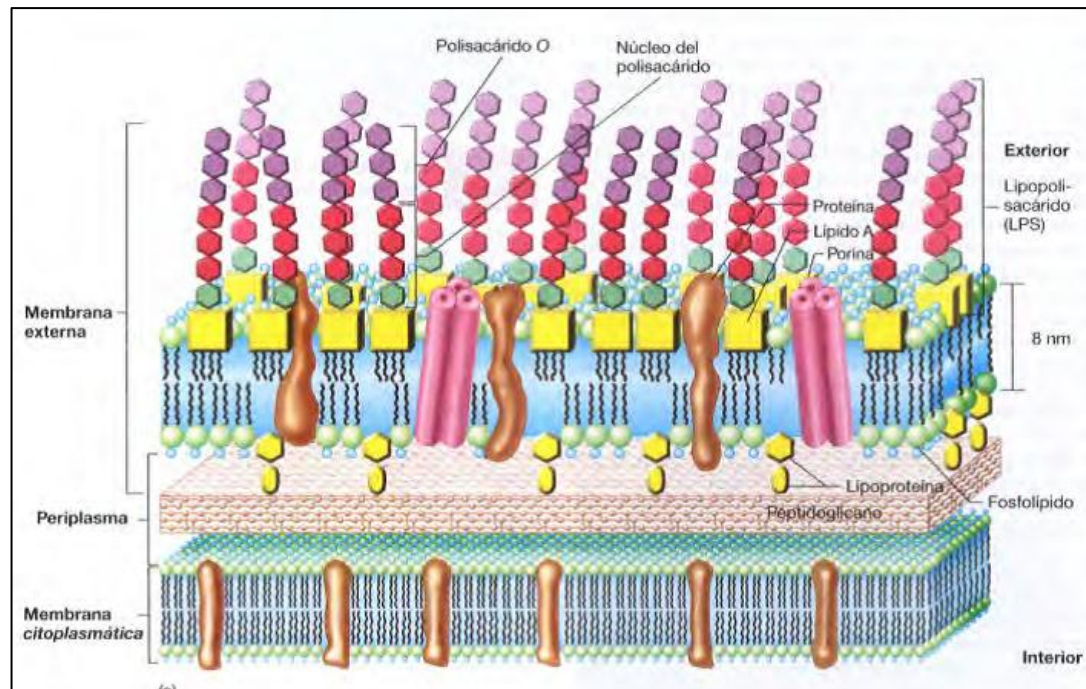
Fuente: [Http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)<sup>(39)</sup>

#### 2.4.2. Bacterias Gram Negativas

En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "Gram-negativas" o también "Gramnegativas"

Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Al ser la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram (Figura 1.12).

(16,28)



**Figura 1.12: Pared celular de Gram Negativo**  
Fuente: [Http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)<sup>(39)</sup>

## 2.5. Staphylococcus aureus.

### 2.6. Características

Coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar racimos de uvas, responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con o sin oxígeno, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar.<sup>(28)</sup>

### 2.7. Identificación de laboratorio

La forma de identificación en laboratorio es a través de las pruebas de coagulasa y DNAsa que dan positiva, producen ácido de la lactosa, maltosa y manitol, reducen los nitratos, hidroliza la urea y reduce el azul de metileno. Es por lo general fosfatasa positiva, aunque no crece agar fosfato de amonio.

La mayoría de las colonias son hemolíticas en agar sangre, pero la zona de hemólisis es relativamente pequeña si se compara con el diámetro de la colonia (diferenciación con los estreptococos hemolíticos).

La producción de pigmento amarillo dorado es probablemente la característica más variable. Los cultivos jóvenes pueden no producir ningún pigmento. Puede desarrollarse color si se dejan los cultivos uno o dos días sobre la mesa del laboratorio a temperatura ambiente. Se favorece la producción de pigmento por la presencia en el medio de lactosa o de otro carbohidrato y de sus productos de escisión. La mejor forma de demostrarlo es en agar glicerina mono acetato. <sup>(28)</sup>

## 2.8. Enzimas

Los *Staphylococcus aureus* produce varias enzimas que pueden contribuir a su virulencia. <sup>(33)</sup>

- *Catalasa:*

La producción de catalasa por parte de estos microorganismos puede actuar para inactivar el peróxido de hidrogeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de la células fagocitas después de la ingestión de estos microorganismos. <sup>(28)</sup>

- *Coagulasa:*

Tanto la coagulasa libre como la unida (también denominada factor de agregación) pueden recubrir las células bacterianas con fibrina y tonarlas resistentes a la ozonización y la fagocitosis.

- *Fibrinolisin:*

(Estafiloquinasa): estas pueden degradar coagulos de fibrina y permitir la diseminación de la infección a los tejidos contiguos.

- *Hialuronidasa:*

Hidroliza la matriz intercelular de mucopolisacaridos en los tejidos y por lo tanto puede actuar diseminado los microorganismos a zonas adyacentes.

- *Lipasa:*

Las cuales son activas sobre una variedad de sustratos incluyendo plasma, grasas y aceites que se acumulan en la superficie del cuerpo, lo cual explica la intensa colonización del *Staphylococcus* por las áreas sebáceas de mayor actividad.

- *Nucleasas:*

La elaboración de una nucleasa resistente al calor parece estar asociada con colonias *Staphylococcus aureus*. Se halla en la célula o en la superficie de ella. <sup>(7)</sup>

- *Otros.*

Los estudios inmunológicos y de especificidad indican que *Staphylococcus aureus* producen por lo menos tres tipos diferentes  $\beta$ -Lactamasas. La producción de estas enzimas pueden ser inducibles es decir se produce solo en presencia de antibióticos  $\beta$ -Lactámicos o constitutiva es decir se producen continuamente y hace que estos microorganismos sean resistentes a la penicilina y la ampicilina. <sup>(28)</sup>

### 2.8.1. Toxinas

*Staphylococcus aureus* presenta diversidad de toxinas, entre ellas se citan:

- *Toxinas Citolíticas*
  - Alfa hemolisina: es una proteína que puede producir lisis de los eritrocitos y lesionar las plaquetas
  - Beta hemolisina: Esta degrada la hemolisina y es toxica para muchas clases de células, incluso los eritrocitos.
  - Leucosidinas: toxina que puede matar a los leucocitos expuestos de muchos animales.
  - Toxina exfoliativa o epidermolítica: Esta toxina está constituida por lo menos por dos proteínas que producen la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada. <sup>(30)</sup>
- *Enterotoxinas:*

Hay por lo menos seis toxinas solubles designadas de la A-F producidas por el *Staphylococcus aureus*, estas son termoestables resistentes a ebullición por 30 minutos y a la acción de las enzimas intestinales; son causas importantes del envenenamiento con alimentos.

### 2.8.2. Enfermedades

Puede producir infecciones cutáneas tales como foliculitis, o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo viral, como celulitis, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además también puede afectar al aparato gastrointestinal ya sea por la ingesta de la bacteria o la entera toxina estafilocócica. (26, 30).

Entre otras afecciones importantes tenemos:

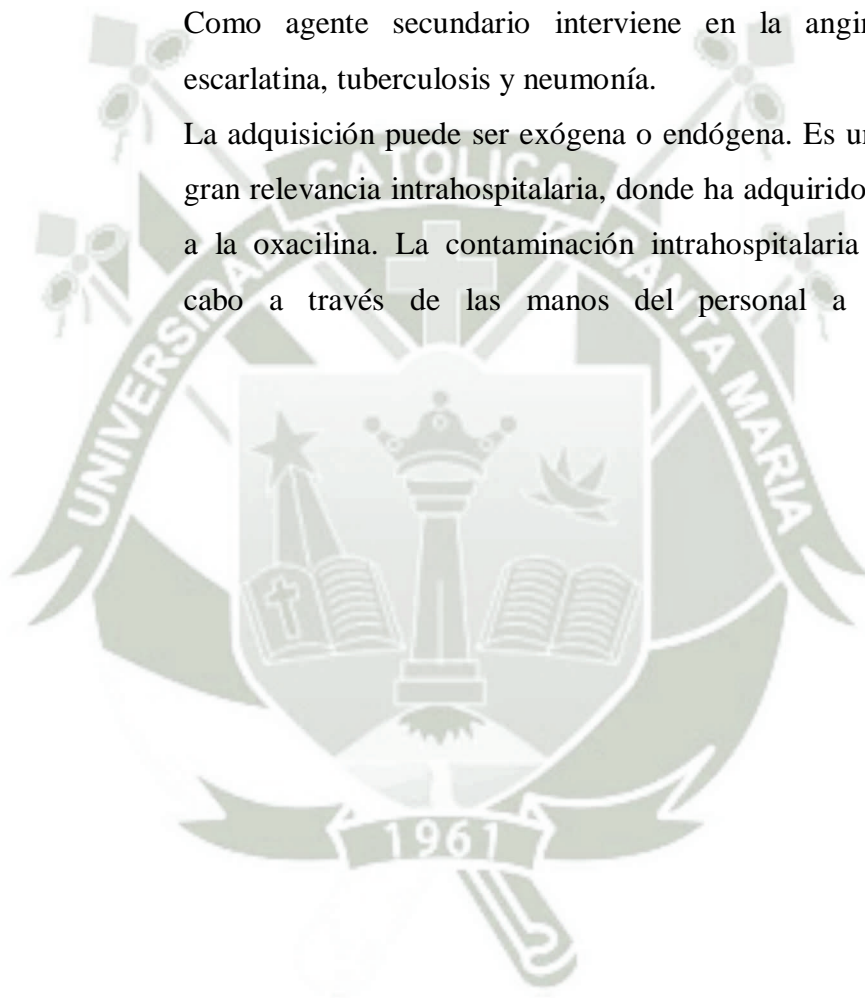
- Síndrome de la piel escaldada por estafilococo: es el síndrome caracterizado por la descamación diseminada del epitelio de recién nacidos y lactantes; no se encuentran microorganismos o leucocitos en las ampollas.
- Intoxicación alimentaria: sucede después de haber ingerido alimentos con la toxina termo estable. Se caracteriza por la presencia de vomito intenso, diarrea y cólicos que inician entre 2 y 6 horas después de la ingesta. La resolución es rápida (menos de 24 hrs).
- Absceso cutáneo: es una acumulación de pus que puede darse en piel y mucosas. También puede darse en diferentes órganos (pulmón, hígado, riñón y cerebro) mediante la diseminación bacteriemia.
- Impétigo: infección cutánea localizada caracterizada por la presencia de vesículas purulentas sobre base eritematosa. Se da preferentemente en niños y zonas expuestas, en especial la cara.

- Foliculitis: es una infección restringida a los orificios de los folículos pilosos y se acompaña por la presencia de lesiones dolorosas, rojizas y pequeñas sin síntomas sistémicos.
- Forunculosis y ántrax: Son piodermas profundos que se presentan como lesiones elevadas, firmes, dolorosas y con centros necróticos que contienen material purulento.
- Hidradenitis supurada: es la infección de las glándulas sudoríparas apócrinas bloqueadas. Se da en áreas intertrigino (axilas, ingle, áreas perineales). Existe dolor, edema y eritema, usualmente sin fiebre.
- Endocarditis: es la principal complicación de la bacteriemia. Daños hacia el revestimiento endotelial del corazón. También afecta a las válvulas cardíacas. Pueden ocultarse soplos.
- Osteomielitis: infección y destrucción ósea, en especial en la metafases de los huesos largos de los niños y la columna vertebral en adultos mayores.
- Bronquitis: Es la hinchazón e inflamación de las vías aéreas principales que llevan aire hacia los pulmones. Esta hinchazón estrecha las vías respiratorias, lo cual dificulta la respiración. Otro síntoma de bronquitis es una tos. Aguda significa que los síntomas sólo han estado presentes por un período corto.
- Meningitis: infección del sistema nervioso, se presenta en pacientes con antecedentes de traumatismo, cirugías, inmunodeficiencia, neoplasias malignas e hidrocefalia.
- Peritonitis: infección del peritoneo, el grupo de riesgo son los pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria.
- Pericarditis: infección del pericardio. Sucede como complicación de la endocarditis estafilocócica o por trauma penetrante en el tórax.

En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.

Como agente secundario interviene en la angina séptica, escarlatina, tuberculosis y neumonía.

La adquisición puede ser exógena o endógena. Es un agente de gran relevancia intrahospitalaria, donde ha adquirido resistencia a la oxacilina. La contaminación intrahospitalaria se lleva a cabo a través de las manos del personal a cargo. <sup>(22)</sup>



## CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODO.

### 1. LUGAR DE ESTUDIO.

El desarrollo experimental fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia (H-103) y microbiología (H-403) de la Facultad de ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

### 2. MATERIALES.

#### 2.1. Material Biológico

##### 2.1.1. Hederá Hélix

En la presente investigación se emplearon hojas y tallos de la planta de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) recolectadas durante el mes de Enero en los jardines de la Universidad Católica de Santa María, cercado Arequipa (Arequipa- Perú).

##### 2.1.2. Colonias utilizadas

Las colonias aisladas en estudio de *Staphylococcus aureus*, fueron obtenidas de las secreciones de garganta de 10 pacientes de forma ambulatoria y aisladas en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad Católica Santa María de Arequipa.

#### 2.2. Material de laboratorio, equipo y reactivos

##### 2.2.1. Equipos

- Autoclave (Sturdy SA- 260 MA)
- Balanza analítica (modelo A-160 Pioner)
- Baño María (Mettler modelo WB14)
- Bomba de vacío de alto rendimiento.
- Cabina de seguridad biológica
- Equipo de extracción Soxhlet
- Estufa incubadora (Isotherm)

- Horno de esterilización (memmert 854)
- Mechero Bunsen
- Microscopio binocular con objetivo de inmersión (Belteccientific)
- Cámara fotográfica digital
- Lámpara de luz ultravioleta (MineralightLampMultiband UV 254-366nm)
- Refrigeradora (Bosh)

#### 2.2.2. Instrumentos

- Baguetas
- Cubeta de vidrio para cromatografía.
- Fiola 25 ml y 50 ml
- Frascos de vidrio ámbar
- Laminas porta objetos y cubre objetos
- Matraz Erlenmeyer
- Pipetas de 1 y 5 ml
- Placas Petri
- Probetas de 50 ml
- Tubos 13 x 100 mm
- Vasos de precipitado 100 ml, 250 ml, 500 ml

#### 2.2.3. Reactivos

- Acetato de Etilo de grado reactivo ( Merck)
- Ácido Acético de grado reactivo
- Ácido Sulfúrico al 5%
- Agua destilada
- Cloruro Férrico al 5% de grado reactivo
- Etanol 97% de grado de reactivo
- Hexano de grado de reactivo (Diproquim)
- N-Butanol de grado reactivo
- Metanol 99% de grado reactivo (Diproquim)

- Peróxido de Hidrogeno (gotas) lab aky
- Reactivo de Kovacs
- Reactivo de Draggendorf.
- Rojo de metilo grado de reactivo
- Tolueno de grado de reactivo
- Vainillina de grado reactivo
- Tween 20 (lab. Meck) de grado de reactivo

#### **2.2.4. Batería para la coloración Gram:**

- Cristal violeta
- Alcohol Acetona
- Lugol
- Safranina

#### **2.2.5. Medios de cultivos microbiológicos**

- Manitol Salado
- Agar Müeller Hinton
- Caldo BHI

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Métodos de Extracción**

La extracción es una de las operaciones farmacéuticas por medio de la cual se obtienen los principios activos de una manera más concentrada; los componentes solubles contenidos en un material vegetal debidamente preparado se disuelven en uno o más solventes o líquidos extractores formando así un extracto crudo o total el cual va a tener la mayor cantidad de los principios activos, pigmentos vegetales y metabolitos primarios. Dentro de los procedimientos de extracción tenemos.<sup>(8)</sup>

- Infusión
- Decocción o cocimiento
- Maceración
- Digestión

- Lixiviación o percolación
- Soxhlet

### **3.2. Método de Extracción por Soxhlet.**

#### **Fundamento de equipo de soxhlet**

La extracción por soxhlet es un método de extracción similar a la digestión y percolación, es un sistema cerrado que permite el flujo del solvente en ciclos.

Los equipos soxhlet constan de tres partes. La primera en la parte inferior denominada reservorio de solvente contiene un balón donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición. La segunda parte es un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro, y por último la tercera parte la cual consta de un refrigerante o condensador el cual recibe los vapores del solvente que viene desde el balón y los condensa para hacer gotear al solvente sobre el material vegetal. <sup>(4, 9,10)</sup>

Cuando el soporte que mantiene al material vegetal se llena de solvente recién destilado se activa un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continúa en ebullición, cada llenada es un ciclo y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra. <sup>(10,15)</sup>

### **3.3. Identificación Cromatográfica.**

La cromatografía es un proceso fisicoquímico que va a permitir la separación de los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por adsorción de estos sobre una superficie estacionaria móvil. <sup>(30)</sup>

### **3.4. Método de separación e identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF)**

#### **3.4.1. Fundamento**

La cromatografía es una técnica de separación de mezclas (muestras complejas) por una migración diferencial de los

componentes de la mezcla, al ser transportados sobre una fase estacionaria, por un solvente o fase móvil el proceso es posible porque los componentes de la mezcla tienen diferente afinidad por la fase estacionaria y/o fase móvil.

La impulsión de la fase móvil se realiza por la fuerza de capilaridad. Las colocaciones generadas por las sustancias fuertes, reveladores y la distancia recorrida por cada componente de la droga en estudio permiten ver la naturaleza de los componentes.

El grado de afinidad depende de la estructura química de las sustancias a separar y de las fases. La afinidad se produce por la posibilidad de establecer enlaces químicos: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces iónicos, etc. <sup>(3, 27,37)</sup>

#### 3.4.2. Factor de referencia ( $R_f$ ):

Es un número que permite identificar sustancias considerando las distancias recorridas en un cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene un  $R_f$  único y específico, por medio del cual se les identifica (Figura 1.10). <sup>(36)</sup>

$$R_f = \frac{D_s}{D_f}$$

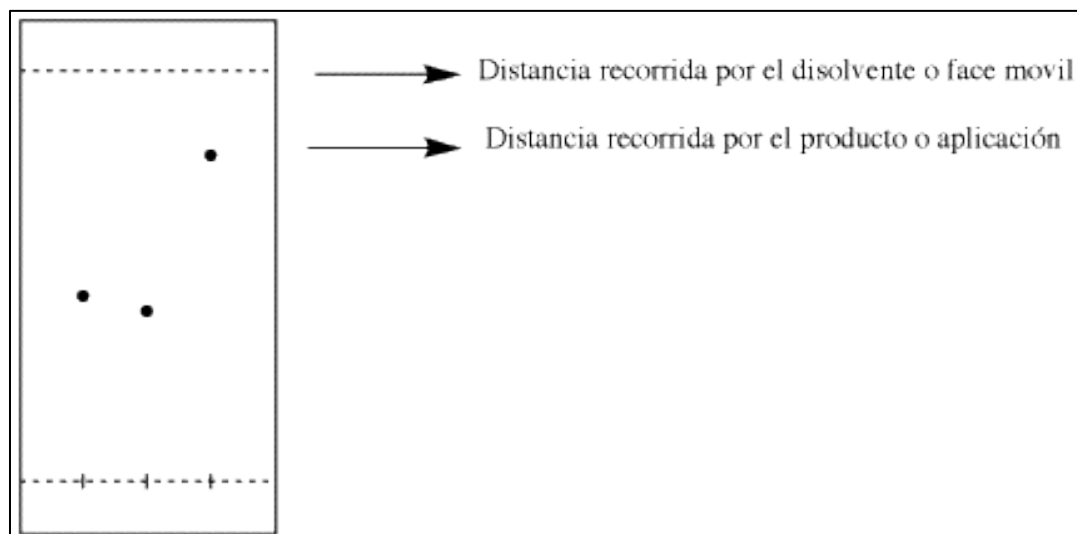
*Ec. 1*

Dónde:

**$D_s$ :** Distancia recorrida por la sustancia.

**$D_f$ :** Distancia recorrida por la fase móvil.

**$R_f$ :** Distancia recorrida por el producto/Distancia recorrida por la fase móvil.



**Figura 2.1 Diagrama explicativo para el cálculo de  $R_f$**

### 3.5. TWEEN 20.

#### 3.5.1. Descripción

Es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas y farmacológicas. Su fórmula molecular es  $C_{58}H_{114}O_{26}$ .<sup>(36,37)</sup>

Es un líquido viscoso de color amarillo ámbar, muy ligeramente opalescente, con ligero olor característico.<sup>(30,32)</sup>

#### 3.5.2. Sinónimos

El TWEEN 20 también es conocido como polisorbato 20, monoleato de Polioxietileno Sorbitan, número CAS 9005-64-51. Nombre IUPAC polioxietileno<sup>(20)</sup> sorbitanmonolaurato.

#### 3.5.3. Propiedades físicas

- Densidad: 1100 kg/m<sup>3</sup>
- Índice de refracción: 1.4705 – 1.4740
- Ph: solución acuosa 5%: 5.5 – 7.5
- Índice de acidez: menor a 2

- Índice de saponificación: 45 – 55
- Humedad: menos del 3%
- Estabilidad y almacenamiento: conservar en envases bien cerrados y herméticos y proteger de la luz. <sup>(10,32)</sup>

#### 3.5.4. Aplicación de Tween 20

En general los polisorbatos son agentes emulgentes del tipo surfactante no iónico que originan emulsiones de fase externa acuosa, estable y textura fina poco afectable por altas concentraciones de electrolitos o por cambio de pH. <sup>(32,24)</sup>

Se utilizan en la industria farmacéutica para la preparación de cremas pomadas lavables y base de supositorios, y para emulsificar aceites de hígado de pescado vegetal y minerales; también son utilizados para solubilizar una gran variedad de sustancias, incluyendo aceites esenciales, perfumes, vitaminas liposolubles y fenobarbital. <sup>(20,24)</sup>

Además se emplean como humectantes en la formulación de suspensiones orales y parenterales. <sup>(24)</sup>

## 4. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EN ESTUDIO

### 4.1. Procedimiento del material vegetal

#### 4.1.1. Recolección

Las hojas y los tallos de la *Hederá hélix L.* (Hiedra común) de donde se recolectó en el mes de Enero 2014, en los jardines de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, Cercador Arequipa- Perú.

#### 4.1.2. Estabilización

La planta recolectada se envolvió en papel periódico y colocado en cajas de cartón para su traslado al laboratorio de H-104 de la Universidad Católica Santa María de Arequipa.

A continuación se separó las hojas, las cuales fueron dispuestas en una bandeja para desecar, por un periodo de 15 min a 100°C, evitando así el periodo de descomposición química. <sup>(1,15)</sup>

#### 4.1.3. Desección

Una vez estabilizadas las hojas se dispusieron para el ventilado sin luz directa para su desecación a una temperatura ambiente por un espacio de quince días. <sup>(1)</sup>

#### 4.1.4. Molienda y almacenamiento

Las hojas y tallos fueron pulverizadas en un mortero (previamente lavado y desinfectado con alcohol) hasta la obtención de partículas uniformes, las cuales fueron almacenadas en un frasco de vidrio de color ámbar, previamente esterilizado, debidamente rotulado y cerrado hasta su posterior uso. <sup>(15)</sup>

#### 4.2. Obtención de extracto por el método Soxhlet

La extracción fue realizada en el laboratorio de Farmacognosia (H-103) a Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica Santa María, mediante un equipo de Soxhlet en el cual el disolvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección.

Los extractos se obtuvieron con los siguientes solventes: Hexano, Acetato de Etilo y Etanol a los 97%, dichos solventes se seleccionaron por sus polaridades variables (Ver anexo 10) podemos ver la constante dieléctrica de los solventes y la polaridad con la cual se determina los solventes a utilizar en la presente investigación. (Tabla 2.1), en la tabla podemos ver la constante dieléctrica, teniendo así al hexano como no polar con una constante dielectrica de 1.9, acetato de etilo

medianamente polar con una constante dieléctrica de 6.0 y etanol como el más polar con una constante dieléctrica de 24.3.

**Tabla 2.1 Solvente utilizados para las diferentes extracciones de acuerdo a su polaridad.**

SOLVENTES	POLARIDAD	CONSTANTE DIELECTRICA
	MAS POLAR	
Etanol		24.3
Acetato de Etilo		6.0
Hexano		1.9
	MENOS POLAR	

FUENTE: Lab. Tools Tables for laboratory use Merck <sup>(17)</sup>

Después de escoger los disolventes por la constante dieléctrica se procedió a pesar 10 g de hojas y tallos de Hiedra común previamente desecada y pulverizada, empacándola en papel filtro y colocándola en el extractor; igualmente 150 ml del solvente indicado (etanol, hexano y acetato de etilo) fueron colocados para luego proceder a armar el equipo (Figura 2.1) el cual permaneció a una temperatura de 80°C por un tiempo de 5 horas, hasta que el solvente haya agotado toda la muestra del cartucho, obteniendo así el extracto indicado.

#### 4.3. Determinación del rendimiento de la extracción mediante el Método gravimétrico

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

Se colocó el extracto en un vaso de precipitado previamente tarado, seguidamente se llevó a Baño María hasta peso constante, para finalmente

Pesarlo y determinar su porcentaje de rendimiento por diferencia (Ec.2) y usarlo en pruebas posteriores.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{(Pr - Pb)}{Pm} \times 100$$

Ec. 2

Dónde:

$Pr$  = Peso de beaker mas extracto.

$Pb$  = Peso de beaker.

$Pm$  = Peso de la muestra de la planta.

Se utilizó el rota vapor para concentrar y lograr evaporar el solvente hasta cantidades más manejables, tal como se muestra en la Figura 2.2.

## 5. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ESTUDIO.

### 5.1. Bacteria

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. <sup>(16, 17, 25,28)</sup>

Además de su tamaño, forma y disposición celular, otro criterio de diferenciación de las bacterias se basa sobre sus características de tinción, con la coloración de Gram, con esta técnica de tinción la mayor parte de las bacterias pueden ser clasificadas como Gran positivas o Gran negativas. El componente rígido de la pared celular de todas las bacterias, está constituido por peptidoglicanos o mureina. Los peptidoglicanos se encuentran en todas las especies de bacterias excepto en los ureaplasma y micoplasmas, ya carecen de pared celular. <sup>(16, 17,27)</sup>

## 5.2. Procesamiento de la bacteria en estudio

### 5.2.1. Obtención de la muestra.

Un total de 10 colonias de muestras de *Staphylococcus aureus*, fueron obtenidas de 10 secreciones faríngeas de diferentes pacientes de la ciudad de Arequipa.

Para obtener las colonias se analizaron, distintos pacientes que en su totalidad fueron 30 pacientes que de ellos los resultados salieron positivos en tubo 15 muestras y de esas muestras se seleccionaron 10 muestras de colonias de *Staphylococcus aureus*

### 5.2.2. Conservación de la muestra.

Los elementos de la muestra identificada se conservaron en placas con 15 ml de agar manitol salado y almacenadas en un refrigerador a 4 °C para su conservación su replicación cada quince días.

### 5.2.3. Pruebas de identificación para *Staphylococcus aureus*.

Ya obtenidas las colonias bacterianas se procedió a realizar la identificación a través de diferentes pruebas microbiológicas para dichos microorganismos.

#### a) Cultivo en caldo BHI

Se cultivó probables colonias de *Staphylococcus aureus* de 10 pacientes distintos en tubos debidamente rotulados de BHI (Figura 2.2). Luego se procedió con la identificación de *Staphylococcus aureus* para la determinación de la concentración bactericida mínima.

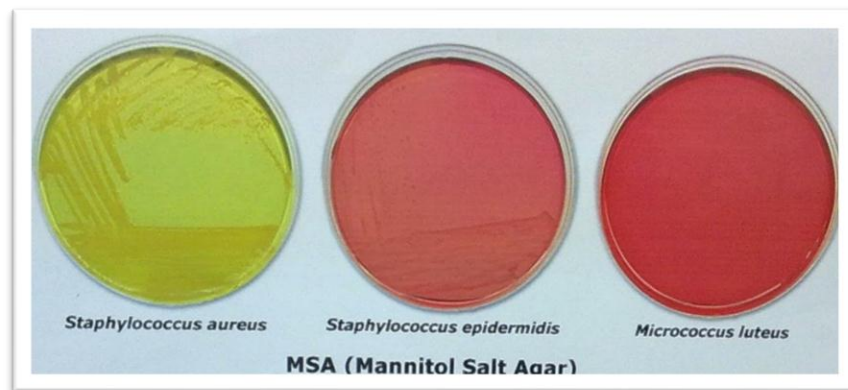


**Figura 2.2 Caldo BHI**  
**Fuente:** *Elaboración propia.*

En la figura 2.2 se puede ver un resultado positivo de crecimiento en el Caldo BHI al apreciarse un enturbiamiento en el líquido transparente.

**b) Agar Manitol Salado (Ver anexo3).**

La muestra de “*Staphylococcus aureus*” fue sembrada en agar manitol Salado por agotamiento en estrías en placa. Se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas. Para su evaluación se consideró Manitol positivo fermentador (Figura 2.3) cuando se produce cambio de coloración del medio a amarillo por la producción del ácido y Manitol negativo no fermentador cuando el medio permanece de color rojo.



**Figura 2.3 Manitol positivo fermentador con presencia de “*Staphylococcus aureus*”.**

En la figura 2.3 se puede ver los distintos tipos de fermentación del Agar Manitol Salado donde se puede apreciar las dos especies de *Staphylococcus*, con una coloración amarilla intensa para “*Staphylococcus aureus*” y una coloración rojo color vino para el “*Staphylococcus epidermidis*”

**c) Coloración Gram o Tinción Gran: (Ver Anexo 1)**

La coloración Gram es importante en microbiología ya que permite diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, siendo el género *Staphylococcus* Gram positivo.

Para la tinción se colocó una asa de kolle sobre el agar que contenía la bacteria y se tomó una pequeña cantidad en una lámina porta objeto limpia. Se dejó secar pasando por la llama del mechero suavemente para obtener la fijación del frotis, con la finalidad que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción. El frotis fue colocado sobre un soporte de tinción y la superficie fue cubierta con solución de cristal violeta.

Luego de unos minutos de exposición al cristal violeta, se lavó bien con agua de caño.

Seguidamente el frotis fue cubierto con iodo de Gram durante un minuto, para luego lavar con agua de caño. Se sostuvo él

porta objeto entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con unas gotas del decolorante alcohol-acetona hasta no arrastrar más colorante violeta, requiriendo unos diez segundos aproximadamente.

La superficie fue cubierta con la safranina durante un minuto para luego ser lavada con agua de caño. Finalmente se secó al aire, a temperatura ambiente y se realizó la observación al microscopio con lente de inmersión (100x) y con aceite de inmersión. <sup>(45)</sup>

#### **d) Prueba de catalasa: (ver anexo 3)**

Los microorganismos de la familia Micrococcaceae se diferencian de la familia Streptococcaceae por la prueba de la catalasa. La rápida aparición y sostenida producción de burbujas de gas o efervescencia constituye un resultado positivo, siendo catalasa positiva la familia Micrococcaceae (género Staphylococcus, Micrococcus, Plamnococcus) y catalasa negativa: familia Streptococcaceae (género Streptococcus)

Para la realización de la prueba con la punta del asa de kolle se colocó en el centro de la lámina de porta objeto la colonia a investigar. Posteriormente se agregó 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno se suspender el microorganismo y observar si hay aparición de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno.

La prueba se determinó positiva cuando se observó la rápida aparición de burbujas de gas o efervescencia.

#### **e) Prueba de la Coagulasa en portaobjetos: (ver anexo3)**

Para la prueba de coagulasa se empleó de 1 a 2 gotas de plasma humano, se sacó con el asa de kole en punta una muestra del microorganismo, y se colocó en el centro del porta objetos. Seguidamente se suspendió el microorganismo en el plasma y se inclinó el portaobjeto hacia uno y otro lado para observar la aparición de grumos.

La formación de grumos en el portaobjetos indica que la reacción es positiva.

#### **f) Prueba de manitol (Ver Anexo 5)**

Esta prueba es realizada en agar manitol salado y se produce la degradación del carbonato manitol hasta ácido el cual hace virar el indicador a rojo de fenol a un color amarillo; esta propiedad es por lo general sinónimo de patogenicidad para el caso de estafilococos.<sup>(44)</sup>

Para la prueba se procedió a realizar la siembra de la muestra de *Staphylococcus aureus* obtenidas en agar Manitol Salado (pico – fondo) mediante el método de punción estría, dejando en estufa a 37 °C por 24 horas.

El *S. aureus* en contraste con el *S. albus* tiene la capacidad de fermentar el manitol con producción de ácido de color amarillo.<sup>(4)</sup>

La prueba fue considerada: según los siguientes criterios

- Manitol positivo: fermentador se produce cambio de coloración del medio a amarillo por la producción de ácido.
- Manitol Negativo: no fermentador, el medio permanece de color rojo.

### **5.3. Evaluación de la actividad Antimicrobiana *in vitro*:**

Para la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*, se procedió de la siguiente manera.<sup>(40)</sup>

#### **5.3.1. Determinación de la concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el Método de dilución en tubos.**

Es definida como la menor concentración del antibiótico que inhibe el desarrollo *in vitro* de los microorganismos.

Se basa en la sensibilidad del microorganismo, se realizan disoluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo, después de lo cual se agrega a una suspensión bacteriana

estandarizada para luego determinar la concentración de la droga que inhibe el crecimiento bacteriano. <sup>(14)</sup>

#### **a) Evaluación de la prueba piloto**

Fue realizada con la finalidad de determinar la concentración inicial del extracto.

#### **b) Preparación del extracto madre**

Se preparó una solución madre con 2.7 g de *Hederá hélix L.* los cuales se diluyeron en 10 ml de agua destilada estéril, para el extracto etanólico, acetato de etilo y del hexano. Lo que permitió obtener una concentración madre.

#### **c) Preparación de inocular**

El inocular deberá contener una concentración de  $10^8$  UFC/7ml; por ello con un asa de kohle estéril se tocó las superficies de las 10 colonias que se deseaban aislar, para luego sumergirla en 10 ml de caldo BHI descargando todo el material bacteriano.

Se buscó que la turbidez del medio sea semejante a la del N° 05 de la Escala de Mac Farland, la cual equivale, a una concentración de  $10^8$  UFC/ml. <sup>(40)</sup>

Posteriormente se realiza una dilución para tener una concentración final de  $10^6$  UFC/ml, con esta concentración empezamos a realizar la pruebas.

### **5.3.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el Método de disolución en agar.**

Se sembró en las placas las diluciones preparadas el día anterior para poder observar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

El Método de disolución en agar determina la menor concentración de la sustancia en investigación, que produce la muerte de más del 99.9% de las bacterias probadas.

Se procedió a sembrar de todos los tubos del 1 al 6, debido a que no se empieza a ver diferenciar a partir del tubo 3 y una mayor turbidez la turbidez, realizando el sembrado en placas conteniendo Agar Müller Hilton y también de agar manitol salado de preferencia para evitar la contaminación con otros microorganismos del ambiente.

Se dejó en incubación a 37 °C por 24 horas y se observó el crecimiento bacteriano en placas, luego se procedió a iniciar el punto de ruptura en las placas donde no hubo crecimiento. <sup>(17,19)</sup>.

#### **5.4. Análisis Fitoquímico de los extractos etanólico, acetato de etilo y de hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común)**

##### **5.4.1. Método de separación e identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF)**

Se buscó identificar compuestos en general: Terpenos, flavonoides, alcaloides y taninos, para ello se trabajó con diferentes fases móviles, fases estacionarias, reactivos reveladores y reveladores según se detalla en la Tabla 2.1

##### **5.4.1.1. Preparación de la fase móvil**

Para la preparación de la fase móvil se mezcló en la cuba de cromatografía los solventes elegidos en las proporciones indicadas para la respectiva identificación. Se tapó la cuba y se dejó en reposo.

##### **5.4.1.2. Preparación de la placa cromatográfica**

La fase estacionaria (F.E) empleada consistió en cromatofolios de silica gel con base de aluminio, e indicador de fluorescencia a 254nm, cortadas en un tamaño de 10 x10 cm, se trazó una línea a 0,5 cm del borde inferior; al que se aplicó el extracto

etanólico y se aplicaron sobre la línea en banda con capilares, se dejó una distancia de 1 cm entre cada extracto.

Dejo secar la muestra y posteriormente se colocó la placa de silica gel en la cuba con la fase móvil. <sup>(3)</sup>

**Tabla 2.2 Componentes de la Cromatografía de Capa Fina (CCF) para identificación de terpenos, taninos y alcaloides.**

IDENTIFICACIÓN					
	General	Terpenos	Taninos	Alcaloides	Flavonoides
Fase Móvil	Acetato de Etilo: Metanol: Agua (97:20:10)	Tolueno: Acetato de Etilo (95:5)	Metanol: Agua (70:30)	Isobutanol: Ácido Acético: Metanol (70:10:20)	N-butanol: Acetato de Etilo: Agua: Metanol (4:10:50:20)
Reactivos reveladores	Sol A: Ácido Sulfúrico 5% en etanol absoluto. Sol B: vainillina al 1% en etanol absoluto	Sol A: Ácido Sulfúrico 5% en etanol absoluto. Sol B: vainillina al 1% en etanol absoluto	Cloruro Férrico al 5% en agua	Reactivo de Draggendorf	Tricloruro de aluminio al 1% en etanol
Fase Estacionaria	Placa de silica gel con marcador de fluorescencia a longitud de onda de 254 nm.	Placa de silica gel con marcador de fluorescencia a longitud de onda de 254 nm.	Placa de silica gel con marcador fluorescencia a longitud a de 254 nm.	Placa de silica gel con marcador de fluorescencia a longitud de onda de 254 nm.	Placa de silica gel con marcador de fluorescencia a longitud de onda de 254 nm.
Revelador	Luz UV 254 nm y luz UV 352 nm	Luz UV 254 nm	Cloruro Férrico al 5% en agua	Reactivo de Draggendorf.	Tricloruro de aluminio al 1% en etanol

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 2.2 se muestran las distintas fases móviles, los reactivos utilizados para la presente investigación y los presuntos metabolitos presentes en la *Hederá hélix L.* “Hiedra Común”.

#### 5.4.1.3. Preparación de la placa cromatográfica

Luego de colocar en una cámara que se preparó 30 minutos antes para obtener una buena saturación del medio; se utilizó 20 ml de fase móvil (F.M) cubriendo el fondo hasta 0,3 cm de altura, se desarrolló el cromatograma hasta que la fase móvil llegó a 1 cm del extremo superior de la placa, para luego retirarlas y secar durante 30 minutos. Ya la placa de silica gel tiene un marcador de fluorescencia a una longitud de onda de 254nm.

Se observó a la luz UV a 254nm, delimitando las zonas donde se pudieron visualizar los componentes del extracto.

#### 5.4.1.4. Revelado

Se pulverizó la placa con sus respectivos reveladores para luego dejar secar a medio ambiente.

#### 5.4.1.5. Identificación de componentes

Se identificaron según su  $R_f$  y en comparación con bibliografía. Los metabolitos presentes en la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común), se iluminan en distintos colores característicos de estos metabolitos.

### 5.5. Métodos estadísticos

Para la comparación de los rendimientos de los extractos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la correspondiente prueba de Tuckey.

Ambos procedimientos estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%. El procesamiento de los datos se realizó mediante el software estadístico Statgraphics Centurion x6.

Para el ordenamiento, interpretación y análisis estadístico de los datos en estudio se utilizó (el software statgraphics) y hoja de cálculos Excel, para lo cual se utilizaron los siguientes instrumentos estadísticos. <sup>(33)</sup>

### 5.5.1. Medidas de Tendencia Central

#### a. Promedio ( $\bar{X}$ ):

$$\bar{x} = \frac{\sum xi}{n}$$

Donde:

$\sum xi$ : sumatoria de cada observación.

$N$ : número total de observaciones

### 5.5.2. Medidas de Dispersión

#### b. Desviación estándar (DS):

$$Ds = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

### 5.5.3. ANOVA (Análisis de Varianza):

Este es una prueba de significancia, la cual tiene como objetivo demostrar estadísticamente si el efecto hallado al aplicar los tratamientos es debido a los mismos o a causas fuera de los tratamientos.

La significancia se interpreta basándose en:

- $P < 0.01$  = diferencia altamente significativa.
- $P < 0.05$  = diferencia Significativa
- $P > 0.05$  = diferencia no significativa

### 5.5.4. Prueba de especificidad: Test de Fisher

Prueba de especificidad, se aplica una vez obtenidos los resultados del análisis de varianza ANOVA, es decir si en el análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos los diferentes tratamientos, se procederá a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente o más

específico, de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA, después se procedió a realizar test de múltiples rangos, se utilizó el test de Fisher.

#### **5.5.5. Método de Bonferroni**

El Test de Bonferroni es un test de comparaciones múltiples. Permite comparar, como los demás contrastes de este tipo, las medias de los  $t$  niveles de un factor después de haber rechazado la Hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA.

Todos los tests de comparaciones múltiples son tests que tratan de concretar una Hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los Test ANOVA.

El Test de Bonferroni hay que entenderlo en relación con el Test LSD de Fisher. Se basa en la creación de un umbral, el BSD (Bonferroni significant difference) por encima del cual, como el LSD en el Test LSD, la diferencia entre las dos medias será significativa y por debajo del cual esa diferencia no lo será de estadísticamente significativa.

Si se comparan ambos test (Ver Test LSD en Herbario de técnicas) se verá que el cambio está en el nivel de significación elegido. En el Test de Bonferroni el nivel de significación se modifica en función del número de comparaciones a hacer. Esto elimina el problema de hacer comparaciones múltiples. Reduce el nivel de significación en tal medida que elimine el error de aplicar el test tantas veces al mismo tiempo.

#### **5.5.6. Prueba de Kruskal- Wallis.**

En estadística, la prueba de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA con los datos

reemplazados por categorías. Es una extensión de la prueba de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos.

Ya que es una prueba no paramétrica, la prueba de Kruskal-Wallis no asume normalidad en los datos, en oposición al tradicional ANOVA. Sí asume, bajo la hipótesis nula, que los datos vienen de la misma distribución. Una forma común en que se viola este supuesto es con datos heterocedásticos.



### CAPÍTULO III

#### RESULTADO Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se estudió el efecto antibacteriano de la planta *Hederá hélix L.* (Hiedra Común); una vez obtenida la muestra se procedió a hacer extractos con diversos solventes de diferentes polaridades los cuales fueron etanol (polar), acetato de etilo (medianamente polar) y hexano (no polar).

La muestra de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común), fue recolectada en la ciudad de Arequipa en el mes de Enero, en los jardines de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa Cercado. Para la estabilización las plantas fueron dispuestas en una bandeja para desecar, por un periodo de 15 min a 100°C, evitando así el periodo de descomposición química.<sup>(1,15)</sup> luego se procedió a desecar (Figura 3.1), una vez estabilizadas las hojas se dispusieron para el ventilado sin luz directa para su desecación a una temperatura ambiente por un espacio de quince días.<sup>(1)</sup>



**Figura 3.1 *Hederá hélix L.* (Hiedra común) desecada**  
*Fuente:* Elaboración propia.

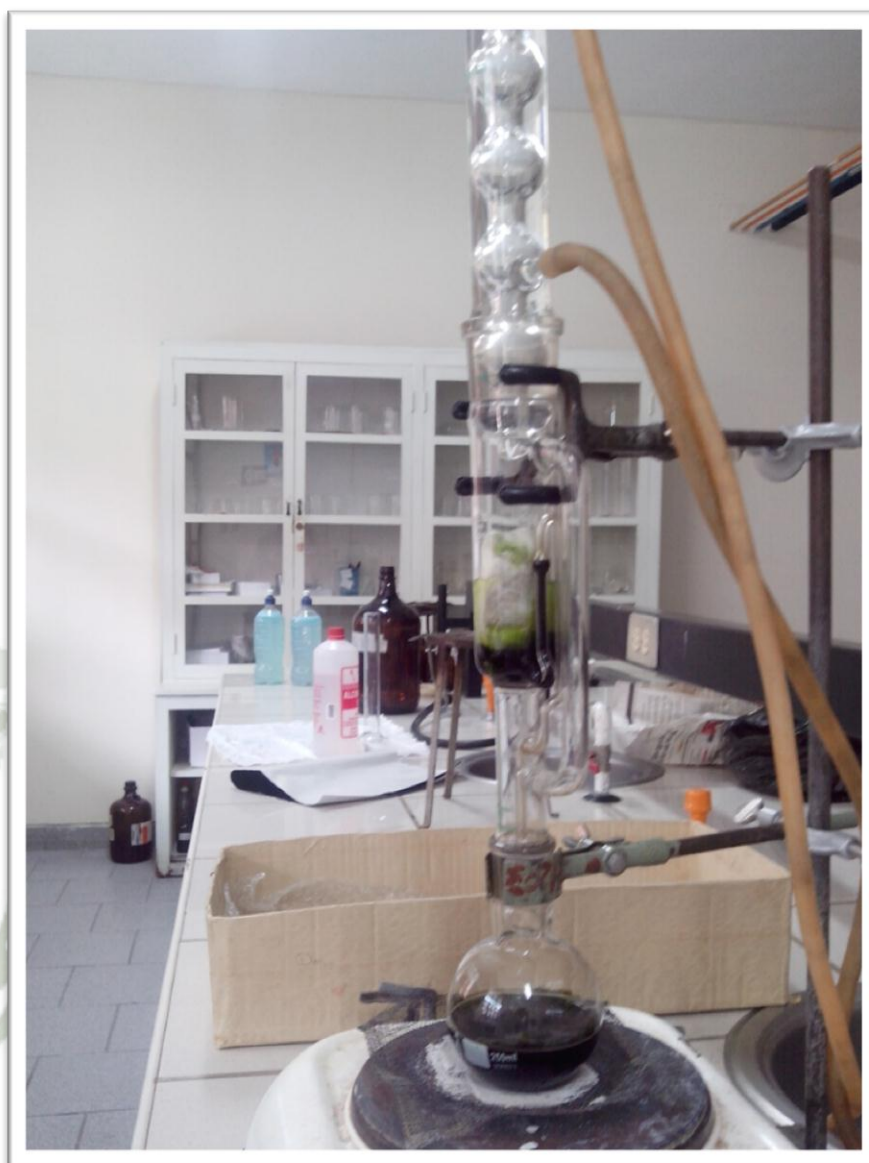
Posteriormente después de los 15 días de secado se procedió con las hojas y tallos fueron pulverizadas en un mortero (previamente lavado y desinfectado con alcohol) hasta la obtención de partículas uniformes, las cuales fueron almacenadas en un frasco de vidrio de color ámbar, previamente esterilizado, debidamente rotulado y cerrado hasta su posterior uso. <sup>(15)</sup>



**Figura 3.2 *Hederá hélix L.* (Hiedra común) Molida**  
*Fuente: elaboración Propia.*

#### 1. Obtención de extractos

Las extracciones se llevaron a cabo por el método de Soxhlet (Figura 3.3), colocando 10 g de la muestra vegetal con 150 ml de cada uno de los solventes (etanol, acetato de etilo y hexano) respectivamente extrayendo hasta agotamiento la muestra.



**Figura 3.3 Equipo Soxhlet.**

Se monta el equipo de soxhet para extraer por agotamiento esto para obtener el máximo rendimiento del material vegetal en un menor tiempo evitando así la degradación de algunos metabolitos secundarios, por tal motivo se usa el método de extracción por soxhlet.

Posteriormente los extractos fueron llevados a rota-vapor (Figura 3.4) y al observar que aún después de la evaporación del solvente eran blandos se decidió continuar con un tratamiento a baño maría logrando obtener extractos secos con aire comprimido para la eliminación de restos de solvente. Los

pesos en mg se muestran en la Tabla 3.1.



**Figura 3.4 Equipo de rota-vapor.**

Después de llevarlo a rota-vapor y concentrar las muestras, a un residuo verde acuoso esto se realizó por 5 veces se realiza las pruebas de rendimiento, como se muestra en la tabla 3.4 se evalúa el rendimiento de los distintos extractos por tal motivo la prueba se realizó por cinco repeticiones, por cada solvente utilizado (etanol, acetato de etilo y hexano).

**Tabla 3.1** Peso en mg de extracto seco de extracción de hojas y tallos de “*Hederá hélix L.*” (Hiedra Común) empleando diferentes solventes.

	Peso de extracto seco (mg)		
	Etanol	Acetato de etilo	Hexano
Rep. 1	7.20	5.69	4.85
Rep. 2	6.95	5.42	5.05
Rep. 3	6.79	5.57	4.81
Rep. 4	6.93	5.09	4.79
Rep. 5	71	52.5	45.8
Promedio	67.9	50.9	45.8

**Fuente:** Elaboración Propia.

## 2. Determinación del rendimiento extracciones

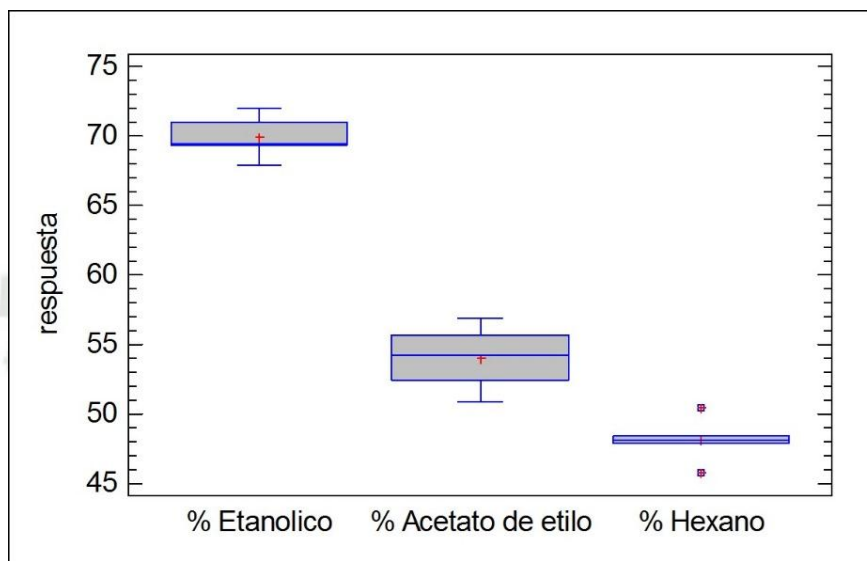
Para evaluar el rendimiento de los diferentes extractos se realizó cinco repeticiones. Los resultados obtenidos luego del cálculo son mostrados en la Tabla 3.2 en la cual se puede observar que los datos de las cinco repeticiones mencionadas muestran un comportamiento normal.

**Tabla 3.2** Determinación del rendimiento (%) de extracto seco de hojas y tallos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) empleando diferentes solventes.

	Rendimiento (%)		
	Etanólico	Acetato de etilo	Hexano
<b>Rep. 1</b>	72	56.9	48.5
<b>Rep. 2</b>	69.5	54.2	50.5
<b>Rep. 3</b>	67.9	55.7	48.1
<b>Rep. 4</b>	69.3	50.9	47.9
<b>Rep. 5</b>	71	52.5	45.8
<b>Mínimo</b>	67.9	50.9	45.8
<b>Máximo</b>	72	56.9	50.5
<b>Rango</b>	4.1	6	4.7
<b>Promedio</b>	69.94+/-1.9762 <sup>a</sup>	54.04+/-2.9898 <sup>b</sup>	48.16+/-2.0807 <sup>c</sup>
<b>Desviación Estándar</b>	1.5915	2.4079	1.6757
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0.1034	-0.1809	-0.025

**Fuente:** Elaboración propia

En cuanto al rendimiento se identificó que el extracto etanólico osciló entre un mínimo de 67.9% y un máximo de 72% con un promedio de  $69.94 \pm 1.9762$ , a diferencia de los extractos de acetato de etilo y hexano que presentaron menor rendimiento luego del proceso, mostrando un promedio de  $54.04 \pm 2.9898$  y  $48.16 \pm 2.0807$  respectivamente.



**Figura 3.5 Diagrama de caja y bigotes para rendimiento de extracto seco de hojas y tallos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) empleando diferentes solventes.**

Fuente: Elaboración propia

Para poder identificar si existió diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mostrado en la Tabla 3.2, la cual muestra un valor p de 0.000 evidenciando que efectivamente si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres promedios de los extractos con un 95.0% de confianza. Por ello al proceder con la prueba de múltiples rangos de LSD Fisher se confirmó que todos eran diferentes tal y como se muestra en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.5

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir y confirmar que el porcentaje de rendimiento del extracto etanólico es el más elevado teniendo así un 69.94 % de rendimiento, siguiéndole el extracto de acetato de etilo con 54,04% y por último el extracto de hexano con un rendimiento de 48,16%.

Se pudo observar en otros trabajos de investigación una similitud de donde se puede apreciar, que el porcentaje de rendimiento de los extractos etanólico de 69.94 %, acetato de etilo de 54.04 % y hexano de 48.16 % de los extractos de *Hederá hélix* L. (Hiedra Común) con el porcentaje de rendimiento del *Piper elongatum* (Matico Matico) le dio para etanol 69.22%, acetato de etilo 52.26% y hexanico 48%.

En investigación de Elvira Lucia Erazo Proaño en estudio de la *Hederá Hélix* en el 2013 nos indica que su porcentaje de rendimiento es de 32% a través de la extracción por maceración, en su investigación de “Separación y Caracterización de los Metabolitos secundarios de la Hiedra (*Hederá hélix*) de Ecuador con fines de aporte a una Técnica de Identificación” en Riobamba Ecuador. <sup>(16)</sup>

En otros trabajos de investigación según Virreuta G. Cecilia Maria; Zegarra Manrique Yesenia en la determinación del efecto antimicótico y antibacteriano in vitro *Piper Elongatum*” Matico Matico” frente a colonias de *Candia Albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Arequipa 2008 con porcentajes de rendimiento de hexano de 55% a comparación nuestra. <sup>(34)</sup>. También se comparó con otros estudios de la misma planta de la *Hederá hélix* L. de laboratorios Rommers, para su estudio de antitusígeno, y ensayos para los sustratos de la planta en la ciudad de Colombia. Se observó similitud puesto que se obtuvo de igual manera mayor rendimiento para el extracto etanólico, seguido por el acetato de etilo y finalmente por el hexanico, esto probablemente por la polaridad de cada solvente.

Después de la extracción, se procedió a elegir el extracto con mayor rendimiento para continuar con la investigación, siendo seleccionado el extracto etanólico con 69.94%, el mayor rendimiento se puede deber a que el etanol es un solvente más polar en comparación con el acetato de etilo y el hexano. Por eso en la identificación de la marcha fotoquímica se toma como

estudio principal el extracto etanólico, y los extractos de acetato de etilo y hexano como extractos de comparación.

Según Eugenio Guerrero-Rodríguez, Susana Solís-Gaona en actividad biológica in vitro de extractos de florescencia en México 2006 donde indica la mayor rendimiento de etanol con 82%, metanol, hexano 58% con éter 96 % con lo cual se demuestra que el mayor rendimiento se obtiene con solventes polares. <sup>(41)</sup>

También nos dice los investigadores Bibiana ECHAVARRÍA Z., Andrea FRANCO, Alejandro MARTÍNEZ M. en la revista de Facultad de Química Farmacéutica en Colombia en el 2006. Donde indican la extracción de los extractos con metanol obtienen un rendimientos máximos para la Caulerpa mexicana, “Sargassum cymosum” y “Laurencia sp” con un valor de 7.94%, 6.77% y 6.33% respectivamente, y los extractos con hexano con valores a 2.84% y 0.64 % con lo cual demuestra los disolvente con una constante dieléctrica mayor a 0 son más efectivos. <sup>(49; 50)</sup>

También en la investigación realizada por Edwin Alexander Rodríguez, Anderson Julián árias, Eva Giselle Vásquez, Jairo René Martínez, Elena E. Stashenko, publicado en la revista de Ciencias exactas Físicas y Naturales de Colombia en 2012, emplearon CO<sub>2</sub> en estado supercrítico. Donde obtuvieron modelos polinómicos para relacionar el rendimiento de extractos. <sup>(45)</sup>

En la cual los resultados fueron extracto de romero mostró el mayor porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica (88%), seguido por el de salvia (76%) y el de hojas de guayaba (43%). Los extractos de romero y salvia exhibieron una capacidad antioxidante alta (1,9  $\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{mg}$ ), similar a la del BHT y la vitamina E (2,8 y 3,0  $\mu\text{mol Trolox} /\text{mg}$ ), mayor que la del extracto de hojas de guayaba (0,7  $\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{mg}$ ). <sup>(30)</sup>

### **3. Procesamiento de la bacteria en estudio. Pruebas de identificación para *Staphylococcus aureus*.**

Para seleccionar las colonias de muestra se trabajó con un base de 35 pacientes de los cuales solo 15 de ellos dieron reacción positivo para rojo de metilo y a partir de esos pacientes se determinó 15 muestras que dieron positivo para *Staphylococcus aureus* después de esto se realizó una

selección a 10 colonias, con las cuales se utilizaron para el presente estudio.

Para el cultivo de las colonias de *Staphylococcus aureus* de 10 pacientes distintos se empleó tubos debidamente rotulados con caldo BHI.

Seguidamente se procedió con la identificación bioquímica de la bacteria obteniendo para agar manitol salado positivo fermentador, con cambio de color del medio a amarillo por la producción del ácido tal y como se observa en la figura (3.6 y 3.7) .



**Figura 3.6 : Aislado la bacteria en agar manitol salado en placa.**

**Fuente:** Elaboración propia

Hay que recalcar que para el inicio del estudio se recolecto muestras de distintos pacientes que en su totalidad fueron 30 pacientes que de ellos los resultados salieron positivos en tubo 15 muestras y de esas muestras se seleccionaron 10 muestras de colonias de *Staphylococcus aureus*.

Según los estudios realizados en cuba por M.J Martinez, J Betacourt, N Alono –Gonzales que en su trabajo realiza la comprobación de trece

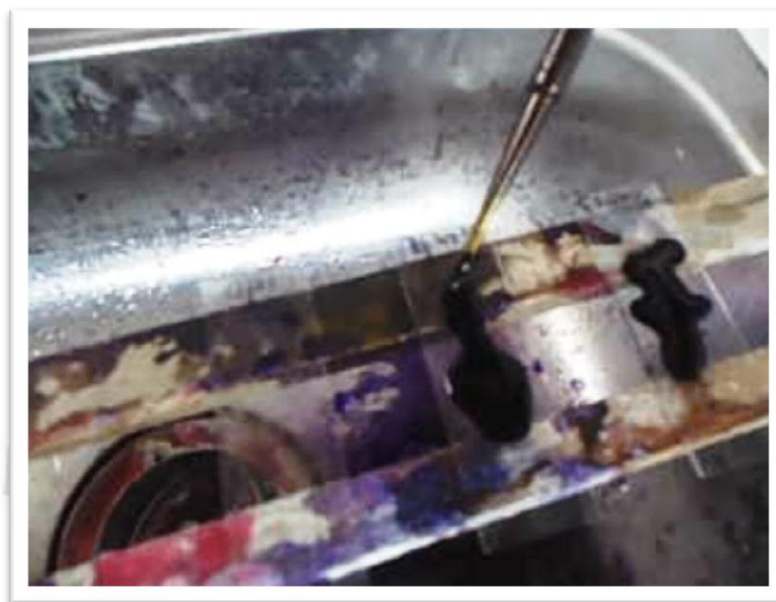
extractos con la comprobación del efecto antibacteriano utilizando *Staphylococcus aureus*, "*Bacillus subtilis*", "*Escherichia coli*", "*Pseudomonas aeruginosa*" y *camdid albicans*", en la ellos realizan la identificación de las bacterias y levaduras a través de agar rojo de metilo y con pacientes y bacterias estándar <sup>(25)</sup>

Otros estudios realizados por Claudia Anessini, Cristina Perez en Plantas Utilizadas en la Medicina Popular Argentina Para la Actividad Antimicrobiana 1993, con el uso de microorganismo como *Staphylococcus aureus*, "*Bacillus subtilis*", "*Escherichia coli*", realizando la identificación de *Staphylococcus aureus* con agar rojo de metilo <sup>(26)</sup>



**Figura 3.7 Aislado las bacterias en agar manitol salado en tubos**  
Fuente: elaboración propia

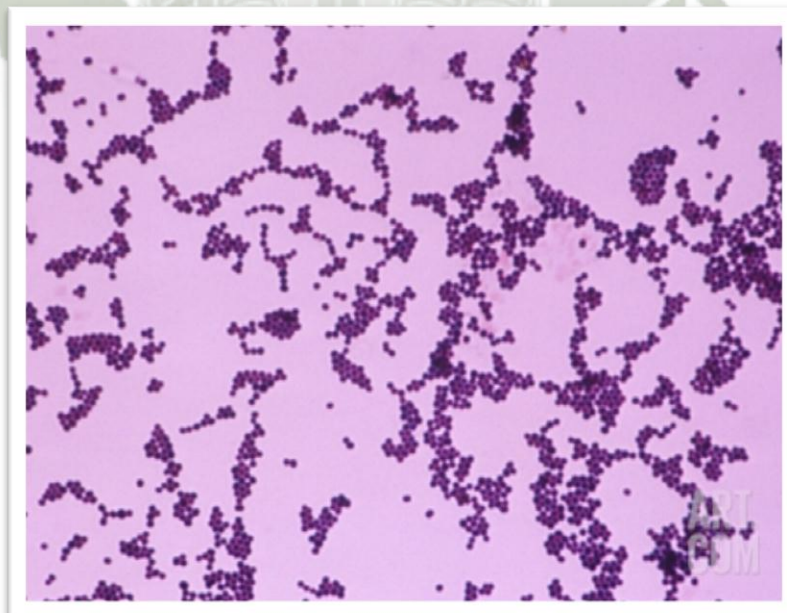
Después de la identificación con el agar manitol salado en tubos se procedio a la identificación por tinción gram para saber si la bacteria es Gram-Negativo o Gram-Positivo. El procedimiento se dé la tinción Gram se explica en el anexo 1



**Figura 3.8 Realización de la tinción Gram**

**Fuente:** elaboración propia

Cuando se realizó a la tinción de Gram como se muestra en las (figuras 3.8 y 3.9), se identificó que las bacterias aisladas correspondían a cocos Gram positivos, los cuales se encuentran aislados en forma de racimos, pares o cadenas.



**Figura 3.9 Tinción de Gram para aislado bacteriano aumento 100x**

**Fuente:** elaboración propia.

Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Al ser la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram. <sup>(17,23)</sup>

Las células gram-Negativas tienen una membrana externa con la cual forma una barrera impermeable, el espacio periplasmático; que es el espacio entre la superficie externa de la membrana citoplasmática, la red de mureína presenta una sola capa.

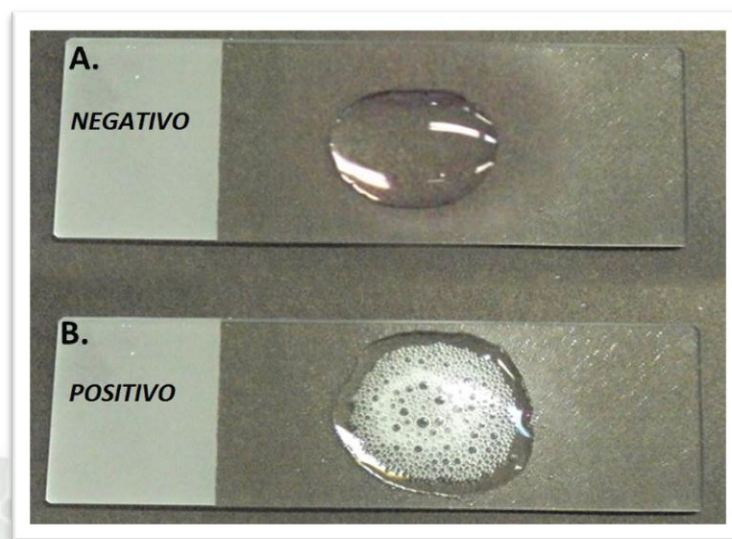
Las penicilinas no matan a las Gram – Negativas a causa de la capa de lipopolisacáridos situada en la pared externa.

Después de realizar la tinción Gram se procedió a realizar las pruebas de catalasa y de cuagulaza.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado ( $Fe^{3+}$ ), en lugar del estado reducido ( $Fe^{2+}$ ). Excepto los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción:





**Figura 3.10 Interpretación de resultado**



**Figura 3.11 Prueba de catalasa para aislado bacteriano para *Staphylococcus aureus*.**

Las pruebas de catalasa, realizada a todas las muestras, fueron positivas ya que se observó la aparición de burbujas de gas o efervescencia, tal y como se observa en la Figura (3.10 y 3.11).

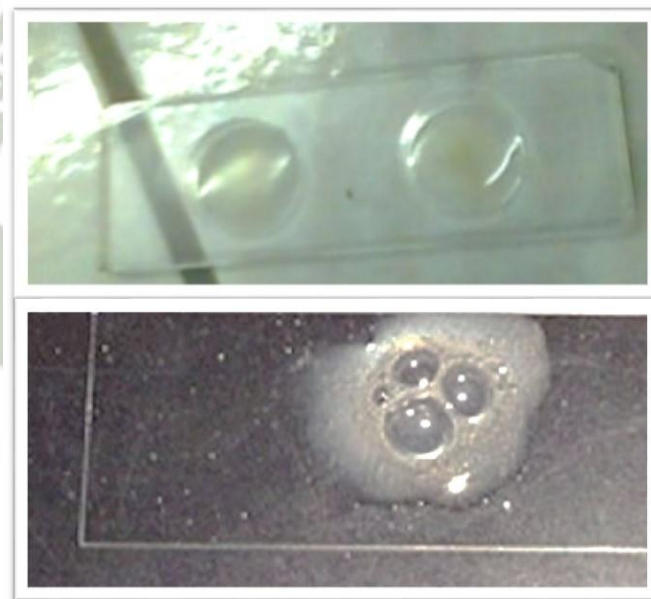
La prueba de catalasa se describe su realización con detalle en el anexo 2.

### Prueba de coagulasa unida (prueba en portaobjetos):

Factor de agrupación, se encuentra unida a la pared celular bacteriana y no se encuentra en los filtrados de cultivos. Entre las células bacterianas se forma bandas de fibrina cuando se suspenden en plasma (fibrinógeno), las que hacen que se agrumen en grumos visibles.

En las pruebas realizadas para coagulasa se observó la formación de grumos en el porta objetos lo cual indicó una reacción positiva (Figura 3.12), esto fue realizado en todas la muestras.

Con esta prueba se pudo diferenciar el *Staphylococcus aureus* de reacción positiva, del "*Staphylococcus epidermidis*".



**Figura 3.12 Pruebas de coagulasa para aislado bacteriano resultado positivo**

**Fuente:** Elaboración propia

La prueba de coagulasa es una proteína de composición desconocida, que tiene actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, que da como resultado la formación de un coágulo visible en los sistemas apropiados. La coagulasa se presenta en dos formas, libre y

unida; y cada una posee diferentes propiedades que requieren el uso de otras especies de estafilococos.

Las pruebas fueron realizadas para todas las muestras con la finalidad de identificar correctamente al microorganismo aislado de los pacientes ambulatorios para utilizar solo 10 colonias como muestra representativa para las pruebas de CIM y CBM, seleccionando aquellas que cumplían los requisitos mostrados en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3 Resultados para “*Staphylococcus aureus*”.**

“ <i>Staphylococcus aureus</i> ”	
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en forma de racimos
Prueba de la catalasa	Positivos
Prueba de la coagulasa	Positivos
Manitol Salado	Fermentación de manitol

Fuente: Elaboración Propia.

Las pruebas fueron realizadas nos indica con certeza que el microorganismo de estudio es *Staphylococcus aureus*.

**4. Evaluación del efecto antimicrobiana *in vitro* con los extractos etanólico, acetato de etilo y hexano de la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

Para la determinación del efecto antimicrobiano se utilizaron 10 colonias de los 15 pacientes en la que se las pruebas dieron para *Staphylococcus aureus* que fueron debidamente identificadas en el laboratorio de análisis clínico de la Universidad Católica Santa María – Arequipa.

Para esta evaluación se empleó el método de dilución en tubo para poder observar la inhibición a presentar de cada dilución.

La bacteria del “*Staphylococcus aureus*” es un componente normal de la micro flora humana autóctona y es transportado en forma asintomática en varias partes del cuerpo.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extractos en etanol, acetato de etilo, hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).

Se trabajó con 10 colonias de *Staphylococcus aureus*, empleando inicialmente una concentración inicial de 200 mg/mL para los tres extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) obteniendo como resultado un inhibición total del microorganismo (Tabla 3.4).

Para realizar las pruebas de concentración inhibitoria mínima (CIM) primero se determinó con una prueba piloto que el emulsificador que se utilizó no tenía poder antibacterial, que pudiera interferir con las pruebas o dar falsos resultados.

El *Staphylococcus aureus* es un componente normal de la microflora humana autóctona y es transportado en forma asintomática en varias partes del cuerpo.

Koneman et al. (1999) señalan que los determinantes de la patogenicidad están relacionados con la producción de enzimas extracelulares (coagulasas, lipasas, hialuronidasas, estafiloquinasas), toxinas citolíticas y enterotoxinas.<sup>(52)</sup>

En la tabla 3.4 podemos observar los datos de la prueba piloto con la cual podemos ver cuál es la concentración mínima para empezar, tomando en cuenta que al usar 2 ml de extracto puro equivale a 2000 mg de extracto concentrado.

Se realiza esta prueba de muestra para determinar una concentración inhibitoria mínima (CIM) de los diferentes extractos etanólico, acetato de etilo y hexano para evitar pérdidas de la muestras en las pruebas realizadas, los resultados se muestran en la tabla 3.4

**Tabla 3.4 Prueba piloto para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra común).**

CARACTERISTICAS	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extracto (G) 2000 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg)/mL)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100
EXTRACTOS	Crecimiento									
<i>S. Aureus</i> (Etanol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Aureus</i> (A. etilo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Aureus</i> (Hexano)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Donde Vol= volumen, Cc= concentración

**Fuente:** Elaboración propia

Las soluciones blanco trabajadas emplearon tween 20 y para comprobar que éste no inhiba el crecimiento bacteriano y se realizó la siembra con el inóculo equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland equivalente a  $10^8$  UFC/mL en el mismo medio de cultivo en las que fueron sembradas las diluciones para comprobar que el inóculo con los microorganismos estaban en óptimas condiciones de crecimiento y a la vez que el medio de cultivo era adecuado para su desarrollo. Los resultados se pueden apreciar en la tabla 3.5 donde nos indica que no tiene ninguna acción bactericida.

**Tabla 3.5 Prueba piloto para determinar la acción bactericida el Tween 20**

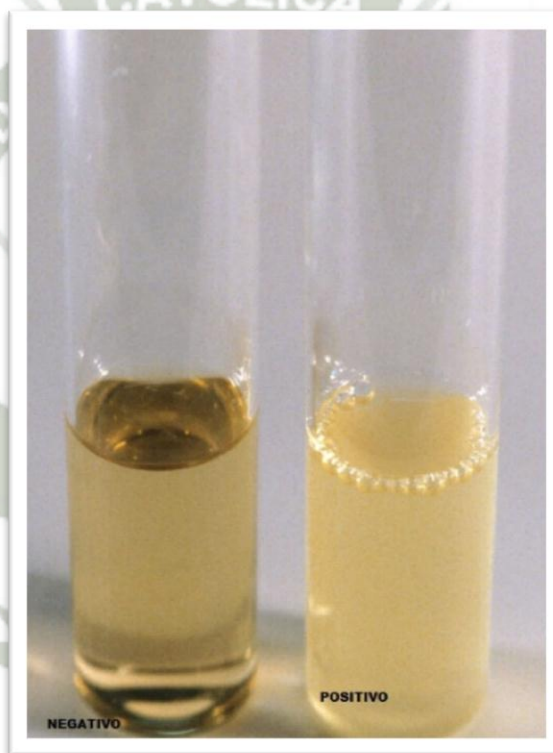
CARACTERISTICAS	Tubos			
	1	2	3	4
Tween20 (G) 2ml	1	0.9	0.8	0.7
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3
Inóculo (ml)	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2
Colonias aisladas	Crecimiento			
<i>S. aureus</i> - 1	+	+	+	+

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += placa con crecimiento, - = placa sin crecimiento, N= Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrado en placas.

**Fuente:** elaboración propia

Debido a la inhibición total presentada se vio por conveniente realizar diluciones de los extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) a concentración inicial de 200 mg/ml bajando la concentración en 10 mg/ml en cada tubo, efectuando con ello las pruebas en la 10 colonias de *Staphylococcus aureus* (tablas 3.5, 3.6 y 3.7.) en busca de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).

En la Tabla 3.5 correspondiente a extracto etanólico se observó la ausencia de crecimiento de las colonias 1 hasta la 9 a una concentración de 80 mg/ml, y para la cepa 10 a una concentración de 90 mg/ml. Por tanto la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue 80 mg/ml.



**Figura 3.13:** Prueba piloto del Tween 20, el resultado es positivo hay crecimiento.

**Fuente:** elaboración propia

Se realiza prueba piloto para el tween 20 donde se demostró que el emulsificador no tiene ningún efecto antibacteriano, con lo cual no interferirá con las pruebas a realizar y se le puede usar como emulsificador para disolver los extractos secos en agua destilada, como se muestra en la figura 3.13

En todos los tubos que se realizó esta prueba en piloto salieron positivo como se muestra en la figura 3.14

Después de realizar esta prueba, se procedió a realizar de forma comparativa los extractos de la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) con un producto antibacterial específico para *Staphylococcus aureus* como la lincomicina, presentación de farmacéutica de lincomicina de 600 mg en ampolla de laboratorio Farmaindustria, con el cual se procedió a realizar las diluciones respectivas para igualar la concentración de los extractos de la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).

**Tabla 3.6 Prueba piloto para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) con lincomicina y así compararlo con los extractos de la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

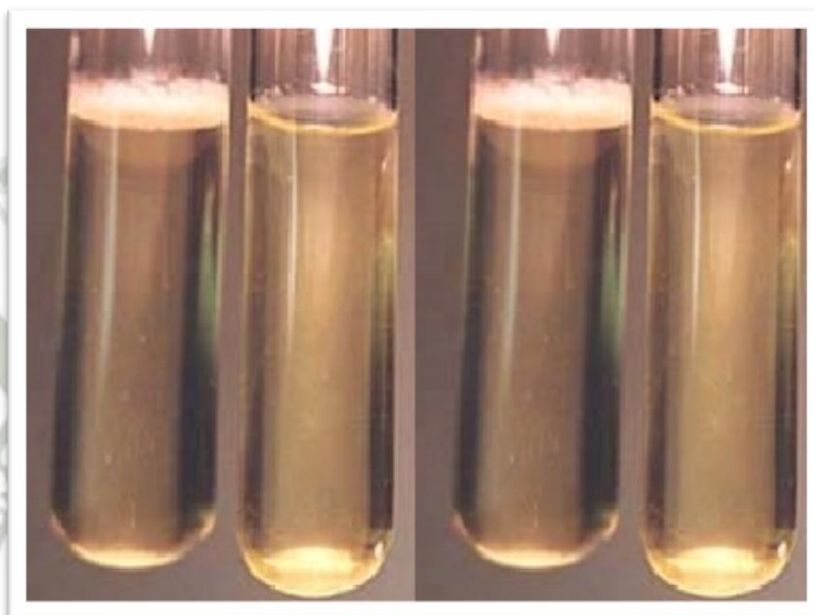
CARACTERISTICAS	Tubos						
	1	2	3	4	5	6	7
Lincomicina (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg)/mL)	100	90	80	70	60	50	40
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>						
S. aureus - 3	-	-	-	-	-	-	-
S. aureus - 5	-	-	-	-	-	-	-

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += se observa crecimiento, - = no se observa crecimiento

**Fuente:** Elaboración propia

Así mismo en la Tabla 3.6 se muestra las pruebas realizadas en las 10 colonias de la muestra de "*Staphylococcus aureus*" para el extracto con

acetato de etilo. Se identificó que las colonias 5 y 9 presentaron ausencia de crecimiento a 100 mg/mL, las colonias 2, 3,4,6,7, 8 y 10 mostraron similar comportamiento a 90 mg/mL y solo la colonia 1 mostro ausencia de crecimiento a 80 mg/mL. Se identificó que la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue de 90 mg/ml.



**Figura 3.14 prueba piloto con lincomicina, el resultado es que no hay crecimiento**

**Fuente:** Elaboración propia

Después de realizar esta prueba piloto, para poder realizar la comparación con los extractos de etanol, acetato de etilo y hexano de la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común). Se puede apreciar que el poder antibacterial de la lincomicina se da en microgramos por ml, al contrario de los extractos obtenidos se dan en miligramos, por lo cual no se puede realizar una comparación, en igualdad de concentración.

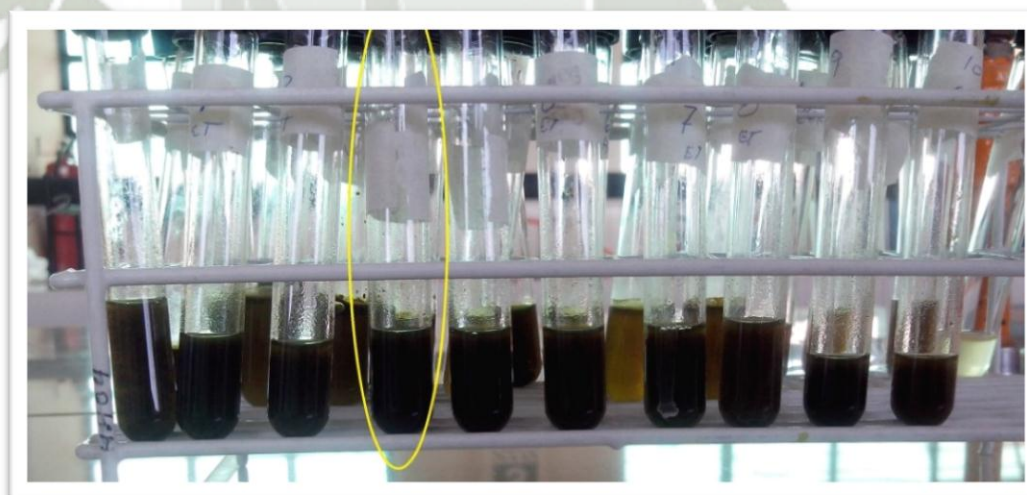
**Tabla 3.7 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto etanólico de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

CARACTERISTICAS	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extracto (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg/mL)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>									
S. aureus – 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += se observa crecimiento, - = no se observa

crecimiento

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 3.15 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto etanólico *Hederá hélix L.* (Hiedra Común)**

Esto se puede apreciar en la figura 3.15 Donde se aprecia que el color ya cambia a contra luz a un tono más lechoso.

Se puede observar que el color de va variando de con la presencia de un tono verde vivo a un tono verde blanquizo o lechoso con lo cual se puede suponer que el extracto está permitiendo el crecimiento de microorganismo, al compararlo con otros estudios realizados.

En cuanto al extracto de etanólico (Tabla 3.7) la muestras de colonias de la muestra 1 a la 9 presentaron inhibición a 80 mg/mL mientras que las colonia 10 lo hicieron a 90 mg/ml. Siendo por tanto la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 90 mg/ml.

El resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 3.7, en la cual se muestra las CIM promedio para cada extracto siendo  $81 \pm 2.2622$ ,  $93 \pm 3.4555$  y  $96 \pm 3.6941$ , para extracto etanólico, con acetato de etilo y hexano respectivamente.

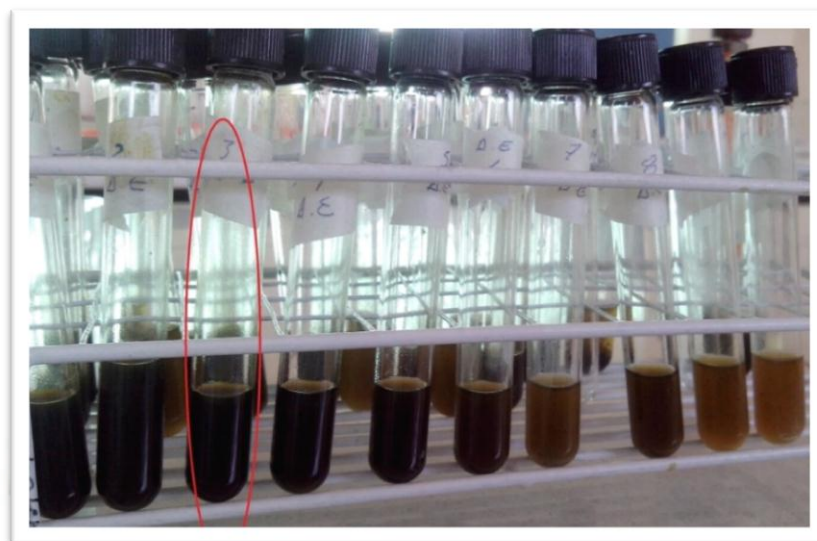
**Tabla 3.8 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto de acetato de etilo de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

CARACTERISTICAS	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extracto (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg/mL)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>									
S. aureus - 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += se observa crecimiento, - = no se observa

crecimiento

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 3.16 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto de acetato de etilo *Hederá hélix L.* (Hiedra Común)**

En cuanto al extracto de etilo (Tabla 3.8) las colonias 1,2,3,4-7,8 y 10 presentaron inhibición a 90 mg/mL mientras que las colonias 5 y 9 lo hicieron a 100 mg/ml. Siendo por tanto la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 90 mg/ml.

En la figura 3.16 se puede apreciar cierta turbidez desde el tubo número 3 donde empieza a perder el efecto antibacteriano del extracto de acetato de etilo, comparando cierta similar con otros estudios realizados con otras plantas estudiadas en su acción bactericida con el mismo microorganismo de estudio.

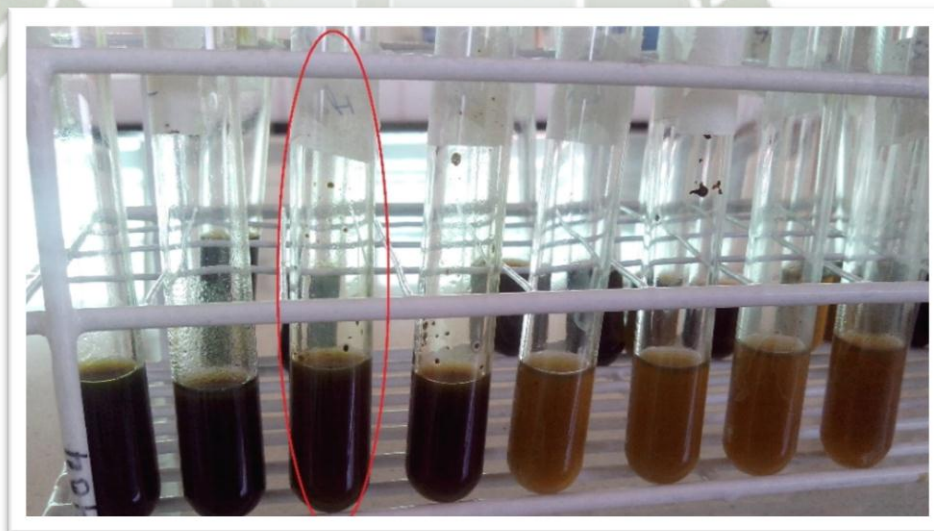
El resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 3.8, en la cual se muestra las CIM promedio para cada extracto siendo  $92 \pm 3.4555^b$  y  $96 \pm 3.6941$ , para extracto etanólico, con acetato de etilo y hexano respectivamente.

**Tabla 3.9 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) con extracto de hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra común).**

CARACTERÍSTICAS	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extracto (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg)/ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>									
S. aureus – 1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus – 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus – 3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus – 4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus – 5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus – 6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus – 7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. aureus - 10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += se observa crecimiento, - = no se observa crecimiento

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 3.17 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extracto de hexano *Hederá hélix L.* (Hiedra Común)**

En cuanto al extracto de hexano (Tabla 3.9) las colonias 3,4,6,8 y 9 presentaron inhibición a 100 mg/mL mientras que las colonias 1,2,5 y 7 lo hicieron a 90 mg/ml. Siendo por tanto la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 90 mg/ml.

En la figura 3.17 se puede apreciar cierta turbidez desde el tubo número 3 donde empieza a perder el efecto antibacteriano del extracto de Hexano, comparando cierta similar con otros estudios realizados con otras plantas estudiadas en su acción bactericida con el mismo microorganismo de estudio.

Es importante indicar que los resultados señalados son referenciales puesto que los pigmentos de color verde intenso dificultaron la identificación de turbidez.

El resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 3.8, en la cual se muestra las CIM promedio para cada extracto siendo  $81 \pm 2.2622$ ,  $93 \pm 3.4555$  y  $96 \pm 3.6941$ , para extracto etanólico, con acetato de etilo y hexano respectivamente.

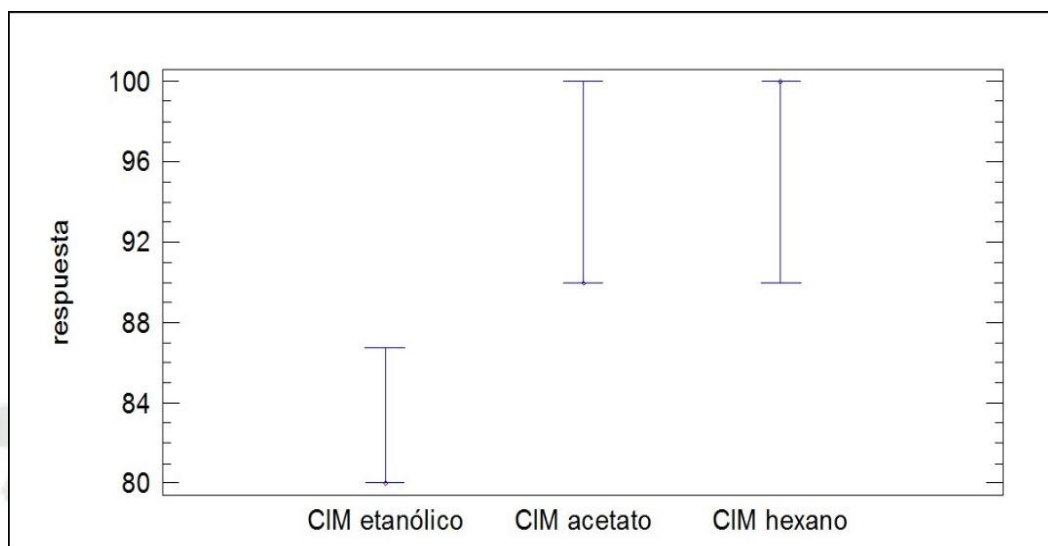
Para comparar los resultados de CIM se realizó la prueba Kruskal-Wallis la cual mostro un valor-p de 0.000 ( $p < 0.05$ ) indicando que existe diferencias estadísticamente significativas entre la CIM de los tres extractos, procediendo por ello a realizar la prueba de múltiples rangos por el método.

**Tabla 3.10 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los diferentes extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

Colonias aisladas	CIM (mg/mL)		
	Etanólico	Acetato de etilo	Hexano
S. aureus - 1	80	80	90
S. aureus - 2	80	90	90
S. aureus - 3	80	90	100
S. aureus - 4	80	100	100
S. aureus - 5	80	90	90
S. aureus - 6	80	90	100
S. aureus - 7	80	90	90
S. aureus - 8	80	100	100
S. aureus - 9	80	90	100

S. aureus - 10	90	100	100
Promedio	81+/-2.2622 <sup>a</sup>	92+/-3.4555 <sup>b</sup>	96+/-3.6941 <sup>b</sup>
Desviación Estándar	3.1623	4.8305	5.1639
Error estándar	1	1.52753	1.63299
Sesgo Estandarizado	4.0825	1.3363	-0.625

**Fuente:** Elaboración propia



**Gráfico 3.18:** Gráfico de medianas para CIM de extractos seco de hojas y tallos de *Hederá hélix L. (Hiedra Común)* empleando diferentes solventes.

**Fuente:** Elaboración propia

De Bonferroni el cual evidenció que la concentración inhibitoria mínima encontrada para acetato de etilo y hexano eran similares entre si y diferentes estas dos con la CIM encontrada para etanol, esto se puede observar claramente en la Grafico (3.18)

Con este grafico (3.18) de bigotes del grafico de medianas para CIM de los extractos realizados en este estudio se puede observar una mayor acción antibacterial en el extracto etanólico.

Esto se aclara cuando sembramos en placas con agar manitol salado, donde se puede apreciar con mayor facilidad el punto donde es inhibitorio el extracto de *Hederá hélix L. (Hiedra común)*, frente al microorganismo de "*Staphylococcus aureus*".

#### 4.1. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de

**los extractos de etanol, acetato de etilo y Hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

La determinación de Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó mediante el método de dilución en tubo respectivamente utilizando como medio de cultivo caldo peptonado, pasadas las 24 horas de incubación las diluciones fueron sembradas en placas con agar Müeller Hinton también se usó agar manito salado por agotamiento en estrías para observar su crecimiento, esto a que el agar (manitol salado) es más específico y nos permite evitara contaminaciones por otros microorganismos.

En la Tabla 3.9 correspondiente a extracto etanólico se observó una clara turbidez a concentraciones de 60 y 50 mg/ml por lo cual estas no fueron sembradas en placas, sin embargo concentraciones superiores si fueron sembradas para la confirmación de crecimiento, identificando así que de esta manera la CBM en los distintos extractos.

**Tabla 3.11 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de etanol de *Hederá hélix L.* (Hiedra común)**

CARACTERISTICAS	Tubos					
	1	2	3	4	5	6
Extracto (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg/ml)	100	90	80	70	60	50
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>					
S. aureus - 1	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 2	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 3	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 4	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 5	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 6	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 7	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 8	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 9	-	-	+	+	N	N
S. aureus - 10	-	+	+	+	N	N

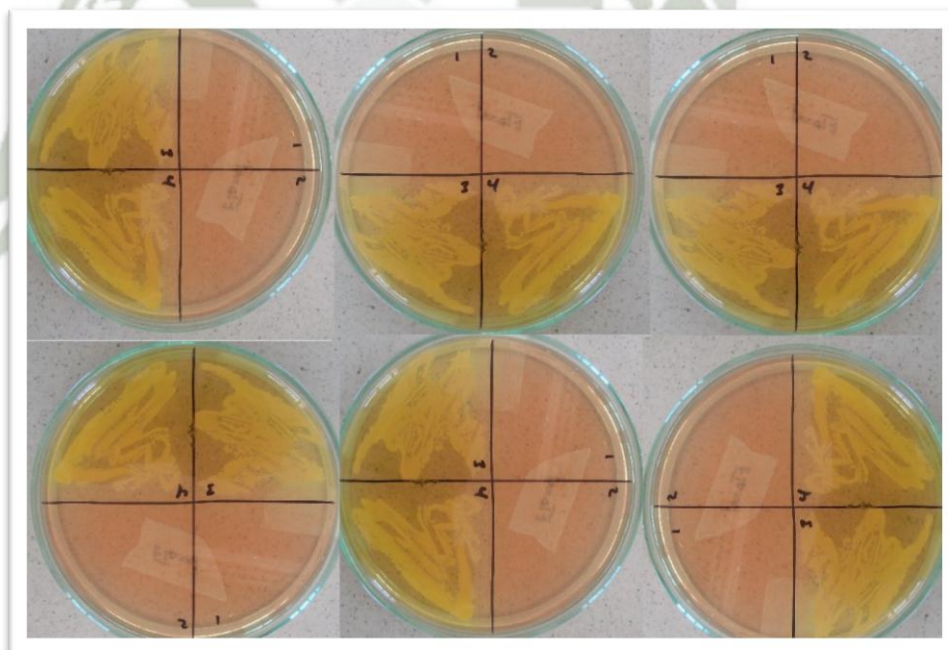
Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += placa con crecimiento, - = placa sin crecimiento,  
N= Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrado en placas.

**Fuente:** Elaboración propia

Las colonias del 1 al 9 la CBM fue de 90mg/ml mientras que para la colonia 10 fue de 100 mg/ml.

En la Tabla 3.11 se observó que la CBM para las colonias 1,2, 3,5,6,7 y 9 fue de 100mg/ml mientras que para las colonias 4,8 y 10 fue de 200mg/ml de extracto de acetato de etilo.

Similar comportamiento de las colonias fue identificado con el extracto de hexano (Tabla 3.11), siendo las colonias 1,2,4, 5,7 y 8 sensibles a 100 mg/ml mientras que las colonias 3,6,9 y 10 lo fueron a 200 mg/ml.



**Figura 3.17** poder anti-bacterial de extracto de etanol *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).

Como se muestra en la imagen (Figura 3.17) el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se da en las zonas donde el extracto se encuentra más diluido donde pierde completamente su poder antibacteriano.

En las placas se puede observar crecimiento en la zona número 3 del sembrado por agotamiento, donde el poder antibacteriano del extracto, ya no tiene efecto como se muestra en la en la tabla 3.9 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de etanol de *Hederá hélix L.* (Hiedra común). Esto comparado con otros estudios de la acción bactericida, presenta cierta igualdad de efecto ante la misma bacteria en estudio, como el extracto de acetato de etilo de *Bidens Pilosa L.* VarMino “amor seco”<sup>(31)</sup> para *Staphylococcus aureus* es de 125 mg/ml observando que su concentración es más elevada para este microorganismo, mientras que el extracto etanólico de *Piper Elongatum* “matico matico” para “*Staphylococcus aureus*”.<sup>(38)</sup>

**Tabla 3.12 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de acetato de etilo de *Hederá hélix L.* (Hiedra común)**

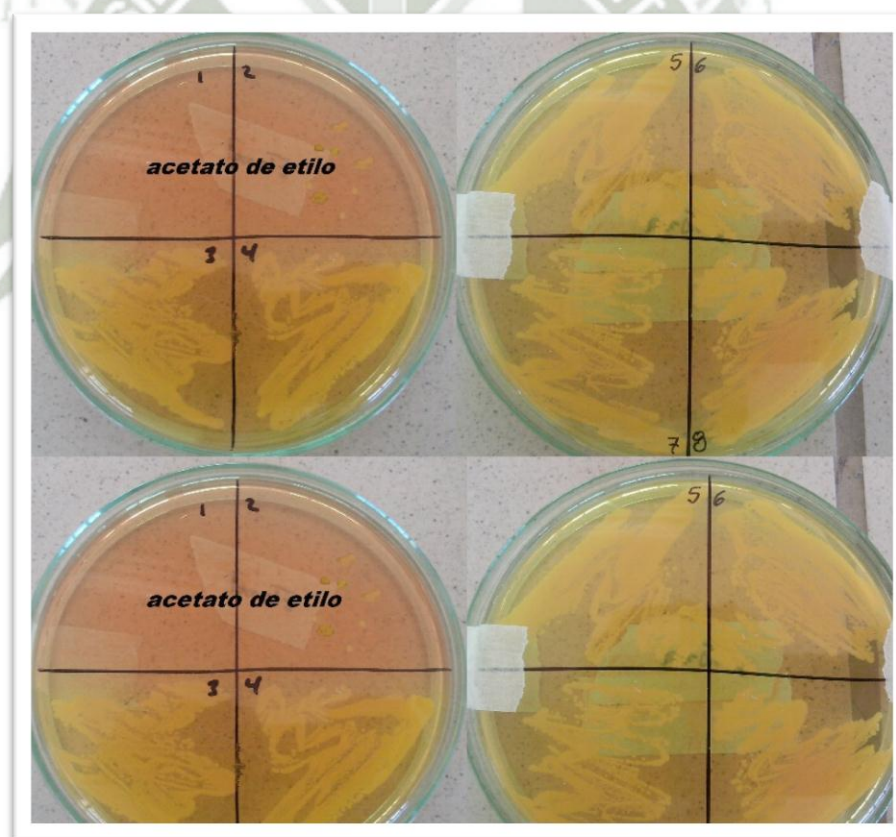
CARACTERISTICAS	Tubos					
	1	2	3	4	5	6
Extracto (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg)/ml)	100	90	80	70	60	50
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>					
S. aureus - 1	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 2	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 3	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 4	+	+	+	+	N	N
S. aureus - 5	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 6	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 7	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 8	+	+	+	+	N	N

S. aureus - 9	-	+	+	+	N	N
S. aureus - 10	+	+	+	+	N	N

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += placa con crecimiento, - = placa sin crecimiento, N= Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrado en placas.

**Fuente:** Elaboración propia

Como se muestra en la Tabla 3.12 y en la Figura 3.20 el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se da en las zonas donde el extracto se encuentra más diluido donde pierde completamente su poder antibacteriano, en la zona 2 donde la concentración del extracto de acetato de etilo es 90 mg/ml se empieza a ver crecimiento de algunas colonias de *Staphylococcus aureus* en las placa, esto nos indica que la concentración del extracto, es insuficiente para matar a las colonias.



**Figura 3.18 Poder antibacterial de extracto de acetato de etilo *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

**Fuente:** Elaboración propia.

En las placas se puede observar crecimiento en la zona número 2 del sembrado por agotamiento, donde el poder antibacteriano del extracto, ya no tiene efecto como se muestra en la en la tabla 3.12 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de acetato de etilo de *Hederá hélix L.* (Hiedra común) y en la Figura 3.20, dando como resultado de CBM de 90 mg/ml. Esto comparado con otros estudios de la acción bactericida, presenta cierta igualdad de efecto ante la misma bacteria en estudio, como el extracto de acetato de etilo de *Bidens Pilosa L. Var.Mino “amor seco”*<sup>(31)</sup> para *Staphylococcus aureus* es de 125 mg/ml observando que su concentración es más elevada para este microorganismo, mientras que el extracto etanolico de *Piper Elongatum “matico matico”* presenta una CBM 150 mg/ml para *Staphylococcus aureus*<sup>(38)</sup>

**Tabla 3.13 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) con el extracto de hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra común)**

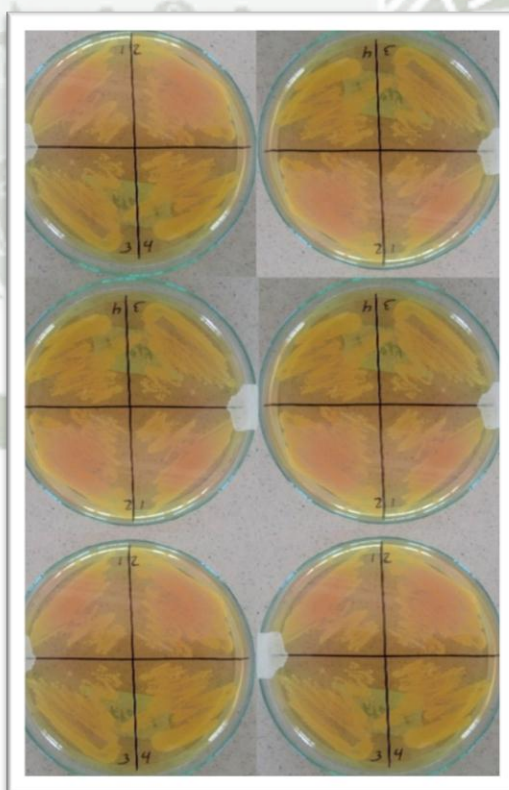
CARACTERISTICAS	Tubos					
	1	2	3	4	5	6
Extracto (G) 200 mg	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
Caldo (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Inóculo (ml)	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2
Cc. Final(mg)/ml)	100	90	80	70	60	50
Colonias aisladas	<b>Crecimiento</b>					
S. aureus - 1	-	+	N	N	N	N
S. aureus - 2	-	+	N	N	N	N
S. aureus - 3	+	+	N	N	N	N
S. aureus - 4	-	+	N	N	N	N
S. aureus - 5	-	+	N	N	N	N
S. aureus - 6	+	+	N	N	N	N
S. aureus - 7	-	+	N	N	N	N
S. aureus - 8	-	+	N	N	N	N
S. aureus - 9	+	+	N	N	N	N
S. aureus - 10	+	+	N	N	N	N

Donde Vol= volumen, Cc= concentración, += placa con crecimiento, - = placa sin crecimiento,

N= Tubo con crecimiento bacteriano (turbidez) por lo que no fue sembrado en placas.

**Fuente:** Elaboración propia

Comparando con otros estudios de la CBM, realizados por Virrueta Gonzales, Cecilia; Zegarra Manrique Yesenia. “determinación de efecto antimicótico y antibacteriano *In vitro* de piper elongatum (matico matico) frente a las colonias de candida albicans, Staphylococcus aureus y Escherichia coli. Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M. Arequipa 2008., sobre este tipo de microorganismo, y con extracto etanólico de Bidens Pilosa L. Var.Mino “amor seco”<sup>(31)</sup>, se identificó que la CBM para *Staphylococcus aureus*



**Figura 3.19** poder antibacterial de extracto de hexano *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).

**Fuente:** Elaboración propia

El resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 3.13, en la cual se muestra las CBM promedio para cada extracto siendo 91+/-2.2622, 130+/-34.5555 y 140+/-36.9410, para extracto etanólico, con acetato de etilo y hexano respectivamente.

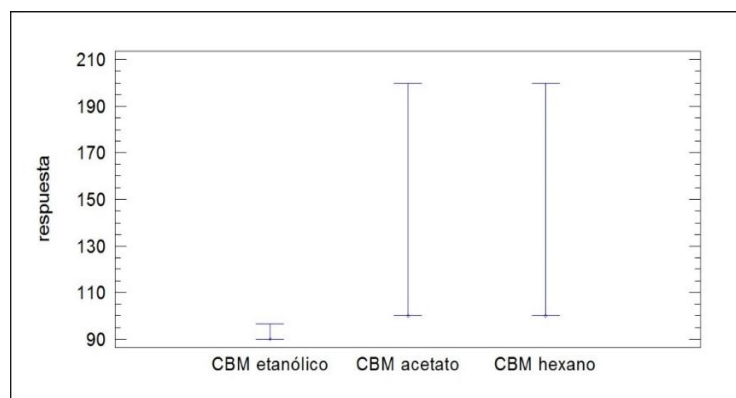
Comparación de resultados de concentración bactericida mínima (CBM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).

**Tabla 3.14 Resumen de la concentración bactericida mínima (CBM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

Colonias aisladas	CBM (mg/ml)		
	Etanólico	Acetato de etilo	Hexano
S. aureus - 1	90	100	100
S. aureus - 2	90	100	100
S. aureus - 3	90	100	200
S. aureus - 4	90	200	100
S. aureus - 5	90	100	100
S. aureus - 6	90	100	200
S. aureus - 7	90	100	100
S. aureus - 8	90	200	100
S. aureus - 9	90	100	200
S. aureus - 10	100	200	200
Promedio	91+/-2.2622 <sup>a</sup>	130+/-34.5550 <sup>ab</sup>	140+/-36.9410 <sup>b</sup>
Desviación Estándar	3.16228	48.3046	51.6398
Error estándar	1	15.2753	16.3299
Sesgo Estandarizado	4.08248	1.33631	0.625

**Fuente:** Elaboración propia

Para comparar los resultados de CBM se realizó la prueba Kruskal-Wallis la cual mostro un valor-p de 0.000 ( $p < 0.05$ ) indicando que existe diferencias estadísticamente significativas entre la CBM de los tres extractos, esto se puede observar claramente en la Figura 3.7



**Gráfico 3.20: Gráfico de medianas para CBM de extractos seco de hojas y tallos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) empleando diferentes solventes.**

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 3.15 Resumen de la concentración inhibitoria mínima (CIM) concentración bactericida mínima (CBM) de los diferentes extractos (etanólico, acetato de etilo y hexano) de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

Colonias aisladas	CIM (mg/ml)			CBM (mg/ml)		
	Etanólico	Acetato de etilo	Hexano	Etanólico	Acetato de etilo	Hexano
Promedio	81+/- 2.2622 <sup>a</sup>	92+/- 3.4555 <sup>b</sup>	96+/- 3.6941 <sup>b</sup>	91+/- 2.2622 <sup>a</sup>	130+/- 34.5550 <sup>ab</sup>	140+/- 36.9410 <sup>b</sup>
Desviación Estándar	3.1623	4.8305	5.1639	3.1622	48.3046	51.6398
Error	1	1.52753	1.63299	1	15.2753	16.3299
Sesgo Estandarizado	4.0825	1.3363	-0.625	4.0825	1.3363	0.6250

Fuente: Elaboración Propia.

La Tabla 3.15 nos permite concluir que la concentración inhibitoria mínima CIM para las muestras de *Staphylococcus aureus* con el extracto etanólico es en promedio de 81 mg/ml, para el extracto de acetato de etilo es de 92 mg/ml y para el extracto e hexano es de 96 mg/ml.

Las 10 colonias de *Staphylococcus aureus*, muestran que la bacteria es más susceptible al extracto de etanólico, con una concentración bactericida mínima (CBM) 91 mg/ml en promedio, se observa que para el extracto de hexano es menos susceptible.

Esto puede deberse a que los extracto se diferencia en el grado de polaridad siendo más polar el etanol y el extracto de hexano como apolar.

Comparando con otros estudios de la CBM, realizados por Virrueta Gonzales, Cecilia; Zegarra Manrique Yesenia. “determinación de efecto antimicótico y antibacteriano *In vitro* depiper elongatum (matico matico) frente a las colonias de candida albicans, Staphylococcus aures y Escherichia coli. Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmaceutico U.C.S.M. Arequipa 2008, sobre este tipo de microorganismo, y con extracto etanólico de Bidens Pilosa L. Var.Mino “amor seco” se observa.<sup>(31)</sup>

Se identificó que la CBM para *Staphylococcus aureus* fue de 125 mg/ml observando que su concentración es más elevada para este microorganismo, mientras que el extracto etanólico de Piper Elongatum “matico matico” presenta una CBM 150 mg/ml para *Staphylococcus aureus* según trabajos realizados por etanólico de Bidens Pilosa L. Var.Mino “amor seco” para *Staphylococcus aureus*. Villena Vargas Giovana; efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de Bidens Pilosa L. (Var. Minor) Arequipa 2010.<sup>(38)</sup>

Comparando con estas investigaciones podemos deducir que el extracto etanólico de *Hederá hélix L.* (Hiedra común) posee efecto antibacteriano y al mismo tiempo presenta un mayor rendimiento de extracción y además posee la mayor cantidad de metabolitos lo cual le confiere un mayor efecto antibacteriano por sobre los otros extractos.<sup>(47)</sup>

Por eso en el análisis fitoquímico por cromatografía de capa fina se toma como extracto de mayor importancia al etanólico pues en la presente investigación y en trabajos similares se observó que presenta mayor efecto antibacteriano.

Así mismo en la investigación realizada por Ghias Uddin , Abdur Rauf, publicada en la revista de investigación científica del 2011 en donde nos indica que el “*Bacillus Subtilis*” que es un Gram-positivo es también susceptible con la mayoría de los extractos como hexano, acetato de etilo,

cloroformo y metanol y que “*Staphylococcus epidermidis*” es susceptible solo con acetato de etilo, en nuestra investigación encontramos que los extractos más polares tienen una mayor efectividad contra los Microorganismos Gram-positivos.<sup>(33)</sup>

Otros trabajos realizados en la investigación de plantas medicinales con actividad antibacteriana de extractos orgánicos y acuosos de 15 plantas contra 8 especies de diferentes especies de bacterias: “*Bacillus subtilis*”, dos especies de “*Escherichia coli*”, *Staphylococcus aureus* ( resistente a la meticilina ), dos especies de *Staphylococcus aureus* ( sensibles a la meticilina ), “*Pseudomonas aeruginosa*” y “*Enterococcus faecalis*”, demuestran la mayor actividad en los extractos acuosos o solventes con polaridad o constante dieléctrica positiva.

Según la investigación de Villena Giovanna del 2010 indica la concentración Bactericida Mínima (CBM) para *Staphylococcus aureus* fue de 137 mg/mL, para extracto de etanólico de *Xanthinium spinosun L.*

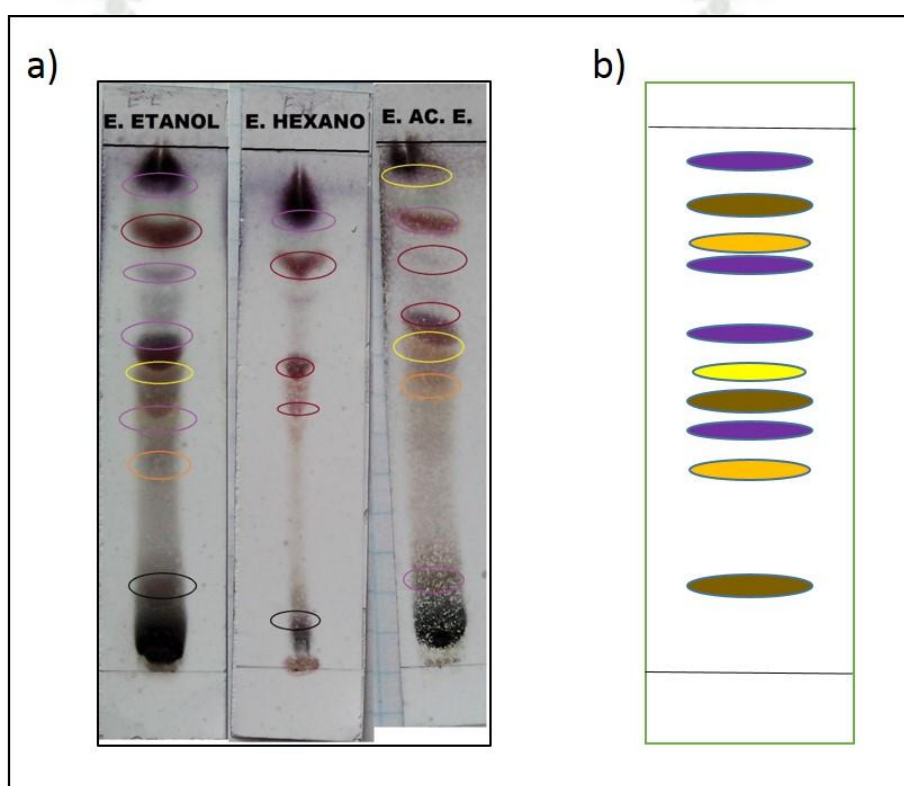
Comparando los resultados de la CBM con otros estudios realizados a este tipo de microorganismos, como extracto metanólico de *Ambrosia peruana* “altamisa” para “*Staphylococcus Aureus*” 20 mg/ml; también en otra investigación de Schimus molle presenta una CBM para *Staphylococcus aureus* de 180.50 mg/ml y para “*Staphylococcus albus*” es de 180 mg/ml, según Villena Giovanna 2010.

#### **4.2. Análisis Fitoquímico por Cromatografía de capa fina del extracto etanólico, hexano y acetato de etilo de la *Hederá hélix L.* (Hiedra común).**

Esta prueba se empleó para determinar los principales constituyentes químicos en los extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra común), hay que

tener en cuenta que la cromatografía realizada fue sin la presencia de estándares, y solo se observó la corrida cromatográfica.

Para la identificación general se utilizó como fase móvil Acetato de etilo; Metanol; Agua a una proporción de (97:20:10), fase estacionaria: placa de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda a 254 nm, teniendo como revelador Sol. A: Ácido sulfúrico al 5% y Sol. B: vainillina en etanol absoluto y Luz UV a 254 nm.



**Figura 3.21 Análisis cromatográfico general de los extractos de *Hederá hélix* L. (Hiedra Común). a) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática.**

**Fuente:** Elaboración propia.

Como se puede observar en la Figura 3.23 y en la tabla 3.24 se encontró la presencia de terpenos, flavonoides (las crisina, hesperidinas) y sesquiterpenlactonas, con presencia de cumarina ( $R_f=0.30$  esculetina) en el

extracto etanólico, toman do los puntos de OLGA LOOK 1995. ANALISIS FITOQUIMICO.

Como se observa en la cromatografía de capa fina general, el extracto de etanólico de *Hederá hélix L.* (Hiedra común), presenta una mayor variedad de compuestos fácilmente identificables.

Los datos encontrados se comparan con estudios similares de plantas estudiadas tomando como base el atlas de las drogas de plantas de H.Wagner, S. Blatt. Plant Drug Análisis, A thin Layer Chromatography Atlas segunda edición Springer. Donde se realiza la comparación de los metabolitos y de los distintos productos obtenidos en la cromatografía de capa fina con las mismas fases móviles utilizadas para la presente investigación, se puede observar la presencia de metabolitos secundarios como terpenos, taninos y flavonoides podrían ser responsables del efecto antibacteriano de la planta *Hederá hélix L.* (Hiedra común) <sup>(41,47)</sup>

En esta publicación de H.Wagner, S. Blatt indica la presencia de acidos carboxílicos fenólicos, cumarinas, rutina en Rf de 0,045 a 0,95; los ácido clorogénico y escopoletina en Rf de 0,45 a 0,5 ; ácidos cafeico en Rf =0,75

**Tabla 3.16 Resultados observados para la cromatografía de capa fina general con el extracto de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

Revelado a luz natural

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Morado	0.95	Terpeno
2	Amarillo	0.90	Flavonide / hesperidinas
6	Marrón	0.89	Sesquiterpenlactonas
3	Amarillo	0.84	Flavonide / hesperidinas
4	Amarillo	0.75	Flavonoide/ crisina
5	Morado	0.68	Terpeno
6	Marrón	0.63	Sesquiterpenlactonas
7	Marrón	0.40	Sesquiterpenlactonas
8	Marrón/Amarillento	0.30	Esculetina /cumatinas

Fuente: elaboración propia

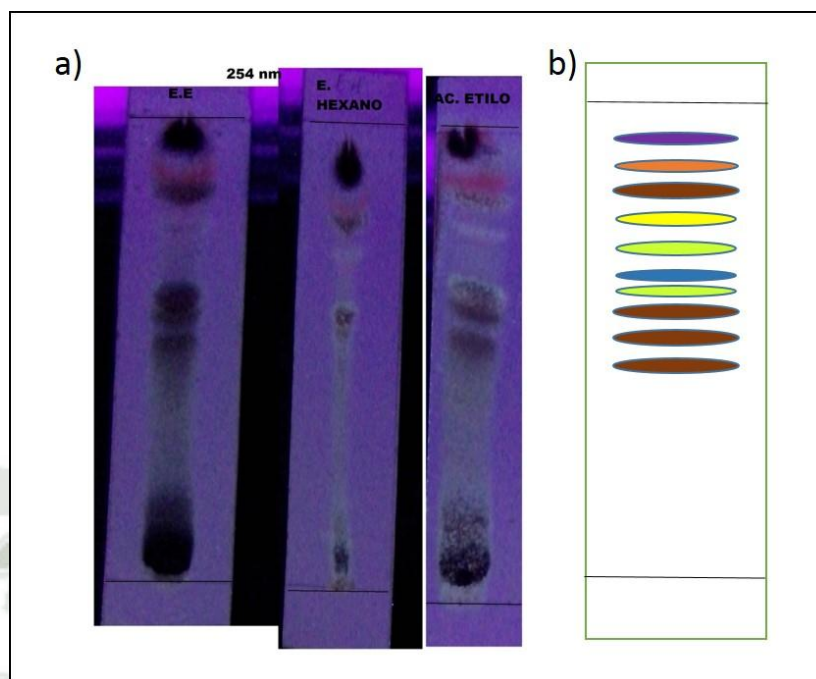
En la publicación de Middle-East Journal of Scientific Research. 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, por cromatografía de gases, indica la presencia taninos con acetato de etilo y metanol.

Se usa como indica OLGA LOOK 1995. ANALISIS FITOQUIMICO. <sup>(33)</sup> y tomando como base el atlas de las drogas de plantas de H.Wagner, S. Bladt. Plant Drug Análisis, A thin Layer Chromatography Atlas segunda edición Springer <sup>(3)</sup>.

Donde se realiza la comparación de los metabolitos, FUTURO EN LA INVESTIGACION EN FITOTERAPIA: TENDENCIAS Y RETOS; Hildebert Wagner. Zentrum Für Pharmaforschung. Universität München, 2006<sup>(20)</sup>.

En la publicación de Middle-East Journal of Scientific Research. 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, por cromatografía de gases con extracto de cloroformo encuentra la presencia de alcaloides, terpenos, taninos y saponinas y en con extracto de metanol encuentran la presencia de azúcares reductores.

Así mismo en la investigación se indica que el “*Bacillus Subtilis*” que es un Gram-positivo es también susceptible con la mayoría de los extractos como hexano, acetato de etilo, cloroformo y metanol y que “*Staphylococcus epidermidis*” es susceptible solo con acetato de etilo, en nuestra investigación encontramos que los extractos más polares tienen una mayor efectividad contra los Microorganismos Gram-positivos.



**Figura 3.22** Análisis cromatográfico general de los extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) bajo luz UV. a) Vista bajo luz UV, b) Representación esquemática.

**Fuente:** Elaboración propia

Tomando como base lo que indica H.Wagner, S. Bladt. En el atlas de las drogas de plantas, Como se puede observar en la (Figura 3.24.), en la placa de silica gel a luz UV a 254 nm los metabolitos presentes son: en un color morado intenso que identifica a los terpenos, los flavonoides de color amarillo encendido.

Como indica María Adelina Jiménez-Arellanes, Lorena Alamilla-Fonseca, Gabriel Alfonso Gutiérrez-Rebolledo, en la Revista mexicana de ciencias farmacéuticas del 2014, ven la efectividad de las Plantas Medicinales de Mexico y su efecto en leishmaniasis, en donde incluyen a *Hederá hélix L.* y su efecto ante esta enfermedad zoonóticas y antroponóticas, en donde también indican la mejor fecha de recolección que es entre diciembre y marzo. <sup>(40)</sup>

**Tabla 3.17 Resultados observados para la cromatografía de capa fina general con el extracto de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).**

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Morado	0.95	Terpeno
2	Amarillo	0.90	Flavonide / hesperidinas
6	Marrón	0.89	Sesquiterpenlactonas
3	Amarillo	0.84	Flavonide / isopreno
4	Amarillo	0.75	Flavonoide/ crisina
5	Morado	0.68	Terpeno
6	Marrón	0.63	Sesquiterpenlactonas
7	Marrón	0.40	Sesquiterpenlactonas
8	Marrón/amarillento	0.30	esculetina

Fuente: elaboración propia

En la publicación de Middle-East Journal of Scientific Research. 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, por cromatografía de gases, indica la presencia de flavonoides.

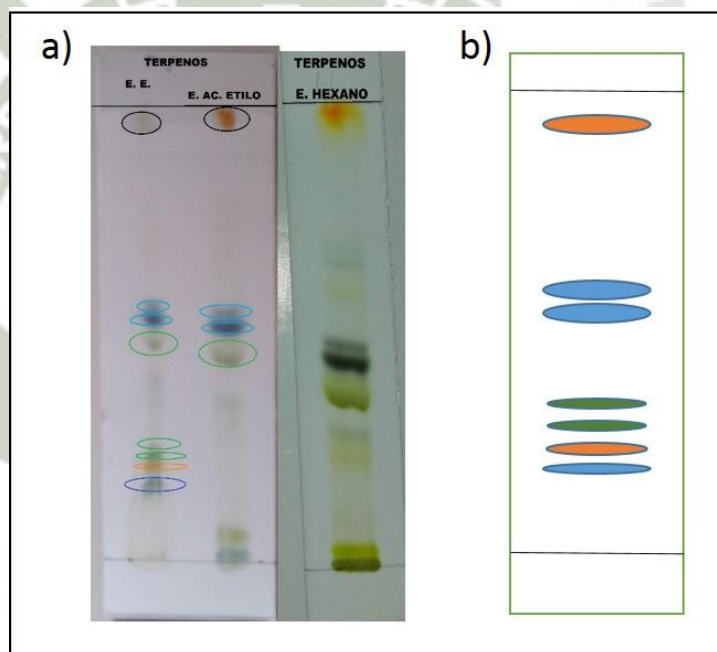
En investigación de Elvira Lucia Erazo Proaño en estudio de la *Hederá Hélix* en el 2013 nos indica la presencia de terpenos, en este estudio realiza la cromatografía de gases en el cual nos indica la presencia de la mayoría metabolito, en su investigación de “Separación y Caracterización de los Metabolitos secundarios de la Hiedra (*Hederá hélix*) de Ecuador con fines de aporte a una Técnica de Identificación” en Riobamba Ecuador. <sup>(16)</sup>

Después de realizar la primera cromatografía de capa fina con solventes para una extracción de metabolitos secundarios en una forma general, se procedió a las cromatografías para separar metabolitos más específicos.

**Para la identificación de terpenos:**

Se utilizó como fase móvil Tolueno: Acetato de etilo (95:5) tenido como revelador ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 1% en etanol absoluto., los reactivos reveladores fueron: Sol. A: Ácido sulfúrico al 5% y Sol. B: vainillina en etanol absoluto.

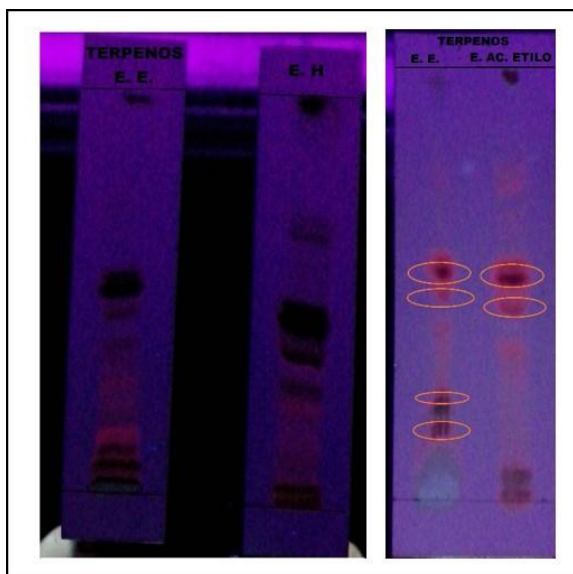
En Tabla 3.16, se puede apreciar los resultados obtenidos de la corrida cromatografía específica para los terpenos en donde se observa coloraciones que van desde el color lila al azul (Figura 3.23) que demuestran que la planta posee buena cantidad de terpenos ya que estas coloraciones son características de los mismos.



**Figura 3.23** Análisis cromatográfico para terpenos de los extractos *Hederá hélix L.* (Hiedra Común). a) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 3.25. Se puede apreciar los resultados obtenidos de la cromatografía específica sin revelador solo a luz natural, esta placa se realizó con fase móvil de tolueno: Acetato de etilo (95:5), específico para terpenos en donde se observa coloraciones que vas desde el lila azulado.



**Figura 3.24:** Análisis cromatográfico para terpenos de los extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) con luz ultra violeta de 254 nm. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 3.26 se puede observar los metabolito secundarios arrastrados de azul oscuro que nos da indicativo de la presencia de terpenos

**Tabla 3.18** Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de terpenos con el extracto de *Hederá hélix L.* (Hiedra común).

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Azul oscuro	0.55	terpenos
2	Azul oscuro	0.45	terpenos
3	Morado	0.35	terpenos
4	Morado	0.29	terpenos

Fuente: Elaboración propia

En la publicación de Middle-East Journal of Scientific Research. 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, por cromatografía de gases extracon hexano encuentra la presencia de terpenos.

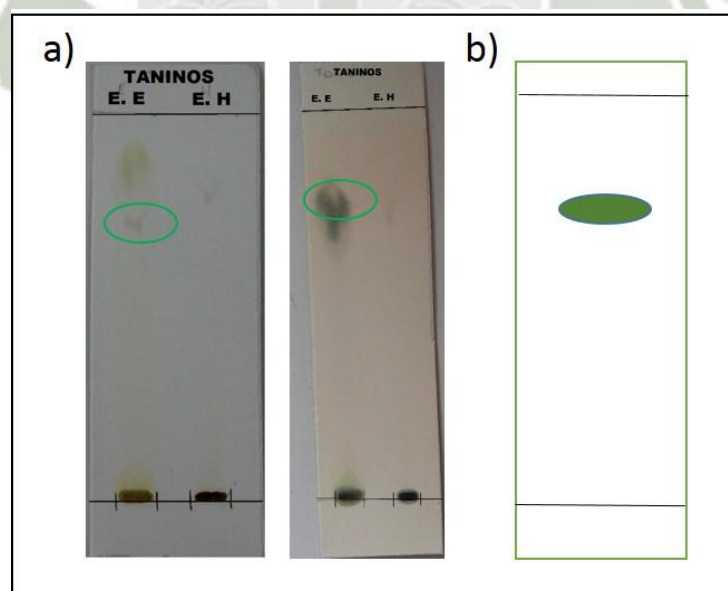
Como OLGA LOOK 1995. ANALISIS FITOQUIMICO, identifica terpenos.

Adicionalmente en Atlas de Drogas de plantas identifican a través de la cromatografía de capa fina la presencia de terpenos con lo cual nos reatifico la presencia de terpenos.

En investigación de Elvira Lucia Erazo Proaño en estudio de la Hederá Hélix en el 2013 nos indica la presencia de terpenos, en este estudio realiza la cromatografía de gases en el cual nos reatifico la presencia de este metabolito. <sup>(16)</sup>

Así mismo S.Juan Matilla 2005 Fitoterapias indica la presencia de triterpélicas derivados de la beta-amirina (herecósidos A,B y C, beta-hederina, alfa-hederina), esto a través de la cromotagrofina de gases indica la presencia de terpenos.

A continuación se procedió a identificar los taninos, para se utilizó como fase móvil metanol: agua a una proporción de (90:10), teniendo como revelador cloruro férrico al 5% en agua. Las muestras reveladas se observan en la Figura 3.27, bajo luz natural.



**Figura 3.25** Análisis cromatográfico para taninos de los extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común). A) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática

La aparición de la coloración verde claro en la placa de silica gel de la cromatografía de capa fina para taninos nos indica la presencia taninos en la muestra tal y como se puede apreciar en la Figura 3.27 y en la Tabla 3.19, la cual indica el número de referencia.

**Tabla 3.19 Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de taninos con el extracto de *Hederá hélix L.* (Hiedra común).**

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Verde claro	0.90	Taninos

Fuente: Elaboración propia.

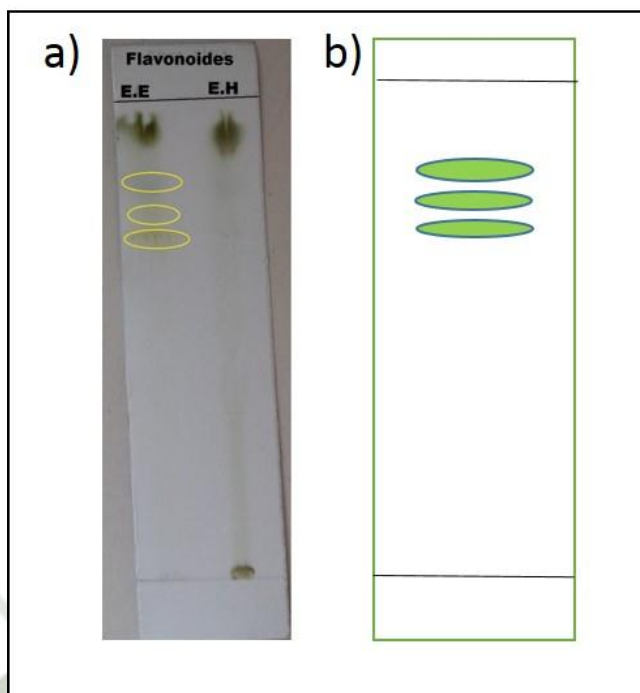
En la publicación de Middle-East Journal of Scientific Research. 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, por cromatografía de gases, indica la presencia taninos con acetato de etilo y metanol.

Así mismo S. Juan Matilla 2006 encuentra, polifenoles como rutina, nicotiflorosido, ácido cafeico, ácido clorogenico. En investigación de Elvira Lucia Erazo Proaño en estudio de la Hederá Hélix en el 2013 nos indica la presencia de taninos, en este estudio realiza la cromatografía de gases. <sup>(16)</sup>

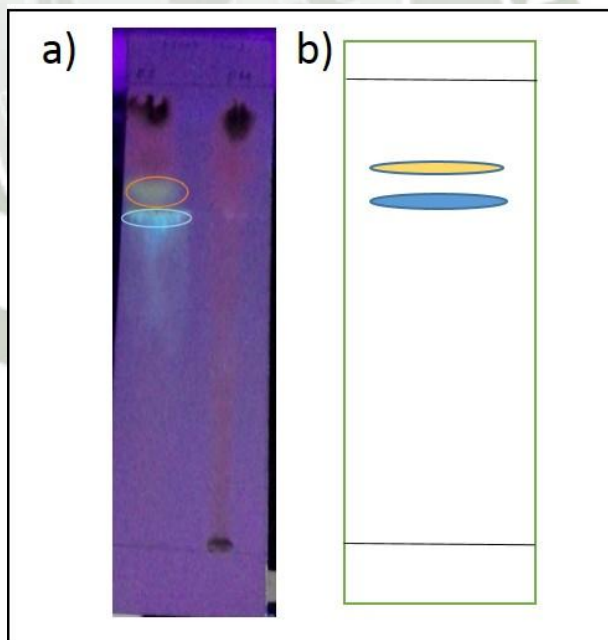
En la publicación del 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, por cromatografía de gases extracción cloroformo y con metanol, indica la ausencia de Taninos.

Adicionalmente en Atlas de Drogas de plantas, Layer Chromatography Atlas, 2008 identifican a través de la cromatografía de capa fina la presencia de taninos en Rf de 0.93 y Rf de 0.85.

**Para la identificación de flavonoides** se utilizó como fase móvil: n-butanol: acetato de etilo: Agua: Metanol (40:10: 50: 20), teniendo como revelador al cloruro de aluminio al 5% etanol. Los resultados se muestran en la Figura 3. 28 y 3.29. En la Tabla 3.15, se indica el número de referencia.



**Figura 3.26** Análisis cromatógrafo para flavonoides de los extractos *Hederá hélix L.* (Hiedra Común). A) Vista bajo luz natural, b) Representación esquemática



**Figura 3.27** Análisis cromatográfico para Flavonoides de los extractos *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) bajo luz UV. A) Vista bajo luz UV, B) Representación esquemática

**Tabla 3.20 Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de taninos con el extracto de *Hederá hélix L.* (Hiedra común).**

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Amarillo	0.85	Flavonoides/ Hesperidinas
2	Amarillo	0.79	Flavonoides/ Crisina
3	Azul	0.69	Flavonoides/Quercetina

Fuente: Elaboración propia.

Según H.Wagner, S. Bladt. Plant Drug Análisis, A thin Layer Chromatography Atlas segunda edición Springer. Donde se realiza la comparación de los metabolitos y la Df de los distintos productos obtenidos en la cromatografía de capa fina con las mismas fases móviles utilizadas para la presente investigación, se puede observar la presencia de metabolitos secundarios como terpenos, taninos y flavonoides podrían ser responsables del efecto antibacteriano de la planta *Hederá hélix L.* (Hiedra común) <sup>(41,47)</sup>.

En investigación de Elvira Lucia Erazo Proaño en estudio de la *Hederá Hélix* en el 2013 también identifica flavonoides, en el estudio realizado por medio de la cromatografía de gases. <sup>(16)</sup>

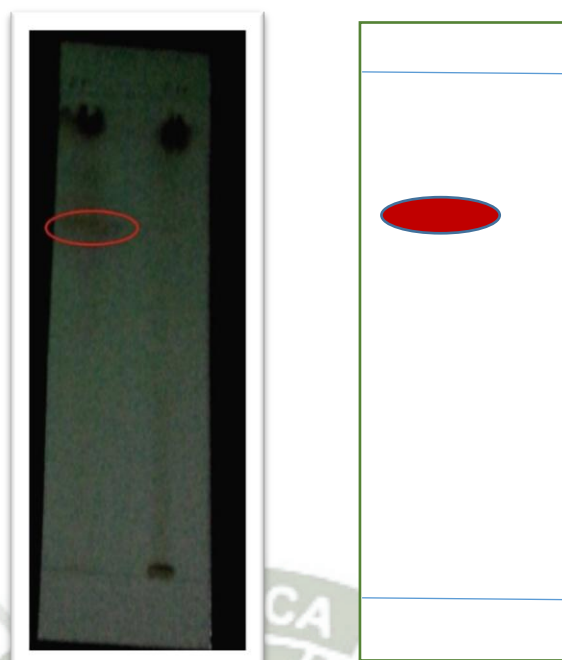
La quercetina (fórmula molecular:  $C_{15}H_{10}O_7$ ) es un flavonol que se encuentra presente generalmente como O - glicósidos y raramente como C - glicósidos en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras en especial en la cebolla. Es el flavonoide más abundante y el más habitual en la dieta humana, destacando por su elevada actividad antioxidante. A partir de él se obtienen otros flavonoides, como la naringenina o la rutina.

Muchas plantas, ya sean consideradas medicinales o no, deben gran parte de sus beneficios a los altos niveles de quercetina que presentan. Por ejemplo, algunas clases de cebolla (como la roja) contienen tanta quercetina que el compuesto representa el 10% de su peso seco, siendo de este hecho de donde derivan sus múltiples propiedades terapéuticas. Otros alimentos con niveles elevados de quercetina son las manzanas, las uvas, el brócoli o el té.

Sus aplicaciones terapéuticas son diversas, siendo especialmente efectivo en el tratamiento y prevención de las enfermedades cerebrovasculares, la obesidad o el cáncer. Debido a su actividad antihistamínica hace que sea útil para la prevención de ataques alérgicos y de asma. Fue descubierta por J. Rigaud en el año 1854. Un estudio realizado *in vitro* mostró que la quercetina y el resveratrol combinados inhiben la producción de células adiposas.

Según estudios de Alines Augusti Boligon (2008) en su investigación de potencial anti oxidante *in vitro* encuentra que el mayor potencial antioxidante se encuentra en presencia de flavonoides.

**Para la identificación para alcaloides** se utilizó como fase móvil: IsoButanol: Acido Aceico: Metanol (70:10:20), teniendo como revelador al Reactivo de Dragendorff. Los resultados se muestran en la Figura 3.30 y En la Tabla 3.21, se indica el número de referencia. En donde se puede observar una coloración rosada a luz natural y a roja a través de luz ultra violeta.



**Figura 3.28** Análisis cromatográfico para alcaloides de los extractos *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) bajo luz UV. A) Vista bajo luz natural, B) Representación esquemática.

**Fuente:** elaboración propia

**Tabla 3.21** Resultados observados para la cromatografía de capa fina en el análisis de alcaloides con el extracto de *Hederá hélix L.* (Hiedra común).

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Rosa/rojo	0.80	emetina

**Fuente:** Elaboración propia.

Según Bernat Vanaclocha, *Fitoterapia Vademécum Prescripción* (2006), nos indica que proviene de los aminoácidos aromáticos con la combinación de los aminoácidos alifáticos, el resultado es alcaloide y proteínas. La emetina tiene una actividad, expectorante, emética, anti disentérica, antihelmíntica.<sup>(1)</sup>

En investigación de Elvira Lucia Erazo Proaño en estudio de la Hederá Hélix en el 2013 no indica la presencia de emetina, en este estudio realiza la cromatografía de gases. <sup>(17)</sup>

En la publicación de Middle-East Journal of Scientific Research. 2011 realizada por Ghias Uddin, Abdur Rauf, identificación de alcaloide en extractos polares, con cloroformo y con metanol, con la utilización de cromatografía de gases. <sup>(19)</sup>

La Dra. Juriana Cortes Cabrera en la universidad de autónoma del estado de Hidalgo México (2005) identifica la emetinina en la planta plumbago pulchella, en donde indica el efecto citotoxico en *Staphylococcus aureus* con el extracto etanólico y no con extracto de acetato de etilo. <sup>(14)</sup>



## DISCUSIÓN

Después de haber realizado este trabajo de investigación, se puede apreciar que la “*Hederá Hélix*” (Hiedra Común) tiene un efecto antibacterial en el extracto etanólico que contiene la mayor parte de los metabolitos secundarios de la planta, sin embargo se observa en otra investigación con *Hederá Hélix* de Elvira Lucia Erazo Proaño. “Separación y Caracterización de los Metabolitos secundarios de la Hiedra (*Hederá hélix*) de Ecuador con fines de aporte a una técnica de identificación” el 2013 en Ecuador (17), en esta investigación no encuentran un efecto antibacterial. Esto pueda deberse a que la elaboración de los extractos es con el subextracto etéreo, el subextracto tolueno y el subextracto butanólico, todos los extractos lo realiza por el método de maceración por calor, por este método los metabolitos secundarios el problema con estés método es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto a macerar, ya que siempre quema o destruye alguna pequeña parte de esta muchas veces se trata de compuestos termolábiles, por tal motivo en este trabajo de investigación no encuentran emetina al realizar coromatografía de gases de los metabolitos secundarios realizados a los extracto de la “*Hederá Hélix*”(Hiedra Común).

Al contrario de la investigación de metabolitos de la “*Hederá Hélix*” en atlas de las plantas de FLORES, R., Atlas de Plantas Medicinales y Curativas., 2ª ed., Madrid- España, 1998 <sup>(20)</sup> y el libro de H.Wagner, S. Bladt. Plant Drug Analysis, A thin Layer Chromatography Atlas 2º edición Springer <sup>(59)</sup>. Donde encuentra presencia de alcaloides en este caso de cumarinas en la cual destaca la emetina y estos estudios realizados fue atraves de extractos etanólicos.

Por tal motivo puedo presumir que el efecto antibacteriano se deba a la presencia de emetina, la cual debe generar un efecto toxico en la colonias de “*Staphylococcus aureus*”.

Pero esto se da en concentraciones altas como lo indica en su informe LABORATORIO ROMMERS, investigación de Hederá Hélix para la presentación del producto Athos en Argentina en 1999. <sup>(40)</sup>, en donde indican que el consumo de más de la dosis recomendada (en adultos 35mg/5ml máximo de dosis 7.5ml 3 veces al día) esto quiere decir que la dosis por toma es de 52.5 mg por dosis el aumentar la dosis puede ocasionar molestias gastrointestinales, ocasionalmente náuseas, vomitos o diarrea ya que contiene emetina.

Después de haber realizado el presente trabajo de investigación se puede suponer que el efecto antibacteriano se por todo el conjunto de metabolitos secundarios en sus altas concentraciones, y también por el extracto etanólico que se realizó, ya que este extracto pudo extraer la mayor cantidad de metabolito presente en la planta de “*Hederá Hélix*” (Hiedra Común), con estas concentraciones del extracto hay un mayor contenido del metabolito de emetina, el cual en tan altas concentraciones pueda tener un efecto toxico para el organismo que lo consuma.

Por lo cual se puede suponer que este extracto etanólico de “*Hederá Hélix*” (Hiedra Común), en estas concentraciones en el consumo humano pueda tener un efecto toxico

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron diferentes extractos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) para los tres solventes: Etanol, Acetato de etilo y Hexano. Los rendimientos obtenidos para el extracto etanólico fue en promedio de 69.94%, para el extracto de acetato de etilo un promedio 54.04 % y para el extracto de hexano un promedio de 48.16 % con lo cual se concluye que el extracto con mayor rendimiento fue el etanólico.
2. Se determinó que la concentración inhibidora mínima (CIM) hallada con el extracto etanólico de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) para “*Staphylococcus aureus*” es de 80 mg/ml en promedio, y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de la Hederá con el mayor efecto antibacteriano frente a “*Staphylococcus aureus*”, en promedio es de 91 mg/ml.
3. Se Realizó las marchas fitoquímicas para ver la presencia de sustancias terpenicas, flavonoides y taninos principalmente, en los otros extractos se observó la falta de presencia de flavonoides.

## SUGERENCIAS

- Efectuar pruebas de identificación y cuantificación de los componentes presentes en el extracto de las hojas y tallos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).
- Realizar investigaciones respecto al porcentaje de flavonoides como (quercetina), ya que tiene una importancia contra el cáncer, combinado con el resveratrol
- Evaluar los efectos terapéuticos atribuibles en la medicina tradicional de las hojas y tallos de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).
- Evaluar el efecto antibacteriano de *Hederá hélix L.* (Hiedra Común) frente a otros tipos de microorganismo.
- Evaluar el efecto toxicológico de la *Hederá hélix L.* (Hiedra Común).
- Realizar un análisis de costo efectividad con antibióticos tópicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arteche A, Vanaclocha B, Güenechea J I. 3.ª ed. Vademecum de prescripción. Plantas medicinales. Barcelona: Masson, 1998.
2. ALEMAN Zulia W. ALVAREZ M. Inalvis DIAZ R Esther, RODRIGUEZ S. María C. Recobrado de Samonella spp. Conservada por medio simple a temperatura ambiente. Instituto nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM).CUBA2003.
3. ALONSO J., Tratado de fitofármacos y Nutraceúticos tratado, Buenos Aires Argentina, Corpus 2 da Edición 2004.Pp564-567.
4. ALONSO-URMENETA B., ARAGON V., Et al. Manual Práctico de Microbiología. 2da Edición 1999.
5. BOLIVAR R., ANDUEZA F. Relación entre la presencia de células de Aeromonas sp. Y la presencia de coliformes totales y fecales en muestras de agua. Memoriasdel XII Congreso Latinoamericano de Microbiologia. Venezuela.1995.
6. Bruneton J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza: Acribia, 1997; 298-324.
7. BRUNETON; Jean. “Elementos de fotoquímica y de farmacognosia”. Editorial Acribia S.A., Zaragoza (España) 2001

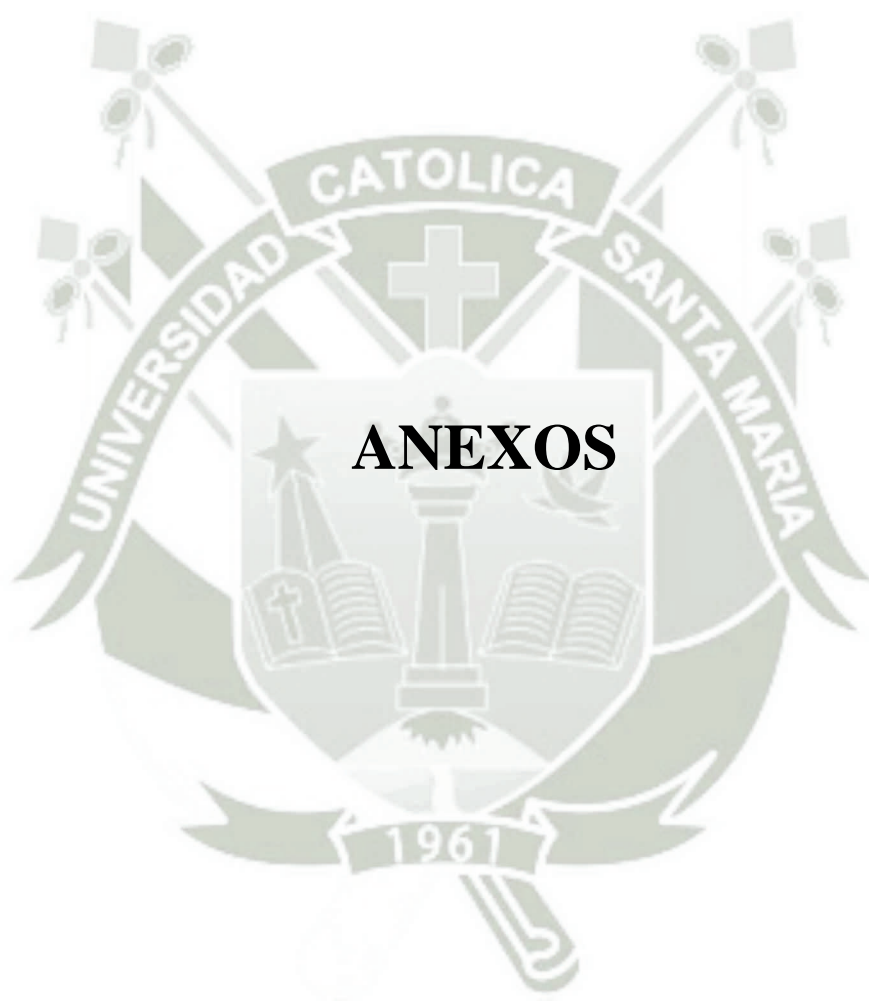
8. Catálogo de las Diaspididae (Hemiptera: Coccoidea) exóticas de la Argentina, Brasil y Chile. Claps Lucia E., Vera R.S. Wolff y Roberto H. Gonzales. Chile 2001
9. CANOSA A. Indicadores bacteriológicos de eutrofización en los embalses de Chuza, Neusa y Tomine, y en la laguna de chingaza. Centro de investigación científica, Bogotá, Colombia 2005
10. CASTILLO GARCIA B: Métodos analíticos y técnicas instrumentales empleadas en el aislamiento, identificación y cuantificación de los P.A presentes en plantas medicinales.
11. CHINEN I., TANARO JD., MILIWEBKY E., LOUND L., CHILLEMI G., LEDRI S. Isolation and characterization of Escherichia coli o157:H7 from retail meats in Argentina. Argentina. 2001
12. CHIRINOS A GUARENAS M. A., SANCHEZ D.M. Laboratorio de análisis de agua .Departamento de química, Instituto Universitario de tecnología Alonso Gamero Venezuela. 2003.
13. CONCEPCION M, GOMEZ M., GONZALES LOPEZ J., Fea coliform related bacterial and coliphage population in five lake of southerastern spain. Microbiological Research. 1998.
14. Cortes Cabrera Julia en la universidad de autónoma del estado de Hidalgo México (2005) .
15. Environment Agency, standing committe of analysts. The Microbiology of drink wáter part 1 methods, for the examintion of wáter and associated materials. Estados Unidos 2002
16. Evans WC. Farmacognosia. Madrid: Inter americana-McGraw-Hill, 1986.
17. Elvira Lucia Erazo Proaño. “Separación y Caracterización de los Metabolitos secundarios de la Hiedra (*Hedera hélix*) de Ecuador con fines de aporte a una técnica de identificación” el 2013 en Ecuador.
18. Elmer Koneman y STEPHEN Allen. Diagnostico microbiológico: texto y altas en color. Edición médica panamericana, 2008
19. Font P. Plantas medicinales. El Dioscórides Renovado. Barcelona: Labor 1992

20. FLORES, R., Atlas de Plantas Medicinales y Curativas., 2ª ed., Madrid- -  
79 - España., 1998. Pp. 90-94.
21. Für Pharmaforschung, Hildebert Wagner.Zentrum . Universität München  
FUTURO EN LA INVESTIGACION EN FITOTERAPIA:  
TENDENCIAS Y RETOS. 2006
22. GRANADOS PEREZ. R, VILLAVERDE P. Maria C. Ciencias de la  
salud. Microbiología, Madrid España, 1998.
23. HARVEY, D., Química Analítica Moderna., 1ªed. Madrid-España., 2002,  
Pp. 402-404.
24. HILA Cano, Anthony Angelio; LAZO Fuentes Fanny Karelia.  
Determinacion del efecto antibacteriano de la ambrosia peruviana L.  
“altamisa” *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*  
*epidermidis*, *Streptococcus pyogenenes* y *klebsiellap nellmoniae* .  
Arequipa 2006.
25. PROYECTO DE PLANTAS MEDICINALES CUBANAS PARA LA  
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, M.J. Martinez, J. Betancourt, N.  
Alonso- Gonzalez, A. Jaurequi 2013, CUBA.
26. PROYECCIÓN DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA  
POPULAR ARGENTINA PARA LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA, Claudia Anesini, Cristina Perez 1993.
27. PRESCOTI, LANSING M. MICROBIOLOGIA V, edición, editorial Me  
Graw Hill 2002.
28. REMINGTON, GENNARO ALFONSO., FARMACIA 20 AVA  
EDICIÓN, 2 TOMO 11 BUENOS AIRES, ARGENTIN, EDITORIAL  
MEDICA PANAMERICANA S. A;2000
29. REMIGTON FARMACIA; TOMO II 17º Edición Editorial Medica  
Panamericana S.A, Buenos Aires. Lima
30. EDWIN Alexander Rodríguez, Anderson Julián Árias, Eva Giselle  
Vásquez, JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, ELENA E. STASHENKO;  
Rendimiento y capacidad Antioxidante de extratos de *Rosmarinus*  
*Offcinals*, *salvia Offcinalis* y *psidium Guajava* obtenidos con CO2

- supercrítico. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. COLOMBIA 2012.
31. JAVE Maquez Jesus Mercedes. Guia de Practicas de Microbiologia de la Facultad de Farmacia y Bioquimica de la UCSM. Arequipa 2008.
  32. JAWETZ R Et. Microbiologia Madica, Ed El manual Moderno, 15° edición. Mexio. 1998.
  33. JOLLEY Robet. Et. Water
  34. TORRES TOVAR, Humberto, PINO FIGUEROA, Alejandro, “Guía de prácticas de Farmacognosia II”. Universidad Católica de Santa María, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Arequipa-Perú. 2003
  35. MILLOPORE. Análisis Microbiológico. Madrid España 2005.
  36. KONEMAN E. Et. Al. , Diagnostico, Ed. Medica Panamericana, 3° edición. México 1997.
  37. OLGA LOOK.1995.ANÁLISIS FITOQUÍMICO
  38. OBON DE C Jose Analisis Microbiologico del Agua Dpto Ingenieria Quimica y Ambiental. Universidad politécnica de Cartagena. 2005.
  39. OPS Condiciones de salud en Americas. Washington, D.C. 1990.
  40. LABORATORIO ROMMERS, investigación de Hederá Hélix para la presentación del producto Athos en Argentina en 1999.
  41. LOCK DE UGAZ O.: Investigación Fotoquímica. Métodos en el estudio de productos Naturales. Primera Edición. Fondo Editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú
  42. Las plantas medicinales de México como fuente de compuestos activos contra la leishmaniasis, María Adelina Jiménez-Arellanes, Lorena Alamilla-Fonseca, Gabriel Alfonso Gutiérrez-Rebolledo, Revista mexicana de ciencias farmacéuticas versión impresa ISSN 1870-0195 Rev. mex. cienc. farm vol.45 no.2 México abr./jun. 2014.
  43. Prescott I. Harley J. Microbiologia. Editorial Mc Graw-Hill. Madris , España 1996.
  44. Peris JB, Stübing G, Vanaclocha B. Fito terapia aplicada. Valencia: COF d Valencia, 1995; 61-72.

45. Actividad Biológica *in vitro* de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* Sacc. Eugenio Guerrero-Rodríguez (+), Susana Solís-Gaona, Francisco Daniel HernándezCastillo, Alberto Flores-Olivas, Víctor Sandoval-López, México 2006
46. Pulcha Amable. "efecto antibacteriano de extracto fluido de la *Krameria triandra* "ratania" *in vitro*. Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M. Arequipa 2005
47. RICHARDSON A. LIBBY S., FANG F. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. USA.2008
48. SALVADOR G., ACEVEDO C. BENNANI A. Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en el laboratorio de microbiología clínica. Servicios de Análisis clínicos Y microbiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. España Murcia. 2005.
49. VILA JATO José Luis. Tecnología farmacéutica, aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Volumen II. Editorial Sintesis. S.A.
50. VASQUEZ M.R.y R.R. Gonzales (2002). Flora virtual de amazonia Peruana: Identificación de angiospermas. website.
51. Virrueta Gonzales, Cecilia; Zegarra Manrique Yesenia. "determinación de efecto antimicótico y antibacteriano *In vitro* de *piper elongatum* (matco matco) frente a las colonias de *candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M. Arequipa 2008.
52. Vademecum Medico del Perú. Edición pablo Grimberg. 2005.
53. VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA ISSN 0121-4004 Volumen 16 número 1, año 2009. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

54. Evaluación de la actividad Antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macro algas del COMBIANO, Bibiana ECHAVARRÍA Z., Andrea FRANCO S. Alejandro MARTÍNEZ, COLOMBIA 2009.
  55. JÁTIVA C., Texto de Farmacognosia y Productos Naturales Riobamba – Ecuador. Centro de documentación de Reproducción de Documentos de ESPOCH. 200 Pp56-59-40.
  56. Koneman, Md. Diagnostico microbiológico. Editorial Medica Panamericana. Quinta edición 1999.
  57. Kuklinsi C. Farmacognosia. Barcelona: Omega, 2000; 146-153.
  58. KUKLINSKI, Claudia. Farmaconosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega S.A España 2000.
  59. H.Wagner, S. Bladt. Plant Drug Analysis, A thin Layer Chromatography Atlas 2º edición Springer.
  60. Bruna Ribeiro Magoga , Andrieli Cassel Feltrin , Vanessa Janovik , Margareth Linde Athayde, Potencian Antioxidante *In vitro* de flavonoides y terpenos 2008
- Paginas de internet
61. <http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide#mediaviewer/Archivo:Flavon>
  62. <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=42636>
  63. <http://www.rdnatural.es/blog/hiedra/>
  64. [http://es.wikipedia.org/wiki/Hedera\\_helix](http://es.wikipedia.org/wiki/Hedera_helix)
  65. <http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>



## ANEXO N° 1

### COLORACIÓN DE GRAM

#### FUNDAMENTO:

El cristal violeta (violeta de genciana) sirve como colorante primario, que se une a la pared celular bacteriana con una solución débil de yodo que sirve como mordiente para la unión del colorante. Algunas bacterias debido a la naturaleza química de sus paredes celulares, tienen la capacidad de retener el cristal violeta, incluso luego de un tratamiento con un decolorante orgánico, como una mezcla de alcohol etílico y acetona.

Las bacterias que retienen el colorante, se ven negro azuladas y se denominan gram-positivas. Algunas bacterias pierden la coloración primaria cuando son tratadas con el decolorante, debido al alto contenido de lípidos de su pared celular. Estas bacterias decoloradas toman el colorante de contraste, la safranina y se ven rojas cuando se observan al microscopio denominándose gram-negativas.

#### PREPARACIÓN:

1. Fije el frotis y déjelo secar. Vierta sobre el portaobjetos colorante cristal violeta, dejar reposar un minuto. Enjuagar con agua abundante.
2. Bañar con solución de Yodo, dejar reposar un minuto, enjuagar con agua abundante.
3. Bañar completamente con solución con Alcohol-Acetona y dejar reposar 30 segundos.
4. Enjuagar con agua abundante.
5. Bañar con solución de Safranina, dejar 45 segundos, lavar con agua abundante.
6. Dejar secar el portaobjetos en el ambiente para luego observar al microscopio con aceite de inmersión.

### INTERPRETACIÓN:

Las bacterias gram-positivas se observan de color violeta o azul y las gram-negativas de color rojo.

En las muestras se observan que son bacterias Gram –Positivas.

Como se muestra en la figura N° 3.



Figura 1: tinción Gram pasos a realizar

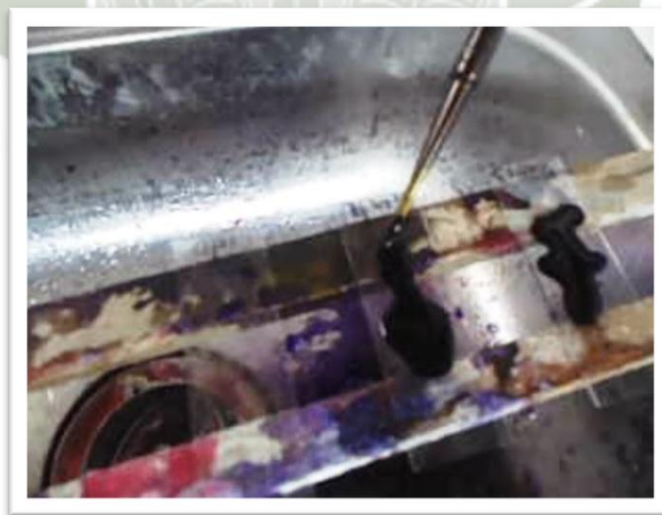
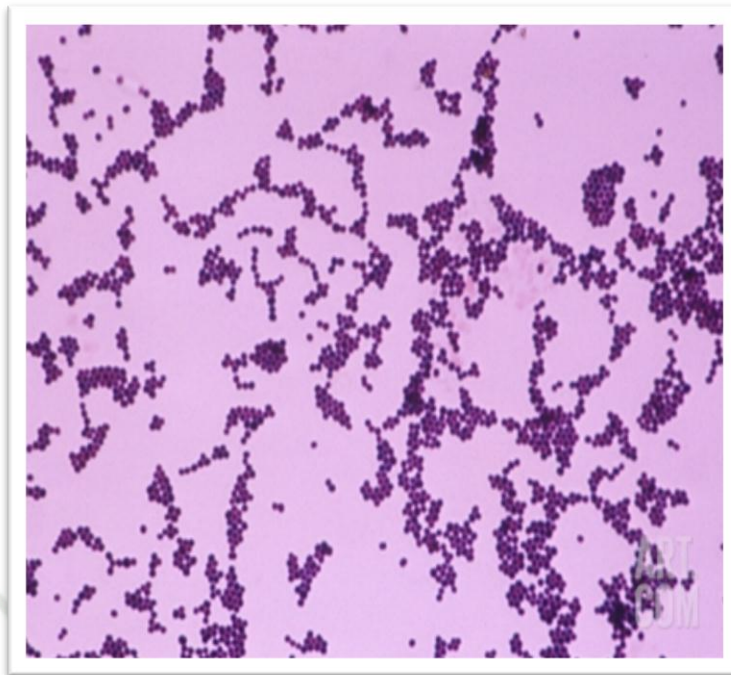
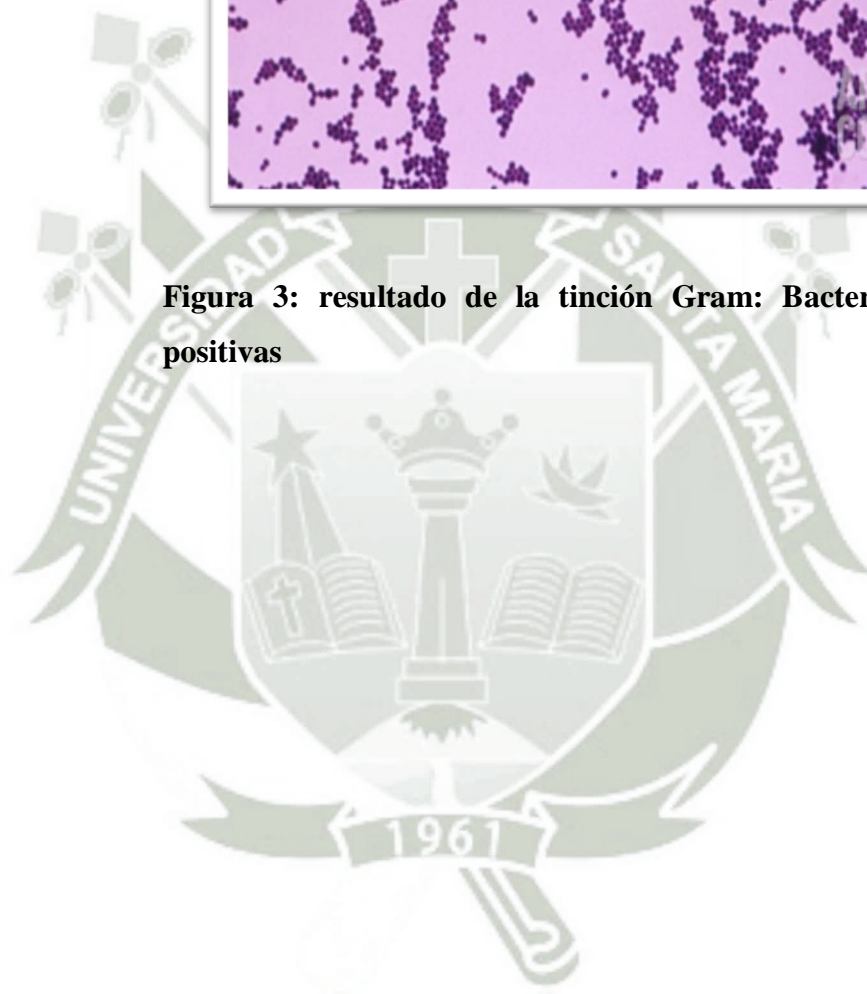


Figura 2: realizando la tinción Gram



**Figura 3: resultado de la tinción Gram: Bacterias gram-positivas**



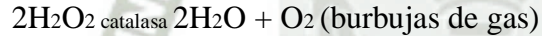
## ANEXO N° 2

### PRUEBA DE LA CATALASA

#### FUNDAMENTO:

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado ( $Fe^{3+}$ ), en lugar del estado reducido ( $Fe^{2+}$ ). Excepto los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción:

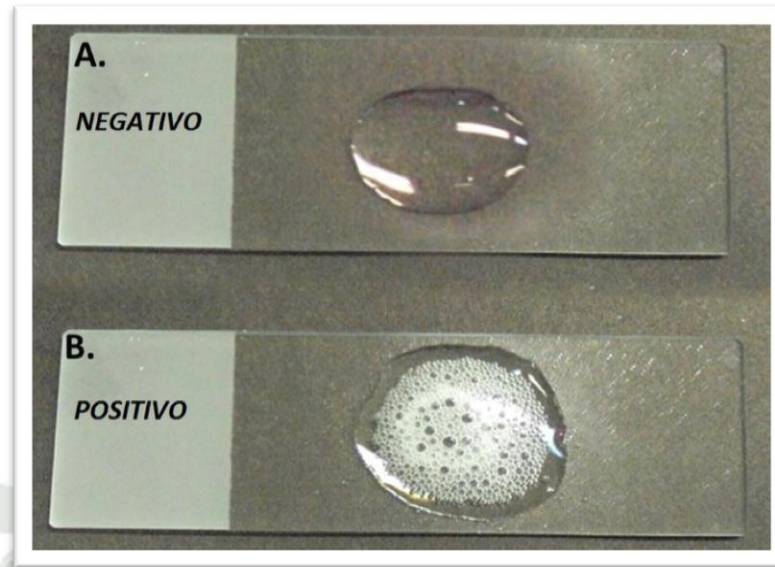


#### PREPARACIÓN:

1. Con una aguja de inoculación, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos.
2. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.

#### INTERPRETACIÓN:

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva.



**Figura 4: interpretación de resultado**



**Figura 5: resultado de las pruebas realizadas fue positiva para catalasa.**

### ANEXO N° 3

## PRUEBA DE LA COAGULASA

#### FUNDAMENTO:

La coagulasa es una proteína de composición desconocida, que tiene actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, que da como resultado la formación de un coágulo visible en los sistemas apropiados. La coagulasa se presenta en dos formas, libre y unida; y cada una posee diferentes propiedades que requieren el uso de otras especies de estafilococos.

**Coagulasa unida (prueba en portaobjetos):** Factor de agrupación, se encuentra unida a la pared celular bacteriana y no se encuentra en los filtrados de cultivos. Entre las células bacterianas se forma bandas de fibrina cuando se suspenden en plasma (fibrinógeno), las que hacen que se agrumen en grumos visibles.

**Coagulasa libre (prueba en tubo):** La coagulasa libre es una sustancia similar a la trombina presente en filtrados de cultivos. Cuando en un tubo de ensayo se prepara una suspensión en plasma de microorganismos productores de coagulasa, se forma un coágulo visible como resultado de la reacción de la coagulasa con una sustancia del suero (factor de reacción con la coagulasa), para formar un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina.

#### PREPARACIÓN:

1. Prueba en portaobjetos (coagulasa unida): colocar dos gotas de agua o solución fisiológica estéril en un portaobjetos de vidrio. Emulsificar material de colonias del microorganismo a identificar. Colocar una gota de plasma, mezclar,

colocar otra gota adelante y atrás, buscando aglutinación en la suspensión de prueba.

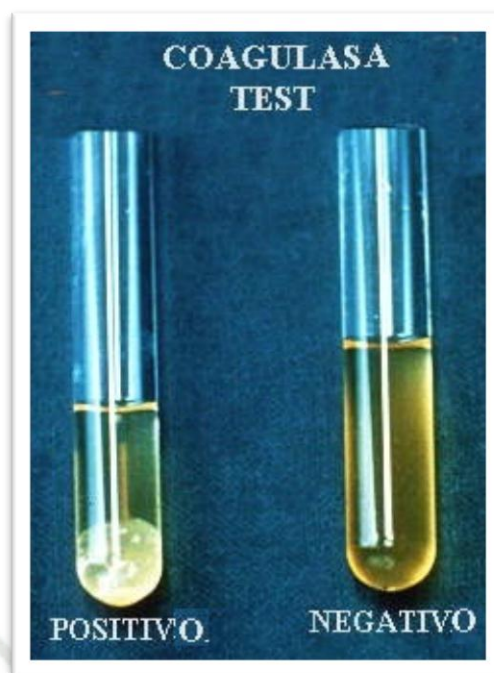
2. Prueba en tubo (coagulasa libre): emulsificar una pequeña cantidad de la colonia el microorganismo en un tubo que contenga 0.5ml de plasma para prueba de coagulasa.

Incubar el tubo a 35°C durante 4 horas y observar si se forma un coágulo inclinando ligeramente el tubo.

#### **INTERPRETACIÓN:**

1. Prueba en portaobjetos: una reacción positiva debe detectarse dentro de los 10 a 15 segundos de mezclar el plasma con la suspensión por la visualización de un precipitado blanco y la aglutinación de los microorganismos de la suspensión. La prueba se considera negativa si no se observa aglutinación en el término de 2 minutos.

2. Prueba en tubo: la prueba de coagulasa en tubo se considera positiva si se detecta cualquier grado de formación de coágulos. El tubo se inclina con suavidad y no se agita, debido a que puede deshacer los coágulos parcialmente formados. La fibrinólisis producida por los microorganismos puede disolver los coágulos poco después de su formación. Los tubos que son negativos después de 4 horas se incuban a temperatura ambiente durante la noche y se leen después de horas.



**A. Coagulasa positiva    B. Coagulasa negativa**

**Figura 6: figuras con posibles resultados**

El resultado obtenido en las pruebas de coagulasa, son positivas como se observa en la Figura N°7



**Figura 7: Prueba de coagulasa en porta objetos**

## ANEXO N° 4

### PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AGAR MÜELLER HINTON

#### FUNDAMENTO:

Es un medio recomendado para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismo exigentes.

#### COMPOSICIÓN (g/L):

- Infusión de Carne 2.0g.
- Hidrolizado de Caseína 17.5g.
- Almidón 1.5g.
- Agar-agar 13.0g.

Ph:  $7.4 \pm 0.2$  a  $25^{\circ} \text{C}$ .

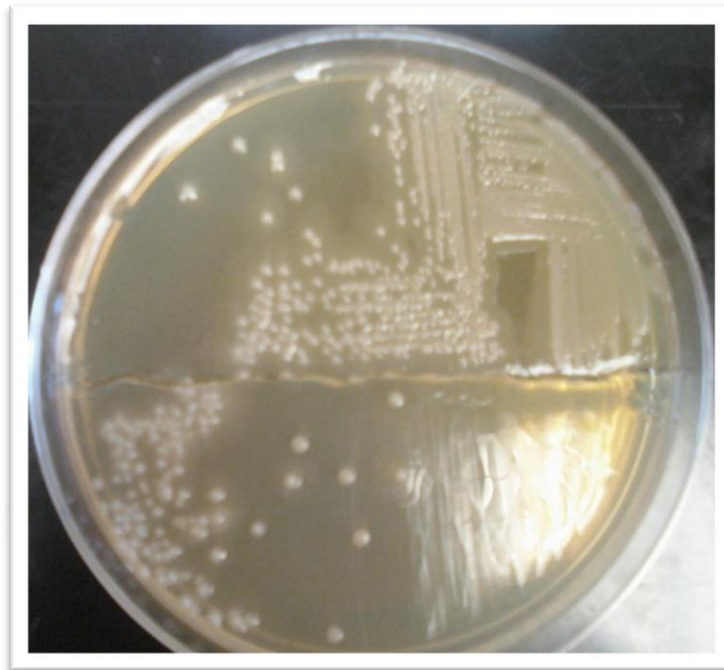
#### PREPARACIÓN:

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre  $+15$  y  $+25^{\circ} \text{C}$ . Disolver 34 g/L, auto clavar (15 minutos por  $121^{\circ} \text{C}$ ). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. 16-20ml.

Sembrar el microorganismo en estudio e incubar a  $37^{\circ} \text{C}$  por 24 horas.

#### INTERPRETACIÓN:

Se emplea este medio sólido para el crecimiento de muchos microorganismos.



**Figura 8: crecimiento en el medio**



**ANEXO N° 5****CALDO BHI (Infusión Cerebro Corazón)****FUNDAMENTO:**

Es un medio rico en nutrientes que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona son la fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas.

La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer.

Los nutrientes de este caldo son apropiados para los hemocultivos, ya que en esta infusión desarrollan especies de estreptococos, los estafilococos que crecen suelen dar mejores reacciones en prueba de coagulasa.

**COMPOSICIÓN (g/L):**

- Infusión de Cerebro de Ternera 10g.
- Infusión de Corazón de res 12g.
- Peptona 5g.
- Cloruro de Sodio 5g.
- Fosfato Disódico 2.5g.
- Glucosa 2.0g.

pH:  $7.4 \pm 0.2$  a  $25^\circ \text{C}$ .

**PREPARACIÓN:**

Utilizable hasta fecha de caducidad y se almacena en lugar seco, protegido de la luz; disolver 37g/L de agua destilada, calentar a ebullición hasta disolver completamente.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Inocular el microorganismo en estudio e incubar a 37°C por 24 horas.

**INTERPRETACIÓN:**

El caldo BHI (Infusión cerebro corazón) es un medio líquido que sirve para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima al apreciar la turbidez de los tubos de ensayo incubados 24 horas a 37° C. Los Tubos con turbidez muestran la proliferación del microorganismo en estudio mientras que los tubos que no presentan turbidez, no hay crecimiento de bacterias.

**Crecimiento negativa****Crecimiento positiva**

## ANEXO N° 6

### AGAR MANITOL SALADO

#### FUNDAMENTO:

Este medio contiene manitol 1%, ClNa al 7.5%, rojo de fenol y peptonas. La alta concentración de sales inhibe el desarrollo de otros microorganismos y recupera selectivamente estafilococos. La degradación de manitol hasta ácido hace virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo, siendo sinónimo de patogenicidad. El *Staphylococcus aureus* en contraste con el *Staphylococcus albus* tiene la capacidad de fermentar el manitol con producción de ácido.

#### COMPOSICIÓN:

- Extracto de Carne 1g.
- Peptona 10g.
- D-Manitol 10g.
- Rojo de Fenol 0.025g.
- Cloruro de sodio 75g.
- Agar-agar 12.5g.
- Agua destilada 1 L.

pH  $7.4 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$

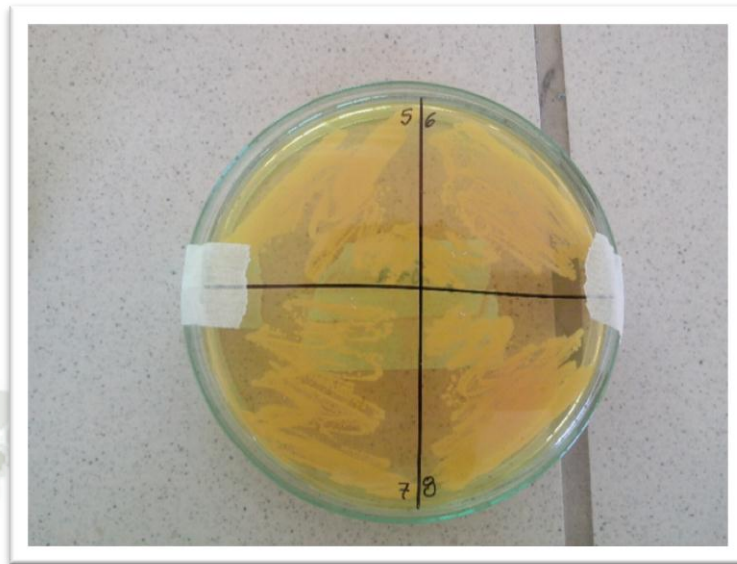
#### PREPARACIÓN:

Disolver 108g/L, autoclavar (15 minutos por  $121^{\circ}\text{C}$ ). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aproximadamente 16-20ml, sembrar la colonia con un asa de Kolle e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

#### INTERPRETACIÓN:

Los microorganismos que degran el manitol salado hacen virar el indicador rojo fenol a amarillo.

- **Color amarillo:** *Staphylococcus aureus*.
- **Color rojo:** *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus saprophyticus*.



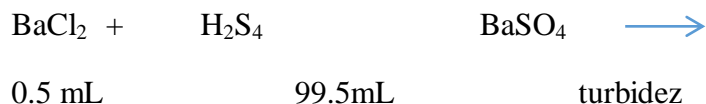
**Figura 10: Reacción Positiva (amarillo)**



**Figura 11: Reacción Negativa (rojo)**

**ANEXO N° 7**  
**ESCALA DE Mac FARLAND**

**COMPOSICION**



**CALCULOS**

Preparar 100 mL de cloruro de bario 0.048M a 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36N.

$$\frac{0.048\text{mol}}{1000\text{ml}} \times \frac{(100\text{ml}) 208.3\text{g BaCl}_2}{1 \text{ mol}} = 0.99984\text{g Cl}_2\text{Ba en } 100\text{ml}$$

Para preparar 100ml de cloruro de bario

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

Para preparar 1000ml de ácido sulfúrico 0.36N.

$$\frac{0.36\text{Equ}}{1000\text{ml}} \times \frac{(1000\text{ml}) 98.08\text{g}/2}{1\text{Equ}} \times \frac{1\text{ml}}{1.84\text{g}} = 9.59478 \text{ ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ al } 96\%$$

Para llevarlo al 100%

$$9.59478 \text{ ----- } 96\%$$

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

$$X = 9,99 \text{ ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ en } 10000\text{ml.}$$

### PREPARACIÓN:

Seguir los siguientes pasos:

Necesito 0.9ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>cc. Para preparar 100ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N. (en fiola).

*Necesito 0.0099 g de BaCl<sub>2</sub> para preparar 1ml de BaCl<sub>2</sub> 0.048M. En un tubo de ensayo colocar 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36N y retirar 0.05ml. (Desechar).*

Completar 0.05ml con BaCl<sub>2</sub> 0.048M.

Agitar.

La turbidez de este tubo de ensayo es similar al tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland, la que es equivalente a la concentración de 10<sup>8</sup> UFC/ml del inóculo.

Necesito 0.0099 g de BaCl<sub>2</sub> para preparar 1ml de BaCl<sub>2</sub> 0.048M.

En un tubo de ensayo colocar 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36N y retirar 0.05ml. (Desechar).

Completar 0.05ml con BaCl<sub>2</sub> 0.048M.

- Agitar.

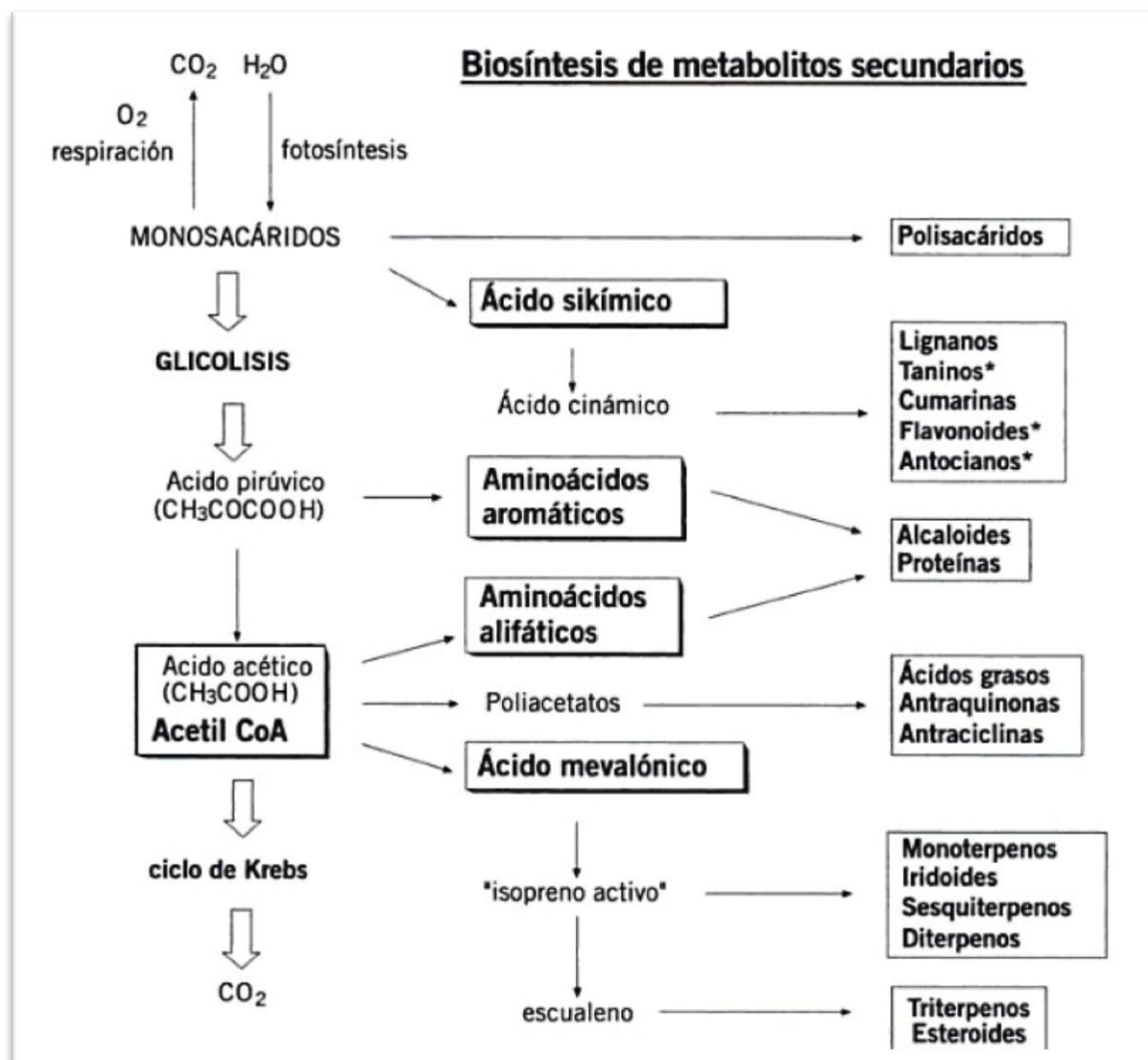
La turbidez de este tubo de ensayo es similar al tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland, la que es equivalente a la concentración de 10<sup>8</sup> UFC/ml del inóculo.

**ANEXO N° 8**  
**CONSTANTE DI ELÉCTRICA PARA LOS SOLVENTES.**

Disolvente	Fórmula química	Punto de ebullición	Constante dieléctrica	Densidad
<b>Disolventes no polares</b>				
Hexano	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69 °C	2,0	0,655 g/ml
Benceno	$\text{C}_6\text{H}_6$	80 °C	2,3	0,879 g/ml
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111 °C	2,4	0,867 g/ml
Éter dietílico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35 °C	4,3	0,713 g/ml
Cloroformo	$\text{CHCl}_3$	61 °C	4,8	1,498 g/ml
<b>Disolventes polares apróticos</b>				
1,4-Dioxano	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$	101 °C	2,3	1,033 g/ml
Acetato de etilo	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77 °C	6,0	0,894 g/ml
Tetrahidrofurano (THF)	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$	66 °C	7,5	0,886 g/ml
Diclorometano (DCM)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	40 °C	9,1	1,326 g/ml
Acetona	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56 °C	21	0,786 g/ml
Acetonitrilo (MeCN)	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	82 °C	37	0,786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	$\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$	153 °C	38	0,944 g/ml
Dimetil sulfóxido (DMSO)	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$	189 °C	47	1,092 g/ml
<b>Disolventes polares próticos</b>				
Ácido acético	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6,2	1,049 g/ml
<i>n</i> -Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0,810 g/ml
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$	82 °C	18	0,785 g/ml
<i>n</i> -Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97 °C	20	0,803 g/ml
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79 °C	24	0,789 g/ml
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65 °C	33	0,791 g/ml
Ácido fórmico	$\text{H-C(=O)OH}$	100 °C	58	1,21 g/ml
Aqua	$\text{H-O-H}$	100 °C	82	1,000 g/ml

ANEXO N° 9

TABLA DE METABOLITOS SECUNDARIOS



## ANEXO N° 10 EQUIPOS UTILIZADOS



- Autoclave (Sturdy SA- 260 MA)



- Balanza analítica (modelo A-160)



- Baño María (Mettmert modelo WB14)



- Equipo de extracción Soxhlet



- Estufa incubadora (Isoterm)



- Microscopio binocular con objetivo de inmersión (Belteccientific)



• Refrigeradora (Bosh)



• Micropipetas