



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL  
EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii*)”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

**PRESENTADO POR**

**GABRIEL ELÍAS CASTRO ALCOCER**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2012**

## **DEDICATORIA**

*Con el inmenso amor de mi corazón dedico este trabajo de investigación a mi mami Lida Alcocer y papi Luis Castro por todo el apoyo y la compañía brindada a largo de toda mi vida.*

*A mi primo Byron Alcocer y Jorge Choca por siempre cuidar de mí en todo este tiempo que hemos compartido juntos.*

*A ti foquita por nunca haber permitido que decaiga y siempre alentarme a seguir adelante, todos los logros que alcance serán dedicados a ti.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por darme la única herramienta que necesito para alcanzar mis anhelos... La vida; te agradezco por estar conmigo y escucharme en los momentos más difíciles de mi vida y nunca abandonarme.*

*A la Dra. Susana Abdo, directora de tesis, sin su ayuda la culminación de este trabajo no hubiera sido posible.*

*Al Dr. Francisco Portero, colaborador de Tesis, por su alto empeño, Doctor gracias por su ardua dedicación y esmero, lo cual permitió llevar a cabo con éxito el presente trabajo investigativo.*

*A mis papis por siempre estar junto a mí en todo momento; no me alcanzaría una vida para agradecerles.*

*A ti foquis por ser mi mayor inspiración, hacerme entender que nada es inalcanzable y creer siempre en mí.*

*A mis amigos por todos los grandes momentos brindados a lo largo de mi carrera, por los momentos tristes en los cuales me acompañaron y siempre me alentaron que siga de pie: Erik, Aaron, Danny, Ángel, Byron, Juanpi, Catty, Lili, Meche, MaJitos. A mis amigas y compañeras, a pesar del corto tiempo, la calidad del mismo ha sido maravillosa: Rosita, Jessy, Verito, Fá, Criss, Karito; gracias por todas las locuras y el trabajo realizado juntos. Al trípode, nunca los olvidaré; gracias por existir: German Toapanta y Edwin Cedeño.*

*A mi familia por siempre estar pendiente y creer en mí. A mis primos Jorge, Diego, Karo, Mayra, Irvin, Dianita por todo el tiempo maravilloso que vivimos juntos.*

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

## FACULTAD DE CIENCIAS

### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: "**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii*)**" de responsabilidad del señor egresado Gabriel Elías Castro Alcocer, ha sido prolijamente revisado por los miembros del tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. Silvio Alvares L. -----  
DECANO FAC. CIENCIAS

Dr. Iván Ramos -----  
DIRECTOR ESCUELA  
BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Dra. Susana Abdo.-----  
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Portero.-----  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Tc. Carlos Rodríguez -----  
DIRECTOR CENTRO  
DE DOCUMENTACIÓN

NOTA TESIS-----

Yo, Gabriel Elías Castro Alcocer, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÈCNICA DE CHIMBORAZO

---

**GABRIEL ELÍAS CASTRO ALCOCER**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AB	Anfotericina B
AND	Ácido desoxirribonucleico
ARC	Agencia de residuos de Cataluña
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
C3	Carbono 3
C6	Carbono 6
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAM	Eosina azul de metileno
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FLU	Fluconazol
GC	Guanina-Citosina
HCl	Ácido Clorhídrico
ITR	Itraconazol
Ket	Ketoconazol
LPS	Lipopolisacárido
MCZ	Miconazol
mg	Miligramo
MH	Mueller Hinton

min.	Minutos
mL	Mililitro
NDM	Delhi metalobetalactamasa
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBPs	Proteínas de unión a penicilina
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PSI	Libras por pulgada cuadrada
SAP	Proteinasa aspártica
SDD	Sensibilidad dosis dependiente
SE	Enterotoxina estafilocócicas
SIM	Sulfuro-Indol-Motilidad
sp.	Especie sin determinar
TLC	Cromatografía en capa fina
TSA	Agar soya tripticasa
TSB	Caldo soya tripticasa
UCI	Unidad de cuidados intensivos
µm	Micra
5FC	5 Fluorocitosina

## ÍNDICE GENERAL

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### ÍNDICE DE CUADROS

### ÍNDICE DE TABLAS

### ÍNDICE DE GRÁFICOS

### ÍNDICE DE FIGURAS

### ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

### ÍNDICE DE ANEXOS

### INTRODUCCIÓN

<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Plantas medicinales .....	1
1.1.1	Historia .....	1
1.1.2	Definición.....	2
1.1.3	Fitoterapia.....	2
1.2	Fitomedicina.....	2
1.2.1	Definición.....	2
1.2.2	Fitomedicamento .....	3
1.2.3	La cromoterapia.....	3
1.3	Fitofarmacología .....	5
1.3.1	Definición.....	5
1.3.2	Fitofármacos.....	5
1.4	Principio activo natural .....	5
1.4.1	Definición.....	5
1.5	Antibióticos naturales.....	6
1.6	Plantas antimicrobianas .....	7
1.6.1	Grupos principales de componentes antimicrobianos de las plantas .....	8
1.7	Mecanismo de acción de antibióticos sintéticos.....	12
1.7.1	Pared celular.....	12
1.7.2	Membrana celular.....	13
1.7.3	Acción sobre ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas .....	13

1.7.4	Acción sobre los ribosomas.....	14
1.8	Iso ( <i>Dalea mutisii</i> kunth).....	14
1.8.1	Descripción.....	14
1.8.2	Taxonomía.....	15
1.8.3	Distribución .....	15
1.8.4	Usos .....	15
1.8.5	Composición química.....	16
1.9	Bacterias .....	16
1.9.1	Morfología y estructura bacteriana.....	16
1.9.2	Tamaño.....	18
1.10	Clasificación de bacterias .....	19
1.11	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.11.1	Morfología.....	21
1.11.2	Taxonomía.....	21
1.11.3	Propiedades bioquímicas .....	21
1.11.4	Patogenicidad .....	22
1.11.5	Perfil antibiótico .....	23
1.12	<i>Escherichia coli</i> .....	23
1.12.1	Morfología.....	23
1.12.2	Taxonomía.....	24
1.12.3	Propiedades bioquímicas .....	25
1.12.4	Patogenicidad .....	25
1.12.5	Perfil antibiótico .....	26
1.13	<i>Salmonella gallinarum</i> .....	27
1.13.1	Morfología.....	27
1.13.2	Taxonomía.....	27
1.13.3	Pruebas bioquímicas.....	27
1.13.4	Patogenicidad .....	28
1.13.5	Perfil antibiótico .....	29
1.14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
1.14.1	Morfología.....	29
1.14.2	Taxonomía.....	30
1.14.3	Pruebas bioquímicas.....	30
1.14.4	Patogenicidad .....	31
1.14.5	Perfil antibiótico .....	32

1.15	<i>Candida albicans</i> .....	32
1.15.1	Morfología.....	32
1.15.2	Taxonomía.....	34
1.15.3	Pruebas de identificación.....	34
1.15.4	Patologías conocidas .....	35
1.15.5	Perfil antifúngico .....	36
1.16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	36
1.16.1	Morfología.....	36
1.16.2	Taxonomía.....	36
1.16.3	Identificación bioquímica.....	37
1.16.4	Patogenicidad .....	37
1.16.4.1	Factores de patogenicidad .....	38
1.16.5	Perfil antibiótico .....	39
1.17	Metodos de determinacion antimicrobiana .....	40
1.17.1	Método de difusión en disco .....	40
1.17.2	Método de gradiente antibiótico (E-test).....	41
1.17.3	Métodos de dilución en un medio líquido y en un medio sólido .....	42
1.17.3.1	Dilución en caldos de cultivo .....	43
1.17.3.2	Dilución en medio sólido .....	44
1.18	Ensayo de actividad antimicrobiana.....	45
1.18.1	Método de mitscher .....	45
1.19	<i>Artemia salina</i> .....	45
1.19.1	Definición.....	45
1.19.2	Taxonomía.....	46
1.19.3	Morfología y ciclo vital.....	47
1.19.4	Importancia de la <i>Artemia salina</i> en investigaciones.....	47
<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>66</b>
2.1	Lugar y pruebas de ensayo .....	66
2.2	Materiales, equipos y reactivos .....	66
2.2.1	Materiales .....	66
2.2.1.1	Material vegetal.....	66
2.2.1.2	Material biológico .....	66
2.2.1.3	Materiales de laboratorio.....	67
2.2.2	Equipos.....	68
2.2.3	Reactivos .....	68

2.3	Técnicas y métodos .....	69
2.3.1	Recolección .....	69
2.3.2	Comprobación taxonómica e identificación botánica .....	69
2.3.3	Procesamiento de materia prima: limpieza y desinfección del material vegetal	69
2.3.4	Análisis físico – químico .....	70
2.3.4.1	Determinación del contenido de humedad .....	70
2.3.4.2	Determinación de cenizas totales. ....	71
2.3.4.3	Determinación de cenizas solubles en agua .....	72
2.3.4.4	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico. ....	73
2.3.5	Tamizaje fitoquímico .....	73
2.3.5.1	Ensayo de Dragendorff.....	74
2.3.5.2	Ensayo de Mayer .....	74
2.3.5.3	Ensayo de Wagner .....	74
2.3.5.4	Ensayo de Liebermann-Burchard .....	75
2.3.5.5	Ensayo de Borntrager .....	75
2.3.5.6	Ensayo de Baljet.....	76
2.3.5.7	Ensayo de Sudán .....	76
2.3.5.8	Ensayo de Catequinas.....	76
2.3.5.9	Ensayo de Resinas .....	76
2.3.5.10	Ensayo de la Espuma.....	77
2.3.5.11	Ensayo del Cloruro férrico .....	77
2.3.5.12	Ensayo de Shinoda .....	77
2.3.5.13	Ensayo de Antocianidinas .....	78
2.3.5.14	Ensayo de Fehling .....	78
2.3.5.15	Ensayos de principios amargos y astringentes .....	79
2.3.6	Obtención de los extractos .....	79
2.3.7	Control de calidad de los extractos.....	80
2.3.7.1	Determinación del pH. ....	80
2.3.7.2	Determinación de la densidad relativa. ....	81
2.3.7.3	Determinación del índice de refracción.....	82
2.3.7.4	Determinación de sólidos totales.....	83
2.3.7.5	Determinación de los requisitos organolépticos.....	84
2.3.7.5.1	Determinación del olor .....	84
2.3.7.5.2	Determinación del color .....	84
2.3.6	Tratamiento de la muestra identificación de flavonoides mediante TLC .....	84

2.3.7	Cromatografía en capa fina .....	84
2.3.8	Capacidad antioxidante .....	86
2.3.8.1	Ensayo de capacidad antioxidante según el método enzimático de inhibición de la polifenoloxidasas .....	86
2.3.8.2	Buffer.....	86
2.3.8.3	Sustrato.....	87
2.3.8.4	Muestra a ensayo .....	87
2.3.8.5	Antioxidante .....	87
2.3.9	Determinación de microorganismos contaminantes.....	89
2.3.9.1	Método de conteo de aerobios mesófilos totales en.....	89
2.3.9.2	Determinación de coliformes totales.....	89
2.3.9.3	Determinación de coliformes fecales. ....	91
2.3.9.4	Método de conteo de mohos en placa .....	91
2.3.10	Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> .....	92
2.3.10.1	Introducción.....	92
2.3.11	Reactivación de cepas microbiológicas ATCC .....	93
2.3.11.1	Preparación de medios.....	93
2.3.11.2	Suspensión de microorganismos atcc.....	95
2.3.11.3	Siembra de microorganismos atcc.....	95
2.3.11.4	Lectura de cajas incubadas .....	96
2.3.11.5	Almacenamiento de microorganismos ATCC reactivados .....	96
2.3.12	Ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de mitscher en el extracto etanólico de hojas y flores de iso ( <i>Dalea mutisiikunth</i> ).....	97
2.3.12.1	Preparación de medios. (Día 1) .....	97
2.3.12.2	Preparación de muestras para el ensayo (Día 2).....	97
2.3.12.3	Preparación de la siembra (Día 3) .....	100
2.3.12.4	Lectura de resultados (Días 4 y 5).....	102
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
3.1	Control de calidad de la droga cruda de iso ( <i>Dalea mutisiikunth</i> ).....	103
3.2	Control de calidad del extracto alcohólico iso ( <i>Dalea mutisiikunth</i> ).....	104
3.3	Determinación de las propiedades organolépticas del extracto alcohólico de iso ( <i>Dalea mutisiikunth</i> ).....	105
3.4	Tamizaje fitoquímico .....	105
3.5	Cromatografía en capa fina .....	107
3.6	Determinación de microorganismos contaminantes.....	111
3.7	Bioensayo de toxicidad .....	111

3.8	Capacidad antioxidante .....	112
3.9	Resultados del test de Mitscher .....	115
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b> .....	<b>118</b>
<b>5.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>133</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Resultados del control de calidad de las drogas secas y pulverizadas de Iso( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	103
CUADRO No. 2	Determinación de los parámetros físicos-químicos del extracto alcohólico de hojas y flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	104
CUADRO No. 3	Determinación organoléptica del extracto de hojas y flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	105
CUADRO No. 4	Tamizaje fitoquímico del extracto de hojas y flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	105
CUADRO No. 5	Resultados de tlc para aceite esencial del extracto alcohólico de flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	107
CUADRO No. 6	Resultados de TLC para triterpenos del extracto alcohólico de hojas de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	108
CUADRO No. 7	Resultados de TLC para flavonoides del extracto alcohólico de hojas de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	109
CUADRO No. 8	Resultados de TLC para flavonoides del extracto alcohólico de flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	110
CUADRO No. 9	Análisis microbiológico de los extractos de hojas y flores de Iso ( <i>Dalea Mutisii</i> Kunth).....	111
CUADRO No. 10	Resultados de número de nauplios vivos en ensayo de biotoxicidad de extracto de hojas y flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth) en <i>Artemia salina</i> .....	111
CUADRO No. 11	Resultados de las mediciones de absorbancia con la utilización del extracto de flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> kunth) a 10, 100, 100 µg/mL, a diversos intervalos de tiempo durante el proceso de oxidación de la pulpa de manzana. Laboratorio de fitoquímica. Facultad de ciencias. Espoch. Riobamba. Septiembre 2012.....	112
CUADRO No. 12	Resultados de las mediciones de absorbancia con la utilización del extracto de hojas de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> kunth) a 10, 100, 100	

	µg/mL, a diversos intervalos de tiempo durante el proceso de oxidación de la pulpa de manzana. Laboratorio de fitoquímica. Facultad de ciencias. Espoch. Riobamba. Septiembre 2012.....	114
CUADRO No. 13	Resultados del test de Mistcher del extracto de hojas de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth) a concentraciones de 10000, 1000 Y 100 ug/mL a 24 y 48 horas.....	115
CUADRO No. 14	Resultados del test de Mistcher del extracto de flores de Iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth) a concentraciones de 10000, 1000 Y 100 ug/mL a 24 y 48 horas.....	116
CUADRO No. 15	Resultados del test de Mistcher del extracto de hojas y flores de Iso en proporción 50:50 a concentraciones de 10000, 1000 Y 100 ug/mL a 24 y 48 horas.....	117

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> .....	26
TABLA No. 2	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Salmonella gallinarum</i> .....	29
TABLA No. 3	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	32
TABLA No. 4	Susceptibilidad antimicótica de <i>Candida albicans</i> .....	36
TABLA No. 5	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
TABLA No. 6	Métodos de determinación antimicrobiana.....	40
TABLA No.7	Interpretación de NMP para la determinación de coliformes totales.....	90

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Absorbancia vs intervalos de 15 segundos para la cuantificación de la actividad antioxidante del extracto de flores a concentraciones de 10, 100 Y 1000ppm.....	113
GRÁFICO No. 2	Absorbancia vs intervalos de 15 segundos para la cuantificación de la actividad antioxidante del extracto de hojas a concentraciones de 10, 100 Y 1000 ppm.....	114

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	<i>Dalea mutisii</i> Kunth.....	14
FOTOGRAFÍA No. 2	Plantilla para estriado de microorganismos.....	102
FOTOGRAFÍA No. 3	TLC de aceite esencial de flores de iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	107
FOTOGRAFÍA No. 4	TLC de triterpenos de hojas de iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	108
FOTOGRAFÍA No. 5	TLC de flavonoides de hojas de iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	109
FOTOGRAFÍA No. 6	TLC de flavonoides de flores de iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth)....	110
FOTOGRAFÍA No. 7	Pruebas de los ensayos del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de hojas y flores de iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth)...	133
FOTOGRAFÍA No. 8	Blanco de agar y DMSO de crecimiento microbiano.....	133
FOTOGRAFÍA No. 9	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 24 horas de incubación del extracto de hojas a concentración de 1000 ug/mL.....	134
FOTOGRAFÍA No. 10	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 24 horas de incubación del extracto de hojas a concentración de 10000 ug/mL.....	134
FOTOGRAFÍA No. 11	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 24 horas de incubación del extracto de flores a concentración de 10000 ug/mL.....	135
FOTOGRAFÍA No. 12	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 24 horas de incubación de la combinación de los extractos de hojas y flores (proporción 50:50) a concentración de 10000 ug/mL.....	135
FOTOGRAFÍA No. 13	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 48 horas de incubación del extracto de hojas a concentración de 10000 ug/mL.....	135
FOTOGRAFÍA No. 14	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 48 horas de incubación del extracto de flores a concentración de 10000 ug/mL.....	136

FOTOGRAFÍA No. 15	Resultados de crecimiento microbiano del test de Mistcher a las 48 horas de incubación de la combinación de los extractos de hojas y flores (proporción 50:50) a concentración de 10000 ug/mL.....	136
-------------------	--	-----

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas y flores de iso ( <i>Dalea mutisii</i> Kunth).....	133
ANEXO No. 2	Blanco de agar y DMSO de crecimiento microbiano.....	133
ANEXO No. 3	Resultados de crecimiento microbiano a las 24 horas de incubación.....	134
ANEXO No. 4	Resultados de crecimiento microbiano a las 48 horas de incubación.....	135

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos están muy vinculados a los factores desencadenantes de las enfermedades que representan un alto índice de mortalidad. Según la OMS, las infecciones respiratorias ocupan el tercer lugar de causa de mortalidad a nivel mundial y el primer lugar en los países de bajos recursos económicos; de igual manera según dicha Organización representa la principal causa de muerte en neonatos. (68)

Desde el descubrimiento del primer antibiótico en 1875 por John Tyndall, se ha dado gran relevancia a la investigación de especies vegetales con el afán de descubrir nuevas propiedades antimicrobianas. La OMS afirmó que la resistencia a los antimicrobianos constituye en la actualidad un problema de carácter mundial; debido a que las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento ordinario, lo que trae como consecuencia una enfermedad prolongada y el riesgo de morir. De acuerdo a esta organización cada año se producen unos 440.000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente que causan al menos 150.000 muertes; de igual manera la resistencia a los antipalúdicos de la generación anterior, como la cloroquina o la sulfadoxina-pirimetamina, es generalizada en la mayoría de los países donde el paludismo es endémico. Este rápido aumento de la prevalencia de la resistencia a antimicrobianos de usos masivo está reduciendo las opciones terapéuticas eficaces y seguras, sobre todo en los niños. Por tal motivo se necesitan con urgencia nuevos antibióticos.(68)

Las infecciones microbianas han marcado importantes períodos de la historia humana, por su alta mortalidad; desde el punto de vista biológico los microbios y el ser humano son dos especies totalmente diferentes y por ende siempre existirán interacciones no deseables entre los mismos; resulta por tal motivo de gran importancia la investigación de nuevos fitofármacos con características citostáticas o citotóxica que contribuyan a combatir a determinados patógenos.

La medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades en las personas. Su uso no sólo está extendido entre los curanderos e indígenas, sino también entre los habitantes de las grandes ciudades modernas del país que aprecian sus propiedades curativas. En la actualidad muchos de esos conocimientos se están perdiendo por la implementación de nuevas tecnologías que facilitan la síntesis química de nuevos fármacos. (63)

El conocimiento ancestral de las propiedades curativas de las plantas ha desarrollado una verdadera farmacopea entre la antropología actual, como parte de una integración religiosa del hombre con la naturaleza. Se recalca que el 80% de la población mundial depende para su seguridad en salud de medicinas basadas en plantas y animales. Más de dos terceras partes de las especies de plantas del mundo, de las cuales al menos 35.000 tienen valor medicinal, se originan en los países en vías de desarrollo. Al menos 7.000 compuestos de la farmacopea occidental se derivan de plantas. A mediados de los años 90, 32.000 millones de dólares corresponden al abanico de productos farmacéuticos basados en medicamentos tradicionales, de los cuales sólo 551 millones de dólares fueron recibidos como beneficios en los países en desarrollo. (10) (58)

En Ecuador existen aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas. El 80% de la población ecuatoriana depende del consumo de plantas medicinales y de sus productos, para su salud y bienestar. De todas las regiones del Ecuador, los Andes constituyen la mayor mina de vegetación silvestre aún no explotada con promisorias expectativas de propiedades medicinales, es así que se registra en la región Andina 255 especies utilizadas, de las cuales 199 (78%) son nativas, 43 (16.7%) introducidas y 13 (5.1%) endémicas. Las 255 especies curan 74 dolencias, según el mayor número de especies que incluye nueve dolencias tratadas el orden de importancia es el siguiente: 80 para la inflamación, 32 circulación, 29 estomacal, 28 limpiados, 16 resfrío, 14 cicatrizante, 13 aromática, 12 cefalea, baño posparto y 11 fortificante, tos. (3) (10)

Esta investigación buscó verificar e identificar los componentes químicos de las hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) por separado para evaluar su propiedad como antimicrobiano, basados en la elevada citotoxicidad que evidencia el aceite esencial de las flores frente al micro crustáceo *Artemia salina*; contribuyendo de tal manera con una nueva herramienta contra los microorganismos patógenos para de este modo asegurar el buen vivir de nuestra sociedad.

El estudio se realizó en los Laboratorios de Fitoquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH; mediante la aplicación del método de Mitscher para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii* Kunth), con la utilización de 6 bacterias ATCC de tipo gram + *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, y Gram - *Escherichia coli* ATCC 9637, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Gallinarum* ATCC 9184 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231; a concentraciones de 10000 µg/mL, 1000 µg/mL, 100 µg/mL y 10 µg/mL, de igual manera se empleó combinaciones de los extractos totales en proporción 50:50. Previamente se realizó un estudio fitoquímico de los extractos puros de hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) con la finalidad de identificar sus componentes químicos, los mismos que contribuyen a la actividad antimicrobiana.

Al término de la investigación se obtuvo como resultado la inhibición total de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y parcialmente la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231; la actividad se evidenció utilizando la concentración de 10000 µg/mL del extracto tanto de flores como de hojas, al igual que la combinación en proporción 50:50 de ambos; cabe anotar que se observó una actividad más pronunciada en la utilización del extracto de flores.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 PLANTAS MEDICINALES

#### 1.1.1 HISTORIA

No sabemos quien utilizó las plantas por primera vez, pero alguien y más probablemente muchos pueblos diferentes descubrieron en los primeros albores de la historia que algunas plantas son buenas para comer y otras tienen propiedades curativas. (7) (62)

Seguramente la búsqueda de algún remedio fue algo que se dio en todas las culturas a la vez, fruto del deseo del hombre de sanar, por cuestión mágica-religiosa o de algún preparado que le proporcionase una mayor felicidad temporal. La mayoría de las veces los descubrimientos fueron simplemente resultado de la búsqueda de nuevos alimentos. Los antepasados tenían que comprobar si las nuevas especies eran comestibles lo que les llevaba a descubrir en su propio cuerpo que muchas de ellos eran evidentemente comestibles; otros venenosos y otros producían efectos un tanto diferentes: aumentaban el sudor, les hacían defecar con mayor facilidad, les eliminaban el dolor de la articulación que hasta el momento les había producido mucho malestar, etc., etc. Otras veces fue simplemente el resultado de la casualidad. (10) (11) (70)

Los conocimientos sobre las plantas medicinales, antes del nacimiento de la escritura, se realizaban oralmente. Se sabe que el primer texto escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene unos 4000 años de antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los Sumerios, un antiguo pueblo que vivía al sur de los ríos Éufrates y Tigris, lo que equivaldría al actual Iraq. (70)(76)

### 1.1.2 DEFINICIÓN

Una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de *droga vegetal*, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, elixir, infusión, jarabe, tintura, unguento, etc. (1) (69)

Los beneficios para la salud de las plantas medicinales lo conocemos de hace centurias. Muchas plantas contienen potentes ingredientes que si se usan correctamente nos traen beneficios para la salud. Actualmente ya existen médicos profesionales de avanzada y recomiendan el uso de plantas medicinales. (11) (61)

Por naturaleza todas las raíces y tallos (corteza) de las plantas tienen principios fungicidas y bactericidas. Porque si no lo tuvieran, los insectos (patógenos) lo destruirían. (1) (61)

### 1.1.3 FITOTERAPIA

La Fitoterapia estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico.(61) (69)

## 1.2 FITOMEDICINA

### 1.2.1 DEFINICIÓN

Es un tipo de medicina alternativa que se basa en las plantas y vegetales para la curación, restablecimiento de la armonía del cuerpo y encontrar el equilibrio que se necesita, en base a la terapia con hierbas medicinales mediante el uso de infusiones, decocciones, extractos u otras formas. Dentro de ella se engloban la fitofarmacología y la fitoterapia. (1) (15)

La fitomedicina puede curar muchos de los males del cuerpo como artritis, ansiedad, estrés, depresión, dolores de espalda, dolores reumáticos, etc. Las plantas tienen

propiedades antiinflamatorias, antitumorales, para actividad hormonal, diuréticas, digestivas, expectorantes, antitusivas, etc. Es un campo muy grande que se puede utilizar para muchas enfermedades y males, basándose en las plantas más recomendadas.(14)(61)

La Fitoterapia Moderna o Fitomedicina, se nutre del desarrollo de la Fitofarmacología básica y clínica, esto es de los estudios farmacológicos realizados con plantas o sus componentes y lo que la lleva a fundamentarse en el uso racional y científico de productos vegetales con finalidad terapéutica; puede así ser utilizada para prevenir, curar o anular estados patológicos.(14) (74)

### 1.2.2 FITOMEDICAMENTO

Es un extracto vegetal estandarizado (Fitofármaco), normalizado y estabilizado y del cual se conoce una acción farmacológica definida y cuantificada, fabricado con tecnología farmacéutica moderna y que su utilización terapéutica está basada en resultados obtenidos de estudios clínicos diseñados y desarrollados de acuerdo con criterios internacionales. Dicho de modo simple, el fitofármaco es al fitomedicamento lo que el fármaco o principio activo es al medicamento alopático. Los fitomedicamentos se producen en variadas formas tales como: tabletas, grageas, comprimidos, cápsulas, gotas y jarabes.(14) (74)

### 1.2.3 LA CROMOTERAPIA

La cromoterapia es un método de armonización y de ayuda a la curación natural de ciertas enfermedades por medio de los colores. Los colores corresponden a vibraciones que tienen velocidades, longitudes y ritmos de ondas diferentes. Estos ejercen una influencia física, psíquica y emocional que nosotros no somos conscientes en general y que permite a nuestra energía vital de tener un estado que facilita la auto sanación.

La cromoterapia y la helioterapia (terapia por medio de los rayos del sol) fueron muy importantes en la práctica de la medicina tradicional de las grandes culturas como la China, la India y la Grecia.

Ciertos colores son astringentes como el rojo, el naranja o el amarillo. El azul ayuda a la extroversión, mientras que el rojo permite la introversión. Ciertos colores como el rojo y el naranja hacen subir la temperatura de una habitación; son los llamados colores calientes. Otros por el contrario como el azul, el indigo o el gris son colores fríos.

Según aquellas personas que lo practican, la enfermedad puede ser causada por la falta de un determinado color en el sistema humano y, con el fin de sanar el organismo y restablecer su desequilibrio, esta terapia aplica el color que se requiere a través de la utilización de luces en el cuerpo.

- **Rojo:** Se trata de un color de calor y energía que estimula la tensión arterial. Trae calor para enfriar extremidades. Se utiliza en el tratamiento de enfermedades como la presión arterial baja, la parálisis, el reumatismo y la anemia.
- **Naranja:** Este color estimula los nervios y es beneficiosa en el tratamiento de cálculos renales y de vesícula y hernia. También es eficaz para estimular la producción de leche de los pechos después del parto.
- **Violeta:** Violeta su aplicación es beneficiosa en el tratamiento de trastornos emocionales y nerviosos, insomnio y artritis.
- **Amarillo:** Este color se considera laxante, diurético y estimulante para el cerebro. También es beneficiosa en el tratamiento de la diabetes, estreñimiento, trastornos renales y hepáticos e infecciones de la garganta.
- **Púrpura:** Púrpura o índigo es un excelente estimulante sin ser un irritante, y es útil en el tratamiento de trastornos del estómago y la piel y la migraña. Tiene un efecto benéfico en los ojos (cataratas) y los oídos.
- **Verde** Este color es producido por el formado por el azul y amarillo y se le considera como un sedante suave. Es beneficiosa en el tratamiento de úlceras, gripe, resfriados, trastornos sexuales, el cáncer y las enfermedades inflamatorias.
- **Azul:** Azul es un color sedante que alivia el dolor, reduce el sangrado y fomenta la pronta cicatrización de las heridas y quemaduras. Es eficaz en el tratamiento de cólicos, asma, trastornos respiratorios, hipertensión arterial y trastornos de la piel
- **Escarlata:** Vasoconstrictor. Estimulante de los riñones. Aumenta la tensión sanguínea.

- **Limón:** Desintoxicación. Estimula los huesos. Estimula la vitalidad en los disturbios crónicos

### **1.3 FITOFARMACOLOGÍA**

#### 1.3.1 DEFINICIÓN

Es la rama de la Farmacología que se orienta al estudio de los extractos estandarizados de plantas medicinales.(14)

#### 1.3.2 FITOFÁRMACOS

La base de los fitofármacos son los vegetales.Son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entienden: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante.(14) (74)

### **1.4 PRINCIPIO ACTIVO NATURAL**

#### 1.4.1 DEFINICIÓN

Sustancia química responsable de la actividad farmacología y del uso terapéutico de una droga. Los principios activos más importantes, desde el punto de vista médico son los alcaloides y glucósidos. (1)

Los principios activos se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos. (1)

Existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos. (1) (4)

Los principios activos se clasifican, según su estructura química, en grupos:

- a. Productos resultantes del metabolismo primario (procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción): Glúcidos, lípidos, derivados de aminoácidos.(4) (46)
  - b. Productos derivados del metabolismo secundario (no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizadas como defensa, adaptación, etc): son los más importantes como principios activos.(4) (46)
- Heterósidos: Antraquinónicos, cardiotónicos, cianogénicos, cumarínicos, fenólicos, flavónicos, ranunculósidos, saponósidos, sulfurados
  - Polifenoles: Ácidos fenólicos; cumarinas; flavonoides; lignanos; taninos; quinonas.
  - Terpenoides: Aceites esenciales; iridoides; lactonas; diterpenos; saponinas.
  - Alcaloides (4) (46)

## **1.5 ANTIBIÓTICOS NATURALES**

Son aquellos remedios procedentes del mundo vegetal que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos.(1) (53)

Los antibióticos naturales se diferencian de aquellos sintéticos en las siguientes características:

- No tienen efectos secundarios: En general, por ejemplo, no producen reacciones alérgicas o sensibilidad en el estómago.
- Son capaces de respetar los microorganismos beneficiosos para el organismo, por ejemplo, la flora intestinal.

- No resultan peligrosos por acumulación.
- Son baratos y fáciles de conseguir.(1) (53)

## 1.6 PLANTAS ANTIMICROBIANAS

Aproximadamente, el 60% de la población mundial utiliza plantas y productos derivados de ellas en su medicación. Estos productos naturales hoy en día son considerados como una de las “medicinas” de gran importancia por su efectividad terapéutica. De las 520 nuevas drogas aprobadas entre 1983 y 1984, el 39% fueron productos naturales o derivados de productos naturales, y el 60 a 80% de drogas antibacterianas y de anticancerígenos son derivados de productos naturales.(22)(50)

Sin embargo, la actividad terapéutica no sólo se puede conseguir luego de procesos de extracción y purificación de principios activos, sino directamente de la planta misma o de algunos extractos relativamente simples de obtener. Por ejemplo, el jugo de arándano tiene una acción de prevención de las recurrencias sintomáticas de infección al tracto urinario; el consumo diario de 300 ml reduce la bacteriuria en mujeres postmenopáusicas pero no en niñas con vejiga neurogénica (34).

*Ocinum micranthum*, planta conocida como “sanialbahaca”, es utilizada para tratar infecciones respiratorias en regiones amazónicas de América del Sur, México y el Caribe. Se determinó la composición química del aceite esencial de las hojas de dicha planta, y también se la enfrentó a bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella* sp., y hongos del género *Aspergillus*, confirmándose que dicho aceite puede ser considerado como un buen agente antibacteriano y antifúngico (15)(31).

Los ácidos ceanótico y ceanotérico, provenientes de la planta *Ceanothus americanus*, han demostrado efectos inhibidores del crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, y *Porphyromonas gingivalis*; y los extractos etanólicos del propóleo han mostrado buena actividad antimicrobiana contra estos mismos microorganismos orales (33).

Los extractos crudos de *Psoralea corylifolia*, un árbol nativo de China, poseen actividades reportadas antimutagénicas, antimicrobianas y de hormona juvenil de insectos; además, un extracto aceitoso en hexano obtenido a partir de sus semillas presentó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Se ha considerado que el responsable de estas actividades es el bakuchiol, un isoprenoide fenólico aislado de las semillas y hojas de esta planta (15)(33).

#### 1.6.1 GRUPOS PRINCIPALES DE COMPONENTES ANTIMICROBIANOS DE LAS PLANTAS

Las plantas tienen una casi ilimitada habilidad de sintetizar sustancias aromáticas, gran cantidad de ellas son fenoles o sus derivados de oxígenos sustituidos. Muchos son metabolitos secundarios de los cuales por lo menos 12000 han sido aislados, un número estimado menor en un 10% del total.(39)(43)

En numerosos casos estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, tales como los terpenoides, dan a las plantas sus olores; otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento de las plantas. Muchos componentes son asimismo responsables del sabor de las plantas (el terpenoide capsaicina en caso del ají), y algunas de las hierbas y especies usados por los humanos para sazonar los alimentos producen compuestos medicinales útiles.(40)(43)(50)

Los compuestos fitoquímicos antimicrobianos útiles pueden ser agrupados en varias categorías, como las siguientes:

- a. **Fenoles y Polifenoles:** El ácido cafeico y el cinámico son representantes de estos grupos, ambos con acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica.(22)(31)

La actividad antimicrobiana del catecol y del pirogallol está directamente relacionada con el número de grupos hidroxilos que tiene el derivado fenólico. Los flavonoides también exhiben actividad antiviral; los taninos presentan actividad

astringente. Se considera que la acción de los fenoles y polifenoles contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas.(31)(39)

Los compuestos fenólicos que poseen una cadena lateral a nivel de C3 en un bajo nivel de oxidación y que no contienen oxígeno, son clasificados como aceites esenciales y a veces se citan como agentes antimicrobianos bacteriostáticos contra hongos y bacterias (21).

- b. Quinonas:** Son anillos aromáticos con dos sustituciones cetónicas. Se encuentran en amplia distribución en la naturaleza y son altamente reactivos en reacciones de óxido-reducción. Producen radicales libres y generan complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, generando su inactivación.(40)(41)

El rango de la actividad antimicrobiana de las quinonas es amplio, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas. Por ejemplo, una antraquinona proveniente de *Cassia italica*, un árbol de Paquistán, tiene acción bacteriostática sobre *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* y *Pseudomonas aeruginosa*, y tiene acción bactericida sobre *Pseudomonas pseudomalliae*. (28)

Plantas de la familia Borraginácea se han caracterizado por producir naftoquinonas en sus raíces, las cuales han sido utilizadas en numerosas culturas indígenas como colorantes en cosméticos y alimentos, y para aplicaciones medicinales por su actividad antitumoral, antiinflamatoria y antimicrobiana (28).

- c. Flavonas, flavonoides y flavonoles:** Son estructuras fenólicas que contienen un solo grupo carbonilo. Estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección antimicrobiana, y su actividad sobre las bacterias probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles,

así como una actividad sobre la pared celular muy similar a la de las quinonas. Los flavonoides lipofílicos pueden perturbar la integridad estructural de la membrana celular (31)(41).

- d. Taninos:** Conforman un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de precipitar gelatina en solución, una propiedad conocida como astringente. Están divididas en dos grupos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están basados en el ácido gálico, usualmente como ésteres múltiples con la D-glucosa, mientras que los taninos condensados más importantes (a veces llamadas proantocianidinas) son derivados de monómeros flavonoides.(29)

En las plantas, los taninos tienen una acción inhibitoria del crecimiento de insectos y perturban la digestión de rumiantes. Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos (21).

- e. Cumarinas:** Son compuestos de los cuales se conoce muy bien su acción antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora. Un gran ejemplo de estos compuestos es la warfarina, usada como un anticoagulante oral y como un rodenticida. Se ha visto que tiene acción antiviral, asimismo, otras cumarinas tienen actividad antimicrobiana sobre *Candida albicans* en trabajos in vivo en conejos. (21)(39).

- f. Terpenoides y aceites esenciales:** Los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se ha reportado que los terpenoides actúan contra *Listeria monocytogenes*. Se cree que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. La capsaicina tiene actividad bactericida sobre *Helicobacter pylori*; aunque tiene un poder muy irritante sobre la mucosa gástrica, se ha demostrado que afecta el sistema nervioso, el cardiovascular y el digestivo. Se ha sugerido que la capsaicina también podría incrementar el crecimiento de *Candida albicans*.(50)

El ácido betulínico es un triterpenoide que muestra actividad inhibitoria del virus VIH. El petalostemumol presenta una actividad excelente contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, aunque tiene una menor actividad sobre bacterias Gram negativas y *Candida albicans*. Por otro lado, los terpenos previenen la formación de úlceras gástricas y disminuyen la severidad de las úlceras existentes, aunque no se sabe a ciencia cierta si esta actividad se debe o no a su acción antimicrobiana (21).

**g. Alcaloides:** Los Glicoalcaloides de especies de *Solanum* podrían ser útiles contra la infección por VIH y también contra las infecciones intestinales relacionadas con el SIDA. Otros alcaloides tienen efecto contra parásitos como *Giardia* y *Entamoeba*. La berberina es un alcaloide representativo por su actividad potencialmente efectiva contra *Tripanosoma* y *Plasmodium*. Se ha descrito que tiene actividad microbicida (por ejemplo, sobre *Giardia* y *Entamoeba*), pero se cree que su acción antidiarreica probablemente se deba a sus efectos sobre el tiempo de tránsito del bolo alimenticio en el intestino delgado (21)(41).

**h. Lectinas y Polipéptidos:** La actividad antimicrobiana de los péptidos fue descrita por primera vez en 1942. Tienen a veces grupos con carga positiva y contienen enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Su mecanismo de acción principalmente se explica como la formación de canales iónicos en la membrana del microorganismo o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas a los receptores polisacáridos del hospedero. Un reciente interés se ha enfocado en estudiar la actividad anti-VIH de péptidos y lectinas. Las tioninas son péptidos tóxicos para levaduras y bacterias Gram positivas y Gram negativas, como por ejemplo las Fabatinas que inhiben el crecimiento de *Pseudomonas*, *E. coli*, *Enterococcus*, etc. (26)

Los péptidos cíclicos son pequeños en tamaño y número de aminoácidos (por lo general menos de 15 aminoácidos) y son sintetizados por bacterias y plantas. También se han encontrado péptidos grandes cíclicos unidos por los extremos de 29 a 31 aminoácidos en plantas de la familia Rubiaceae (café). (30)

## 1.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS SINTÉTICOS

Debido a que los antibióticos tienen efectos sobre una diversidad de bacterias, sus mecanismos de acción difieren basados en las características vitales de cada organismo y que, por lo general, son objetivos que no existen en las células de mamíferos.(32)(49)

### 1.7.1 PARED CELULAR

Algunos antibióticos ejercen su función en regiones y orgánulos intracelulares, por lo que son ineficaces en bacterias que contengan una pared celular, a menos que se logre inhibir la síntesis de esta estructura exterior, presente en muchas bacterias, pero no en animales. Muchos antibióticos van dirigidos a bloquear la síntesis, exportación, organización o formación de la pared celular, específicamente los enlaces cruzados del peptidoglicano, el principal componente de la pared celular, sin interferir con los componentes intracelulares. Esto permite alterar la composición intracelular del microorganismo por medio de la presión osmótica. Como la maquinaria intracelular permanece intacta, ello aumenta la presión interna sobre la membrana hasta el punto en que ésta cede, el contenido celular se libera al exterior, y la bacteria muere. También permiten la entrada de otros agentes antimicrobianos que no pueden atravesar la pared celular. Algunos ejemplos clásicos son:(32)(49)

- La bacitracina: del grupo de los péptidos, inhibe al transportador lipídico del peptidoglucano hacia el exterior de la célula.
- La penicilina: en el grupo de los betalactámicos, inhibe la transpeptidación, una reacción en la que se producen los enlaces cruzados de la pared celular y bloquea los inhibidores de las autolisinas.
- Las cefalosporinas: otro tipo de moléculas que inhiben la transpeptidación, por unión a las proteínas PBPs, implicadas en la última fase de la formación de la pared celular. (36)

### 1.7.2 MEMBRANA CELULAR

Ciertos antibióticos pueden lesionar directa o indirectamente —al inhibir la síntesis de los constituyentes— la integridad de la membrana celular de las bacterias y de ciertos hongos. Las polimixinas, por ejemplo, son antibióticos que actúan como surfactante o detergente que reacciona con los lípidos de la membrana celular de las bacterias. Ello destruye la integridad de la permeabilidad de la membrana. Los elementos hidrosolubles y algunos que son tóxicos para el germen, pueden así entrar sin restricción al interior celular. La gramicidina A forma poros o canales en las bicapas lipídicas.(32) (36)(49)

### 1.7.3 ACCIÓN SOBRE ÁCIDOS NUCLEICOS (ADN Y ARN) Y PROTEÍNAS

Algunos antibióticos actúan bloqueando la síntesis del ADN, ARN, ribosomas, ácidos nucleicos o las enzimas que participan en la síntesis de las proteínas, resultando en proteínas defectuosas. La mitomicina es un compuesto con estructura asimétrica y que se fija a las hélices del ADN e inhibe o bloquea la expresión de la enzima ADN polimerasa y, por ende, la replicación del ADN y el ensamblaje de las proteínas. La actinomicina, por su parte, ejerce su mecanismo en la misma manera que la mitomicina, solo que es una molécula simétrica.(32)(67)

Las sulfamidas son análogos estructurales de moléculas biológicas y tienen parecido a las moléculas normalmente usadas por la célula diana. Al hacer uso de estas moléculas farmacológicas, las vías metabólicas del microorganismo son bloqueadas, provocando una inhibición en la producción de bases nitrogenadas y, eventualmente, la muerte celular.(32)(67)

Las quinolonas y fluoroquinolonas actúan sobre enzimas bacterianas del tipo girasas y topoisomerasas del ADN, responsables de la topología de los cromosomas, alterando el control celular sobre la replicación bacteriana y produciendo una alteración en la lectura del mensaje genético.(32)(67)

#### 1.7.4 ACCIÓN SOBRE LOS RIBOSOMAS

Aproximadamente la mitad de los antibióticos actúan por inhibición de los ribosomas bacterianos, los orgánulos responsables de la síntesis de proteínas y que son distintos en composición de los ribosomas en mamíferos. Algunos ejemplos incluyen los aminoglucósidos (se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma), las tetraciclinas (bloquean la unión del ARNt aminoacil al complejo ARNm-ribosoma), eritromicina (se fijan de manera específica a la porción 50S de los ribosomas bacterianos) y la doxiciclina.(32)(36) (49)

### 1.8 ISO (*Dalea mutisii* Kunth)

#### 1.8.1 DESCRIPCIÓN

Es una planta que llega a unos 50 cm. De alto. Se encuentra en quebradas, bosques y llanos. El tallo es duro. Las hojas son pequeñas, delgadas y muy onduladas. La flor es de color morado y tiene forma de una mazorca larga. Abundante ramificación que empieza desde el suelo. Copa de forma redondeada; folaje verde grisáceo. Es silvestre. Es caliente ++. El período de floración comprende: Enero, Febrero, Marzo, Abril, Mayo, Junio, Julio, Agosto, Septiembre, Octubre, Noviembre, Diciembre. Crece en un rango de pH de 6.1 a 7.8. La reproducción es perenne. Necesita abundante exposición a la luz solar, es tolerante a la sequía; el rango de temperatura óptimo para su crecimiento se encuentra entre 10°C-20°C. (3) (12) (59)(75)



FUENTE:[http://www.viverotiernanegra.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=87:chiripique&catid=37:clima-frio&Itemid=12](http://www.viverotiernanegra.com/index.php?option=com_content&view=article&id=87:chiripique&catid=37:clima-frio&Itemid=12)

FOTOGRAFÍA No. 1. *Dalea mutisii* Kunth

## 1.8.2 TAXONOMÍA

<b>Categoría taxonómica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Phyllum	Magnoliophyta
Subphyllum	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Dalea</i>
Epíteto específico	<i>Dalea coerulea</i> (L.f.)Schinz & Thell

### **Sinónimos:**

*Dalea astragalina* Kunth, *Dalea caerulea* L. F., *Dalea mutisii* Kunth, *Galega coerulea* L. F., *Parosela astragalina* (Kunth)J. F. Macbr, *Parosela coerulea* (L. F.). F. Macbr, *Tephrosia coerulea* Pers(59)

## 1.8.3 DISTRIBUCIÓN

Es una especie malífera que sirve como forraje y, por ser fijadora de nitrógeno es apta para la recuperación de suelos y control de erosión. Su madera sirve para la construcción en general, para gabinetes y tornería; la infusión de sus hojas para limpiar la sangre; se siembra en parques, avenidas, jardines, para planeación ornamental de árboles en grupo; y como cerca viva.(75)

## 1.8.4 USOS

*Dalea mutisii*Kunth conocida con el nombre de Flor de Iso es una planta común en los terrenos interandinos del Ecuador. Empleado como infusión de las ramas floridas es utilizada como un remedio eficaz contra las toses e indigestiones (estomacal y pectoral),

la infusión puede ser endulzada ligeramente con miel de abeja. La parte utilizada en medicina popular son las flores. (3)

### 1.8.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El aceite esencial de *Dalea mutisii* es particularmente rico en monoterpenos y han sido identificados triciclono,  $\beta$ -ocimeno, campheno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -phelandreno  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$  terpineno, limoneno, sabineno, alloocimeno, 3-careno, P-cimeno, 2-careno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno.  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -amorpheno, E-citral,  $\delta$  cadieno (3)

## 1.9 BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5  $\mu$ 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.(17)(18)(19)

### 1.9.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA BACTERIANA

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento.(12) (18)(19)

Las bacterias integran el reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo). (12) (17)(18)

Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética.(12) (17)(18)

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas. En este reino, según criterios evolutivos, diferenciamos el grupo de las eubacterias y el de las arqueobacterias. Este último comprende bacterias sin peptidoglicano como las anaerobias que viven en condiciones ácidas calientes, las que viven en condiciones salinas y las que reducen el anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) a metano.(18)(19)

Los procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, a diferencia de los eucariotas. También es importante destacar que el ADN procariota es circular y cerrado, mientras que el eucariota se organiza en cromosomas individuales y se asocia a proteínas de tipo histonas. Las bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano (a excepción de los *Mycoplasmas*) mientras que las células eucariotas no tienen este tipo de pared (la pared celular de los vegetales es de celulosa). La reproducción en los eucariotas puede ser tanto sexuada como asexuada, mientras que los procariotas se reproducen por división simple (forma asexuada). El tamaño de la célula eucariota es mayor que el de la procariota.(12) (17)(18)

Los procariotas no poseen citoesqueleto, a diferencia de los eucariotas. Otra diferencia es la presencia de fimbrias o pilis en las bacterias. Los procariotas pueden poseer flagelos, mientras que los de los eucariotas si los poseen, éstos tienen una estructura más compleja. Por último mencionar que mientras las células eucariotas se reproducen por mitosis, las células procariotas lo hacen por fisión binaria. En dicho proceso la célula crece, se forma un tabique y finalmente se desprenden dos células nuevas. En este proceso se produce también la replicación del ADN, de forma que las células hijas contienen cada una un duplicado idéntico del genoma de la progenitora.(12) (17)(18)

Una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células. Las características de la colonia también dependen de la movilidad de la bacteria. El tamaño puede variar desde 0.5 mm (*Haemophilus* sp. o *N. gonorrhoeae*) a más grandes como las enterobacterias. La forma de la colonia puede ser circular (*Staphylococcus*), irregular o filamentosa (*Bacillus*). Los bordes pueden ser ondulados (característicos de los bacilos largos como *Bacillus anthracis*), en sierra o dentados (*Yersinia pestis*) o lisos (por ejemplo *Proteus vulgaris* o *Escherichia coli*). La superficie de la colonia también es orientadora y puede ser: plana, convexa, mamelonada, umbilicada (*S. pneumoniae*). En relación al pigmento que adquieren, éste puede ser: verde (*P. aeruginosa*), amarillo (*S. aureus*), grisáceo (*N. meningitidis*). También es diferente el comportamiento frente a la luz: brillante (*Streptococcus*) u opaca (*Staphylococcus*). Pueden presentar olores particulares como el frutal de *Ps. aeruginosa* o el putrefacto de los anaerobios. (17)(19)

Por último hay que destacar la consistencia: mucoide (M), liso (S) o rugoso (R). Las colonias M tienen aspecto acuoso, brillante, propio de las bacterias capsuladas o que forman cubiertas polisacáridas como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Los polímeros capsulares pueden ser específicos de grupo y son generalmente antigénicos. Entre las bacterias patógenas, las formas capsuladas suelen ser más virulentas. Por otra parte, las colonias S son de aspecto homogéneo, de textura uniforme y son características de microorganismos de tipo salvaje recientemente aislados de su hábitat natural como las enterobacterias. Las colonias R son de aspecto granulado, en general son cepas mutantes que carecen de proteínas o polisacáridos de superficie. Las formas R de enterobacterias, por ejemplo, generalmente no son virulentas, en oposición a la mayor resistencia de las bacterias procedentes de colonias S de tipo salvaje. Un cuarto tipo de colonia es la L y se asocia a la ausencia de la pared celular como resultado de la exposición a antibióticos; en general estas formas vuelven a sintetizar la pared celular una vez que el fármaco se extrae del medio. (12) (17)(18)

### 1.9.2 TAMAÑO

El tamaño de las bacterias oscila entre las 0.5 y 3  $\mu\text{m}$ , pudiendo llegar en algunos tipos a 10  $\mu\text{m}$ . Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0.4 y 2  $\mu\text{m}$ .(17)(19)

## 1.10 CLASIFICACION DE BACTERIAS

Existen diferentes criterios para clasificar e identificar las bacterias. Uno de ellos consiste en la agrupación por familias y especies, distinguiéndose 11 órdenes: (56)

- Eubacteriales.
- Pseudomonadales.
- Espiroquetales.
- Actinomicetales.
- Rickettsiales.
- Micoplasmatales.
- Clamidobacteriales.
- Hifomicrobiales.
- Beggiatoales.
- Cariofanales.
- Cixobacteriales.

Otro modo de clasificarlas es atendiendo a su forma y ordenamiento. Cuando es en forma de coco (esférico) se clasifican de la siguiente forma: (56)

- Coco, cuando se dividen en un solo plano vertical, separándose y conservando su individualidad.
- Diplococo, cuando las células hijas se presentan en parejas.
- *Streptococcus*, cuando se presentan formando cadenas.
- *Staphylococcus*, cuando tras la división celular se agrupan de forma irregular, parecida a un racimo de uvas y a veces de gran volumen.
- Tetracoco, cuando tras la división celular se forman grupos de 4 células.
- Sarcina, cuando la división celular produce paquetes de 8 células.

Las otras dos formas son los espirilos, en forma de espiral, y los bacilos, en forma de bastón. (56)

Otra de las formas de clasificar a las bacterias es por la composición de la pared celular y su reacción a la tinción Gram. Con este método se distinguen las bacterias Gram negativas, que no retienen el cristal violeta y conservan el rojo, y las bacterias Gram positivas, que sí absorben el colorante y se tornan violetas. (56)

Por la necesidad, o no, que tienen de oxígeno también se distinguen entre: (56)

- Aerobias estrictas, cuando dependen del oxígeno.
- Anaerobias estrictas, cuando se desarrollan en ausencia total de oxígeno.
- Anaerobias facultativas, pueden desarrollarse con o sin oxígeno.
- Microaerófilas, cuando solo pueden desarrollarse en bajas tensiones de oxígeno y altas de dióxido de carbono.

La temperatura también es otro modo de clasificarlas: (56)

- Termófilas, cuando se desarrollan entre los 25 y los 80 grados.
- Mesófilas, cuando se desarrollan entre los 10 y los 45 grados.
- Psicrófilas, cuando se desarrollan entre los -5 y los 30 grados.

Atendiendo al pH en el que se desarrollan pueden clasificarse como: (56)

- Acidófilas, cuando el pH está entre 1 y 5.
- Neutrófilas, cuando el pH está entre 5.5 y 8.5.
- Basófilas, cuando el pH está entre 9 y 10.

La clasificación también puede llevarse a cabo atendiendo a su forma de nutrición. En este caso se distinguen entre bacterias autótrofas quimiosintéticas y heterótrofas. Las primeras utilizan la luz solar y bióxido de carbono para fabricar el alimento, mientras que las heterótrofas utilizan fuentes de carbono orgánico. (56)

## 1.11 *Staphylococcus aureus*

### 1.11.1 MORFOLOGÍA

*Staphylococcus aureus*, conocido como estafilococo áureo o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, no esporulada, es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 µm de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas.(16)(17)

### 1.11.2 TAXONOMÍA (2)

<b>Categoría taxonómica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Bacteria
Reino	Procariota
División o Phylum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i>

### 1.11.3 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

El *staphylococcus aureus* convierte las moléculas de alta energía como la glucosa, (un azúcar de seis átomos de carbono) en energía mediante un proceso denominado respiración celular. La respiración celular es una serie de procesos metabólicos que generan energía en forma de ATP. El ATP es una forma eficiente de energía almacenada que puede ser fácilmente utilizada por las células. Hay dos tipos de respiración celular: aeróbica y anaeróbica. La respiración aeróbica sólo puede tener lugar en presencia de oxígeno. La respiración anaeróbica, también llamada fermentación, puede llevarse a cabo sin oxígeno. El *Staphylococcus aureus* es un anaerobio facultativo. Esto significa que normalmente la respiración celular es en forma aeróbica, pero si el oxígeno no está

disponible puede respirar en forma anaeróbica para la producción de energía. Produce una enzima llamada catalasa. La catalasa ayuda al *Staphylococcus aureus* a descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno puede ser una toxina para algunos organismos.(60)

#### 1.11.4 PATOGENICIDAD

El sitio blanco de acción de las enterotoxinas que origina el reflejo emético está localizado en la víscera abdominal, donde existen receptores celulares SE. Debido a que estos receptores no han sido identificados resta mucha incertidumbre con respecto a los eventos tempranos en la patogenia de la intoxicación por *S. aureus*. (6) (35)(55)

La hipótesis mas sustentada argumenta que los vómitos ocurren en respuesta a la inflamación inducida por las enterotoxinas. Los síntomas están altamente correlacionados con la producción de un gran número de mediadores de la inflamación, incluyendo prostaglandina E2, leucotrieno B4, y ácido 5- hidroxicicosatetraenoico. No está claro si estos mediadores son generados directa o indirectamente en respuesta a las SE. (35) (55)

En última instancia, la respuesta emética a las SE es dependiente de la activación del centro del vómito en el tronco encefálico, el cual es estimulado por impulsos transmitidos desde el vago y nervios simpáticos. (6) (35)(55)

Las enfermedades cuya responsabilidad recae en el *Staphylococcus aureus* son muy diversas. Entre las más destacadas se pueden citar: (55)

- Osteomielitis.
- Conjuntivitis.
- Artritis.
- Infecciones orbitales graves.
- Sinusitis.
- Meningitis.
- Otitis media.

- Mastoiditis.
- Orzuelos.
- Bronquitis.
- Neumonía estafilocócica primaria.
- Parotiditis.
- Enterocolitis.
- Cistitis.
- Prostatitis.
- Cervicitis.
- Salpingitis.

#### 1.11.5 PERFIL ANTIBIOTICO

Cepas sensibles a meticilina: amoxicilina-clavulánico, ampicilina-sulbactam, cefalosporina de 1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> generaciones, clindamicina, fluorquinolona de 3<sup>a</sup> (levofloxacin) o 4<sup>a</sup> generación (moxifloxacin) o imipenem. Cepas resistentes a meticilina: linezolid, synergid, cotrimoxazol, minociclina. La fosfomicina, el ácido fusídico y la rimfapicina pueden ser activos, pero no deben emplearse como antibiótico único porque generan con facilidad la aparición de mutantes resistentes. La asociación de fosfomicina con imipenem puede ser sinérgica.(13) (67)

### **1.12 *Escherichia coli***

#### 1.12.1 MORFOLOGÍA

La *Escherichia coli*, también conocida por la abreviación de su nombre, *E. coli*, es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. (17)

Morfológicamente, las colibacterias son bacilos rectos generalmente flagelados peritricos y, por tanto, móviles. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos. Catabolizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden utilizar urea ni citratos. No se forma hidrógeno sulfúrico. El rango de crecimiento se sitúa entre 4 y 46°C. Al igual que las restantes enterobacterias, las colibacterias son resistentes a las sustancias tensioactivas. (57)

La compleja estructura antigénica se basa en antígenos O-, K- y H-. Los antígenos O son lipopolisacáridos (LPS), componentes estructurales de la membrana externa. Una estructura química diferente de LPS corresponde a una distinta especificidad serológica. Las cepas de bacterias que poseen el antígeno O forman colonias brillantes sobre medios de cultivo sólidos, por lo que se denominan formas S (ingl. *smooth*). Los antígenos K son componentes capsulares. Sin embargo, no todas las cepas llevan antígenos K. Las cepas de esta estructura antigénica suelen ser más bien tóxicas y resistentes a la fagocitosis. Las colonias de las cepas bacterianas con mucha sustancia capsular tienen un aspecto mucoso. Las proteínas de los flagelos constituyen antígenos H. (57)

#### 1.12.2 TAXONOMÍA (2)

<b>Categoría taxonómica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Bacteria
Reino	Procariota
División o Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i>

### 1.12.3 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS (2)

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo
SH <sub>2</sub>	Negativo
Citrato	Negativo
Fenilalanina desaminasa	Negativo
Indol	Positivo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Manitol	Positivo
Movilidad	Positivo
Ureasa	Negativo

### 1.12.4 PATOGENICIDAD

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.

La *Escherichia coli* está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente le pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C. (6)

Las infecciones urinarias son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm, o bien 1 a 2 pulgadas) en comparación con los hombres (unos 15 cm, o unas 7 pulgadas). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción entre hombres y mujeres. Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra (una infección ascendente), los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia,

como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el evento iniciante de la infección es desconocido. Aunque las infecciones ascendentes son las causantes de infecciones del tracto urinario bajo y cistitis, no es necesariamente ésta la causa de infecciones superiores como la pielonefritis, que puede tener origen hematógeno. (6)

#### 1.12.5 PERFIL ANTIBIÓTICO

**TABLANo. 1. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli***

<b>Drogas antimicrobianas</b>	<b>Sensible %</b>	<b>Drogas antimicrobianas</b>	<b>Resistente %</b>
Nitrofurantoína	82,5 %	Sulfaprin	83,9 %
Rocephin	68,9 %	Cefuroxima	76,7 %
Ciprofloxacina	52,4 %	Ampicilina	68,9 %
Ac. Nalidíxico	45,6 %	Oxacilina	68,0 %
Claforan	38,8 %	Ac. Nalidíxico	52,4 %
Amikacina	38,8 %	Claforan	51,5 %
Kanamicina	34,1 %	Cefazolina	46,6 %
Sulfaprin	33,0 %	Rocephin	23,3 %
Azitromicina	23,3 %	Azitromicina	23,3 %
Norfloxacina	9,7 %	Eritromicina	18,6 %
Cefuroxima	2,9 %	Kanamicina	9,7 %
Cefazolina	1,9 %	Norfloxacina	5,8 %
Vancomicina	1,0 %	Nitrofurantoína	4,8 %
Eritromicina	1,0 %	Tetraciclina	3,9 %
Ampicilina	1,0 %	Penicilina	2,9 %
		Amikacina	2,9 %
		Ciprofloxacina	1,9 %

FUENTE: NARCHI H, AL-HAMDANIM.UROPATHOGEN RESISTANCE TO ANTIBIOTIC PROPHYLAXIS IN URINARY TRACT INFECTIONS.MICROBDRUGRESIST. 2010 JUN;16(2):151-4.

### 1.13 *Salmonella gallinarum*

#### 1.13.1 MORFOLOGÍA

Es un bacilo corto y grueso sin flagelos no forma esporas ni cápsulas, se tiñe con colorantes ordinarios es Gram negativo puede aislarse fácilmente de la sangre e hígado. Es aerobio y anaerobio facultativo y su temperatura óptima para el crecimiento es los 37°C. Posee un antígeno “O” 1,9 y 12similar al grupo “D” de la clasificación de las salmonellas.(73)

#### 1.13.2 TAXONOMÍA (64)

<b>Categoría taxonómica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Bacteria
Reino	Procariota
División o Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>gallinarum</i>

#### 1.13.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS (64)

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Negativo
Lactosa	Negativo
SH <sub>2</sub>	Variable
Sacarosa	Negativo
Ureasa	Negativo
Ornitina descarboxilasa	Negativo
Lisina descarboxilasa	Positivo

Maltosa	Positivo
Movilidad	Negativo
Dulcitol	Positivo

#### 1.13.4 PATOGENICIDAD

Las fuentes de infección suelen ser otros animales portadores infectados, pero también otros mamíferos, aves, roedores, insectos, el hombre, el agua o el alimento contaminado y el ambiente de la granja (heces, polvo, equipos, suelos mal desinfectados, etc.). (74)

La principal puerta de entrada de la *Salmonella* es la vía oral, por contacto con heces de animales infectados. Resistente al pH del estómago, sales biliares y peristaltismo, coloniza el intestino delgado e invade los ganglios linfáticos mesentéricos, provocando una infección localizada. (74)

La *Salmonella* evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida y comienza a dividirse dentro de la célula. Posteriormente, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en hígado, bazo, médula ósea, etc. (74)

Se elimina por las heces, y se multiplica en el ambiente, donde es muy resistente. (74)

La enfermedad por *Salmonella gallinarum* tiene una presentación aguda en pollitos durante los primeros días de vida. En las gallinas adultas, el germen produce una infección crónica causando un mayor efecto en los ovarios por deformidad de estos, en el caso de los pavos la enfermedad ataca del mismo modo que en las gallinas adultas.(64)  
(74)

### 1.13.5 PERFIL ANTIBIÓTICO

TABLA No. 2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Salmonella gallinarum*.

<i>Salmonella gallinarum</i>		
Antimicrobiano	Resistencia %	Sensibilidad %
Amikacina	27,3	45,5
Amoxicilina	54,5	18,2
Ampicilina	9,1	27,3
Cefalexina	36,4	63,6
Ciprofloxacina	9,1	36,4
Cloranfenicol	0,0	90,9
Doxiciclina	45,5	27,3
Enrofloxacina	27,3	36,4
Estreptimicina	100	0,0
Florefenicol	72,7	18,2
Fosfomicina	9,1	54,5
Gentamicina	18,2	36,4
Kanamicina	27,3	45,5
Norfloxacina	9,1	9,1
Tetraciclina	90,9	0,0
Trimetropin sulfa	0,0	81,8

FUENTE: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/article/view/18252/19836>

## 1.14 *Klebsiella pneumoniae*

### 1.14.1 MORFOLOGÍA

*Klebsiella pneumoniae* es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae*, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX.(65)

El bacilo ahora conocido como *Klebsiella pneumoniae* también fue descrito por Karl Friedländer, y durante muchos años se conoció como el «bacilo de Friedländer».(65)

Son bacterias gram negativas, poseen un capsula, son móviles; algunas especies poseen fimbrias y producen bacteriocinas. Son aerobios y anaerobios facultativos. La asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado y en el medio Kligler o TSI donde son Ácido/Ácido, es decir fermentador de la lactosa mas producción de gas; y en la fermentación acetónica o prueba de Voges Proskauer son positivos. Por último, sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a 37 °C, pH de 7.0, presión osmótica de 1 atm.(25)(65)

#### 1.14.2 TAXONOMÍA(2)

<b>Categoría taxonómica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Bacteria
Reino	Procariota
División o Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>pneumoniae</i>

#### 1.14.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS (2)

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Negativo
SH <sub>2</sub>	Negativo
Citrato	Positivo
Indol	Negativo

Movilidad	Positivo
Ureasa	Positivo

#### 1.14.4 PATOGENICIDAD

Las *Klebsiellas* se detectan en tierra, plantas y agua. Además, en alrededor del 30% de la población sana se encuentran en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias superiores. Las enfermedades provocadas por *Klebsiella* son principalmente neumonía (neumonía de Friedländer), sepsis e infección urinaria. No obstante, en ocasiones también pueden provocar endocarditis, meningitis, enteritis o infecciones de partes blandas. La proporción de infecciones nosocomiales es de alrededor del 5 -10%. Los microorganismos se absorben por vía aérea, a través de vegetales comestibles o agua contaminada. Una parte de las infecciones se produce de forma endógena. *Klebsiella pneumoniae*, subespecie *ozaenae* y subespecie *rhinoscleromatis* forman parte de los patógenos habituales en las infecciones nasofaríngeas.(25)(65)

Dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos. A día de hoy también existe una fuerte teoría que la relaciona con la espondilitis anquilosante.(65)

Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema.(65)

También suele encontrarse en las infecciones de la toracotomía para realización de *by pass* o revascularización coronaria. Suele responder en estos casos al imipenem, 1 g IV cada 6 horas por 21 días + ciprofloxacina, 400 mg IV cada 12 h por 21 días, acompañado

todo esto de enérgica cura diaria realizada por el cirujano cardiovascular y colocación de Intrasite Gel (hidrogel de carboximetilcelulosa) cada 2 o 3 días dentro del lecho de la herida cuando ya no hay más secreción. El cierre por segunda intención es la regla.(25)(65)

#### 1.14.5 PERFIL ANTIBIÓTICO

**TABLA No. 3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Klebsiella pneumoniae***

Antimicrobianos	Resistencia %	Sensible %
Amoxicilina/clavulánico	13,1	59
Ampicilina/sulbactam	42,6	52,5
Piperazina/tazobactam	36,1	62,3
Cefuroxima	47,5	52,5
Cefoxitina	1,6	98,4
Cefixima	47,5	52,5
Ceftriaxona	47,5	52,5
Cefepime	47,5	52,5
Meropenen	6,6	93,4
Amikacina	11,5	62,3
Gentamicina	39,3	60,7
Ciprifloxacina	41	59

FUENTE: [http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol51\\_3\\_12/med04312.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol51_3_12/med04312.htm)

### 1.15 *Candida albicans*

#### 1.15.1 MORFOLOGÍA

*Candida albicans* es un hongodiploideasexual (forma de levadura). Saprófito de la familia de los Sacaromicetos. (27) (23)

Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación. (27) (23) (24)

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas. (27) (48)(24)

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable<sup>20</sup>. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. (23)(48)(24)

*Candida albicans* puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección. Durante el embarazo, la vejez o la infancia son frecuentes las candidiasis superficiales y lo mismo sucede en personas portadoras de prótesis dentales y en diabéticos. En personas con inmunodeficiencias celulares, como las infectadas por el VIH, es frecuente observar un incremento de las

candidiasis mucocutáneas por *Candida* cuando disminuye el número de linfocitos T cooperadores (CD4+). (27)12

*Candida albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade. Los factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto y que determinan el fenotipo y virulencia de cada aislamiento. Entre los genes conocidos asociados a la virulencia de *Candida albicans* están el gen de la hexosaminidasa (HEX1), varios genes de proteinasas aspárticas (SAP1, SAP2, SAP3 y SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión ( $\alpha$ INT1).(23)(48)

#### 1.15.2 TAXONOMÍA(2)

<b>Categoría taxonómica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Eucarya
Reino	Fungi
División o Phylum	Deuteromyceta
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>Albicans</i>

#### 1.15.3 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Tubos germinativo	Positivo
Agar harina de maíz	Positivo
Zimograma	Positivo
Auxanograma	Positivo
CHROM agar	Positivo

#### 1.15.4 PATOLOGÍAS CONOCIDAS

*Candida albicans* puede asumir patogeneidad provocando la candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel. (9) (27)

En un físico debilitado, inmunodeprimido o convaleciente de un larga cura antibiótica, la *Candida* se multiplica en modo anómalo y, atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando la candidemia. Este fenómeno da lugar a síntomas algunos abdominales, mala digestión, gases e hichazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión. (9) (27)

La candidiasis induce también una disminución de la absorción de las sustancias nutritivas por lo que se podría producir un estado de malnutrición. (9) (27)

La frecuencia de infecciones invasoras causadas por *Candida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas, constituyendo actualmente la candidemia un importante agente de infección intrahospitalaria. Se ha descrito en E.U.A. un aumento de 4 veces las tasas de fungemia nosocomial entre 1980 y 1990, representando alrededor del 10% de todas las infecciones del torrente sanguíneo durante 1990. (9)

Esto se debe en gran parte a avances de la medicina, con la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, son considerados factores de riesgo para esta infección. Con mayor frecuencia ocurren en pacientes que tienen condiciones de base tales como ser neonatos, prematurez, patología oncológica en quimioterapia, terapia inmunosupresora, ser sometidos a gran cirugía y estar afectados por enfermedades severas que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos (UCI). (27)

### 1.15.5 PERFIL ANTIFÚNGICO

**TABLA No. 4. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICÓTICA DE *Candida albicans***

<b>Antifúngico</b>	<b>µg/mL</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Resistencia</b>
		<b>%</b>	<b>%</b>
<b>5FC</b>	2	97,6	2,4
	32	97,6	2,4
<b>AB</b>	2	97,6	0,0
	8	100	0,0
<b>MCZ</b>	0.5	70,7	14,6
	8	90,2	2,4
<b>KET</b>	0.5	75,6	9,8
	4	80,5	7,3
<b>ITR</b>	0.5	70,7	12,2
	4	78,0	9,8
<b>FLU</b>	8	80,5	4,9
	64	75,6	4,9

FUENTE: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2012/rmd122b.pdf>

S=Sensibilidad; R=Resistencia; SDD=Sensibilidad Dosis Dependiente. 5FC=5 Fluorocitosina; AB=Anfotericina B; MCZ=Miconazol; Ket=Ketoconazol; ITR=Itraconazol; FLU=Fluconazol

### 1.16 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.16.1 MORFOLOGÍA

Son bacilos Gram negativos, móviles con flagelos polares, aerobios estrictos, metabolismo oxidativo no fermentativo, crece entre 10 y 42°C.(72)

#### 1.16.2 TAXONOMÍA (72)

<b>Categoría taxónomica</b>	<b>Clasificación científica</b>
Dominio	Bacteria
Reino	Procariota

División o Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Aeruginosa</i>

### 1.16.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (2)

Oxidasa	Negativo
Movilidad	Positivo
Catalasa	Positivo
Ureasa	Negativo
Maltosa	Negativo
Lactosa	Negativo

### 1.16.4 PATOGENICIDAD

La *Pseudomonas aeruginosa*, tiene forma de bastoncillo, produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es una bacteria muy extendida, y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas, ya que sus necesidades alimenticias son mínimas, aunque las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos. En los seres humanos puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano. (49)(50)

Es muy poco frecuente que la *Pseudomonas aeruginosa* produzca trastornos en personas sanas. La enfermedad se origina como resultado de alteraciones en las defensas normales del huésped. Esto puede suponer la pérdida de protección que proporcionan las membranas mucosas o la piel, como ocurre con la "otitis externa". Sus mínimas

necesidades de nutrición, adaptabilidad y relativa resistencia a los antibióticos permiten a esta bacteria sobrevivir cerca de su anfitrión.(49)(50)

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son graves, especialmente cuando existe bacteriemia. Ésta suele presentarse en pacientes con enfermedad grave de base, larga estancia hospitalaria y uso previo de antibióticos.(72)

Al parecer la lesión inicial provocada por la *Ps. aeruginosa* al epitelio respiratorio y otras mucosas está mediada por pili o fimbrias y por un exopolisacárido mucoide conocido como alginato. Existen receptores de estas adhesinas en las células epiteliales.(72)

El microorganismo produce diversas enzimas extracelulares como la proteasa alcalina, elastasa, fosfolipasa, citotoxina y exoenzimas A y S. la alteración de los tejidos del huésped por estos productos bacterianos extracelulares crea las condiciones necesarias para la proliferación e invasión bacteriana y la consiguiente destrucción del tejido.(72)

La *Pseudomonas aeruginosa* frecuentemente ocasiona infecciones adquiridas en el hospital, prolongando el período de hospitalización, incrementando los costos médicos, particularmente en pacientes inmunocomprometidos o críticamente enfermos. Estas infecciones son difíciles de tratar debido a que las cepas responsables pueden ser resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación. Puede ocurrir resistencia antibiótica durante o después del tratamiento de las infecciones por *Ps. aeruginosa*.(72)

#### 1.16.4.1 FACTORES DE PATOGENICIDAD

- Mucoide extracelular: es antifagocitario y adherente.
- Exoenzimas: ureasa, gelatinasa, lecitinasa, proteasas, colagenasa, etc.
- Bacteriocinas: actúan destruyendo bacterias del mismo o de distinto género.
- Endotoxina: LPS de pared, se libera al destruirse la bacteria.

- Toxina A: es una exotoxina que actúa inhibiendo la síntesis proteica con la consiguiente muerte de la célula eucariota. Inhibe síntesis de proteína por el EF-2(Factor de elongación de cadena polimerica de la cadena 2).
- Secreta compuestos de hierro que son tóxicos para las células endoteliales produciendo lesión vascular.
- Secreta fosfolipasa “C”: Lisis eritrocitos y degrada surfactante pulmonar y una Elastasa que degrada Ig “G”.
- Pigmentos: pirocianina, pioverdina, piorrubina, fluoresceína, que poseen acción bactericida.(72)

#### 1.16.5 PERFIL ANTIBIÓTICO

**TABLA No. 5. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Pseudomonas aeruginosa***

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistencia %</b>	<b>Intermedio %</b>	<b>Sensible %</b>
Ceftazidima	71	5	24
Cefepime	53	14	33
Aztreonam	62	18	20
Imipenem	47	2	51
Meropenem	27	6	67
Amikacina	52	2	46
Gentamicina	55	9	36
Ciprofloxacina	57	10	33

FUENTE: <http://es.scribd.com/doc/14229371/Resistencia-a-los-antibioticos-en-aislados-clinicos-de-Pseudomonas-aeruginosa-en-un-hospital-universitario-en-Lima-Peru-Rev-Biomed>

## 1.17 METODOS DE DETERMINACION ANTIMICROBIANA

Podemos distinguir los siguientes tipos de métodos:

**TABLA No. 6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN ANTIMICROBIANA.**

MÉTODO	TÉCNICA	INFORMACIÓN
Cualitativo	Antibiograma Difusión de Microdiscos (Kirby-Bauer)	Resistencia
		Valor intermedio
		Sensibilidad
Semicuantitativo	Gradiente Antibiótico (E-Test)	Aproximación a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
Cuantitativo	1. Dilución de caldo:	Determinación de la CMI
	- Macrodilución en tubo	
	- Microdilución en placa	
	2. Dilución en agar	
	3. Sistemas automatizados	

FUENTE: <http://minnie.uab.es/~veteri/21273/Practica%202.2009-10.pdf>

Cada sistema tiene sus ventajas y sus inconvenientes:

- El método de Kirby-Bauer es probablemente el más utilizado por su sencillez y, si se realiza correctamente, presenta una correlación muy buena con los métodos cuantitativos.(71)

- Algunos laboratorios trabajan con métodos semicuantitativos como el E-test. Estos sistemas son una modificación del método de Kirby-Bauer, en los que en lugar de discos se utilizan tiras de papel impregnadas con un gradiente del antibiótico, lo que permite una semi-cuantificación. (71)

- Los sistemas cuantitativos son los más exactos pero también los más laboriosos.(71)

### 1.17.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

La difusión en disco hace referencia a la difusión que experimenta un agente antimicrobiano a una determinada concentración a partir de discos, tiras o tabletas, que se depositan en un medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con el aislamiento del inóculo seleccionado en cultivo aséptico. El método de difusión en disco se basa en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco. (66)

La difusión de un antimicrobiano en un medio de cultivo inoculado crea un gradiente de la sustancia antimicrobiana. Cuando su concentración llega a ser tan diluida que no logra inhibir el crecimiento de la bacteria ensayada, termina la zona de inhibición. El diámetro de esta zona de inhibición alrededor del disco antimicrobiano se corresponde con la concentración mínima inhibitoria (MIC) para esa combinación concreta de bacteria y antimicrobiano. En otras palabras, la zona de inhibición se correlaciona de modo inversamente proporcional con el valor de la MIC para la bacteria ensayada. En general, cuanto mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento de los microorganismos. No obstante, esto depende también de la concentración del antibiótico en el disco y de su capacidad de difusión. (66)

Hay que advertir que las pruebas de difusión en disco basadas solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición, sin considerar su tamaño, no son aceptables como ensayos para la sensibilidad a los antimicrobianos desde el punto de vista metodológico.(66)

#### 1.17.2 MÉTODO DE GRADIENTE ANTIBIÓTICO (E-TEST)

Este es un método cuantitativo. El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test podemos, mediante lectura directa, determinar la CIM. (5)

Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CIM será el valor donde la elipse corta la tira. Las tiras deben conservarse a menos de 20°C y deben estar protegidas de la humedad. Antes de usarse se deben atemperar a temperatura ambiente durante por lo menos 30 minutos. Las placas de Petri con el medio de MH y la forma de sembrado es la misma que en el método de disco difusión. Luego se colocan las tiras sobre la superficie del agar. Se debe dejar absorber el inóculo de 10 a 15 min para asegurar que la superficie del agar esté completamente seca antes de aplicar las tiras. Debemos asegurarnos que la tira contacte completamente con la superficie del agar. No se deben mover las tiras una vez que han sido colocadas, ya que el antibiótico empieza a difundir rápidamente. Cuando se usa una placa de Petri de 100 mm depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, si se usa una de 150 mm no se deben colocar más de 6 tiras. Se incuba durante 16 a 20 hs a 37°C o según los requerimientos óptimos de la cepa bacteriana en estudio. Si colocamos la tira al revés no se observa elipse de inhibición, ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. Se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM, que se detalla más adelante. (5)

### 1.17.3 MÉTODOS DE DILUCIÓN EN UN MEDIO LÍQUIDO Y EN UN MEDIO SÓLIDO

La finalidad de estos métodos es determinar la concentración más baja del antimicrobiano ensayado que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria analizada (MIC, concentración mínima inhibitoria, que normalmente se expresa en mililitros o

miligramos/litro). Sin embargo, la MIC no siempre representa un valor absoluto. La "verdadera" MIC es un punto que se encuentra entre la concentración más baja del ensayo que inhibe el crecimiento de la bacteria y la siguiente concentración más baja del ensayo. Por tanto, se puede considerar que las determinaciones de la MIC utilizando una serie de diluciones tienen una variación inherente de una dilución.(66)

El rango de los antimicrobianos debería abarcar tanto los criterios de interpretación (sensibilidad, valor intermedio y resistencia) para una combinación específica entre bacteria y antibiótico como los microorganismos de referencia apropiados para el control de calidad. (66)

Los métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos que se basan en diluciones parecen ser más reproducibles y fáciles de cuantificar que los basados en difusión. Sin embargo, los antibióticos se ensayan normalmente mediante diluciones seriadas reduciendo la concentración a la mitad, lo que puede originar datos inexactos relativos a la MIC.(66)

Cualquier laboratorio que pretenda usar un método de dilución y utilizar sus propios reactivos y diluciones de antibióticos debería tener la capacidad de obtener, preparar y mantener un stock de soluciones de antimicrobianos con una pureza adecuada y generar diluciones de trabajo de modo regular. Por consiguiente, es importante que tales laboratorios usen microorganismos de control garantizado para asegurar la precisión y estandarización en sus procedimientos. (66)

#### 1.17.3.1 DILUCIÓN EN CALDOS DE CULTIVO

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas dobles) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución).

Existen en el mercado varios tipos de placas de microtitulación que contienen antibióticos prediluidos dentro de los pocillos de las placas. El uso de lotes idénticos de estas placas de microtitulación puede ayudar a reducir al mínimo la variación que puede surgir durante la preparación y dilución de los antimicrobianos que proceden de diferentes laboratorios. Dicho uso, junto a un protocolo de prueba documentado, que incluya la especificación de los microorganismos de referencia apropiados, facilitará la equivalencia de resultados entre laboratorios.(66)

Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antimicrobianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad para admitir cambios necesarios derivados del programa de control y seguimiento.(66)

Como la compra de placas antimicrobianas y de la infraestructura necesaria puede ser costosa, esta metodología no es viable para algunos laboratorios.(66)

#### 1.17.3.2 DILUCIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor MIC para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta.(66)

Las ventajas de los métodos de dilución en medio sólido son:

- a. La capacidad de ensayar simultáneamente varias bacterias, excepto las que se acumulan, en una misma placa de medio con agar.
- b. La mejora potencial en cuanto a la determinación de valores MIC por extensión del rango de concentraciones del antimicrobiano.

- c. La posibilidad de semi-automatizar el procedimiento mediante la utilización de un replicador del inóculo. Existen en el mercado unos replicadores de los inóculos que pueden transferir entre 32 y 36 inóculos bacterianos diferentes a cada una de las placas con medio sólido. (66)
- d. Los métodos de dilución en medio sólido tienen algunos inconvenientes; por ejemplo:
  - Si no están automatizados, son muy laboriosos y requieren importantes recursos económicos y técnicos.
  - Una vez preparadas las placas deben utilizarse al cabo de una semana.
  - Los puntos finales no son siempre fáciles de determinar ni resulta fácil verificar la pureza del inóculo. (66)

La dilución en medio sólido se recomienda a menudo como un ensayo estandarizado para medir la sensibilidad a los antimicrobianos de microorganismos difíciles de cultivar, como es el caso de los anaerobios y las especies *Helicobacter* y *Campylobacter*. (8, 64)

## **1.18 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **1.18.1 MÉTODO DE MITSCHER**

Se basa en el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar. En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua. (38)

### **1.19 *Artemia salina***

#### **1.19.1 DEFINICIÓN**

Del griego artemía que significa óptima conservación. Género de crustáceos branquiopodos del orden anostráceos, de pequeño tamaño llegando a alcanzar 10-15 mm en etapa adulta, y desprovistos de caparazón. Viven en las aguas salobres del litoral o del interior. Presentan razas anfigónicas y partenogenéticas, adaptadas a cada medio en particular. En las razas partenogenéticas son frecuentes las formas polipoides. (54)

Además la *Artemia Salina* posee el atributo de que sus huevos pueden resistir el permanecer deshidratados durante años. Dichos huevos se recogen con frecuencia en artesas, en las que tiene lugar la evaporación comercial del agua del mar. Se secan, se tamizan y se envasan para una conservación prolongada al vacío, se hallan disponibles en los comercios dentro de tarros o tubos de vidrio, en cantidades grandes o pequeñas, y como todos sabemos se utiliza como alimento en las experiencias de cultivo de diversos animales acuáticos. (54)

#### 1.19.2 TAXONOMÍA(54)

Domonio: Eukarya  
Reino: Animalia  
Phyllum: Artrópoda.  
Clase: Crustacea.  
Subclase: Branquiopoda.  
Orden: Anostraca.  
Familia: Artemiidae.  
Género: *Artemia*, Leach 1819.

El nombre específico *Artemia Salinano* es taxonómicamente válido en la actualidad.

Experiencias de cruzamiento entre diferentes poblaciones de *Artemia* han demostrado el aislamiento reproductivo de algunos grupos de poblaciones y ésto ha llevado al reconocimiento de especies hermanas (sibling) a las que se les han dado nombres diferentes.(54)

Entre las cepas bisexuales o zigogénicas de *Artemia* (poblaciones compuestas por individuos machos y hembras) se han descrito hasta la fecha 6 especies hermanas:

*Artemia salina*: Lymington, Inglaterra (extinguida).

*Artemia tunisiana*: Europa.

*Artemia franciscana*: América (Norte, Centro y Sur).

*Artemia persimilis*: Argentina.

*Artemia urmiana*: Irán.

*Artemia monica*: Mono Lake, CA-USA.

(54)

### 1.19.3 MORFOLOGÍA Y CICLO VITAL

Los huevos pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos períodos (incluso de 10 años) en condiciones de total ausencia de agua y oxígeno, y a temperaturas por debajo del punto de congelación. Esta característica inusual es llamada criptobiosis o diapausa; una vez el entorno es adecuado, la eclosión puede comenzar transcurridas las primeras ocho horas. (54)

El adulto alcanza un centímetro de largo en promedio, y su vida media es de un año. Este rápido desarrollo, y la habilidad de sus huevos para soportar largos períodos en condiciones desfavorables, la hacen un modelo invaluable en investigaciones biológicas, algunas incluso desarrolladas en el espacio exterior. Un conocido y repetido experimento escolar consiste en estudiar la variación de las condiciones de salinidad del ambiente en el desarrollo de las larvas de *Artemia*. (54)

Al eclosionar, las larvas nauplio tienen menos de 500 micras ( $5 \times 10^{-4}$  m). Se alimentan de fitoplancton, en especial algas de los géneros *Chlamydomonas*, *Tetrahedrony* y *Dunaliella*. En laboratorios y acuarios se les suele suministrar harinas de pescado, maíz osoya, y también se suele utilizar la clara de huevo. (54)

### 1.19.4 IMPORTANCIA DE LA *Artemia salina* EN INVESTIGACIONES

Actualmente, la *Artemia* se utiliza como especie de bioensayo para una variedad de objetivos tales como:

Investigación de la fuente de toxicidad en mezclas de sustancias químicas y muestras ambientales, tamizaje de toxicidad aguda de sustancias químicas, detección de toxinas naturales en comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias, y estudios de la transferencia trófica de contaminantes. (44)

El potencial de *Artemia* para investigación y aplicaciones en toxicología acuática se ha explorado desde 1975 en el Laboratorio de Investigación Biológica en Toxicología Acuática de la Universidad estatal de Ghent, Bélgica. En 1981 se desarrolló el primer ensayo estandarizado de ecotoxicología marina: el ensayo ARC (Agencia de Residuos Catalunya), que es un ensayo de 24 horas para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en nauplios de instares II y III. La confiabilidad y precisión de este ensayo fue investigada durante un extenso ejercicio de calibración involucrando a 80 laboratorios americanos y europeos, dando resultados muy satisfactorios. La experiencia obtenida desde entonces ha abierto el camino para mejorar uno de los ensayos de tamizaje más sencillos, más reproducible y rentable en toxicología acuática. (44)

## CAPÍTULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO

La presente investigación se desarrolló en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- Laboratorio de Fitoquímica.
- Laboratorio de Microbiología del departamento de Investigación y Desarrollo.

#### 2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 2.2.1 MATERIALES

###### 2.2.1.1 MATERIAL VEGETAL

Hojas y flores secas y pulverizadas de Iso(*Dalea mutisii* Kunth), vegetal que se recolectó en la Facultad de Ciencias y Mecánica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

###### 2.2.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- *Staphylococcus aureus* ATCC6538
- *Escherichia coli* ATCC 9637
- *Salmonella gallinarum* ATCC9184
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031
- *Candida albicans* ATCC 10231

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853
- *Artemia salina*
- *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.2.1.3 MATERIALES DE LABORATORIO

- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Vasos de precipitación de 250 y 500 mL
- Balones esmerilados de 250 y 1000 mL
- Trípode
- Termómetro
- Crisol
- Papel filtro
- Reverbero
- Varilla de agitación
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Cápsulas de porcelanas
- Pinza para tubos de ensayo
- Guantes de látex
- Mascarilla 3M
- Zapatones desechables
- Gorro folliodress desechable
- Matraces de Erlenmeyer de 125, 250 y 1000 mL
- Probetas 10, 100 y de 500 mL
- Embudo
- Papel toalla absorbente
- Frascos ámbar de 30, 50 y 4000 mL
- Papel aluminio
- Algodón
- Tijera
- Refrigerante
- Pinza universal
- Codo
- Espátula
- Lámpara de alcohol
- Picnómetro
- Cuba cromatográfica
- Placa de sílica gel
- Asa de platino
- Cajas petri
- Pera de succión
- Parafilm
- Gasas estériles
- Cinta testigo
- Aplicadores
- Bisturí
- Puntas estériles para micropipetas
- Micropipetas de 10, 20, 50, 100, 1000  $\mu$ L
- Fundas de tela
- Fundas de plástico
- Jeringa de 3 mL
- Pipeta Pasteur
- Lámpara

- Cinta adhesiva
- Mandil
- Tapones de caucho

### 2.2.2 EQUIPOS

- Balanza analítica (BOECO)
- Desecador
- Estufa (MEMMERT)
- Estufa de cultura (FANEM modelo 002 CB)
- Mufla (OPTIC IVYMEN SYSTEM)
- Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
- pH – metro (HANNA)
- Refractómetro
- Bomba de presión
- Cámara fotográfica
- Computadora HP
- Refrigeradora
- Bomba de oxígeno
- Cámara UV
- Autoclave
- Baño maría
- Esterilizador vía seca
- Ultrasonido
- Molino mecánico
- Vortex

### 2.2.3 REACTIVOS

- Alcohol potable 96%
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Borntrager
- Reactivo de Baljet
- Sudan III
- Solución de Cloruro Férrico al 5%
- Solución de Fehling A y B
- Cloroformo
- Cloruro de Sodio
- Hidróxido de Sodio
- Solución de Sulfato de Cerio
- Ácido Clorhídrico 1%
- Ácido Clorhídrico concentrado
- Granallas de Magnesio Metálico
- Acetato de Etilo
- Metanol
- Agua destilada
- Anhídrido acético
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Vainillina
- Alcohol amílico
- Éter di etílico
- Suero fisiológico
- Reactivo revelador y fases móviles

- de terpenos y revisar
- DMSO
- Solución de urea al 20%
- Caldo de soya tripticasa MERCK
- Agar de soya tripticasa MERCK
- Agar Sauboraud MERCK
- Agar Base sangre MERCK
- Agar EMB MERCK
- Agar Manitol MERCK
- Agar SIM MERCK
- Agar Christensen MERCK
- Agar citratado de Simmons MERCK
- Reactivo de Ehrlich

## 2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

### 2.3.1 RECOLECCIÓN

La planta de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) se recolectó en las proximidades de la Facultad de Ciencias y Mecánica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a 2750m.s.n.m., el día 06 de junio del 2012 con el criterio que debían ser especies vegetales de aproximadamente 50 cm de altura y con flores en forma de mazorca de color violeta.

### 2.3.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se tomó la planta entera y se procedió a prensarla, posteriormente se la llevó al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien identificó y certificó la clasificación científica del ejemplar.

### 2.3.3 PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- Se tomó la raíz y se eliminan impurezas y cuerpos extraños, sacudiéndola.
- Se lavó con abundante agua por varias pasadas o sumergiéndolas en un recipiente con agua.
- Se dejó escurrir exponiendo al sol por aproximadamente una hora, hasta secarla.
- Se procedió a deshojarla y desflorarla por separado.
- Se las tendió al aire libre sin la incidencia directa de la luz solar por 6 días.

- Una vez desecada se procedió a triturar las hojas y flores recolectando el producto en recipientes por separados.
- Se almacenó la droga evitando contacto con luz y humedad en recipientes de plásticos oscuros.

## 2.3.4 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO

### 2.3.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

#### **Método Gravimétrico**

Se pesó 2 g. ± 0.5 mg de droga cruda y se transfirieron a un pesa filtro previamente tarado y se secó a 100°C durante 3 horas. El papel filtro se puso en un desecador donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó; colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora y se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante. El ensayo se realizó por triplicado.(37)(42)(45)(47)

Cálculos:

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M} \times 100$$

#### **FÓRMULA N° 1.**

Donde:

H = Porcentaje de Humedad

M = masa de la muestra de ensayo (g).

M1= masa del pesa filtro con la muestra desecada (g)

M2 = masa del pesa filtro con la muestra de ensayo (g).

100 = factor matemático para los cálculos.

#### 2.3.4.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES.

Se determina la masa de no menos de 2.0g ni más de 3.0g de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0.5mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. Caliente suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinere en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante 2 horas.(37)(42)(45)(47)

Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por g (masa constante).(37)(42)(45)(47)

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min.(37)(42)(45)(47)

Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.(37)(42)(45)(47)

#### **Expresión de los resultados:**

$$C = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

#### **FÓRMULA N° 2.**

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M1= masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

#### 2.3.4.3 DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750 °C, durante 2h.(37)(42)(45)(47)

Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante. (18)(41)(47)(49)

Expresión de los resultados.

$$Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} \times 100$$

#### FÓRMULA N° 3.

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma =masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

Los valores se aproximan a las décimas.

#### 2.3.4.4 DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO.

A las cenizas totales obtenidas según la técnica, se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10min. Se lava el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se deseca de 100 a 105 °C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica) Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante.(37)(42)(45)(47)

#### Expresión de los resultados

$$B = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

#### FÓRMULA N° 4.

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

#### 2.3.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a una extracción sucesiva, al extracto se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto

es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto. Posteriormente se le realiza los siguientes ensayos.(42) (51)

#### 2.3.5.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).(42)(51)

#### 2.3.5.2 ENSAYO DE MAYER

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).(42)(51)

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.(42)(51)

#### 2.3.5.3 ENSAYO DE WAGNER

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.(42)(51)

#### 2.3.5.4 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.(42)(51)

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:(42)(51)

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.(42)(51)

**IMPORTANTE:** Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente. La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroideas de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.(42)(51)

#### 2.3.5.5 ENSAYO DE BORNTTRAGER

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el

residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).(42)(51)

#### 2.3.5.6 ENSAYO DE BALJET

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.(42)(51)

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo ( ++ y +++ ) respectivamente.(42)(51)

#### 2.3.5.7 ENSAYO DE SUDÁN

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos.(42)(51)

#### 2.3.5.8 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.(42)(51)

#### 2.3.5.9 ENSAYO DE RESINAS

Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.(42)(51)

#### 2.3.5.10 ENSAYO DE LA ESPUMA

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.(42)(51)

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.(42)(51)

#### 2.3.5.11 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. (42)(51)

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

#### 2.3.5.12 ENSAYO DE SHINODA

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.(42)(51)

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.(42)(51)

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.(42)(51)

#### 2.3.5.13 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.(42)(51)

#### 2.3.5.14 ENSAYO DE FEHLING

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:(42)(51)

Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.(42)(51)

Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.(42)(51)

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.(42)(51)

### 2.3.5.15 ENSAYOS DE PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES

El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.(42)(51)

### 2.3.6 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos blandos son líquidos espesos o masas semisólidas, que se obtienen por concentración de los licores extraídos sin llegar a sequedad. Generalmente cada gramo de licor extractivo es equivalente a 2-6 g de droga.(42)

Las principales técnicas extractivas son: maceración, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación y extracción continua.(42)

En esta investigación el método utilizado para realizar el extracto fue pormaceración de hojas y flores por separado de Iso (*Dalea mutisii* Kunth).

### PROCEDIMIENTO

- a.** En un recipiente de vidrio ámbar, se transfirió 700 g. de la droga cruda pulverizada (hojas y flores en cada recipiente) y se le añadió directamente etanol a 96% (se empleó por cada gramo de droga, 3mL de alcohol potable). Se homogenizó por agitación. Se maceró por 86 horas.
- b.** A las 86 horas días se transfirió a un Erlenmeyer de 1000mL todo el material líquido obtenido, en un proceso de decantación.
- c.** Con ayuda de un embudo cuyo orificio de salida se cubrió con algodón y papel toalla absorbente, se transfirió el líquido decantado a otro recipiente ámbar; consiguiendo de esta forma eliminar las impurezas y obtener solamente el extracto líquido de cada una de las partes del vegetal.

- d. El filtrado tanto de hojas como de flores fue sellado herméticamente y colocado en refrigeración por 16 horas.
- e. Se colocó 400 mL de extracto etanólico filtrado en un balón esmerilado de 1000 mL, y se inició el proceso de concentración del extracto mediante la utilización del rotavapor, a 250 rpm y 65 °C.
- f. El producto concentrado final obtenido se envasó en recipiente de vidrio ámbar estéril, sellado herméticamente con parafilm apto para el desarrollo del estudio microbiológico. Se refrigeró a 4°C y se mantuvo fuera del alcance de la luz y humedad.

### 2.3.7 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

#### 2.3.7.1 DETERMINACIÓN DEL pH.

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:(42)(45)

$$\text{pH} = - \log a [\text{H}^+]$$

a [H<sup>+</sup> ] = actividad de los iones hidrógeno.

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.(42)(45)

Se ajusta el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.(42)(45)

#### 2.3.7.2 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA.

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.(42)(45)

Primeramente pése el picnómetro vacío y seco a 25 ° C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 ° C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 15 min y ajústese el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso y seque exteriormente el picnómetro.(42)(45)

Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 ° C, después de limpiar el picnómetro.(42)(45)

#### **Expresión del resultado:**

La densidad relativa a 25 ° C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

#### **FÓRMULA N° 5.**

Donde:

M1 = peso del picnómetro con la muestra (g)

M2 = peso del picnómetro con la muestra (g)

M = peso del picnómetro vacío (g)

### 2.3.7.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.(42)(45)

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

#### FÓRMULA N° 6.

$$\eta = \frac{\text{Sen}i}{\text{Sen}r_r}$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada. Utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.(42)(45)

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.(42)(45)

#### **Expresión de los resultados:**

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002. Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:(42)(45)

$$N_{d25} = N_{dt} + 0.00044 (t-25)$$

### FÓRMULA N° 7.

Donde:

Nd25 = índice de refracción a 25 °C.

Ndt = Valor leído en la escala del aparato a la temperatura.

T = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C).

0.00044 = factor de correlación por Grados Celsius.

Los valores se aproximan hasta las milésima

### 2.3.7.4 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES.

La determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en estufa, hasta masa constante, se le asigna como sólidos totales. 5.0 mL del extracto se llevan a una cápsula previamente tarada a 105 °C, se evapora sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 horas). Se retira la cápsula de la estufa y se coloca, en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente. Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos. (42)(45)

#### **Expresión de los resultados:**

La cantidad de sólidos totales, expresado en %, R, se calcula por la siguiente fórmula;

$$St = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

### FÓRMULA N° 8.

Donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo (g).

P == masa de la cápsula vacía (g).

V = volumen de la porción de ensayo.

100 == factor matemático para el cálculo.

### 2.3.7.5 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS.

#### 2.3.7.5.1 DETERMINACIÓN DEL OLOR

Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.(42)(45)

#### 2.3.7.5.2 DETERMINACIÓN DEL COLOR

Se toma un tubo de ensayos bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. Se informa los resultados.(42)(45)

### 2.3.6 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES MEDIANTE TLC

- a.** Mezclar 1 g de droga en polvo con 10 mL de metanol por 5 min en un baño de agua (60°C)
- b.** Tomar 5 mL de la solución metanólica y concentrar hasta obtener 2 mL.
- c.** Colocar 3 mL de agua y 10 mL de acetato de etilo, agitar por 10 min.
- d.** Separar la fase de acetato de etilo y concentrar hasta obtener 1 mL.
- e.** Usar el concentrado para la cromatografía. (27)

### 2.3.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

**a.** Preparar el sistema de solventes y dejarlo reposar en la cuba cromatográfica tapada para saturar la misma.

**b.** Una vez que se ha concentrado el extracto de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) se aplica 10uL del concentrado en una placa cromatografía de sílica gel 60 F254 con la ayuda de un capilar.

**c.** Se deja secar después de cada aplicación.

**d.** Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.

**e.** Se retira de la cuba y dejar secar para luego observar en la lámpara UV 365 nm.

**f.** Finalmente se revela la placa y dejar secar, calentar en la estufa y anotar los Rf.

### **Aceite esencial (20)**

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: Acetato de etilo:Tolueno

Proporción: (7:93)

Revelador: Ácido sulfúrico - vainillina

### **Triterpenos (20)**

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes:Tolueno : Cloroformo : Etanol

Proporción: (40:40:10)

Revelador: Solución de Sulfato de Cerio

### **Flavonoides**

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes:

- Tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (36:12:5)
- Tolueno-acetato de etilo-ácido acético (36:12:5)
- N-hexano-acetato de etilo-ácido acético (31:14:5)
- Tetracloruro de carbono-acetona-ácido fórmico (35:10:5)

Revelador: Solución de Sulfato de Cerio

**Cálculo:**

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida de la muestra}}{\text{distancia recorrida del solvente}}$$

**2.3.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

**2.3.8.1 ENSAYO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA**

- Reactivos y técnica
- Extracto enzimático

Se homogeneiza 10g de pulpa de manzana en 20 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético 20mM (pH 5). Se centrifuga a 20.000 rev/min y se utiliza el sobrenadante como solución enzimática.

**2.3.8.2 BUFFER**

Acetato de sodio/ácido acético 20mM pH 5. Se prepara primeramente las soluciones de acetato de sodio y ácido acético de la siguiente manera:

- Solución concentrada A: se diluye 11,55mL de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) en un litro de agua destilada (solución 0.2M)
- Solución concentrada B: se diluye 16.41g de acetato de sodio anhidro ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) ó 27.22g de acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) en un litro de agua destilada (solución 0.2M también)

Se mezclan los volúmenes de soluciones concentradas presentadas a continuación, y se aforó a 100mL, con agua destilada para obtener los valores mencionados de pH.

mL A	mL B	pH final
14.8	35.2	5.0

#### 2.3.8.3 SUSTRATO

Catecol 0.5M preparado en el buffer acetato. Para lo cual se pesa exactamente 0.2752g de catecol (peso molecular 110.06g/mol) y se diluye con 5mL de buffer acetato de sodio/ácido acético cantidad que es suficiente para los análisis. Cabe destacar que el catecol se prepara para cada análisis ya que se degrada fácilmente por factores ambientales tales como la luz y el oxígeno del aire.

#### 2.3.8.4 MUESTRA A ENSAYO

Las muestras de las que se mide la capacidad antioxidante son preparadas a tres diferentes concentraciones 10.000 µg/mL, 1.000 µg/mL y 100 µg/mL, de manera que al ser agregadas las otras sustancias las concentraciones finales son de: 1000 µg/mL, 100 µg/mL y 10 µg/mL.

A estas muestras se las prepara pesando 0.0500g del extracto de la planta (se anota en el libro record exacta) se pasa a un vial limpio y seco diluyéndolo con 5mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) lo que da como resultado tener una solución con una concentración de 10.000 µg/mL.

Sucesivamente se realiza diluciones al décimo para obtener las concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL. Al agregar las otras soluciones como son el catecol, el extracto enzimático y el buffer se obtiene las siguientes concentraciones: 1000 µg/mL, 100 µg/mL y 10 µg/mL que se consideran responsables de la actividad antioxidante.

#### 2.3.8.5 ANTIOXIDANTE

Como agente antioxidante positivo se utiliza la vitamina C a una concentración de 1000 µg/mL que al final de la dilución con el catecol, el extracto enzimático y el buffer resulta ser de 100 µg/mL. Dicha solución se la prepara diluyendo 0.0500g de vitamina C en 5mL de buffer 10.000 µg/mL, se la diluye al décimo con buffer y se obtiene la solución de 1000 µg/mL.

La solución de solvente, la muestra, el sustrato, y las enzimas se realizan directamente a la cubeta en la cual se llega a un volumen final de 1mL. Se da inicio a la recolección mediante la adición de extractos enzimáticos y se comienza inmediatamente a leer y anotar la absorbancia.

Se anotan los resultados que da el fotómetro cada 15 segundos desde el inicio del experimento hasta que hayan transcurrido 120 segundos. Es decir se realizan ocho lecturas.

Primeramente se lleva a cero el aparato con buffer acetato, ya que este es el solvente que interviene en mayor volumen dentro del experimento. Se lee primeramente el blanco, luego las diluciones de muestra de menor a mayor concentración y por ultimo un testigo positivo, la vitamina C a 100 µg/mL que efectivamente tiene poder antioxidante. Este procedimiento se repite por dos ocasiones más en cada muestra.

A continuación se expone el esquema del procedimiento a seguir:

<b>Volumen en mL</b>	<b>Blanco</b>	<b>Muestra 1° dilución</b>	<b>Muestra 2° dilución</b>	<b>Muestra 3° dilución</b>	<b>Antioxidante Vitamina C</b>
<b>Buffer Acetato</b>	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7
<b>Sustrato catecol</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Muestra</b>	-	0.1	0.1	0.1	-
<b>Extracto Enzimático</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Antioxidante</b>	-	-	-	-	0.1

Se considera como inhibición nula la absorbancia correspondiente al blanco, en el que las enzimas actúan libremente sobre el catecol. Asimismo, se toma como inhibición absoluta la que presenta la cubeta con el antioxidante de poder previamente probado.

El porcentaje de inhibición se determina relacionando la lectura del blanco con la lectura de cada uno de los extractos.

FUENTE: BQF. FAUSTO CONTERO

### 2.3.9 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES.

#### 2.3.9.1 MÉTODO DE CONTEO DE AEROBIOS MESÓFILOS TOTALES EN PLACA.

- Pesar 25g de tintura en un erlenmeyer estéril
- Agregar 250 mL de agua peptonada al 0.1% estéril y homogenizar; de este modo se obtiene una dilución de  $10^{-1}$
- Dejar reposar por 1h
- De esta dilución, tomar 1 mL y mezclar con 9 mL de agua peptonada 0.1 % y obtener una dilución  $10^{-2}$
- De este modo realizar otras diluciones
- Se preparan tubos de ensayo tapa rosca con 15 mL de medio de cultivo PCA (plate count Agar).
- A cada tubo con ágar se adiciona 1 mL de la dilución preparada en el agua peptonada al 0.1%
- Homogenizar en un vortex, y el contenido de cada tubo verter en cajas petri
- Incubar a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 h
- Transcurrido este tiempo, realizar la lectura. Contar las colonias que se desarrollan y se anota el resultado de las placas con mayor número de colonias. (8) (51)

#### 2.3.9.2 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES

##### a. PRUEBA PRESUNTIVA.

- Pesar 25g de tintura en un erlenmeyer estéril
- Agregar 250 mL de agua peptonada al 0.1% estéril y homogenizar; de este modo se obtiene una dilución de  $10^{-1}$
- Dejar reposar por 1h

- De esta dilución, tomar 1 mL y mezclar con 9 mL de agua peptonada 0.1 % y obtener una dilución 10<sup>-2</sup>.
- Incubar por 24 – 48 h a 35 ± 2°C
- Observar si existe turbidez en el caldo lactosado y/o presencia de burbujas en la campana Durham (fermentación con formación de gas)
- Prueba Confirmatoria
- De los tubos positivos en el caldo lactosado tomar 2 o 3 asadas y sembrar en tubos 10 mL de caldo Brilla
- Incubar por 24 – 48 h a 35 ± 2°C
- Observar si existe turbidez en el caldo lactosado y/o presencia de burbujas en la campana Durham (fermentación con formación de gas)
- Los resultados se interpretaran según el Tabla No. 7. (8) (51)

**TABLA No. 7. INTERPRETACIÓN DE NMP PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES.**

<b>Combinación de tubos</b>	<b>NMP</b>	<b>Combinación de tubos</b>	<b>NMP</b>
0-0-0	Menor que 3	3-0-0	23
0-0-1	3	3-0-1	39
0-1-0	3	3-0-2	64
1-0-0	4	3-1-0	43
1-0-1	7	3-1-1	75
1-1-0	7	3-1-2	120
1-1-1	11	3-2-0	93
1-2-0	11	3-2-1	150
2-0-0	9	3-2-2	210
2-0-1	14	3-3-0	240
2-1-0	15	3-3-1	260
2-1-1	20	3-3-2	1100
2-2-0	21	3-3-3	Mayor que 2400

**FUENTE:** PILCO, G. COMPROBACIÓN DEL EFECTO ADELGAZANTE DE LA TINTURA DE APIO (*Apium graveolens*) Y EL PEREJIL (*Petroselinum sativum*) EN VOLUNTARIOS CON SOBREPESO. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. P.p. 33-74

### 2.3.9.3 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES.

#### a. PRUEBA PRESUNTIVA.

Se procede de igual forma que en la prueba presuntiva para Coliformes totales.(8)

#### b. PRUEBA CONFIRMATORIA.

- De los tubos positivos en caldo lactosado tomar 2 ó 3 asadas y sembrar en tubos
- 10 mL de caldo EC.
- Incubar por 24-48 h a  $35 \pm 2^\circ$  C.
- Observar si existe turbidez en el caldo lactosado y/o presencia de burbujas en la campana Durham (fermentación con formación de gas).
- Los resultados se interpretaran según la tabla de NMP. (8) (51)

### 2.3.9.4 MÉTODO DE CONTEO DE MOHOS EN PLACA

- Pesar 25 g de tintura en un erlenmeyer estéril.
- Agregar 250 mL de agua peptonada al 0.1% estéril y homogenizar; de este modo se obtiene una dilución de 10-1.
- Dejar reposar por 1 hora.
- De esta dilución, tomar 1 mL y mezclar con 9 mL de agua peptonada 0.1% y obtener una dilución de 10-2.
- Preparar cajas petri con medio de cultivo OGY.
- Sobre las cajas petri colocar 0.1 mL de las diluciones respectivas y extender mediante un extensor de vidrio.
- Incubar a temperatura ambiente por 5-7 días.
- Realizar el contaje.
- El recuento del número de colonias formadas no debe ser mayor de 100 Colonias/caja. (8) (51)

### 2.3.10 BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Artemia salina*

#### 2.3.10.1 INTRODUCCIÓN

El bioensayo con *Artemia salina* es un método que permite determinar citotoxicidad en la larva de este crustáceo que es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas. La toxicidad se expresa como CL<sub>50</sub> (concentración letal 50)

Día 1

- A. Se prepara agua mar según las instrucciones del envase (3,8 g de sal de mar comercial en 100 mL de agua destilada). Se filtra.
  
- B. Se colocan aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un Erlenmeyer con 350 mL de agua de mar. Se colocan en un lugar con luz (artificial o natural). Se les coloca una bomba de oxígeno con burbujeo lento.

Día 2

- A. Se transfiere la mayor cantidad de nauplios vivos a un matraz Erlenmeyer con agua de mar fresca.
  
- B. Se pesan 20 mg de muestra.

Día 3

- A. Se disuelven 20 mg de la muestra en 2 mL del disolvente, de la siguiente forma: las muestras polares se disuelven en 2 mL de agua destilada y las muestras apolares, se disuelven en 0,5 mL de DMSO y 1,5 mL de agua destilada (lo que hace un total de 2 mL). A partir de esta solución, se preparan diluciones de 1000, 100 y 10 ppm, transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5 uL respectivamente. Son tres viales por cada concentración (9 en total). Se hace un control por muestra. Si la muestra es apolar debe agregarse al control 50uL de DMSO.
  
- B. Los nauplios están listos para el ensayo. A cada vial se le agregan 10 nauplios (30 nauplios por dilución) y la dilución del extracto requerida. Luego, se agrega

agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agrega además, una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca se disuelven en 5 mL de agua de mar) como alimento.

Nota: los nauplios pueden ser utilizados entre 48-72 horas después de que se ha iniciado la incubación; sin embargo luego de 72 horas deben ser descartados.

Día 4

- A. Después de 24 horas, se cuenta y anota el número de sobrevivientes en cada dilución.
  
- B. Se analizan los datos con el programa de computadora Fineey (DOS) para determinar valores CL<sub>50</sub>. Los valores de CL<sub>50</sub> menores que 1000 ppm son considerados activos.

FUENTE: MANUAL DE TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN DEL CYTED, MARZO 1995

### 2.3.11 REACTIVACIÓN DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS ATCC

#### 2.3.11.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS

##### **A. PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO SOYA TRIPTICASA**

Se preparó una cantidad suficiente de caldo soya tripticasa y se reparten 25mL en 6 Erlenmeyers individuales de 125mL previamente estériles, con tapones de gasa y algodón. Se autoclavó a 121°C, 15 psi por 30 minutos y se enfrió para la suspensión de bacterias.(46)

##### **B. PREPARACIÓN DE AGAR BASE SANGRE, AGAR EOSINA Y AZUL DE METILENO, AGAR SABOURAUD Y AGAR MANITOL**

Se preparó una cantidad determinada de agar base sangre, eosina, saboraud y manitol en 4 Erlenmeyers de 1000mL respectivamente. Se llevaron a ebullición y se autoclavaron a 121°C, 15 psi durante 30 minutos. Ya preparados y esterilizados se repartió en cajas petri

una cantidad de 15mL. Al enfriar se invirtieron y almacenaron en refrigeración en bolsas plásticas.(46)

En el caso de agar base sangre, una vez preparado y esterilizado el medio se dejó enfriar hasta una temperatura de 45-50°C y se le añadió en condiciones asépticas, del 15 al 10 % de sangre. Seguidamente se homogenizó y se repartió en cajas petri.(46)

### **C. PREPARACIÓN DE AGAR PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Se preparó una cantidad suficiente de agar Kligler, agar SIM, agar citratado de Simmons y Urea en 4 erlenmeyers de 500 mL respectivamente. Se llevaron a ebullición y se autoclavaron a 121°C, 15 psi durante 30 minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente. Se repartió 3mL de cada agar preparado en tubos de 75x100mm previamente estériles con su tapa. Se inclinaron con el pico flauta bastante largo sin que este toque el tapón de caucho, procurando dejar 1 cm de altura en la base del mismo; excepto SIM, el mismo que se dejó enfriar en posición vertical. En el caso de Urea al bajar la temperatura se colocó una cantidad suficiente de reactivo de urea al 20% previamente estéril y filtrada y se procedió de la misma manera.(46)

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se los almacena en gradillas con fundas plásticas en refrigeración.(46)

### **D. PREPARACIÓN DE REACTIVO DE EHRLICH**

Se utiliza la siguiente fórmula:

- Para-dimetilaminobenzaldehído: 2g.
- Alcohol etílico de 95°: 190 mL.
- Ácido clorhídrico concentrado: 40 mL.

Disolver el aldehído con el alcohol y agregar lentamente el ácido con agitación constante. El reactivo es de color amarillo y se almacena protegido de la luz en un frasco ámbar previamente estéril a 4°C.(46)

## **E. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE ÚREA**

Para el estudio se realizó una solución de úrea al 20%. Pesar 20 gramos de úrea deshidratada y disolver en 100mL de agua destilada. Si es necesario esterilizar por filtración. Almacenar protegido de la luz a temperatura de 4°C.(46)

## **F. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)**

Se preparó una cantidad suficiente de agar Soya Tripticasa (TSA), se llevó a ebullición y se repartió 6 mL en tubos individuales 100x13 mL de capacidad. Se autoclavaron a 121°C, 15 psi por 30 minutos. Los tubos con TSA se colocaron a un ángulo aproximado de 45° de manera que puedan inclinarse y se solidifiquen. Se pueden mantener a temperatura ambiente hasta el momento de usar, bien tapados y envueltos en fundas plásticas.(46)

### **2.3.11.2 SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS ATCC**

Se verifica las cepas ATCC encontradas y almacenadas en el laboratorio y con ayuda de hisopos estériles se tomó una cantidad adecuada y se suspendieron a un ángulo de 45° en cada Erlenmeyer (previamente codificado) que contiene los 25mL de caldo soya tripticasa. Se incubaron a 35°C durante 24 horas. (46)

### **2.3.11.3 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS ATCC**

Se verifica si existe crecimiento de los microorganismos que deseamos reactivar, para ello nos fijamos en la turbidez de los Erlenmeyers lo cual es el primer indicativo. Por medio de un asa estéril, y enfriándola en las paredes del Erlenmeyer, se introdujeron para obtener una pequeña cantidad de muestra y se sembraron en las respectivas cajas petri codificadas con el microorganismo a reactivar, que contienen agar sangre, EAM y Saubouraud, éste último en el caso de *Candida albicans*. Se incuban a 35°C por 24 horas.(46)

#### 2.3.11.4 LECTURA DE CAJAS INCUBADAS

Se tomaron las cajas petri sembradas del día anterior y se observó si existe crecimiento en cada una de ellas. Se observaron las características macroscópicas de cada colonia y se realizan las pruebas bioquímicas necesarias para verificar si el microorganismo obtenido es el deseado o una contaminación.(46)

#### PROCEDIMIENTO

- En el caso de *Staphylococcus aureus* se debe tomar una colonia crecida en agar sangre con el asa estéril y se siembra en agar Manitol. Se deja incubar a 35°C por 24 horas.(46)
- En el caso de *Candida albicans* la observación macroscópica es clara en agar Sauboraud y su olor. Pero se realiza un fresco y Gram para determinar microscópicamente las colonias de hongos.(46)
- Las características macroscópicas en agar EMB de *Escherichia coli* son suficientes para verificar la bacteria sin embargo se realiza pruebas bioquímicas, como a todas las enterobacterias y bacterias Gram negativas. (46)
- Para la realización de pruebas bioquímicas se toma una colonia crecida en EMB con aguja de inoculación estéril y se siembra en cada una de las pruebas bioquímicas esto es en Kligler, Citrato y Urea, en agar pico flauta se hace picadura y estriamiento, mientras que para la prueba de Indol se inocula en picadura hasta 1cm de altura de la base del agar. Los tubos se dejan incubar a 35°C semi-tapados por 18 horas.(46)

En caso de no existir crecimiento en las cajas petri, se siembra nuevamente.

#### 2.3.11.5 ALMACENAMIENTO DE MICROORGANISMOS ATCC REACTIVADOS

Al obtener y comprobar la existencia de las cepas reactivadas de los microorganismos ATCC, con un asa estéril se tomó una asada directamente de agar EMB o de las pruebas bioquímicas realizadas (Manitol en el caso de *S. aureus*; Kligler en el caso de *E. coli*) y se sembraron por estriamiento en tubos codificados de TSA que se mantuvieron

almacenados a temperatura ambiente. Se incubaron por 18-24 horas a 35°C. Al día siguiente se almacenan en gradillas y se realiza un sellado hermético para evitar la contaminación.(46)

### 2.3.12 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS Y FLORES DE Iso (*Dalea mutisii* Kunth)

#### 2.3.12.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS. (Día 1)

##### **A. PREPARACIÓN DE SUERO FISIOLÓGICO (0,85%)**

Se preparó 100mL de suero fisiológico al 0,85% y se coloca en un envase de tapa rosca, seco y libre de impurezas que proteja al producto de la luz. Se autoclavó a 121°C, 15 psi por 30 minutos, semi-tapado de manera que el vapor esterilice el producto. Puede mantenerse en refrigeración a 4°C hasta el momento de usar.(46)

##### **B. PREPARACIÓN DE AGUA ESTÉRIL**

Se colocó 200mL de agua destilada en un envase de tapa rosca, seco y libre de impurezas. Se autoclavó a 121°C, 15 psi por 30 minutos. Se mantiene en refrigeración hasta el momento de usar.(46)

##### **C. ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES**

Se preparó todo el material necesario para realizar el estudio por triplicado. Estos materiales sean de vidrio o plástico se los colocan en fundas de tela etiquetadas, clasificándolos en tubos, tapas, viales, balones, puntas, etc. Se autoclavaron a 121°C, 15 psi durante 50-55 minutos. Se coloca en una estufa para secarlas a 90°C y se almacena en un lugar aséptico en las mismas fundas de tela sin abrirlas hasta el momento de usarlos.(46)

#### 2.3.12.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ENSAYO (Día 2)

#### **A. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA EL ENSAYO**

- Se tomó el extracto seco y se colocó en viales estériles y secos, bien tapados y se mantuvo protegido de la luz y el calor.
- Se tomó un vial estéril y seco y se pesó en una balanza analítica e informo resultados. Con un aplicador de punta estéril se pesó con precisión 40mg de extracto en el vial. Se añadió 400µL. de DMSO y se disolvió con ayuda de ultrasonido.
- Se tapa y se deja en reposo hasta el momento de su uso. A éste vial lo codificamos con el nombre de la planta.

#### **B. PREPARACIÓN DE CALDO SOYA TRIPTICASA (TSB)**

Se preparó una cantidad suficiente de caldo de Soya Triptica (TSB) y se repartió 25 ml en 4 erlenmeyers individuales de 125 mL de capacidad, previamente esterilizados. Se autoclavarón a 121°C por 30 minutos.(46)

#### **C. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA**

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella galinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Candida albicans* ATCC 10231
6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- Se llevó a temperatura ambiente los 6 erlenmeyer que contenían 25 mL de TSB estéril y se codifico con el nombre de los microorganismos ATCC y la fecha.
- Utilizando aplicadores estériles se tomó una cantidad de los microorganismos ATCC de los tubos inclinados (TSA) que los contienen y se transfirieron independientemente a los erlenmeyer codificados.
- Los erlenmeyer se incubaron a 35°C por 18-24 horas.

#### **D. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)**

Se preparó 630mL de agar soya triptica (TSA) y se repartió 15mL en 42 tubos 25X150 mm de pírex individuales cada uno con su tapa o tapón. Se autoclavaron a 121°C por 15 minutos. Se mantienen a 45°C hasta el momento de usarlos.(46)

#### **E. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI CON EL EXTRACTO**

- Se inicia con el vial de la disolución del extracto en DMSO, que se codificó con el nombre del extracto de la planta. Cuya concentración final del extracto fue 10.000 µg/mL. El estudio es por duplicado por lo tanto el mismo procedimiento hacemos dos veces.
- Se codificó las cajas Petri estériles con el nombre del extracto, la concentración final y el tratamiento (dos cajas para cada concentración 10.000, 1000, 100 µg/ml).
- En un tubo con TSA estéril a 45°C, se adicionó 100µL de la disolución del extracto en DMSO, se mezcla con ayuda del vortex e inmediatamente dispensamos en una caja petri codificada y se dejó en reposo hasta solidificarla.
- Se realizó una dilución al decimo, utilizando tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración 10.000 µg/mL y así obtenemos una dilución 1/10, dando una concentración final de 1000 µg/mL.
- Se pipeteó 100 µL de la disolución de concentración 1000 µg/ml a los tubos 25x150mm pírex que contenían 15 ml de TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre del extracto y de la concentración y tratamiento. Se dejaron solidificar.
- Se realiza otra dilución 1/100 en tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración 1000 µg/mL, obteniendo una concentración final de 100 µg/mL.(46)
- Se pipeteó 100 µL de la dilución de concentración 100 µg/mL a los tubos 25x150mm pírex grandes que contenían 15 ml de TSA 45°C. Se mezclaron en el vortex e inmediatamente se dispensaron en las cajas petri previamente codificadas.(46)

- Una vez solidificado el medio de cultivo que contienen los extractos se invirtieron las cajas y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas, dentro de una bolsa de tela.(46)

## **F. PREPARACIÓN DE CAJAS BLANCO**

- Se codificaron 2cajas petri estériles con el nombre de blanco (TSA, DMSO).
- Se tomaron tubos de TSA 45°C e inmediatamente se colocaron en las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco TSA. Dejar solidificar.
- Se pipetearon 100 µL de DMSO a los tubos que contenían TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se dispensaron a las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco + DMSO. Dejar solidificar.
- Una vez solidificado el medio de cultivo que contenía los blancos se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente durante 18-24 horas recubiertos por bolsas de tela.(46)

### 2.3.12.3 PREPARACIÓN DE LA SIEMBRA (Día 3)

#### **A. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI**

- Las cajas petri preparadas en el día 2 no deben tener contaminación alguna, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado.
- Todas las cajas petri se dividieron con marcador en cuatro partes iguales y se marcaron del 1 al 6, representando cada uno a los microorganismos testados. (46)

#### **B. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES SALINAS DE LOS MICROORGANISMOS**

- Se colocó 10mL de suero fisiológico en 4 tubos de 15x150 limpios, secos y estériles. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se codificaron con el nombre de cada microorganismo.

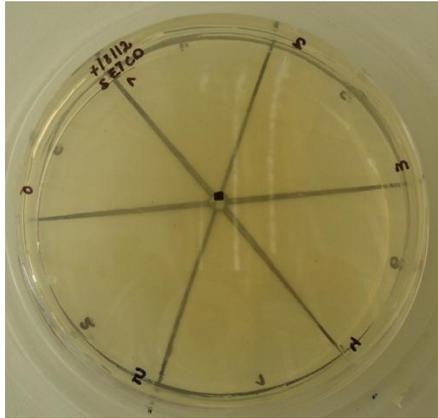
- Sacamos los erlenmeyer incubados por 24 horas desde el día anterior a 35°C, debiendo estar visiblemente turbios, y se mezcla ligeramente para evitar sedimentos, a partir de éstos se realizaron las suspensiones de los microorganismos.
- Se pipeteó 100 µL de la suspensión, a los tubos que contenían los 10mL de suero fisiológico 0,85%. Se mezclaron con ayuda de un vortex. Siendo éstas las suspensiones:

(46)

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538  
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
2. *Escherichia coli* ATCC 9637  
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
3. *Salmonella galinarum* ATCC 9184  
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
4. *Candida albicans* ATCC 10231  
1 mL susp. /10mL sol. Salina
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
100 µl susp. / 10 ml sol. Salina

### **C. ESTRIADO DE MICROORGANISMOS**

- A partir de las suspensiones de los microorganismos en la solución salina y utilizando varias asas de platino (4 asas microbiológicas con una capacidad de 5 µL) esterilizadas y enfriadas entre un estriado y otro, se tomó una asada de cada microorganismo en su turno y se estrió en un patrón radial en cada caja petri, a 0,5cm del borde la caja y del centro de la misma, siguiendo la plantilla.(46)



FOTOGRAFÍA No. 2. PLANTILLA PARA ESTRIADO DE MICROORGANISMOS.

- Las suspensiones de los microorganismos se agitaron en un tiempo determinado para evitar la sedimentación.
  - Al compartir la labor del estriado se estrió todas las cajas petri con un microorganismo dado. Por ejemplo iniciamos con *Staphylococcus aureus*, estriamos todas las cajas con esa misma bacteria y finalizado iniciamos con la bacteria dos.
  - Cuando todas las cajas petri fueron estriadas con todos los microorganismos se invirtieron y se incubaron a 35°C por 18-24 horas. Se incuban boca abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento. Es necesario dejar incubar por 18-24 horas más, es decir total 48 horas.
- (46)

#### 2.3.12.4 LECTURA DE RESULTADOS (Días 4 y 5)

- Las cajas se sacaron de la incubadora y fueron examinadas el día cuatro, contra los blancos.
- Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se debe, reincubar y leer el día cinco.
- Las cajas petri se sacan de la incubadora y se examinan, es más apropiado realizar la lectura al quinto día (especialmente por el crecimiento de *Candida albicans*).
- Existe actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima CIM es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.
- A éste estudio se lo clasifica en tres parámetros de lectura:

**A** = Activo (No existe crecimiento)

**P**= Parcialmente Activo (poco crecimiento)

**I**= Inactivo (existe crecimiento)

- Si el microorganismo es morfológicamente alterado, por ejemplo si *Ps. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como **P**.
- Las cajas petri de control debe tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo blanco y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así, el experimento ha fallado y debe ser repetido.

La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja lejos de la línea rayadas, es señal de contaminación se pueden generalmente ignorar.(46)

## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA DE ISO (*Dalea mutisii*)

CUADRO No. 1. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LAS DROGAS SECAS Y PULVERIZADAS DE ISO (*Dalea mutisii*Kunth).LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO 2012.

PARÁMETRO	HOJAS	FLORES	REFERENCIA INEN 1602
Humedad	9,28±0,22	11,69±0,23	Hasta 14%
Cenizas totales	6,19±0,17	6,04±0,02	Hasta 7%
Cenizas solubles en agua	4,67±0,16	3,84±0,55	Hasta 7%
Cenizas insolubles en HCl	1,77±0,20	1,76±0,33	Hasta 7%

Los resultados expresados en la Cuadro No. 1 nos indica que el contenido de humedad de las hojas fue de 9,28% y de las flores de 11,69%; valores que se encuentran dentro del máximo permitido para una droga cruda que es de 14%según INEN 1602; para llegar a este porcentaje se tuvo que desecar la planta, ya que un nivel de humedad por encima del 14% puede contribuir a hidrolizar los principios activos presentes y al crecimiento bacteriano.

Las hojas presentaron presentaron 6,19% de cenizas totales, 4,67% de cenizas solubles en agua y 1,77% de cenizas insolubles en HCl; mientras que las flores contienen 6,04% de cenizas totales, 3,84 de cenizas solubles en agua y 1,76% de cenizas insolubles en HCl. Todos estos valores se encuentran dentro del parámetro normal, el cual es hasta 7% de contenido según la Norma Ecuatoriana de FitoterápicosINEN 1602.

### 3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO ISO (*Dalea mutisii*)

CUADRO No.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO 2012.

PARÁMETRO	EX. HOJAS	EX. FLORES
pH	5,99	5,60
Densidad relativa	0,96	0,88 g/mL
Índice de refracción	1,371	1,382
Grados Brix	25,4	32
Sólidos totales	8,11±4,53	10,42±6,46

El pH de las hojas fue de 5,99 y el de las flores de 5,60, lo que indica que las flores contienen mayor cantidad de compuestos ricos en iones  $H^+$ , como los de naturaleza fenólica.

La densidad relativa (respecto a la del agua) del extracto de flores es de 0,88 g/mL mientras que el extracto de hojas evidenció 0,96 g/mL, indicativo que ambos extractos son ricos en componentes de naturaleza apolar, pudiendo ser estos terpenos y, la concentración de dichos componentes es más abundante en las flores que en las hojas.

Los °Brix de las hojas fue de 25,4 mientras que de las flores de 32, indicativo que las flores contiene mayor cantidad de azúcares que las hojas, esto es corroborable con el olor del extracto de flores el cual emanaba cierta esencia azucarada.

Los resultados del índice de refracción para las hojas fueron de 1,371 y sólidos totales de 8,11; mientras que el extracto de flores presentó un índice de refracción de 1,382 y sólidos totales de 10,42; al comparar estos resultados con el índice de refracción del agua el cual es de 1,333 se interpreta que los extractos poseen componentes disueltos en el mismo, siendo el de flores el que posee mayor cantidad.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE ISO (*Dalea mutisii*).

CUADRO No. 3. DETERMINACIÓN ORGANOLÉPTICA DEL EXTRACTO DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBAJUNIO 2012.

PARÁMETRO	EX. HOJAS	EX. FLORES
Aspecto	Siruposo	Siruposo
Color	Canela oscuro	Canela oscuro
Olor	Característico a alcohol	A ciruelas, agradable
Sabor	Astringente	Astringente

En la determinación organoléptica de los extractos de hojas y flores; el olor de los mismos es característico del solvente utilizado en la maceración sin embargo el de flores presentaba adicionalmente un olor a ciruelas por su alto contenido de azúcares con relación al de hojas; de igual el color de ambos fue canela oscuro; el sabor de ambos es astringente debido al empleo de alcohol absoluto como solvente. El aspecto de ambos extracto fue siruposo.

### 3.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

CUADRO No.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO 2012.

ENSAYO	METABOLITO	RESULTADOS		EXTRACTO
		HOJAS	FLORES	
<b>Sudán III</b>	Aceites y grasas	+	+	Etéreo
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	-	Etéreo
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	Etéreo
<b>Baljet</b>	Lactonas y y cumarinas	-	+	Etéreo
<b>L-B</b>	Triterpenos y/o esteroides	+++	+++	Etéreo
<b>Catequinas</b>	Catequinas	++	-	Alcohólico
<b>Resinas</b>	Resinas	-	-	Alcohólico

<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	++	+++	Alcohólico
<b>Baljet</b>	Lactonas y cumarinas	-	+	Alcohólico
<b>L-B</b>	Triterpenos y/o esteroides	+++	+++	Alcohólico
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Taninos	+++	+++	Alcohólico
		(verde intenso)	(verde intenso)	
<b>Borntrager</b>	Quinonas	+++	+++	Alcohólico
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	++	++	Alcohólico
		(amarillo)	(anaranjado)	
<b>Antocianidina</b>	Flavonoides	+++	+++	Alcohólico
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	-	Alcohólico
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	Alcohólico
<b>Espuma</b>	Saponinas	-	-	Alcohólico
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	-	Acuoso
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	-	Acuoso
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Taninos	+++	+++	Acuoso
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	+++	+++	Acuoso
		(amarillo)	(rojo)	
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	+++	+++	Acuoso
<b>Espuma</b>	Saponinas	-	-	Acuoso
<b>Mucílagos</b>	Mucílagos	-	-	Acuoso
<b>Principios amargos</b>		+++	++	Acuoso

+++: Alta evidencia

++: Evidencia

+: Baja evidencia

-: Negativo

Los resultados de la Cuadro No. 4 nos indican la presencia abundante de flavonoides y terpenos. Otros compuestos existentes fueron: taninos, triterpenos, quinonas y azúcares, este último abundante especialmente en las flores, de igual manera en este se evidenció la presencia de lactonas.

### 3.5 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

CUADRO No. 5. RESULTADOS DE TLC PARA ACEITE ESENCIAL DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

Banda	R <sub>f</sub>	Compuesto identificado
1	0,40	Cineol
2	0,46	Carvona
3	0,52	Timol
4	0,64	Geranyl acetato
5	0,70	
6	0,72	Mentyl acetato
7	0,88	
8	0,96	

FUENTE: HILDEBERT WAGNER. SABINE BLADT. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.



FOTOGRAFÍA NO. 3. TLC ACEITE ESENCIAL DE FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth)

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: Tolueno:Acetato de etilo

Proporción: (93:7)

Revelador: Ácido sulfúrico – vainillina

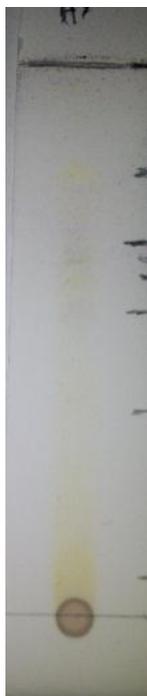
La cromatografía en capa fina para la presencia de aceites esenciales en el extracto de flores de Iso tuvo la presencia de 8 componentes con los R<sub>f</sub> mostrados en la Cuadro No. 5 sin revelar, al aplicar el revelador de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vainillina las bandas que permanecieron fueron las mostradas en la Fotografía No.3, sin embargo en bibliografía (20) tan solo se

pudo identificar 5, los compuestos 1, 2, 3, 4 y 6 siendo el Cineol, Carvona, Timol, Geranyl acetato y Mentyl acetato. En el TLC para hojas no existió corrida de bandas, debido a que las mismas no poseen aceites esenciales.

**CUADRO No. 6. RESULTADOS DE TLC PARA TRITERPENOS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**

<b>Banda</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>Compuesto identificado</b>
1	0,32	Ononin
2	0,50	Onocerin
3	0,58	
4	0,60	
5	0,62	
6	0,77	
7	0,95	

FUENTE: HILDEBERT WAGNER. SABINE BLADT. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.



**FOTOGRAFÍA No. 4. TLC TRITERPENOS DE HOJAS DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth)**

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: Tolueno:Cloroformo:Etanol

Proporción: (40:40:10)

Revelador: Ácido sulfúrico – Asinaldehído

La cromatografía en capa fina para la presencia de triterpenos en el extracto de hojas de Iso tuvo la presencia de 7 componentes con los R<sub>f</sub> mostrados en la Cuadro No. 6 sin revelar, al aplicar el revelador de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vainillina las bandas que permanecieron

fueron las mostradas en la Fotografía No. 4, sin embargo en bibliografía (20) tan solo se pudo identificar 2, los compuestos 1 y 2, siendo el Ononin y Onocerin.

**CUADRO No. 7. RESULTADOS DE TLC PARA FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**

<b>Banda</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>Compuesto identificado</b>
1	0,55	Ácido cumárico
2	0,60	
3	0,65	Galangin
4	0,69	
5	0,71	
6	0,77	3-hydroxiflavona
7	0,83	
8	0,95	

FUENTE: HILDEBERT WAGNER. SABINE BLADT. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.



**FOTOGRAFÍA No. 5. TLC FLAVONOIDES DE FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth)**

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: Tolueno:Etyl acetato:Ácido fórmico

Proporción: (36:12:5)

Revelador: Sulfato de Cerio

La cromatografía en capa fina para la presencia de flavonoides en el extracto de hojas de Iso tuvo la presencia de 8 componentes con los Rf mostrados en la Cuadro No. 7 sin revelar, al aplicar el revelador de Sulfato de Cerio las bandas que permanecieron fueron las mostradas en la Fotografía No 11, sin embargo en bibliografía (20) tan solo se pudo identificar 3, los compuestos 1, 3 y 6 siendo el Ácido cumárico, Galangin y 3-hydroxiflavona.

**CUADRO No. 8. RESULTADOS DE TLC PARA FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**

<b>Banda</b>	<b>Rf</b>	<b>Compuesto identificado</b>
1	0,63	Ácido ferúlico
2	0,72	Galangin
3	0,73	Ácido cumárico
4	0,75	6-hidroxiflavona
5	0,78	
6	0,82	3-hidroxiflavona
7	0,84	
8	0,88	
9	0,90	Flavona
10	0,97	

FUENTE: HILDEBERT WAGNER. SABINE BLADT. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.



**FOTOGRAFÍA No. 6. TLC FLAVONOIDES DE HOJAS DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth)**

Absorbente: Sílica gel 60 F254

Sistema de solventes: n-hexano-etilacetato-ácido acético

Proporción: (31:14:5)

Revelador: Sulfato de Cerio

La cromatografía en capa fina para la presencia de flavonoides en el extracto de hojas de Iso tuvo la presencia de 10 componentes con los Rf mostrados en la Cuadro No. 8 sin revelar, al aplicar el revelador de Sulfato de Cerio las bandas que permanecieron fueron las mostradas en la Fotografía No 6, sin embargo en bibliografía(20)tan solo se pudo identificar 6, los compuestos 1, 2, 3, 4, 6 y 9 siendo el Ácido ferúlico, Galangin, Ácido cumárico, 6-hydroxiflavona, 3-hydroxiflavona y flavona.

### 3.6 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

**CUADRO No. 9. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea Mutisii* Kunth). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA APLICADA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2012.**

PARÁMETRO	HOJAS	FLORES	OMS	CONGRESO NACIONAL(50)
	<b>Valor encontrado</b>		<b>Referencia</b>	
Aerobios mesófilos ufc/g	2x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	≤ 10 <sup>4</sup>
Coliformes fecales y <i>E. coli</i> ufc/g	<1	<1	10	No menciona
Levaduras y hongos ufc/g	<1	<1	10 <sup>3</sup>	≤ 10

En las pruebas microbiológicas realizadas a los extractos de hojas y flores indican que están dentro de los parámetros considerados en la OMS 2007 y en el congreso realizado en el Salvador en el 2007 (50). Lo que nos indica que son aptos para la realización de un análisis o investigación como fue el caso de la presentes Tesis.

### 3.7 BIOENSAYO DE TOXICIDAD

**CUADRO No. 10. RESULTADOS DE NÚMERO DE NAUPLIOS VIVOS EN ENSAYO DE BIOTOXICIDAD DE EXTRACTO DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth) EN *Artemia salina*. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO 2012.**

	BLANCO			EX. HOJAS			EX. FLORES		
1000 ppm	10	10	10	0	0	0	0	0	0
100 ppm	10	10	10	2	2	0	0	0	0
5 ppm	10	10	10	10	9	9	5	6	5

\*En cada tubo inicialmente se encontraban 10 nauplios

**CL<sub>50</sub> HOJAS:**25,67 ppm

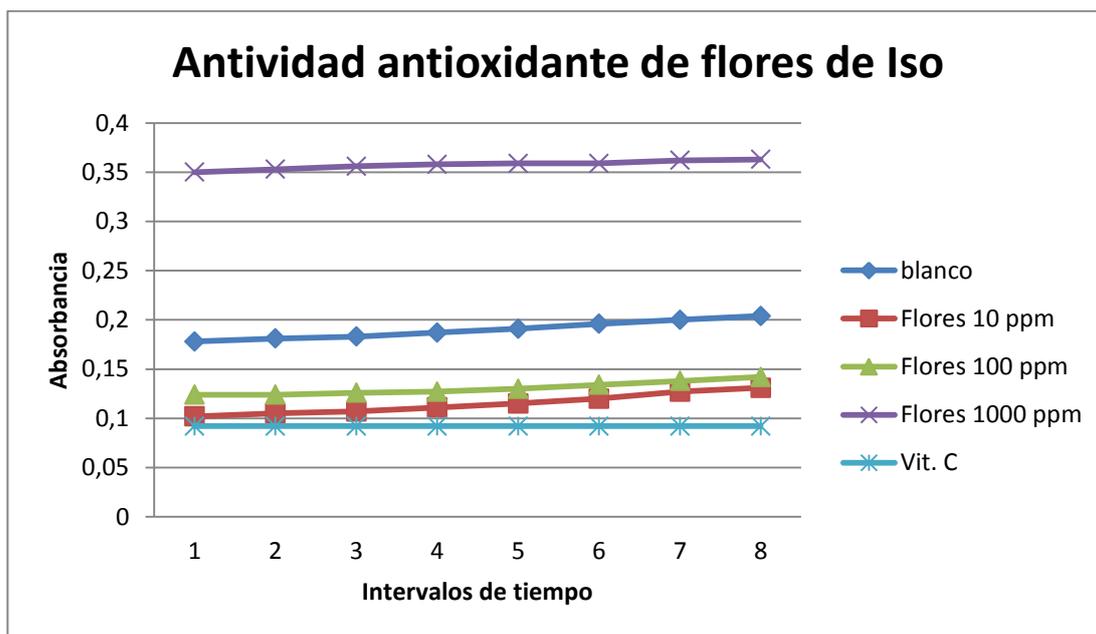
**CL<sub>50</sub> FLORES:**5,01 ppm

Los resultados de la Cuadro No. 10 muestran la sobrevivencia de 16 nauplios de 30 iniciales en la concentración 5 ppm del extracto de flores; mientras que en el extracto de hojas a concentración de 100 ppm se observó la supervivencia de 4 nauplios de 30 iniciales y a 5ppm sobrevivieron 28 de los 30 iniciales. Por ende la concentración letal media de las flores fue mayor (5,01 ppm) en comparación a la de las hojas (25,67 ppm). La investigación realizada por Germania Samaniego determina que la toxicidad del aceite esencial de las flores de Iso  $\leq$  1 ppm, lo cual es corroborales ya que en el aceite esencial los componentes de la flor se encuentran en mayor cantidad que en el extracto.

### 3.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

**CUADRO No. 11. RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DE ABSORBANCIA CON LA UTILIZACIÓN DEL EXTRACTO DE FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* kunth) A 10, 100, 100  $\mu$ g/mL, A DIVERSOS INTERVALOS DE TIEMPO DURANTE EL PROCESO DE OXIDACIÓN DE LA PULPA DE MANZANA.LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2012.**

TIEMPO (Intervalos de 15 s.)	BLANCO	FLORES				Vit. C
		10 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	1000 $\mu$ g/mL	1000 $\mu$ g/MI	
15	0.178	0.102	0.124	0.350	0.092	
30	0.181	0.105	0.124	0.353	0.092	
45	0.183	0.107	0.126	0.356	0.092	
60	0.187	0.111	0.127	0.358	0.092	
75	0.191	0.115	0.130	0.359	0.092	
90	0.196	0.120	0.134	0.359	0.092	
105	0.200	0.127	0.138	0.362	0.092	
120	0.204	0.131	0.142	0.363	0.092	

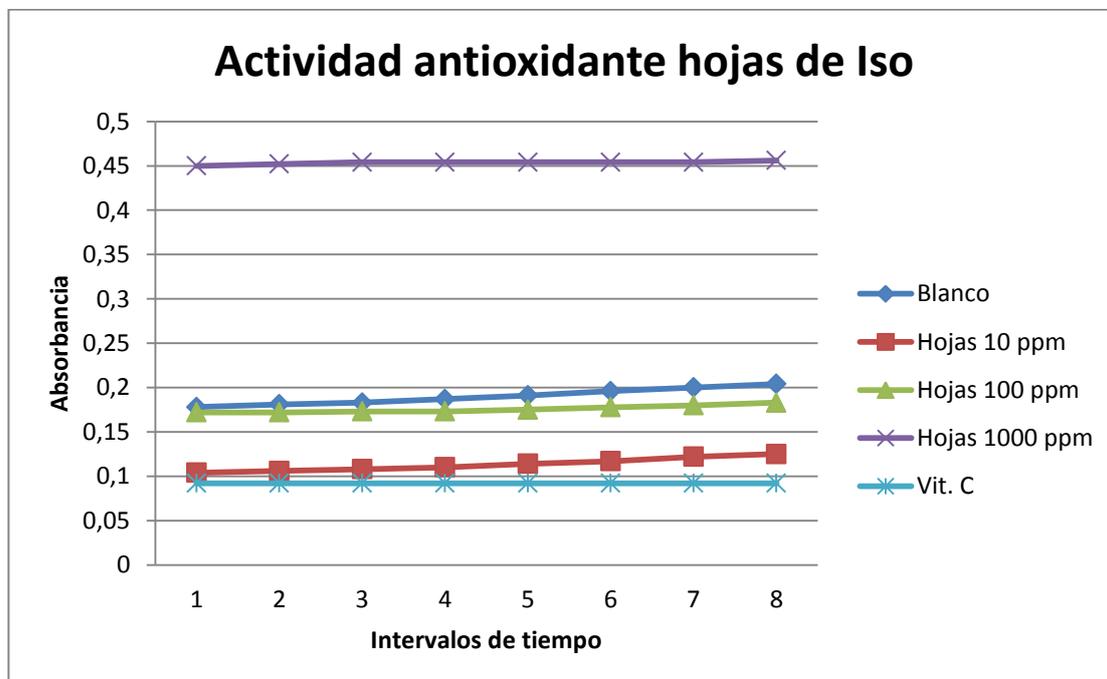


**GRÁFICO No. 1. ABSORBANCIA VS INTERVALOS DE 15 SEGUNDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE FLORES A CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1000 ppm. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2012.**

En elGráfico No. 1 se evidencia que la capacidad antioxidante del extracto de flores es proporcional al incremento de su concentración; obteniendo mejores expectativas a 1000 ppm, donde se aprecia menor variabilidad de incremento de la absorbancia, producto de la oxidación del catecol a benzoquinona por parte de las polifenoloxidasas, con relación significativa a la de 10 y 100 ppm. Sin embargo se puede observar una diferencia significativa con respecto a la capacidad antioxidante que presenta el ácido ascórbico. La leve inhibición de la oxidación se presume que puede estar dada por los flavonoides, los cuales se evidenciaron en gran cantidad en el tamizaje fitoquímico.

**CUADRO No. 12. RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DE ABSORBANCIA CON LA UTILIZACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ISO (*Dalea mutisiikunth*) A 10, 100, 1000 µg/mL, A DIVERSOS INTERVALOS DE TIEMPO DURANTE EL PROCESO DE OXIDACIÓN DE LA PULPA DE MANZANA. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2012.**

TIEMPO (Intervalos de 15 s.)	HOJAS				Vit. C
	BLANCO	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL	1000 µg/mL
15	0.178	0.104	0.172	0.450	0.092
30	0.181	0.106	0.172	0.452	0.092
45	0.183	0.108	0.173	0.454	0.092
60	0.187	0.110	0.173	0.454	0.092
75	0.191	0.114	0.175	0.454	0.092
90	0.196	0.117	0.1777	0.454	0.092
105	0.200	0.122	0.180	0.454	0.092
120	0.204	0.125	0.183	0.456	0.092



**GRÁFICO No. 2. ABSORBANCIA VS INTERVALOS DE 15 SEGUNDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE HOJAS A CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1000 ppm. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. SEPTIEMBRE 2012.**

En la Gráfica No. 2 se observa que el extracto de hojas presenta mayor actividad antioxidante en comparación con el de flores; y a medida que aumenta la concentración también se incrementa la capacidad antioxidante. A 1000 ppm los niveles de absorbancia productos de la oxidación del catecol se estabilizan, con lo cual se obtienen resultados muy promisorios de inhibición al compararlos con los del ácido ascórbico. Esta actividad antioxidante más marcada en las hojas, puede deberse a una mayor concentración de compuestos como flavonoides o a su vez de derivados fenólicos con mayor capacidad antioxidante.

### 3.9 RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER

**CUADRO No. 13. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth) A CONCENTRACIONES DE 10000, 1000 Y 100 µg/mL A 24 y 48 HORAS. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	10000	1000	100	10000	1000	100
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	A	P	I	A	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	I	I	I	I	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I
R: repetición	A: activo	P: parcialmente activo		I: inactivo		

Los resultados de la Cuadro No. 13 indican que el extracto de hojas tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a 10000 µg/mL y actividad parcial a 1000 µg/mL. Los responsables de dicha actividad pueden corresponder a

flavonoides o terpenos que son los más abundantes en el extracto y por cualidad de contribuir con radicales libres.

**CUADRO No. 14. RESULTADOS DEL TEST DE MISTCHER DEL EXTRACTO DE FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth) A CONCENTRACIONES DE 10000, 1000 Y 100 µg/mL A 24 Y 48 HORAS. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

MICROORGANISMOS	EXTRACTO DE FLORES					
	24 HORAS			48 HORAS		
	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	A	I	I	A	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonela gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	A	I	I	A	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I
R: repetición	A: activo	P: parcialmente activo		I: inactivo		

Los resultados de la Cuadro No. 14 indican que el extracto de flores tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231. La existencia de actividad antimicótica de las flores se correlaciona con la investigación de Germania Samaniego, quien determinó mediante el método de dilución con suspensión de esporas que el aceite esencial de Iso poseía actividad inhibitoria contra el hongo *Mycrosporium cannis* 10214 a concentración de 500 µg/mL y *Trichophyton rubrum* 22402 a concentración de 250 µg/mL; por ende las flores poseen componentes con actividad antimicótica que se encuentran ausentes en las hojas, con mucha probabilidad de que los responsables sean los aceites esenciales. (52)

**CUADRO No. 15. RESULTADOS DEL TEST DE MISTCHER DEL EXTRACTO DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth) EN PROPORCIÓN 50:50 A CONCENTRACIONES DE 10000, 1000 Y 100 µg/mL A 24 y 48 HORAS. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

**EXTRACTO DE HOJAS Y FLORES  
(PROPORCIÓN 50:50)**

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	A	I	I	A	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonela gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	I	I	P	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I

R: repetición      A: activo      P: parcialmente activo      I: inactivo

Los resultados de la Cuadro No. 15 indican que la combinación de los extractos de hojas y flores en proporción 50:50 tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y actividad parcial frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Interpretando que las flores aumentan la actividad produciendo un sinergismo en combinación con las hojas.

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES.

1. El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) permitió identificar la presencia de: flavonoides, terpenos, lactonas, quinonas, compuestos fenólicos, taninos, cumarinas y principios amargos. (Cuadro No. 4).
2. Se acepta la hipótesis planteada ya que los extractos de hojas y flores de Iso, si presentaron capacidad inhibitoria frente a dos microorganismos objetos de estudio *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, y *Candida albicans* ATCC 10231.
3. El extracto de hojas de Iso (*Dalea mutisii* Kunth), mediante comprobación con el test de Mistcher, se demostró que posee actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* a concentración de 10000 µg/mL.(Cuadro No. 13)
4. El extracto flores de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) tiene actividad antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a concentraciones de 10000 µg/mL.(Cuadro No. 14)
5. La combinación de extracto de hojas y flores *Dalea mutisii* Kunth) presentaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y parcialmente frente a *Candida albicans* a concentración de 10000 µg/mL.(Cuadro No. 15)
6. La biotoxicidad frente a *Artemia salina* del extracto de hojas fue de 25,67ppm mientras que de flores fue 5,01 ppm.(Cuadro No. 10)

## CAPÍTULO V

### 5. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) basados en su citotoxicidad; ya que pueden ser de gran aporte en fitofármacos contra el cáncer y afecciones afines.
2. Determinar la forma farmacéutica más óptima para tratar infecciones por *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.
3. Realizar estudios más específicos para identificar los componentes del Iso (*Dalea mutisii*) responsables de la actividad antimicrobiana.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESUMEN

En los laboratorios de la Escuela de Bioquímica y Farmacia - ESPOCH. Se llevó a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii* Kunth) mediante la aplicación del test de Mistcher con el objetivo de contribuir en la investigación de nuevos fitofármacos que ayuden a combatir las infecciones causadas por agentes patógenos.

El extracto de hojas y flores de Iso se obtuvo por maceración; a la materia prima y el producto se le realizó un control de calidad riguroso. La inhibición microbiana se evaluó a través del método de Mistcher, cuyo fundamento es la inhibición del crecimiento exponencial de microorganismos susceptibles a moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Gallinarum* ATCC 9184 y *Candida albicans* ATCC 10231; a concentraciones de 10000, 1000 y 100 µg/mL; de igual manera se empleó combinaciones de los extractos totales en proporción 50:50. Previamente se realizó un estudio fitoquímico de los extractos con la finalidad de identificar sus componentes químicos.

El extracto total de hojas a 10000 µg/mL tiene actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y actividad parcial a 1000 µg/mL. El extracto de flores a 10000 µg/mL presenta actividad contra *Candida albicans*. La combinación de ambos extractos a 10000 µg/mL es activo frente *Staphylococcus aureus* y parcialmente activo contra *Candida albicans*.

Se concluyó que ambos extractos incluyendo la mezcla de los mismos presentan actividad antimicrobiana a concentraciones de 10000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231; posiblemente debido a los

abundantes compuestos fenólicos que contienen los extractos. Se recomienda realizar estudios de Iso basados en su citotoxicidad; ya que pueden ser de gran aporte en fitofármacos contra el cáncer.

## SUMMARY

It was conducted the antimicrobial activity of the ethanol extract of Iso leaves and flowers (*Dalea mutissi kunth*) by applying the test Mitscher in order to contribute to the investigation of new herbal medicines that help fight infections caused by agents pathogens in the laboratories of the School of Biochemistry and Pharmacy at ESPOCH.

The extract of Iso leaves and flowers was obtained by maceration, to the raw material and the product underwent rigorous quality control. The microbial inhibition was assessed using the Mitscher method, which fundament is the exponential growth inhibition of microorganisms susceptible to bioactive molecules diluted in agar medium, against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* 27853, ATCC 9184, *Salmonella gallinarum* ATCC 10231 and *Candida albicans*, at concentrations of 10000, 1000, and 100 ug/mL it was used similarly combinations in total extracts ratio: 50:50. Previously, a study phytochemical extracts, in order to identify their chemical components.

The total leaf extract to 1000 ug/mL. the extract of flowers to 10000 ug/mL shows activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. The combination of both extracts at 10000 ug/mL is active against *Staphylococcus aureus* and partially active against *Candida albicans*.

It was concluded that both extracts including mixtures thereof, exhibit antimicrobial activity at concentrations of 10000 ug/mL against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Candida albicans* ATCC 10231, possibly due to the abundant phenolic compounds containing extracts.

It is recommended Iso studies based on its cytotoxicity, which can be of great contribution phytodrugs cancer.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **AGÁPITO., T.,** y otros., Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales., s.ed., Lima-Perú., Editorial Isabel., 2005., Pp. 22-35
2. **ÁLVARES., V.,** y otros., Manual de Técnicas en Microbiología Clínica., s.ed., Madrid-España., s.edt., 1995., Pp. 28, 70-78, 111
3. **BALLADELLI., P.,** Entre lo mágico y natural, la medicina indígena., 3a. ed., Quito-Ecuador., Editorial Docutech., 1996., Pp. 110-116.
4. **BRUNETON., J.,** Farmacognosia-Plantas Medicinales., 2a. ed., Zaragoza-España., Editorial Acribia S. A., 2001., Pp. 35, 39-41
5. **CANTÓN., R.,** y otros., Procedimientos en Microbiología Clínica., s.ed., Madrid-España., Editorial Picazo., 2000., Pp. 44-52-
6. **COLL., P.,** y otros., Epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas., s.ed., Madrid-España., Editorial Panamericana., 2006., Pp. 71-83
7. **FLORES., R.,** Atlas de las plantas medicinales y curativas., s.ed., Madrid-España., Ediciones Culturales S.A., 1997., Pp. 169-175
8. **GALLEGOS., J.,** Prácticas de microbiología de alimentos., s.ed., Riobamba-Ecuador., Editorial Docucentro-ESPOCH., 2005., Pp. 19-21, 33-35, 91-95
9. **GONZÁLEZ., G.,** Micología médica básica., 3a. ed., México D.F.-México., Editorial McGraw-Hill., 2009., Pp. 487-493.

10. **GUPTA., M.,** 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. 1a.ed., Bogotá-Colombia., s.edt., 1995., Pp. 139.
11. **IGLESIA., G.,** El uso de las plantas en la medicina tradicional de los Quichuas del Napo., s.ed., Quito-Ecuador., s.edt., 2010., P.p. 19-22
12. **JOKLIK., WK.,y otros.,**Microbiología., 20a. ed. Buenos Aires-Argentina., Editorial Panamericana., 1994., Pp. 23-26.
13. **MENSA., J.,y otros.,**Guía Terapéutica Antimicrobiana., 14a. ed., Barcelona-España., Editorial Masson S.A., 2004., P.p 75.
14. **MORALES., A.,y otros.,**Plantas medicinales y Medicina natural., 2a. ed., Santiago-Chile., s.edt., 2009., Pp. 31,33.
15. **MUÑOZ., J.,**Guía para el Análisis de Vegetales., 2a.ed., Quito-Ecuador., s.edt., 1982., Pp. 55.
16. **PAHISSA., A.,**Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus.*,1a. ed., Barcelona-España., Editorial ICG Marge., 2009., P.p.110.
17. **PRESCOTT., H., y otros.,**Microbiología. 4a. ed., Madrid-España., Mc Graw-Hill Interamericana., 1999., Pp.82-87.
18. **SCHAECHTER., M.,** Microbiología., 2a. ed., Buenos Aires-Argentina., Editorial Panamericana., 1993., Pp. 47-49.
19. **VANACLOCHA., C.,**Fitoterapia: vademécum de prescripción. 4a. ed. Madrid-España., s.edt., 2003., Pp. 15
20. **WAGNER., H.,**Plant Drug Analysis.,2a. ed.,Munich-Alemania., Editorial Springer., 1996., Pp. 195-210.

21. **COWAN., M.**, Plant products as antimicrobial agents., No.4. Vol. 12., Madrid-España., 1999., Pp. 564 – 582.
22. **DE PAULA., J.**, y otros., Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. No. 1. Vol. 5., Habana-Cuba., 2000., Pp. 26-9.
23. **GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ., M.**, y otros., Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD., No. 56. Vol 2., México D.F-México., Pp. 93-101.
24. **LÓPEZ., C.**, Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Centro de Referencia en Micología (CEREMIC). No. 37., Rosario-Argentina., 2000., Pp. 16-21.
25. **URRUTIA., O.**, Comportamiento de la Resistencia Antibiótica en una Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos., No. 318., Habana-Cuba., Pp. 26, 419.
26. **BAZALAR., D.**, Acción inhibitoria de crecimiento de la asociación de los extractos acuosos de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxyllense* y *Plantago major* frente a bacterias y hongos., No. 1., 1998., Pp 24 – 30.
27. **BONIFAZ., A.**, CROMagar-Candida. Experiencia en la identificación presuntiva de levaduras oportunistas de candidosis oral en pacientes inmunosuprimidos., No. 23., 1998., Pp. 794-800
28. **BRIGHAM., L.**, Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Physiology. 1999. Vol. 119. pp 417 – 428.
29. **CUMPA., N.**, Avances en la investigación de tioglicósidos en plantas del género *Tropaeolum*, actividad antibacteriana y antifúngica., No. 1., Lima-Perú., 1991., Pp. 15-24

30. **FRIEDRICH., C.,** Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. Antimicrobial agents and chemotherapy., No. 8. Vol. 42., 1999. Pp. 1542-1548.
31. **FUERTES., C.,** Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica., No. 1., México D.F-México., 1997., Pp. 43-49.
32. **HANCOCK., R.,** Mechanisms of action of newer antibiotics for gram-positive organisms., No. 209., 2005., Pp.18.
33. **KATSURA., H.,** In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. Antimicrobial agents and chemotherapy., No. 11. Vol. 45., 2001., Pp. 3009–3013.
34. **KONTIOKARI., T.,** Randomised trial of cranberrylingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women., No. 30. Vol. 322., 2001., Pp. 1 – 5.
35. **MARTÍNEZ., J.,** y otros., Servicio de Enfermedades Infecciosas., No. 1660., Barcelona-España., 2007.
36. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA.,** Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana., No. 36. Vol 4., México D.F-México., 1998., Pp. 428-438.
37. **MIRANDA., M.,** Farmacognosia y productos naturales., No. 16., Habana-Cuba., 2006., Pp. 32-44, 56-62
38. **MITSCHER., L.,** y otros., A modern look at folkloric use anti-infective agents., s.ed., No.5., 1987, Pp. 1025-1041

39. **NARCHI, H.**, Uropathogen resistance to antibiotic prophylaxis in urinary tract infections., No. 2. Vol. 16., Pp.151.
40. **ROSS, Z.**, Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder., No.1 Vol 67., 2001., Pp. 475–480.
41. **SUÁREZ, B.**, Detección de mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidrogosresistentes., No. 1., La Habana-Cuba., 2012., Pp. 35-37.
42. **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN)**, Fitoterápico Droga De Calidad Cruda Especificaciones Generales., Quito-Ecuador., NT. No. 1602., 1999. Pp. 6-12
43. **ARAUJO, J.**, y otros., “Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus*”, Resúmenes del III Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia., Lima-Perú., 2004., Pp. 9.
44. **SAGASTUME, P.**, Microbioensayos ecotoxicológicos para monitoreo ambiental y otras aplicaciones, II Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental., Guatemala-Guatemala., 2001., Pp. 10-11
45. **ARAGADVAY, S.**, Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Hierbamora (*Solanum nigrum*)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2009. Pp 45-49, 54-59, 60-65.

46. **BONILLA., C.**,Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de carrasquilla (*Berberis hallii*) sobre *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.,Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador.,**TESIS.**, 2011., P.p. 83-94
  
47. **CRUZ., P.**,Elaboración y control de calidad del gel Antimicótico de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Matico (*Aristiguetia glutinosa*), y Marco (*Ambrosia arborescens*) Para Neo – Fármaco., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2009., Pp. 47-48
  
48. **MANTILLA., J.**, Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia.,Universidad Nacional de Colombia.,Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia., Bogotá-Colombia.,**TESIS.**, 2010., Pp. 56-67.
  
49. **MARTINEZ., J.**,Estudio de metiltransferasas involucradas en la resistencia a antibioticos en cepas de bacilos gram negativos no fermentadores de origen clínico.,Instituto Politécnico Nacional., Facultad de Ciencias Biológicas., México D.F-México.,**TESIS.**, 2010., Pp. 45-53.
  
50. **MORALES., L.**,Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de tres plantas del Perú., Uinversidad Nacional Mayor de San Marcos., Facultad de Ciencias.,Lima-Perú.,**TESIS.**,1996., Pp. 54-63.
  
51. **PILCO., G.**,Comprobación del efecto adelgazante de la tintura de apio (*Apium graveolens*) y el perejil (*Petroselinum sativum*) en voluntarios con sobrepeso., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de

Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador.,  
**TESIS.**, 2012., P.p. 33-74

**52. SAMANIEGO., G.,**Actividad antimicrobiana y antimicótica en aceites  
esenciales.,Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de  
Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador.,  
**TESIS.**, 1998. P.p. 33-74

**53. ANTIBIOTICO TERAPIA**

[http://clientes.entornodigital.com/clientes/antibio/modules.php?name=Ne  
ws&file=article&sid=565&num=2006-02-01](http://clientes.entornodigital.com/clientes/antibio/modules.php?name=News&file=article&sid=565&num=2006-02-01)  
2012/09/09

**54. Artemia salina.**

<http://biblioteca.portalpez.com/la-artemia-salina-vp15740.html>  
2012/09/09

**55. BACTERIA STAPHYLOCOCCUS AUREUS: SÍNTOMAS, CONTAGIO Y  
TRATAMIENTO**

[http://suite101.net/article/bacteria-staphylococcus-aureus-sintomas-  
contagio-y-tratamiento-a43652](http://suite101.net/article/bacteria-staphylococcus-aureus-sintomas-contagio-y-tratamiento-a43652)  
2012/09/09

**56. BACTERIAS: CARACTERÍSTICAS, TIPOS, ESTRUCTURA Y  
CLASIFICACIÓN**

[http://suite101.net/article/bacterias-caracteristicas-tipos-estructura-y-  
clasificacion-a80751](http://suite101.net/article/bacterias-caracteristicas-tipos-estructura-y-clasificacion-a80751)  
2012/09/09

**57. COLI**

[http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)  
2012/09/09

**58. CONOCIMIENTOS ANCESTRALES**

<http://www.wanamey.org/chamanismo/chamanes-peru.htm>  
2012/09/09

**59. DALEA COERULEA**

[http://zipcodezoo.com/Plants/D/Dalea\\_coerulea/](http://zipcodezoo.com/Plants/D/Dalea_coerulea/)  
2012/09/09

**60. EL ESTAFILOCOCO AUREUS Y SUS CARACTERISTICAS BIOQUÍMICAS**

[http://www.ehowenespanol.com/estafilococo-aureus-caracteristicas-bioquimicas-sobre\\_44034/](http://www.ehowenespanol.com/estafilococo-aureus-caracteristicas-bioquimicas-sobre_44034/)  
2012/09/09

**61. FITOMEDICINA**

<http://blogdefarmacia.com/que-es-la-fitomedicina>  
2012/09/09

**62. HISTORIA DE PLANTAS MEDICINALES**

<http://www.biomanantial.com/historia-plantas-medicinales-a-87-es.html>  
2012/09/09

**63. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES**

[http://www.fastonline.org/CD3WD\\_40/HLTHES/APS/APS10S/ES/CH03.HTM](http://www.fastonline.org/CD3WD_40/HLTHES/APS/APS10S/ES/CH03.HTM)  
2012/09/09

**64. INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella gallinarum* SEGÚN MÉTODO TRADICIONAL OIE.**

<http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCrypte dData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hPsNQHlcdk8M&argModo=&argOri gen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=7116>  
2012/09/09

**65. KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

[http://www.codeinep.org/control/Klebsiella\\_pneumoniae\\_ii.pdf](http://www.codeinep.org/control/Klebsiella_pneumoniae_ii.pdf)  
2012/09/09

**66. LA CROMOTERAPIA**

<http://www.naturamedic.com/cromoterapia.htm>  
<http://www.remediospopulares.com/Cromoterapia.html>  
2012/09/09

**67. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LOS ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS**

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/1.01.06.%20M%E9todos%20de%20laboratorio.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06.%20M%E9todos%20de%20laboratorio.pdf)  
2012/09/09

**68. OMS**

<http://www.who.int/es/>  
2012/09/09

**69. PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR**

<http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicinales.html>  
2012/09/09

**70. PRUEBAS DE CALIDAD FÍSICAS, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS.**

<http://www.docstoc.com/docs/27504107/Requisitos-de-calidad-deProductos-Naturales-Medicinales>  
2011/09/12

**71. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A AGENTES MICROBIANOS.**

<http://minnie.uab.es/~veteri/21273/Practica%202.2009-10.pdf>  
2012/09/09

**72. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.**

<http://es.scribd.com/doc/14430515/Pseudomonas-aeruginosa>  
2012/09/09

**73. SALMONELLA AVIAR.**

<http://www.slideshare.net/ALEJANDRAJAIME/salmonella-en-aves>  
2012/09/09

**74. SALMONELOSIS.**

<http://158.109.105.11/granja/salmonelosis.pdf>  
2012/09/09

**75. TIERRA NEGRA**

[http://www.viverotierranegra.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=87:chiripique&catid=37:clima-frio&Itemid=12](http://www.viverotierranegra.com/index.php?option=com_content&view=article&id=87:chiripique&catid=37:clima-frio&Itemid=12)  
2012/09/09

**76. USO DE PLANTAS**

<http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/uso-plantas.html>  
2012/05/30

## CAPÍTULO VIII

### 8. ANEXOS

ANEXO No 1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO 2012.



FOTOGRAFÍA No. 7. PRUEBAS POSITIVAS DE LOS ENSAYOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO REALIZADO A LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE ISO (*Dalea mutisii* Kunth). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO 2012.

ANEXO No 2. BLANCO DE AGAR Y DMSO DE CRECIMIENTO MICROBIANO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

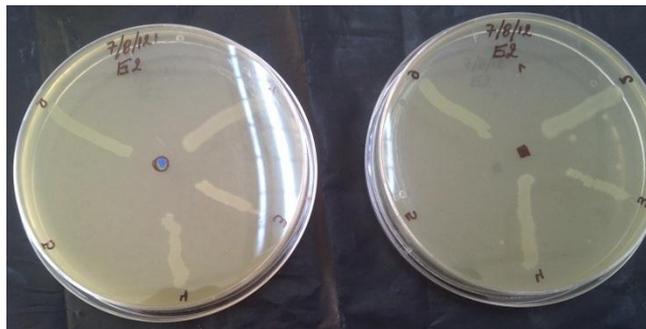


FOTOGRAFÍA No. 8. BLANCO DE AGAR Y DMSO DE CRECIMIENTO MICROBIANO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

**ANEXO No 3. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



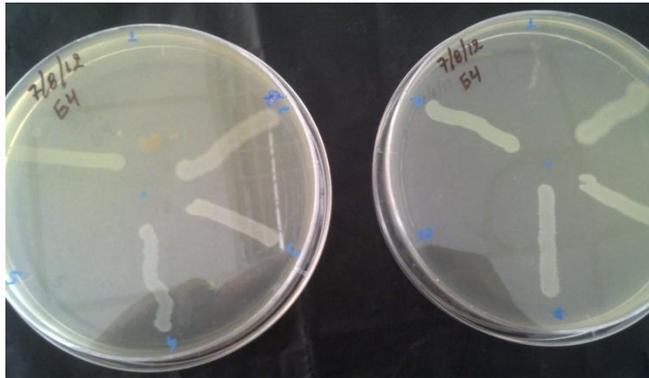
**FOTOGRAFÍA No. 9. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS A CONCENTRACIÓN DE 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



**FOTOGRAFÍA No. 10. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS A CONCENTRACIÓN DE 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



**FOTOGRAFÍA No. 11. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN DEL EXTRACTO DE FLORES A CONCENTRACIÓN DE 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



**FOTOGRAFÍA No. 12. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES (PROPORCIÓN 50:50) A CONCENTRACIÓN DE 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**

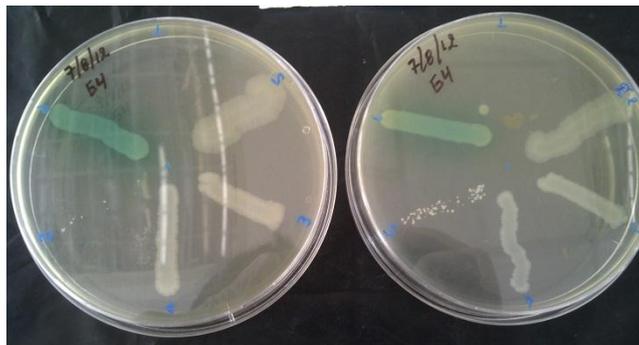
**ANEXO No 4. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



**FOTOGRAFÍA No. 13. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS A CONCENTRACIÓN DE 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



**FOTOGRAFÍA No. 14. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN DEL EXTRACTO DE FLORES A CONCENTRACIÓN DE 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**



**FOTOGRAFÍA No. 15. RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO DEL TEST DE MISTCHER A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES (PROPORCIÓN 50:50) A CONCENTRACIÓN DE 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.**