

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO FRACCIONADO DE *Byrsonima crassifolia* “INDANO”
FRENTE A *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* POR EL MÉTODO
DE DIFUSIÓN EN AGAR, IQUITOS 2014.”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado Por:

Bach. RODRÍGUEZ MACEDO, Silvia Nathaly

Asesor:

Q.F. Wilfredo Oswaldo GUTIÉRREZ ALVARADO

Co-Asesores:

Ing. Alenguer Gerónimo ALVA ARÉVALO, Dr.

Blga. Jessy Patricia VÁSQUEZ CHUMBE, Mgr.

IQUITOS – PERÚ

2014



168



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los ⁰⁹.....días del mes de ¹².....del dos mil catorce, siendo las ¹⁹.....Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N°149-FFB-UNAP-2014, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA. PRESIDENTE
- BLGO. FELIPE RÍOS ISERN. MIEMBRO
- Q.F. CARLOS ADOLFO CONTRERAS LICETTI. MIEMBRO



Se constituyeron al Auditorio de la Facultad de Agronomía, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO FRACCIONADO DE *Byrsonima crassifolia* "INDANO" FRENTE A *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR, IQUITOS 2014", presentado por la Bachiller SILVIA NATHALY RODRÍGUEZ MACEDO, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de la sustentante, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

..... *satisfactoriamente*

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido..... *Aprobada por excelencia*
- 2.- Observaciones..... *Ninguna*



Siendo las ^{20:30}.....horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a la sustentante por su..... *excelente exposición*

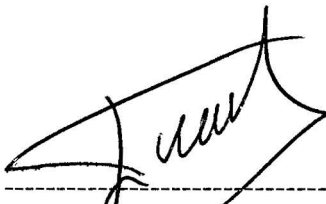
.....
Q.F. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA.
PRESIDENTE

.....
BLGO. FELIPE RÍOS ISERN
MIEMBRO

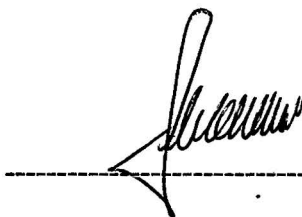
.....
Q.F. CARLOS ADOLFO CONTRERAS LICETTI
MIEMBRO

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA in vitro
DEL EXTRACTO ETANOLICO FRACCIONADO DE *Byrsonima crassifolia*
“INDANO” MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR”

PAGINA DE APROBACIÓN



QF. José D. Torres Tejada,
PRESIDENTE



Q.F. Carlos Contreras Licetti
MIEMBRO

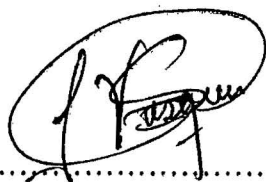


Blgo. Felipe Ríos Isern
MIEMBRO

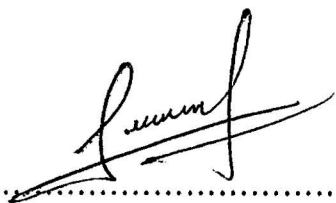
“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL
EXTRACTO ETANOLICO FRACCIONADO DE *Byrsonima crassifolia* “INDANO”
MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR”



.....
Q.F. Wilfredo Oswaldo Gutiérrez Alvarado
Asesor



.....
Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe Mg.
Co- Asesor



.....
Ing. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo Dr.
Co-Asesor

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO
FRACCIONADO DE *Byrsonima crassifolia* “INDANO” FRENTE A *Staphylococcus
aureus* Y *Escherichia coli* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR, IQUITÓS
2014.”**

Resumen:

El objetivo del presente trabajo, fue el de realizar un estudio de actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico fraccionado de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por el método de difusión en agar.

Las muestras de cortezas de “Indano” procedieron de la comunidad de Lamas – Provincia de Lamas, distrito de Lamas, Departamento de San Martín – Perú.

Se efectuó la maceración de la muestra para obtener el extracto etanólico y luego se realizó el fraccionamiento obteniendo cuatro fracciones que se clasificaron como fracción A, fracción B (ácida), Fracción C (neutra) y fracción D (acuosa). Se realizó la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* mediante el método de difusión en agar por discos y el método de macrodilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria, utilizando para los dos métodos las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

De las fracciones de “Indano” a las concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg, frente a *Escherichia coli* se obtuvo un 42% en la fracción A, 37% de la B, 39% de la C y 43% de la D y un 123% de la A, 50% de la B, 125% de la C, y 78% de la D, de porcentaje de inhibición bacteriana respectivamente.

Se determinó para el extracto etanólico fraccionado de corteza de “Indano” una C.M.I. de 0.5 mg/ml con la fracción C frente a *Staphylococcus aureus*, y con respecto a *Escherichia coli* no se encontró ninguna actividad.

Palabras claves: *Indano*, *Byrsonima crassifolia*, actividad antibacteriana; Concentración Mínima Inhibitoria; Concentración Mínima Bactericida *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

“ANTIBACTERIAL ACTIVITY *in vitro* OF THE FRACTIONAL ETANOLIC EXTRACT OF *Byrsonima crassifolia* "INDANO" FRONT TO *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli* BY THE AGAR DIFFUSION METHOD , IQUITOS 2014”.

Abstract:

The objective of the present work was a study of antibacterial activity *in vitro* of the fractional etanolic extract of *Byrsonima crassifolia* "Indano" in front to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* for the agar diffusion method.

The samples of barks of “Indano” came from the collected in Lamas community, in Lamas district , Department of San Martin – Peru.

The maceration of the sample for obtain the extract etanolic and later the division obtaining four fractions were classified as fraction A, fraction B (sour), Fraction C (neuter) and fraction D (watery). He was carried out the determination of the antibacterial activity *in vitro* by the agar diffusion method for disks and the macrodilución method between liquid to determine the Minimum Concentration Inhibitory, using for the two methods the stumps of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Of the fractions of "Indano" to concentrations of 200, 400, 600 and 800 mg, in front of *Escherichia coli* 42% was obtained in the fraction A, 37% in the B, 39% in the C and 43% in the D and 123% in the A, 50% in the B, 125% in the C, and 78% in the D, of percentage of inhibition bacterial respectively.

It is determined for the fractional etanolic extract of bark of "Indano" a C. M. I. of 0.5 mg/ml with the fraction C in front of *Staphylococcus aureus*, and with regard to *Escherichia coli* he was not any activity.

Key words: *Indano*, *Byrsonima crassifolia*, activity antibacteriana; Minimum concentration Inhibitory; Concentration Minimum Germicide *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

DEDICATORIA

Bach. Silvia Nathaly Rodríguez Macedo:

*A nuestro padre celestial
que siempre ilumina mi caminar
y aumenta cada segundo mi Fé.*

*A mi familia, mis padres Wilfredo y Kelly por la vida
por inculcarme buenos valores
y ser mi apoyo incondicional.*

*A Javier Mori mi gran compañero
por estar siempre ahí
fortaleciéndome en los momentos
que me siento abatida con su gran amor .*

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios por permitirme la vida y permitirme vivirla de esta forma.

Expreso mi agradecimiento a mis padres por sus esfuerzos para poder iniciar y culminar con éxito mi profesión.

*A mis jurados: Q.F. José D. Torres Tejada, Q.F. Carlos Contreras Licetti
Y al Blgo. Felipe Ríos Isern por sus grandes apoyos.*

Al docente de la facultad Q.F. Wilfredo Oswaldo Gutiérrez Alvarado, que a pesar del poco tiempo disponible me ha brindado su apoyo con la aportación de sus conocimientos.

A la Facultad de Industrias Alimentarias, por permitir la ejecución de mi proyecto en sus respectivos laboratorios.

Al Ing. Alenguer Alva Arévalo Dr. Y a la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe Mg. Por brindarme sus confianza y aportar sus conocimientos para la realización de las pruebas fitoquímicas y microbiológicas.

A mis compañeros de estudios Christian Gatica, Ericka Soplin por sus apoyo en la realización de las pruebas microbiológicas y a Tany López Ruiz por facilitarme los materiales de laboratorio.

A Javier Mori Ceba por su apoyo, comprensión y amor incondicional. A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron en la realización de la presente tesis.

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| DEDICATORIA | 4 |
| AGRADECIMIENTO | 5 |
| | |
| CAPÍTULO I | |
| I. INTRODUCCIÓN | 16 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| 2.1. Descripción del Problema | |
| 2.2. Formulación del Problema | |
| III. OBJETIVOS | 21 |
| 3.1. Objetivo general | |
| 3.2. Objetivos específicos | |
| | |
| CAPÍTULO II | |
| I. MARCO TEÓRICO | 23 |
| 1. Antecedentes | |
| 2. <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano) característica generales | |
| 3. Características De Las Cepas En Estudio | |
| Bacterias: | |
| 3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| 3.2 <i>Escherichia coli</i> | |
| 4. Resistencia Bacteriana | |
| 5. Ensayos Antimicrobianos | |
| II. DEFINICIONES OPERACIONALES | 45 |
| 2.1. Variables | |
| Variable independiente | |

| | |
|--|-----------|
| Variable dependiente | |
| 2.2. Indicadores | |
| Indicador de la Variable independiente | |
| Indicador de la Variable Dependiente | |
| III. HIPÓTESIS | 48 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----------|
| I. METODOLOGÍA | 50 |
| 1.1 Tipo De Estudio | |
| 1.2 Diseño Experimental | |
| 1.3 Población | |
| 1.4 Muestra | |
| 1.5 Tamaño de la Muestra | |
| 1.6 Instrumentos. | |
| 1.7 Procedimiento y Recolección de Datos | |
| II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 59 |
| 2.1. Procedimiento de Análisis para la Numeración de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> . | |
| III. ANÁLISIS E INTERPRETACION | 69 |
| 3.1 Diseño y método estadístico | |
| 3.2 Análisis e Interpretación de Datos | |

CAPÍTULO IV

| | |
|----------------------------|-----------|
| I.RESULTADO | 72 |
| II.DISCUCION | 85 |
| III.CONCLUSIONES | 87 |
| IV. RECOMENDACIONES | 88 |

CAPÍTULO V

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |
|--------------------------------------|-----------|

ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA N° 01:** Características Organolépticas del Extracto Etanólico y de los Extractos Fraccionados de La Corteza De *Byrsonima crassifolia* (Indano). 72
- TABLA N° 02:** Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico de la Corteza de *Byrsonima Crassifolia* “Indano”. 73
- TABLA N° 03:** Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción A frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 74
- TABLA N° 04:** Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción B frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 76
- TABLA N° 05:** Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción C frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 77
- TABLA N° 06:** Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción D frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 78
- TABLA N°07:** Comparación del Grado de Inhibición de las Fracciones A, B, C

y D del Extracto Etanólico de cortezas de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a la concentración de 800 mg frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 79

TABLA N° 08: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción A de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 80

TABLA N° 09: Concentración Mínima Inhibitoria (mg/ml) de la fracción B de la corteza De *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 81

TABLA N° 10. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción C de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 82

TABLA N° 11. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción D de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción A frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 75

GRAFICO 02: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción B frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 76

GRÁFICO 03: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del

Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción C frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 77

GRÁFICO 04: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción D frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 78

GRÁFICO 05: Comparación del Grado de Inhibición de las Fracciones A, B, C y D del Extracto Etanólico de cortezas de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a la concentración de 800 mg frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 79

GRÁFICO N° 06: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción A de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 81

GRÁFICO N° 07: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción B de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *staphylococcus aerus*. 82

GRÁFICO N° 08: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción C de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 83

GRÁFICO N° 09. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción D de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 84

ÍNDICE DE esquemas

| | |
|--|----|
| ESQUEMA N°01: Extracción De Plantas Medicinales. | 58 |
| ESQUEMA N°02: Fraccionamiento del extracto etanolico de corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano) | 97 |
| ESQUEMA N°03: Procedimiento del método de difusión en disco. | 61 |
| ESQUEMA N°04: Flujograma del desarrollo de investigación en anexo N°02. | 98 |

ÍNDICE DE cuadros

| | |
|--|----|
| CUADRO N° 01: Valores de referencia de sensibilidad a distintos antibióticos. | 64 |
| CUADRO N°02: Fórmula para determinar el porcentaje de Inhibición | 65 |
| CUADRO N° 03: Determinación de la actividad antibacteriana según el porcentaje de Inhibición | 65 |
| CUADRO N° 04: Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración mínima inhibitoria | 68 |

ÍNDICE DE fotos

ANEXO N°01

| | |
|---------------------|----|
| NORMAS DE SEGURIDAD | 94 |
|---------------------|----|

ANEXO N°02

| | |
|-------------------------------------|----|
| CERTIFICADO DE LA PLANTE EN ESTUDIO | 96 |
|-------------------------------------|----|

ANEXO N°03

| | |
|--|-----|
| Foto N° 01: Cortezas de Indano | 99 |
| Foto N° 02: Maceración de las cortezas | 99 |
| Foto N° 03: Filtración de la muestra en maceración | 99 |
| Foto N° 04: Extracción por rotavapor del extracto etanólico de <i>Byrsomina crassifolia</i> (Indano) | 100 |
| Foto N° 05: Molienda del extracto etanólico de corteza de <i>Byrsomina crassifolia</i> (Indano) | 100 |
| Foto N° 06: Obtención del extracto etanólico de corteza de <i>Byrsomina crassifolia</i> (Indano). | 101 |

ANEXO N°04

| | |
|--|-----|
| Foto N° 07: Obtención de la fracción A | 102 |
| Foto N° 08: Obtención de la fracción B (Ácida) | 102 |
| Foto N° 09: Separación del extracto para la obtención de la fracción C | 103 |
| Foto N° 10: Secado para la obtención de la fracción C | 103 |

ANEXO N°05

Foto N° 11: Colocación de los discos 104

Foto N° 12: Comparación del inóculo En las placas McFarland 104

Foto N° 13: Colocación de las respectivas concentraciones a los discos 104

ANEXO N°06

Foto N° 14: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción A frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 105

Foto N° 15: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción B frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 105

Foto N° 16: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción C frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 106

Foto N° 17: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción D frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 106

Foto N° 18: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción A frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 107

Foto N° 19: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción B frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 107

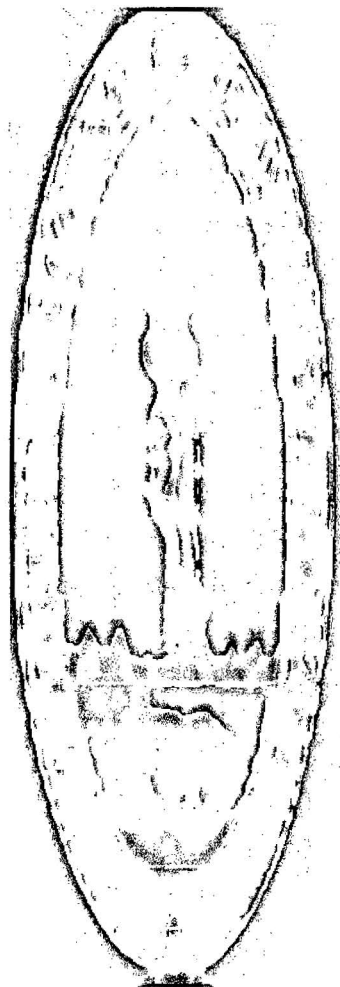
Foto N° 20: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción C frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 108

Foto N° 21: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción D frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml 108

Foto N° 22: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción C frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 800 mg/ml. 109

ANEXO N° 07

- Foto N° 23:** Muestra de la Concentración Mínima Inhibitoria De La Fracciones frente a *Escherichia coli* 110
- Foto N°24:** Concentración Mínima Inhibitoria De la Fracción A a concentración 0.5 (Tubo N°07) frente a *Staphylococcus aureus* 110
- Foto N°25:** Concentración Mínima Inhibitoria De la fracción C a concentración 0.5 (Tubo N°07) frente a *Staphylococcus aureus* 111
- Foto N° 26:** Concentración Mínima Inhibitoria Del control positivo (Gentamicina) Frente a *Staphylococcus aureus* 111



UNAP

Capítulo I

I.- INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales en toda su biodiversidad de especies se caracterizan por ser útiles en la mayoría de casos en el tratamiento empírico de dolencias y males. Sin embargo, a pesar de existir muchas especies vegetales estudiadas y con aplicaciones en el tratamiento de enfermedades, hace falta una mayor investigación de un sinnúmero de especies que también se aplican para tratar enfermedades, con el fin de determinar su aplicabilidad en el tratamiento médico de diversas enfermedades.

Se consideran plantas medicinales aquellas cuya calidad y cantidad de principios activos tienen propiedades terapéuticas comprobadas científicamente en beneficio de la salud humana.

Las sustancias químicas de origen vegetal destacan en forma importante la contribución de la flora del Nuevo Mundo, citadas en las farmacopeas de los países industrializados, a pesar de que éstas han sido escasamente investigadas, lo que significa que hay una oferta extraordinaria de fármacos para el futuro.⁽¹⁾

Se ha desplegado un gran interés por parte de los investigadores tanto en el desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, así como en estudiar sustancias naturales que pose algunas propiedades farmacológicas con efecto antibacteriano⁽²⁾.

En el Perú, como en otros países en vías de desarrollo, las plantas medicinales representan aún la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional. La flora peruana ofrece grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana.⁽³⁾

Las infecciones intrahospitalarias constituyen un problema de salud pública tanto a nivel nacional como mundial, dado que se asocian a un incremento de muerte de pacientes.⁽⁴⁾

Se estima que en el Perú se producen 50,000 casos de infecciones intrahospitalarias aproximadamente, se ha observado que las más frecuentes son las infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones en herida hospitalaria (IHH) y neumonía. Los servicios más afectados son la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), Neonatología y Cirugía.⁽⁵⁾

Respecto al Indano, en La Región San Martín viene siendo utilizado en maceración y cocción por algunos pobladores de la comunidad de lamas para sanar enfermedades infecciosas producidas por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otros, como: infecciones vaginales, de vías urinarias e infecciones intestinales; es utilizado también como: astringente, antiinflamatorio y expectorante.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA:

En los últimos años, después de un periodo en que la industria farmacéutica se dedicó exclusivamente a la fabricación de fármacos de síntesis, dejando atrás las antiguas medicinas que tenían como base los extractos de plantas medicinales, hay un cambio cualitativo en los programas industriales con dedicación a la búsqueda de nuevos medicamentos de origen herbario debido que en los últimos años hay un incremento en la incidencia de enfermedades infecciosas, destacando las antibacterianas y fúngicas.⁽⁶⁾

La resistencia de los microorganismos a los antibacterianos es un problema de salud pública a nivel mundial generado en los últimos 50 años, debido principalmente al uso inapropiado de los antibióticos; porque con esto se favorece la multiplicación de microorganismos resistentes y, al mismo tiempo, la supresión de los susceptibles, haciendo más difícil el tratamiento de las infecciones que causan.

Este problema también afecta al Perú siendo unas de las causas relevantes el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en los hogares, hospitales, comunidades, con los animales, que adicionan a las fuerzas del ambiente a seleccionar y mantener cepas de bacterias resistentes.⁽⁷⁾

Debido al problema actual de resistencia bacteriana, tradicionalmente las plantas son consideradas como un laboratorio biosintético que no sólo elabora compuestos químicos llamados metabolitos primarios, sino también metabolitos secundarios que son de gran importancia por sus propiedades medicinales y curativas por lo que constituyen una fuente casi inagotable de moléculas, cuyos análisis se está facilitando por la disponibilidad de bioensayos *in vitro* e *in vivo*.⁽⁸⁾

En nuestro país las diferentes comunidades y poblaciones vienen utilizando *Byrsonima crassifolia* (Indano) como una alternativa terapéutica por sus propiedades antidiarreicas, antipiréticas, astringentes, antiinflamatorias y expectorantes; sin embargo, no han sido realizados estudios científicos para comprobar su eficacia terapéutica y menos aún su actividad antibacteriana.

En la ciudad de Iquitos solamente se realizó un estudio respecto a la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* “Indano” mediante el método de difusión en agar. Este estudio demostró la presencia de metabolitos secundarios como lactonas, flavonoides, taninos y azúcares reductores. Para el estudio de la actividad antibacteriana se utilizó cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en donde el extracto etanólico en ambos casos evidenció poca actividad antibacteriana en comparación al extracto acuoso que presentó actividad nula frente a ambas bacterias.



2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Presenta actividad antibacteriana *in vitro* el extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en agar. Iquitos, 2014?

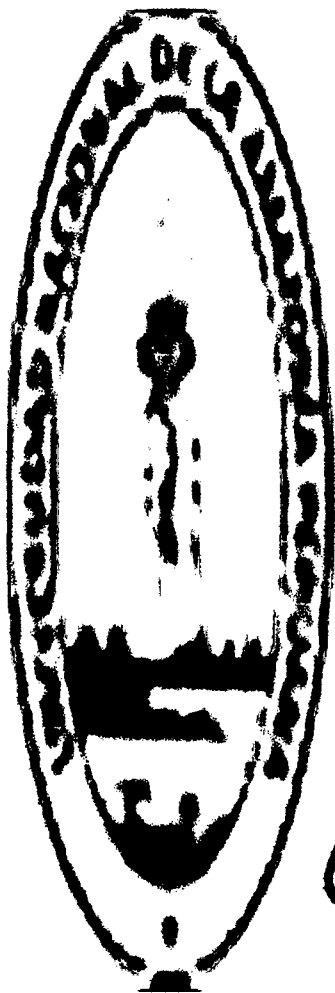
III.- OBJETIVOS

3.1 GENERAL:

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus* por el método de difusión en agar, Iquitos 2014.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Obtener del extracto etanólico la parte fraccionada de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico fraccionado de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano), utilizando pruebas de sensibilidad mediante difusión en agar frente a *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* “Indano” por el método de macrodilución.



UNAP

Capítulo II

I. MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

Se estima que más del 90 por ciento de las especies vegetales no han sido estudiadas para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas de interés farmacéutico. Los productos naturales representan el 50% de las drogas de uso clínico en países en vías de desarrollo ⁽⁹⁾. La flora amazónica peruana constituye una de las mayores reservas de recursos fitoterapéuticos. En efecto, desde los primeros años del encuentro con los europeos, las propiedades curativas de las plantas medicinales peruanas atrajeron la atención de los recién llegados.

Cáceres *et al.* (1991)⁽¹⁰⁾ en su tesis titulado "Efecto terapéutico del extracto de Nance sobre candidosis", validó los efectos de extractos de *Byrsonima crassifolia* (Nance) en sus propiedades antifúngicas contra *Candida albicans* (candidiasis); actividad antidermatofita contra *Epidermophyton floccosum* (pié de atleta), *Trichophyton rubrum* (pié de atleta, tiña de la barba), pero no encontraron efectos contra *Asperillus flavus* (productor de flavotoxinas). Mostraron mayor actividad los extractos de la corteza y las hojas, utilizando como solvente etanol.

Loaiza, R. (2004)⁽¹¹⁾ en su trabajo "Estimulación de la germinación del Nance (*Byrsonima crassifolia*) con giberelinas y agua caliente"; Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria en Honduras, concluyó que los tratamientos con agua caliente no mostraron efecto alguno en la germinación de *Byrsonima crassifolia* (Nance), luego de estar 5 y 2.5 meses en el campo con las condiciones apropiadas para su germinación. La aplicación de ácido giberélico (AG) a remojo de 24 horas en 2,000 y 4,000 ppm fue efectiva para estimular y acelerar la germinación.

Silva, *et al* (2007)⁽¹²⁾ en su investigación "*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K Estudio Fitoquímico", realizado en el Estado de Pará (Brasil) de *Byrsonima crassifolia* (Nanche), determinó el contenido en polifenoles totales del fruto debido a su interés como antioxidante con capacidad protectora frente a diversas afecciones. Los frutos recogidos

presentaron un contenido en polifenoles totales de 0,8 mg (equivalentes de ácido gálico por gramo de planta fresca) y un contenido en flavonoides totales de 0,12 mg (equivalentes de catequina por gramo de planta fresca).

Bautista, F. y González, E. (2007) ⁽¹³⁾ en su tesis “*Análisis cualitativo y cuantitativo de taninos en las cortezas *Byrsonima crassifolia* (Nance), *Pithecollobium dulce* (Mongollano) y en la raíz de *Punica granatum* (Granado)*”, Universidad de El Salvador, tiene como finalidad el desarrollo de un método de identificación colorimétrica y un método volumétrico denominado LOWENTHAL para la cuantificación de taninos en los extractos; en el que se encontró que la especie vegetal que presentó la mayor cantidad de taninos fue el Mongollano; después el Nance y por último el Granado.

Albíter, J (2009) ⁽¹⁴⁾ en su investigación sobre “Caracterización morfológica de fruto y semilla de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Nanche) y su relación con la capacidad germinativa”, demostró que el endocarpio duro y grueso de la semilla limita la germinación de éstas, obteniendo mejores porcentajes de germinación en los testigos de los cinco ecotipos (32, 42, 60, 75 y 58% respectivamente); los resultados de la prueba de germinación con endocarpios, reafirman lo anterior, al obtener el máximo porcentaje de germinación (16.74 %) con la aplicación de ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos que desgastó el endocarpio, facilitando la protrusión de la radícula. Las semillas de Nanche presentaron latencia primaria atribuible a la dureza y espesor del endocarpio, que se elimina mediante escarificación mecánica y química; la capacidad germinativa de Nanche está relacionada también con el número de semillas por endocarpio, número de semillas vanas y el peso de la semilla.

Rivero-Cruz, J. Fausto; Sánchez-Nietob, Sobeida; et al (2009) ⁽¹⁵⁾ en su investigación sobre “Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*”, lograron el aislamiento de ocho compuestos conocidos: *f*-amirina(1), betulina (2), ácido betulínico (3), ácido oleanólico (4), quercetina (5), epicatequina (6), ácido gálico (7) y *f*-sitosterol de la fracción de diclorometano derivada del extracto metanólico de *Byrsonima crassifolia*. Todos los compuestos aislados se evaluaron para determinar su actividad antibacteriana contra un panel de doce bacterias y *Candida albicans*. Los compuestos aislados inhibieron el crecimiento de las bacterias a concentraciones en el rango de 64 a 1088 mg/ml.

Fernández, M (2012) ⁽¹⁶⁾, en su investigación sobre "*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.: estudio fitoquímico y farmacológico" realizado en la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia Departamento de Farmacología, al realizar el tamizaje fitoquímico por cromatografía en capa fina, demostró la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos y triterpenos en el extracto hidroalcohólico, comprobando además la existencia de taninos en alta concentración, aceites esenciales, triterpenos y saponinas como componentes mayoritarios del extracto diclorometano. En el estudio farmacológico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K., realiza el test de actividad sobre el SNC evaluando la actividad neurofarmacológica mediante un conjunto de técnicas; las dosis utilizadas fueron 0,5 g de planta/Kg para el extracto hidroalcohólico y de 1,25 g de planta/Kg para el extracto diclorometánico, respectivamente, observando un interesante efecto depresor del sistema nervioso central para el extracto hidroalcohólico y una escasa actividad del extracto diclorometánico a este nivel.

Guerra, J. y Pozo, W (2013) ⁽¹⁷⁾, en su tesis "Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* "Indano" mediante el método de difusión en agar" realizado en la región Loreto, concluye que el extracto acuoso y etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* "Indano", evaluado mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* no se evidenció actividad antibacteriana; por el método de macrodilución el extracto acuoso y etanólico no presentaron actividad antibacteriana, clasificándolos como inactivo frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; en comparación con el control positivo (gentamicina).

1.2 BASES TEÓRICAS

1.2.1 *Byrsonima Crassifolia* (Indano)

1.2.1.1 Características Generales

Árbol de 2 a 10 m de altura, con el tronco tortuoso, muy ramificado, con las ramas tocando el suelo o creciendo casi horizontalmente, corteza gruesa y superficie escamosa, inflorescencia en racimos, flores hermafroditas pentámeras, el fruto es una pequeña drupa globosa de 1 a 2 cm de diámetro, epicarpio o cáscara delgada de color verde (inmaduro) y amarillo (maduro); la parte comestible constituida por el mesocarpio de color amarillo, suave y pastoso, con cerca de 0,5 cm de espesor y olor y sabor característicos; endocarpio ovalado, leñoso, conteniendo una, dos o tres semillas viables.⁽¹⁸⁾

1.2.1.2 Taxonomía

La especie *B. crassifolia* se incluye en la siguiente clasificación taxonómica:

División: Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Orden : Geraniales

Familia : Malpighiaceae

Género : *Byrsonima*

Especie : *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K (Cronquist, A. 1981).

1.2.1.3 Sinonimia.

La sinonimia de *Byrsonima crassifolia* es amplia; los que más se emplean, son:

Byrsonima cumingana Juss.; *Byrsonima fendleri* Turcz.; *Byrsonima panamensis* Beurl.; *Byrsonima pulcra* Sesé.; *Malpighia crassifolia* L.; *Malpighia pulcra* Sesé. *Byrsonima cotinifolia* Kunth, *Byrsonima cubensis* Juss; *Byrsonima Karwinskiana*; *Byrsonima lanceolata* dc., *Byrsonima rufescens* Bertol, *Byrsonima cynerea* Dec. y *Byrsonima ferruginea*, entre otros⁽¹⁹⁾.

1.2.1.4 Distribución y Producción

El género *Byrsonima* se distribuye desde México hasta el Norte de Sudamérica debido a la tolerancia de los árboles a un amplio rango de condiciones ambientales.

La especie se distribuye en altitudes comprendidas entre los cero y 1600 metros sobre el nivel del mar, pero preferentemente hasta los 500 m.s.n.m.

Esta planta se multiplica por semillas y esquejes. Requiere un clima cálido y suelos fértiles, no siendo demasiado exigente en riegos ⁽²⁰⁾.

1.2.1.5 Composición Química

La corteza contiene taninos (20 a 30%), ácido oxálico (2.7%), glucósidos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenolactonas y triterpenos (β -amirina).

El tamizaje fitoquímico de hojas indica la presencia de saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólidos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles y triterpenoides (birsonimol); contiene terpenos (betulinaldehído, betulina, ácido betulínico, lupeol, ácido oleanólico, ursenaldehído), esteroides (β -sisterol y su glucósido).

Las hojas contienen 6% de grasa, β -sisterol, ácido maslínico y elágico, flavonoides (catequina, epicatequina, guayaverina, hiperina, quercetina, y galoilgalactósido), ésteres aromáticos (metilgalato), aminoácidos (alanina, ácido aspártico, prolina, valina, ácido pipercolico y 5-hidroxipipercolico) y un sulfonoglicolípido. La raíz contiene flavonoides, glucósidos cardiotónicos, sesquiterpenolactonas, taninos y triterpenos ⁽²¹⁾.

1.2.1.6 Usos Del Indano

La producción de Indano se ha incrementado en la provincia de Lamas (San Martín); durante los meses de enero a abril es el periodo en el que se produce en abundancia.

La especie *Byrsonima Crassifolia* tiene un sabor agrídulce y aceitoso. Se consume en forma natural como refrescos, helados, dulces, en pastas o en macerados con alcohol.

También se consume mezclado con harina de yuca, en sopas o como relleno de carnes. En algunos países de América Central y en Florida, se cultiva como ornamental por el efecto decorativo de sus flores.

Estudios demuestran que la corteza es astringente y tiene entre 10 y 25% de taninos; también como cauterizante y hemostática. En infusión es utilizada para curar diarrea por los nativos Lamas de la Selva Alta del Perú. Los frutos también son empleados para obtener manteca comestible y tintes. El jugo del fruto verde se vuelve negro cuando es expuesto al aire y se utiliza como tinte. De la corteza y de los frutos se extrae un tinte color marrón claro, empleado en Guatemala para teñir las telas de algodón.

En Panamá preparan un líquido fermentado de los frutos que denominan "chicha". Los nativos de la Amazonía utilizan infusiones o la cocción de la corteza, como producto febrífugo, broncodilatador, astringente, antiinflamatorio, expectorante y antidiarreico, lo cual puede estar relacionado a que contiene un alcaloide tipo fenantroindolizidina; también tiene varios derivados fenólicos, además de taninos y almidón⁽²²⁾.

1.2.1.7 Farmacología

Debido a su composición química, desde la antigüedad *Byrsonima crassifolia* (Indano) se ha aprovechado como medicina tradicional en México, en América central, particularmente en Guatemala, y en América del Sur, ya que se preparan remedios con el cocimiento de la corteza, ramas y hojas, sirviendo como astringente para casos de diarrea, disentería, enfermedades infecciosas de la piel, tos, para cicatrizar úlceras, estomatitis, favorecer la digestión, limpiar el vientre y estimular el apetito.

1.2.1.8 Metabolitos Principales

Los metabolitos principales son los taninos, especialmente en la corteza. Los responsables de la actividad farmacológica son los galatos de proantocianidinas β_2 , que en este caso se utilizan como antifúngicos, antiinflamatorios y nematocida. Estudios recientes en España han mostrado que los galatos de proantocianidinas β_2 , encontrados en otras plantas como ruda y mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) mejoran la

irrigación coronaria, aumentan la tolerancia miocárdica a la deficiencia de oxígeno, disminuyen la resistencia vascular periférica y mejoran la función cardíaca en general. Pueden tener acción contra enfermedades degenerativas cardíacas, como la esclerosis coronaria y angina de pecho y en general todos aquellos estados en los que hay una disminución de la eficiencia cardíaca. Las proantocianidinas β_2 también se utilizan en tratamientos de trastornos del ritmo, especialmente extra sístole y taquicardia paroxística. ⁽²³⁾

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

1.3.1 BACTERIA

Son los organismos más abundantes del planeta. Las caracteriza su ubicuidad, encontrándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre.

Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que hay aproximadamente 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce ⁽²⁴⁾.

➤ MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

Estos organismos microscópicos que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices; unicelulares sin núcleo ni clorofila, pueden presentarse desnudas o con una cápsula gelatinosa, aisladas o en grupos que pueden tener cilios o flagelos.

Las bacterias son microorganismos procariontes debido a que no poseen membrana nuclear por lo que su ADN está libre en la célula, son de organización muy sencilla.

La célula bacteriana consta de:

- Citoplasma:

Presenta un aspecto viscoso, y en su zona central aparece un nucleoide que contiene la mayor parte del ADN bacteriano, y en algunas bacterias aparecen fragmentos circulares de ADN con información genética, dispersos por el citoplasma: son los plásmidos.

La membrana plasmática presenta invaginaciones, que son los mesosomas, donde se encuentran enzimas que intervienen en la síntesis de ATP, y los pigmentos fotosintéticos en el caso de bacterias fotosintéticas.

En el citoplasma se encuentran inclusiones de diversa naturaleza química.

Las bacterias que presentan flagelos generalmente son rígidas, implantados en la membrana mediante un corpúsculo basal. Pueden poseer también fimbrias o pili muy numerosos y cortos, que pueden servir como pelos sexuales para el paso de ADN de una célula a otra.

- ARN y ribosomas característicos, para la síntesis de proteínas.

- Pared celular, que es rígida y con moléculas exclusivas de bacterias.⁽²⁵⁾

➤ ALIMENTACIÓN

Todos los mecanismos posibles de obtención de materia y energía podemos encontrarlos en las bacterias.

Según la fuente de carbono que utilizan, los seres vivos se dividen en autótrofos, cuya principal fuente de carbono es el CO₂, y heterótrofos cuando su fuente de carbono es materia orgánica.

Por otra parte según la fuente de energía, los organismos o seres vivos pueden ser fotótrofos, cuya principal fuente de energía es la luz, y quimiótrofos, cuya fuente de energía es un compuesto químico que se oxida.

Entre las bacterias podemos encontrar las siguientes formas:

1. Las bacterias quimioheterótrofas, utilizan un compuesto químico como fuente de carbono, y a su vez, este mismo compuesto es la fuente de energía. La mayor

parte de las bacterias cultivadas en laboratorios y las bacterias patógenas son de este grupo.

2. Las bacterias quimioautótrofas, utilizan compuestos inorgánicos reducidos como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono. Como, por ejemplo, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*.
3. Las bacterias fotoautótrofas, utilizan la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono. Bacterias purpúreas.
4. Las bacterias fotoheterótrofas, utilizan la luz como fuente de energía y biomoléculas como fuente de carbono. Ejemplos como *Rhodospirillum* y *Cloroflexus*.

➤ REPRODUCCIÓN DE LAS BACTERIAS

- Reproducción asexual.

Tras la duplicación del ADN, que está dirigida por la ADN-polimerasa que se encuentra en los mesosomas. La pared bacteriana crece hasta formar un tabique transversal separador de las dos nuevas bacterias.

- Reproducción sexual

Este tipo de reproducción se intercambia fragmentos de ADN. Puede realizarse por transformación, por conjugación o por transducción.

- a) **Transformación:** Es el intercambio genético que se produce cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de ADN de otra bacteria que se encuentran dispersos en el medio donde vive.
- b) **Conjugación:** En este proceso, una bacteria donadora transmite a través de un puente o pili, un fragmento de ADN, a otra bacteria receptora. La bacteria donadora posee un plásmido, además del cromosoma bacteriano.
- c) **Transducción:** En este caso la transferencia de ADN de una bacteria a otra se realiza a través de un virus bacteriófago, que se comporta como un vector intermediario entre las dos bacterias.⁽²⁶⁾

➤ CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

La identificación de las bacterias se realiza sobre la base de modelos agrupados en familias y especies.

Según el Orden, las bacterias se clasifican en:

1. Eubacteriales: son esféricas o bacilares, comprenden casi todas las bacterias patógenas y las formas fotótrofas.
2. Pseudomonadales: orden dividido en diez familias entre las que cabe citar las *Pseudomonae* y las *Spirillaceae*.
3. Espiroquetales: Treponemas, leptospiras.
4. Actinomicetales: micobacterias, actinomicetes.
5. Rickettsiales.
6. Micoplasmales.
7. Clamidobacteriales.
8. Hifomicrobiales.
9. Beggiatoales.
10. Cariofanales.
11. Mixobacteriales.

➤ RELACIONES ENTRE LA BACTERIA Y SU HUÉSPED

Ciertas bacterias viven independientes de otros seres vivos. Otras son parásitas. Pueden vivir en simbiosis con su huésped ayudándose mutuamente, o como comensales (sin beneficio). Pueden ser patógenas, es decir, vivir de su huésped.

La virulencia es la aptitud de un microorganismo para multiplicarse en los tejidos de su huésped (creando en ellos alteraciones). Esta virulencia puede estar atenuada (base del principio de la vacunación) o exaltada (paso de un sujeto a otro) y parece ser función del huésped (terreno) y del entorno (condiciones climáticas). La puerta de entrada de la infección tiene igualmente un papel considerable en la virulencia del germen.

El poder patógeno es la capacidad de un germen de implantarse en un huésped y de crear trastornos en él. Este poder patógeno está ligado a dos causas:

- La producción de lesiones en los tejidos mediante constituyentes de la bacteria, como pueden ser enzimas que ella excreta y que atacan tejidos vecinos, o productos tóxicos provenientes del metabolismo bacteriano.
- La producción de toxinas. Se puede tratar de toxinas proteicas (exotoxinas excretadas por la bacteria, transportadas a través de la sangre y que actúan a distancia sobre órganos sensibles) o de toxinas glucoproteicas (endotoxinas); estas últimas actúan únicamente en el momento de la destrucción de la bacteria y pudiendo ser responsables de choques infecciosos en el curso de septicemias provocadas por gérmenes Gramnegativos en el momento en que la toxina es liberada.

A estas agresiones microbianas, el organismo opone reacciones defensivas ligadas a procesos de inmunidad, mientras que el conflicto huésped-bacteria se traduce por manifestaciones clínicas y biológicas de la enfermedad infecciosa. ⁽²⁷⁾

➤ BACTERIAS PATÓGENAS

Casi doscientas especies de bacterias son patógenas para el ser humano; es decir, causantes de enfermedades.

El efecto patógeno varía mucho en función de las especies y depende tanto de la virulencia de la especie en particular como de las condiciones del organismo huésped.

Entre las bacterias más dañinas están las causantes del cólera, del tétanos, de la gangrena gaseosa, de la lepra, de la peste, de la disentería bacilar, de la tuberculosis, de la sífilis, de la fiebre tifoidea, de la difteria, de la fiebre ondulante o brucelosis, y de muchas formas de neumonía.

Hasta el descubrimiento de los virus, las bacterias fueron consideradas los agentes patógenos de todas las enfermedades infecciosas.

Entre los más importantes desde el punto de vista de salud, se encuentran:

1.3.2 *Staphylococcus aureus*

Los *Staphylococcus* son cocos Gram⁺ positivos, catalasa positivos que necesitan una fuente de nitrógeno orgánico para poder crecer. La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus* producen un pigmento dorado; se destruye lentamente a 60°C. Se encuentran en las fosas nasales, la piel y las lesiones de humanos y otros mamíferos y se utilizan como componentes de criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación y para aquellos que son sometidos a manipulación después del proceso térmico. Producen toxiinfección alimentaria y su presencia en cantidades altas en los alimentos es totalmente inadmisibles. Generalmente los estafilococos se eliminan durante la cocción. Altos recuentos en alimentos sometidos a procesos térmicos se deben a contaminación posterior a este tratamiento (manipulación, contacto con equipo o aire contaminado y/o conservación inadecuada del mismo - falta de refrigeración).

La presencia de *Staphylococcus aureus* puede indicar un riesgo potencial para la salud. Un número elevado de estafilococos puede indicar la presencia de toxinas termoestables; no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas, ya que una población numerosa pudo haberse reducido a un número más pequeño debido a una etapa del proceso, por ej., calentamiento o fermentación. ⁽²⁸⁾

***Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina o SARM**

Es una cepa de la bacteria *Staphylococcus aureus* que se ha vuelto resistente a varios antibióticos, primero a la penicilina y posteriormente a la meticilina. Fue descubierto originalmente en el Reino Unido en 1961 y actualmente está muy propagado.

La infección de este microorganismo puede amenazar la vida de pacientes con heridas profundas, mediante catéteres intravenosos u otros instrumentos que introducen cuerpos extraños, o como una infección secundaria en pacientes con un sistema inmunitario debilitado. Si bien el SARM no responde a los antibióticos más comunes, hay otros fármacos como la vancomicina y el linezolid, que ayudan a combatir la infección

El SARM produce sobre todo infección nosocomial, es decir, una infección contraída en un hospital. Su manifestación más grave es la neumonía nosocomial, enfermedad

que puede ser mortal y que se contrae a través de la inserción de un tubo ventilador en el cuerpo del paciente.

En Estados Unidos se informa cada vez más de brotes de colonización de SARM mediante contacto cutáneo en vestidores y gimnasios, incluso entre poblaciones sanas, y el SARM causa al menos el 20% de las infecciones de *Staphylococcus aureus* en poblaciones que consumen drogas por vía intravenosa.

El SARM puede provocar infecciones potencialmente letales y generalmente solo es posible tratarla con antibióticos intravenosos muy costosos.

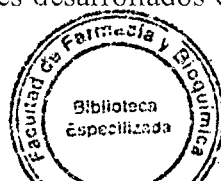
Binh Diep, investigador de la University of California en San Francisco, afirmó que "Una vez que esto alcance a la población general, será realmente imparable".

El SARM causó la muerte de unos 19.000 estadounidenses en el 2005, la mayoría de ellos en hospitales, según un informe publicado en octubre en Journal of the American Medical Association. Cerca del 30% de las personas transporta estafilococos de manera crónica, los cuales pueden transmitirse por el contacto con otras personas o porque las bacterias se depositan en superficies u objetos que luego las personas tocan. La bacteria puede generar infecciones profundas en los tejidos si ingresa al organismo por una herida en la piel. ⁽²⁹⁾

1.3.3 *Escherichia coli*

Bacteria con forma de bastón (bacilo), que pertenece a la familia de las Enterobacteriáceas; está considerada como el material biológico más utilizado en experimentación. Esta bacteria se encuentra en el tracto intestinal de los mamíferos. La especie comprende varios grupos que se establecen según su actividad.

Escherichia coli enteropatógena o EPEC (del inglés Enteropathogenic *Escherichia coli*) es patógena principalmente en niños pequeños, incluyendo a los neonatos. La primera variedad patógena de *Escherichia coli* reconocida como causa de diarrea fue EPEC y ocasionó brotes epidémicos de diarrea infantil (incluyendo algunos brotes en guarderías de hospitales) en países desarrollados en los decenios de 1940 y 1950. Sin



embargo, en la actualidad la infección por EPEC es rara en los países desarrollados. Por el contrario, en los subdesarrollados este microorganismo es causa importante de diarrea infantil (tanto brotes epidémicos como casos aislados). También puede ocurrir diseminación rápida de persona a persona. Una vez que se coloniza el intestino delgado, los síntomas aparecen después de un período breve de incubación (uno o dos días). La adherencia circunscrita inicial provoca borramiento característico de las microvellosidades, con la formación de pedestales con forma de taza en los que abunda la actina. Las evacuaciones diarreicas contienen moco, pero no sangre. Aunque la diarrea por EPEC es autolimitada (dura cinco a 15 días), en ocasiones persiste varias semanas.

- ***Escherichia coli* entero agregante y adherencia difusa.**

EAEC (del inglés Entero aggregative *Escherichia coli*) y DAEC (Entero Aggregative *Escherichia coli*) se observan básicamente en los países en desarrollo y en niños pequeños. Estas cepas pueden causar diarrea del turista. Se necesita una gran concentración para que haya infección. *In vitro*, los microorganismos presentan un patrón de adherencia difuso o "en pila de ladrillos". El cuadro clínico conlleva diarrea líquida prolongada.

Cepas comensales

Las variedades comensales de *Escherichia coli* integran la mayor parte de la flora intestinal facultativa del ser humano y por lo general ofrecen beneficios a su hospedador. Estas cepas por lo general carecen de los factores especializados de virulencia que permiten a las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena intestinal y extraintestinal originar enfermedades dentro y fuera del aparato digestivo, respectivamente. No obstante, *Escherichia coli* comensal algunas veces participa en ciertas infecciones extraintestinales, cuando existe algún factor agravante, como un cuerpo extraño (p. ej., una sonda), defectos en el hospedador (p. ej., anomalías anatómicas o funcionales locales, como obstrucción urinaria o biliar o inmunodeficiencia) o una inoculación abundante o que contiene una mezcla de especies bacterianas (como contaminación fecal de la cavidad peritoneal).⁽³⁰⁾

1.4 La Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico

Las bacterias resistentes son inmunes a los efectos de los antibacterianos, como los antibióticos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud de marzo del 2012, en el mundo cada año se producen unos 440 000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente que causan como mínimo 150,000 defunciones. Hasta la fecha, la tuberculosis ultrarresistente se ha notificado en 64 países.

Mecanismos de Resistencia

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. De esta manera puede observarse la resistencia desde el ambiente biológico y otro desde el bioquímico.

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprim/sulfametoxazol; bacilos Gramnegativos aeróbicos a clindamicina.

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el ADN (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones).

En el primero se dan casos tales como la transformación de una betalactamasa en una betalactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las purinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo.

Existen otras denominaciones de resistencia como son:

- Resistencia relativa o intermedia: cuando ocurre un incremento gradual de la CMI (concentración Mínima Inhibitoria) a través del tiempo. Para obtener un efecto terapéutico es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados. La susceptibilidad o resistencia del germen es en este caso dependiente de concentración.
- Resistencia absoluta: cuando sucede un incremento súbito en la CMI de un cultivo durante o después de la terapia. Es inefectivo el incremento de la dosis clínica usual. Ejemplo de ello es la *Pseudomonas spp.* resistente a gentamicina y el *Streptococcus pneumoniae* altamente resistente a penicilina y uso de levofloxacina.
- Seudoresistencia: cuando ocurre una resistencia *in vitro* pero una gran efectividad *in vivo*.

1.4.1 La resistencia bacteriana en el Perú

La incidencia de la resistencia bacteriana en los últimos años ha venido ocasionando un problema de salud en todos los grupos poblacionales peruanos especialmente en niños.

El uso irracional de antibacterianos ha derivado en la emergencia y diseminación de bacterias antes resistentes a drogas de primera línea, baratas y efectivos.

El Instituto Nacional de salud (INS) en el informe proporcionada por la Vigilancia de la Resistencia a Antimicrobianos en el 2007, afirma que bacterias con mayor índice de resistencia y causantes de las principales enfermedades, son las enfermedades diarreicas, infecciones del tracto respiratorio, meningitis, infecciones de transmisión sexual y las infecciones adquiridas en el hospital, siendo entre los agentes infecciosos más importantes *Staphylococcus aureus*, *S. coagulasa negativo*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella* y otros. ⁽³¹⁾

1.4.2 Resistencia bacteriana en la Región Loreto

En la región Loreto existen pocos reportes de casos de resistencia a antibacterianos debido a que la mayoría de instituciones de salud no cuentan con las instalaciones adecuadas para su análisis y estudio.

En un estudio de investigación realizado por el Comité de Ética del NAMRU-6 de la Marina de los Estados Unidos, reportó que en los hospitales de Iquitos existen casos de resistencia bacteriana donde *Staphylococcus aureus* presentó mayor resistencia en un 100% a las penicilinas, *Pseudomona aureginosa* a amoxicilina (100%), *Escherichia coli* a múltiples antibióticos como ampicilina (100%), ciprofloxacino (86,7%), cotrimoxazol (80%) y tetraciclina (100%).⁽³²⁾

2. MÉTODOS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

Un medio de cultivo intenta el crecimiento y reproducción *in vitro* de las bacterias, para observar sus propiedades y conseguir un mejor estudio bioquímico e inmunológico.

Los **medios selectivos** son aquellos que poseen algún componente que permite o no el crecimiento de una especie bacteriana, carácter de importancias para su identificación; los **medios diferenciales** son aquellos en que las diversas especies que hay que testar, alteran de forma distinta, por lo que suelen llevar indicadores (sustancias que varían su coloración según el pH del medio) u otros índices de reacciones químicas definidas. Ambos medios, selectivos o diferenciales, pueden ser líquidos o sólidos.

El objetivo clásico del aislamiento es la separación de los microorganismos en grupos que puedan identificarse siguiendo los principios de la microbiología.

LOS MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN PARA BACTERIAS MÁS UTILIZADOS, SON:

2.1 Métodos De Difusión

2.1.1 Método del Antibiógrama Disco-Placa

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer - Kirby es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde en el agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como *concentración crítica* y se aproxima a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ejemplo método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores.

Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.

Indicaciones y limitaciones

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo

de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.* Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus spp.*

2.1.2 Método de tiras Epsilon (E-test)

Es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana, bastante sencillo y se correlaciona bien con el método de dilución en caldo; aquí se puede conocer la CMI.

Consiste en una tira de plástico no poroso que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano.

Se inocula la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose la difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar.

Tras la incubación se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La CMI será el valor obtenido en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira.

Lectura de resultados:

Después del período de incubación se lee la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test.

Indicaciones y limitaciones

Cuando la CMI coincide entre dos marcas se informa el valor superior.

Si se observan intersecciones diferentes, se informa el valor más alto, siempre que la diferencia entre los dos valores no sea superior a la mitad de un paso de dilución doble.

Si se observan colonias grandes en la zona de inhibición, puede representar cultivo mixto o variantes resistentes. Se debe repetir el test a partir del cultivo primario. Si se repite el mismo patrón se debe trabajar las colonias que aparecen en la zona de inhibición. ⁽³³⁾

2.1.3 Métodos de Dilución

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente, puede determinarse también la actividad bactericida.

Indicaciones y limitaciones

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada. La determinación de la actividad antimicrobiana mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2) en vez de una escala continua (como sucede en el método de difusión), por lo que los valores de CMI reales de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente

obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Desde el punto de vista clínico, la diferencia entre los valores real y experimental de CMI no suelen ser trascendentes cuando se trata de concentraciones bajas, pero pueden tener importancia para las CMI altas que se acerquen a las concentraciones alcanzables *in vivo*.

En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros, en particular cuando se utilizan paneles comerciales de microdilución.

2.1.4 Método de Macrodilución.

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo-bacteria una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1 ml de medio estéril sin antimicrobiano.

Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo.

Microdilución en caldo:

Es el método de referencia dentro de los métodos de dilución para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos y sirve como base para la realización de métodos automáticos y semiautomáticos.

Está basado en la inhibición del crecimiento microbiano en un medio líquido, en presencia de una concentración del antibiótico en progresión aritmética.

Indicaciones y limitaciones

La CMI será la concentración de antibiótico contenida en el primer pocillo donde no se observa crecimiento bacteriano (no turbidez).

Si el microorganismo crece en todos los pocillos, la CMI es superior a la mayor concentración del antimicrobiano estudiado. Si no crece en ningún pocillo, la CMI es inferior a la menor concentración del antimicrobiano estudiado.

Es un método de manejo sencillo, con menor consumo de recursos humanos, de alta reproducibilidad, con análisis de resultados mediante sistemas expertos y de bastante rapidez.

Inconvenientes: elevado costo en consumibles y solamente tiene garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y sin requerimientos especiales.

Se emplea un análisis de regresión para determinar la CMI derivada del crecimiento observado. ⁽³⁴⁾



II. DEFINICIONES OPERACIONALES

2.1 VARIABLES:

2.1.1 Independiente:

- ❖ Extracto etanólico fraccionado obtenido de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).

2.1.2 Dependiente:

- ❖ Actividad antibacteriana del extracto etanólico fraccionado obtenido de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).

2.2 INDICADORES:

2.2.1 Independiente (X):

Concentración del extracto:

- Concentración baja : 3.91 mg/ml*
- Concentración media: 62.5 mg/ml*
- Concentración alta : 2000 mg/ml*

2.2.2 Dependiente (Y):

Grado de turbidez:

4 = No inhibición.

3 = Ligera inhibición, inhibición del 25%.

2 = Inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%.

1 = Ligera turbidez del medio, inhibición del 75%.

0 = Inhibición del 100%.

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE

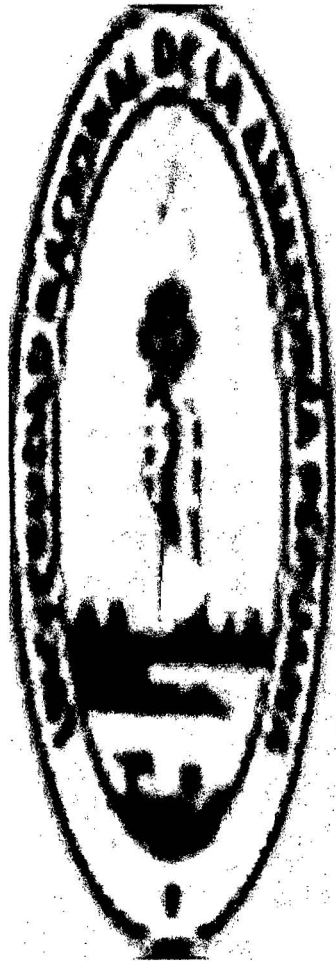
| VARIABLE INDEPENDIENTE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL | INDICADOR | INDICE | ESCALA | TIPO DE VARIABLE |
|--------------------------------|---|---|---|--|---------|------------------|
| Extracto etanólico fraccionado | Diluciones realizadas a partir del extracto etanólico para obtener una solución y una ácida | <p>Fracción A: 10ml del extracto etanólico (fase básica).</p> <p>Fracción B: Dilución del extracto etanólico con HCL al 1% obteniendo un pH 2 (Fase ácida).</p> <p>Fracción C: Dilución del extracto etanólico con hidróxido de sodio obteniendo un pH 7 (Fase neutra).</p> <p>Fracción D: Dilución del extracto etanólico con sulfato de sodio (0,1 gr. por ml de solución), obteniendo una fase acuosa.</p> | Concentración del extracto etanólico fraccionado de corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Indano). | <p>Método de Difusión en Disco:</p> <p>Concentración baja: 200 mg en disco</p> <p>Concentración media: 400 mg en disco</p> <p>Concentración alta: 600 mg en disco</p> <p>Concentración muy alta: 800 mg en disco</p> <p>Método de Macrodilución:</p> <p>CMI: De 32 a 0.25 mg/ml</p> | Nominal | Cuantitativa |

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE.

| VARIABLE DEPENDIENTE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL | INDICADOR | ÍNDICE | ESCALA | TIPO DE VARIABLE |
|--------------------------|---|---|---|--|---------|------------------|
| Actividad antibacteriana | Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> causado por agentes químicos externos produciendo una acción bacteriostática o bactericida de la bacteria. | El grado de sensibilidad que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> expuesta al extracto en estudio. | <ul style="list-style-type: none"> Grado de sensibilidad | Método de Difusión en Disco: Presenta halo de Inhibición No presenta halo de Inhibición | Nominal | Cualitativa |
| | | El grado de turbidez que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> expuesta al extracto en estudio | <ul style="list-style-type: none"> Grado de Turbidez | Método de Macrodilución: Mínima Concentración que no presenta turbidez | Nominal | Cualitativa |

III. HIPÓTESIS

Presenta actividad antibacteriana *in vitro* el extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* "Indano" frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar. Iquitos, 2014.



UNAP

Capítulo **III**

I. METODOLOGÍA

1.1 TIPO DE ESTUDIO

Se empleo el *Diseño experimental, descriptivo, prospectivo y Longitudinal.*

- ❖ *Experimental*: Porque se evalúa un fenómeno dado introduciendo elementos que modifican el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.
- ❖ *Descriptivo* : Porque el estudio describe e interpreta en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- ❖ *Prospectivo* : Porque en el registro de información se toma en cuenta los hechos a partir del inicio de la fecha de estudio.
- ❖ *Longitudinal* : Porque se recolectaron datos a través del tiempo en puntos o periodos especificados para hacer referencias respecto al cambio, sus determinantes y consecuencias.

1.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

1.2.1 Población Vegetal:

La población vegetal en estudio estuvo constituido por la especie vegetal *Byrsonima crassifolia* (Indano) de la comunidad de Lamas, Departamento de San Martín.

1.2.2 Muestra Vegetal:

Constituida por 2 kilogramos de corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” recolectados de la comunidad de Lamas, Departamento de San Martín.

1.2.2.1 Criterios de Inclusión:

- Cortezas no contaminadas con bacterias u hongos.

1.2.2.2 Criterios de exclusión:

- Cortezas contaminadas con bacterias u hongos.

1.2.3 Población Microbiológica

La población microbiológica es constituida por cepas de bacterias procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS).

1.2.4 Muestra Microbiológica

Las muestras microbiológicas están constituidas por las bacterias:

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922

1.2.4.1 Criterios de Inclusión:

- Cepas morfológicamente iguales.
- Cepas sin contaminación
- Cepas de crecimiento reciente.

1.2.4.2 Criterios de exclusión:

- Cepas que no sean morfológicamente iguales.
- Cepas contaminadas con otros microorganismos.
- Cepas incubadas por un tiempo mayor a las 24 horas.



1.3 INSTRUMENTOS

1.3.1 Materiales de vidrio:

- ❖ Matraz Erlenmeyer x 250, 500 y 1000 cc.
- ❖ Vaso de precipitado x 5, 10, 20, 50 y 100 cc.
- ❖ Pipeta graduada de 1, 5 y 10 cc.
- ❖ Placas de Petri
- ❖ Pipeta Pasteur
- ❖ Probeta x 10, 100, 250 y 1000 cc.
- ❖ Frascos de vidrio.
- ❖ Embudos de vidrio.
- ❖ Tubos de ensayo de 5 y 7 cc.
- ❖ Bagueta de vidrio.

1.3.2 Material de metal:

- ❖ Asa de Kolle para siembra bacteriológica.
- ❖ Cuchillo mediano.
- ❖ Escobillas lavatubos.
- ❖ Espátulas medianas.
- ❖ Gradilla metálica.
- ❖ Pinza estéril.
- ❖ Regla Vernier

1.3.3 Equipos:

- ❖ Autoclave AUTESTER MOD. 437 - P
- ❖ Balanza analítica SARTORIUS
- ❖ Baño termostado SELECTA PRECISTERM
- ❖ Cámara fotográfica SONY DSC-W690
- ❖ Centrífuga CHRJST
- ❖ Cocina eléctrica.
- ❖ Estufa SELECTA
- ❖ Incubadora microbiológica MEMMERT.
- ❖ Potenciómetro – pH-meter CORNING PR 15
- ❖ Refrigeradora FRIOLUX
- ❖ Rotavapor BÜCHI
- ❖ Cabina de bioseguridad NUAIRE CLASS II
- ❖ Desionizador de agua OPTIC IVYMEN SYSTEMN AC – L8
- ❖ Micropipetas de 10, 20, 30 y 40 cc.
- ❖ Pipeteador automático LABMATE SOFT
- ❖ Mechero de Bunsen
- ❖ Bomba al vacío
- ❖ Vórtex MIXER MODEL VM-1000

1.3.4 Medios de cultivo y Reactivos:

- ❖ Agar Papa Dextrosa MERCK.
- ❖ Agar Mueller Hinton MERCK
- ❖ Caldo Mueller Hinton MERCK
- ❖ Cloruro de bario (BaCl_2) MERCK, para la preparación de Estándar 0.5 de McFarland
- ❖ Ácido sulfúrico MERCK, para la preparación de Estándar 0.5 de McFarland
- ❖ Caldo Trypticase Soya MERCK.
- ❖ Cloruro de magnesio MERCK
- ❖ Discos de sensibilidad (gentamicina 10 μg) MERCK
- ❖ Ácido clorhídrico MERCK
- ❖ Sulfato de sodio MERCK.
- ❖ Hidróxido de amonio merck.
- ❖ Cloroformo MERCK.

Otros materiales:

- ❖ Algodón.
- ❖ Agua deionizada
- ❖ Agua destilada
- ❖ Alcohol 70°
- ❖ Alcohol de 96°
- ❖ Detergente.
- ❖ Guantes quirúrgicos.

- ❖ Hisopos.
- ❖ Mascarillas.
- ❖ Papel aluminio.
- ❖ Papel de despacho.
- ❖ Papel secante.
- ❖ Papel tissue.
- ❖ Parafilm 2'x 250'
- ❖ Plumón marcador.
- ❖ Gradillas
- ❖ Frasco-viales (Eppendorf)
- ❖ Cinta adhesiva
- ❖ Gasa
- ❖ Gorro
- ❖ Solución desinfectante
- ❖ Mandiles
- ❖ Discos impregnados con antibiótico
- ❖ Discos impregnados con muestra problema.
- ❖ Mortero de porcelana
- ❖ Lentes de protección

1.4 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

1.4.1 Recolección de la Muestra Vegetal

Las muestras de *Byrsonima crassifolia* (Indano) fueron recolectadas en la comunidad de Lamas –Provincia de Lamas, Distrito de Lamas, Región de San Martín, Perú.

Latitud : 6.42189 S
Longitud : 76.5161 N
Altitud : 809 msnm.

1.4.2. Identificación de la muestra vegetal

Para la identificación de la especie vegetal que se utilizó como materia prima, se enviaron muestras de cortezas de la planta al Herbarium Amazonense que cuenta con las excicatas de identificación.

Una vez clasificadas y seleccionadas fueron depositadas en el almacén del laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de industria Alimentaria de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), ubicado en la Planta Piloto, Av. Freyre N° 610 -- Iquitos.

La muestra vegetal seleccionada *Byrsonima crassifolia* (Indano) fue desecada a temperatura ambiente entre 23° a 30°C, en lugar apartado del laboratorio exento de humedad por un periodo de 7 días.

1.4.3 Molienda de la muestra vegetal:

La materia prima fue molida lo suficientemente pequeña, se colocó en recipientes adecuados lo cual se conservó en lugares secos y frescos.

1.4.4 Obtención del extracto Etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).

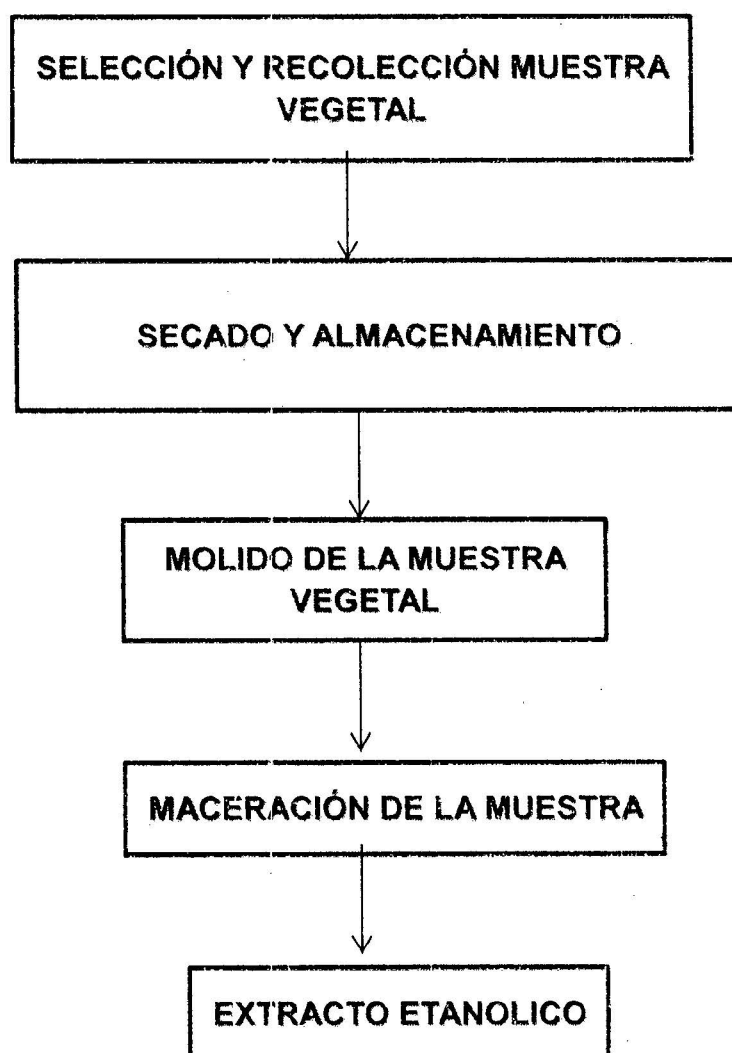
Se obtuvo 1300g de materia prima en 3000 ml de alcohol al 96%, dejándolo macerar durante 7 días a temperatura ambiente para su maceración se adiciono

un poco de alcohol (etanol) al 96% para una rápida remoción del macerado luego se filtró consecutivamente con filtros de 10cm.

La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor Büch estándar, a una temperatura de 65 °C y a una presión de 690 mmHg por espacio de 3 h aproximadamente; posteriormente se dejó secar de 2 a 3 días en placas Petri.

La muestra seca tiene un aspecto vidrioso y se procedió a moler con la ayuda de un mortero obteniendo un peso de 136g.

Esquema N°01: Extracción De Plantas Medicinales.



II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES A PARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO (VER ESQUEMA N° 02 EN ANEXO N°02).

Fracción A:

Está constituida por 10 ml del extracto etanólico de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano). (VER FOTO N° 07 EN ANEXO N°04).

Fracción B:

Del residuo sólido seco se toma como muestra 10 g al que luego se le agregó 400 ml de HCL al 1%; para una mejor dilución se añadió un poquito de alcohol al 96 % dando un pH 2 luego se procedió al filtrado, debido que la muestra es un poco viscosa se impregno al papel filtro con un poquito de alcohol al 96% para facilitar el paso de la solución. (VER FOTO N° 08 EN ANEXO N°04).

A la solución filtrada se añadió 100 ml de cloroformo; y se realizó la separación con la ayuda de una pera de decantación realizando previamente una pequeña agitación.

Se realiza la separación obteniendo la fase insoluble (ácida) la cual se seca con 25 g de sulfato de sodio, dejando secar la muestra obteniéndose así la Fracción B.

Fracción C:

La solución que no es separada se coloca en un vaso de precipitación para neutralizar con hidróxido de sodio llegando a un pH 7 luego se extrae con cloroformo (4 extracciones de 100 ml cada una), dando como resultado 400 ml de solución clorofórmica realizando en cada extracción la separación y el secado con 25g sulfato de sodio obteniendo la Fracción C (fase neutra). (VER FOTO N° 10 EN ANEXO N°04).

Fracción D:

A la solución que queda en la pera de decantación se agrega 25 g de sulfato de sodio (0,1 g por ml de solución), luego se extrae con una mezcla de cloroformo: etanol (3:2) realizando 7 extracciones de 100 ml cada una y secando con 4g de sulfato de sodio obteniendo una fase acuosa siendo la fracción D.

Cada fracción se deja por varios días expuesto al medio ambiente, en vasos correctamente sellados con papel aluminio con pequeñas aberturas; esto hasta que por evaporación se obtenga un residuo sólido.

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD Y ACCIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR POR DISCO.

- De cada extracto fraccionado (fracciones A, B, C y D) se procedió a sacar 200, 400, 600 y 800 mg de residuo, en de disolución metanol/agua estéril (1:1) disolviéndolos en 2000, 4000, 6000 y 8000 μL , y colocados en tubos de ensayos estériles para obtener las concentraciones respectivas.
- Para una homogenización completa se colocaron cada tubo de ensayo en el vórtex hasta que se disuelva por completo.

Preparación de los discos de sensibilidad

- Se obtuvo los discos de sensibilidad utilizando el papel Whatman N°3 y empleando un perforador, los discos fueron colocados en una placa petri para que sean esterilizados en autoclave a 121 °C en 15 libras de presión por 15 minutos.
- Luego se procedió a agregar a cada uno de los discos 20 μL de las concentraciones de los extractos vegetales de cada fracción que son de 200 mg/ml, 400 mg/ml, 600 mg/ml y 800 mg/ml y se dejaron secar a 37 °C.

Esquema N°03: Procedimiento Del Método De Difusión En Disco

“FRACCION A”

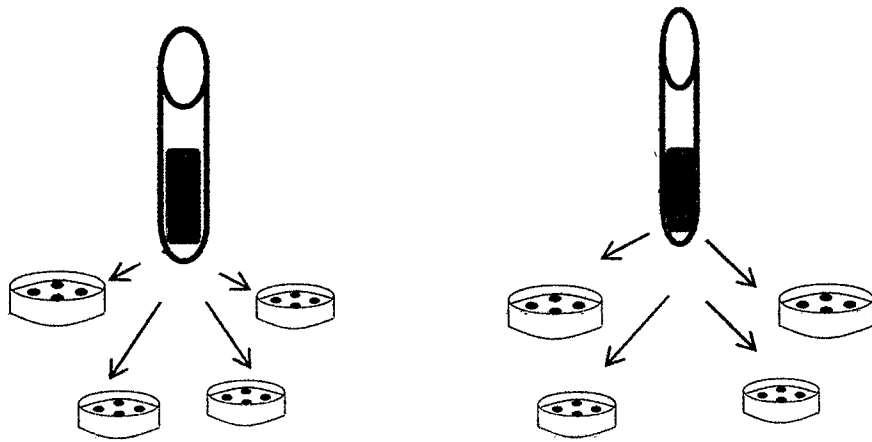
Concentración 200mg

Concentración 400mg



Concentración 6000mg

Concentración 800mg



Preparación de los inóculos:

- a. De un cultivo de bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) cultivado en agar nutritivo se seleccionaron cuatro colonias del mismo tipo morfológico, y se transfirió a un tubo inclinado de caldo TSB para su incubación a una temperatura de entre 35°C a 37°C por 24 horas.
- b. El cultivo obtenido se sembró por estrías y por triplicado (Ver foto N°2) en una placa de Petri conteniendo agar TSA y se incubo a una temperatura de 35°C a 37°C por 24 horas.
- c. Con un asa bacteriológica se transfirió cada colonia a un tubo que contenga 5 ml de suero fisiológico.
- d. El suero fisiológico se incubo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta obtener una turbidez que alcance la del estándar 0,5 de la escala de McFarland (por 2 a 6 horas). Se ajusta la turbidez del inóculo hasta 0.5 de la escala de McFarland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente se observan los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.
- e. Si no se alcanza la turbidez de McFarland se vuelve a sembrar y si en caso el inoculo es muy turbio se agrega mas suero hasta obtener la misma turbidez al McFarland una vez que se alcanzo la turbidez lo dejamos incubar por 15 minutos entre 35°C a 37°C.

La suspensión preparada contuvo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Inoculación de las Placas

Después de los 15 minutos siguientes de ajustada la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rosando el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inóculo.



Se inocularon en la superficie de la placa con agar Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo, se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos antes de colocar los discos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido. Esto se realiza para cada extracto fraccionado (A, B, C Y D) y por triplicado.

Utilización de los discos

Se colocaron los discos estériles impregnados con las diversas concentraciones (200, 400, 600 y 800 mg) de cada extracto fraccionado (A, B, C y D) colocándolos individualmente sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie de la placa.

Se distribuyeron los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. No deberán colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Los discos no deben ser removidos una vez que toman contacto con la superficie del agar debido a que algunas muestras se difunden rápidamente.

- El control positivo para cada placa fue un disco de sensibilidad impregnado con 10 µg de gentamicina.
- El control negativo para cada placa fue un disco impregnado con 20 uL de una mezcla metanol/agua estéril (1:1).
- A los 15 minutos posteriores a la aplicación de las muestras a los discos, se incubaron las placas en posición invertida a 35°C. Después del tiempo recomendado de incubación 20 horas se examinó cada placa y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

- Se midió los diámetros de las zonas de inhibición, con un vernier incluyendo el diámetro del disco.
- Se debe mantener iluminada la parte posterior a la placa Petri localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.
- Se observo la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas del vernier por efecto del paralelismo.
- El punto final se tomo como el área que no muestra un crecimiento visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no se incluyo un velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que pueden ser detectadas con mucha dificultad en el borde de la zona.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE ANTIBIÓTICOS DE REFERENCIA

CUADRO 01: VALORES DE REFERENCIA DE SENSIBILIDAD A DISTINTOS ANTIBIÓTICOS.

| | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | | | | | | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | | | | |
|----------------|---------------------------------------|-------|-----|--------------------------|----|-----|--|-------|-----|-------------------------|---|------|
| | Diámetro de inhibición (mm) | | | CMI del estándar (ug/mL) | | | Diámetro de inhibición (mm) | | | CMI del estándar(ug/mL) | | |
| | S | I | R | S | I | R | S | I | R | S | I | R |
| Gentamicina | ≥15 | 13-14 | ≤12 | ≥4 | 8 | ≤16 | ≥15 | 13-14 | ≤12 | ≥4 | 8 | ≤16 |
| Ampicilina | ≥17 | 14-17 | ≤13 | ≥8 | 16 | ≤32 | ≥29 | - | ≤28 | ≥0,2 | - | ≤0,5 |
| Ciprofloxacino | ≥21 | 16-20 | ≤15 | ≥1 | 2 | ≤4 | ≥21 | 16-20 | ≤15 | ≥1 | 8 | ≤4 |

* Fuente: valores tomados de CLSI 2010

S= sensible

I= intermedia

R= resistente

CUADRO 02: FÓRMULA PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN:

$$\%INHIBICIÓN: \frac{(\text{Diámetro de la muestra} - \text{Diámetro del CN}) \times 100}{\text{Diámetro del CP}}$$

Donde:

CN: Control Negativo

CP: Control positivo

CUADRO 03: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SEGÚN EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN:

| ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA | PORCENTAJE DE INHIBICIÓN |
|--------------------------|--------------------------|
| Inactivo | < 40% |
| Poco activo | 40 a 50% |
| Moderadamente activo | 51 a 75% |
| Muy activo | > 76% |

➤ Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antibacteriana IMET – EsSalud 2007

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO (MACRODILUCIÓN)

Método de Macrodilución en caldo.

- De cada extracto fraccionado se peso 640 mg y se colocaron en viales tipo Eppendorf estériles, diluidos en 1 ml de disolución metanol/agua (1:1) para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/ml obteniendo una solución madre para cada extracto.
- Se enumeraron 8 tubos de ensayo de tapa-rosca estériles para cada fracción, teniéndose un total de 32 tubos de ensayo.

- De la solución madre del extracto A se sacan 0.2 ml y se agregan al tubo N° 01 que contiene 1.8 ml de caldo Mueller Hinton. Se procede de la misma manera para las fracciones A, B, C y D.
- Del tubo N° 01 se sacó 1 ml para ser añadido al Tubo N° 02, y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 08; del tubo N° 08 se saca 1 ml para desecharlo.
- Después de este proceso se agregan a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana. El volumen final mínimo en cada tubo, fue de 2 ml.
- Las soluciones de cada tubo, quedan con concentraciones comprendidas entre el rango de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml.

Los extractos que no se disuelven por agitación fueron llevados por algunos minutos en baño maría (temperatura de 40°C) y colocados nuevamente en el vórtex.

El tiempo de incubación para los microorganismos fue de 16 a 20 horas.

Preparación de los controles

- Para el control positivo en la prueba se utilizó el antibiótico gentamicina en ampolla de 160 mg/2ml, de la cual se utilizó 0.64 ml para enrasar hasta 5 ml con agua destilada en un tubo estéril para obtener una solución madre de 10240 µg/ml.
- De la solución madre se sacó 0.2 ml para añadir al tubo N° 01 que contenía 1.8 ml de caldo Mueller Hinton.
- Del tubo N° 01 se sacó 1 ml para añadir al Tubo N° 02 ; y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09.

- Del tubo N° 09 se sacó 1 ml que fue desechado.
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana.
Las concentraciones obtenidas estuvieron comprendidas en el rango de 5120 µg/ml y 20 µg/ml.
Este control se realizó para cada fracción.

Preparación del inóculo

- Se obtuvo por crecimiento de la bacteria (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) hasta alcanzar una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland, o por suspensión directa de colonias en caldo o solución fisiológica hasta alcanzar dicha turbidez, Se realizó el ensayo en tubos y se llevo a cabo una dilución al 1/100 de este inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml.

Lectura de los resultados

- La CMI será la menor concentración del antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo.
- El punto final se define visualmente cuando no hay turbidez en el caldo.
- Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada tubo con el tubo control de crecimiento.

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) utiliza una puntuación de 0 a 4 para medir la inhibición del crecimiento, según:

4 = No inhibición.

3 = Ligera inhibición, inhibición del 25%.

2 = Inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%.

1 = Ligera turbidez del medio, inhibición del 75%.

0 = Inhibición del 100%.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima.

- Una vez leída la CMI se homogenizo el contenido de los tubos para sembrar 10 µl de los tubos donde no hay crecimiento.
- Se depositó 10 µl de cada tubo sobre el agar TSA y se extendió con un asa y para así diluir la concentración del antimicrobiano vehiculado, se neutraliza el efecto y se favorece el recuento.
- Se incubó a 38°C y leer a las 20, y 24 horas.
- Se Recontó las colonias que han crecido a las 20, y 24 horas de incubación en las placas donde se sembró el inoculo original.
- Se Calculó que cantidad de colonias representan al 0.1%.

CUADRO N°04: CLASIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SEGÚN LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

| ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA | CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA |
|--------------------------|----------------------------------|
| Inactiva | >16 mg/ml |
| Poco activa | 6 a 15 mg/ml |
| Moderadamente activa | 1 a 5 mg/ml |
| Buena actividad | < 1 mg/ml |

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – EsSalud 2007

ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados que se obtuvieron en dicho estudio se expresaron teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se calculó la media y la desviación estándar de los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, obtenidos del extracto etanólico fraccionado de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que se representan mediante tablas y gráficos.
- Se calculó el porcentaje de inhibición de las muestras, obtenidas del extracto etanólico fraccionado de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en la prueba de actividad antimicrobiana por el método de disco difusión. Estos valores son representados en tablas, gráficos.
- Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y las Concentraciones Bactericidas Mínimas, obtenidas del extracto etanólico fraccionado de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son presentadas en tablas y gráficos.

PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS

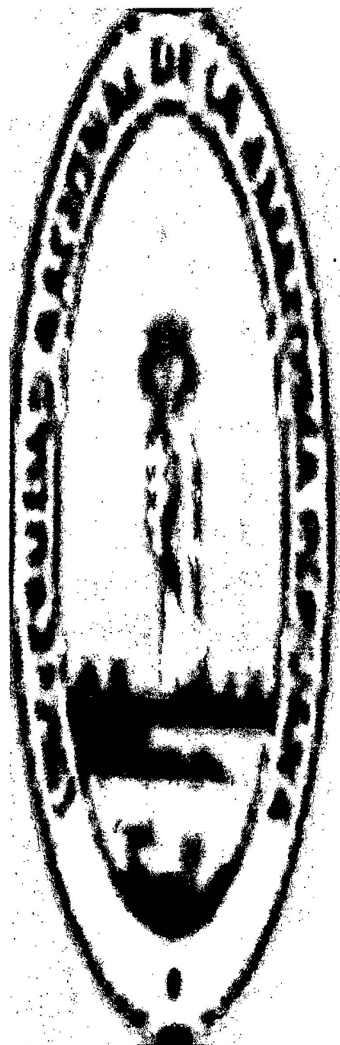
El área de microbiología es el lugar en el cual los ensayos experimentales son realizados y por ello constituye un medio ambiente de trabajo especial que presenta riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio. Para evitar riesgos se contará con estrictas medidas de bioseguridad (Ver AnexoN°01).

CUESTIONES ÉTICAS EN LA EXPERIMENTACIÓN

El estudio se realiza siguiendo los principios de seguridad de las 3 R:

- Reducción
- Refinamiento
- Reemplazo

Estos principios ayudan a Reducir a cero el número de animales. Se refinaron las pruebas experimentales por un método alternativo de mayor sensibilidad (permite ensayar mayor concentración de muestra, hasta 75% v/v) y se reemplazaron por un método alternativo *in vitro*.



UNAP

Capítulo IV

I. RESULTADOS:

1.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

- ❖ El extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” presenta color rojo pálido, de olor característico.
- ❖ El extracto fraccionado etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano”, A y B, presentan color rojo pálido y las fracciones C y D presentan color rojo oscuro a rojo caoba brillante.

Las características organolépticas del extracto etanólico y de los extractos fraccionados etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano”, se presentan en la tabla N° 01:

TABLA N° 01: Características Organolépticas del Extracto Etanólico y de los Extractos Fraccionados de La Corteza De *Byrsonima crassifolia* (Indano).

| Características Organolépticas | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| | Extracto etanólico | Fracción A | Fracción B | Fracción C | Fracción D |
| Partículas | Sólidas | Sólidas viscosas | Sólidas viscosas | Sólidas cristalinas | Sólidas cristalinas |
| Color | Marrón claro | Marrón claro | Marrón | Rojo caoba | Rojo caoba |
| Olor | Característico | Característico | Característico | Característico | Característico |
| pH | 6-7 | 6-7 | 2 | 7 | 9 |

1.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* “INDANO”

Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano”, se muestran en la siguiente Tabla.

TABLA N° 02: Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico de la Corteza de *Byrsonima Crassifolia* “Indano”.

| PRUEBAS FITOQUÍMICAS | METABOLITOS PRESENTES | RESULTADOS |
|-------------------------|--------------------------|------------|
| Liebermann- burchard | Triterpenos | - |
| Liebermann | Esteroides | - |
| Buchard | Quinonas | - |
| Borntrager | Cumarinas fijas | - |
| Drangerdorff,y Mayer | Alcaloides | - |
| Tollens | Lactonas | +++ |
| Cloruro Férrico | Saponinas | - |
| Ninhidrina | Fenoles | - |
| Cloruro ferrico | Taninos | +++ |
| Shinona | Flavonoides | +++ |
| Ninhidrina | Aminas y aminoácidos | - |
| Fehling | Azucares reductores | +++ |

Leyenda: (-) Ensayo Negativo; (+) Ensayo Positivo; (+++): Abundante; (++) : mediano; (+): poco.

Interpretación de los resultados:

Como se muestra en la Tabla N° 2, el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* determinó la presencia de los siguientes

metabolitos secundarios: lactonas, taninos, flavonoides y azúcares reductores, en abundancia (+++).

1.3 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO FRACCIONADO DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* "INDANO" POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

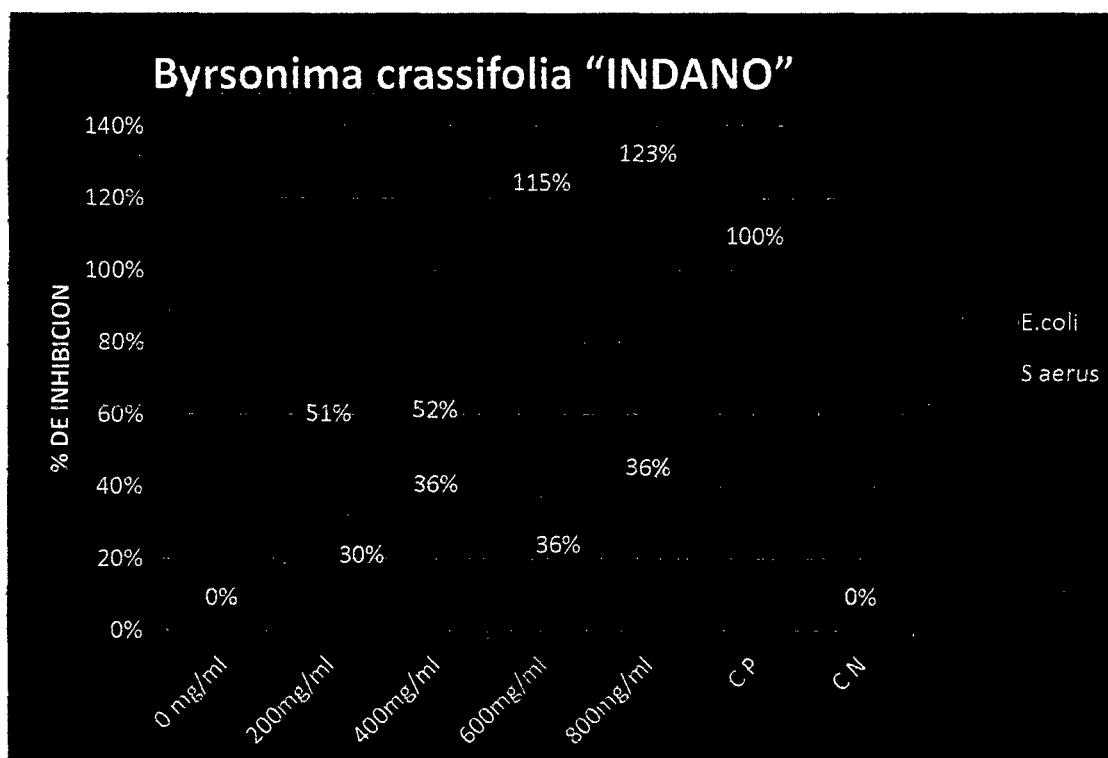
TABLA N° 03: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* "Indano" a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción A frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| CONCENTRACIÓN [mg] | FRACCIÓN A | | | | | |
|-----------------------|------------|-----|-------------------------|------------------------------|-----|--------------|
| | | | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
| | X + DS | | % INHIBICIÓN | X + DS | | % INHIBICIÓN |
| 200 | 8 | 0.4 | 30 | 12 | 0.4 | 51 |
| 400 | 8 | 0.4 | 36 | 12 | 0.4 | 52 |
| 600 | 9 | 0 | 36 | 13 | 0 | 115 |
| 800 | 9 | 0.4 | 36 | 23 | 0.4 | 123 |

X = Media aritmética; DS = Desviación estándar.



GRÁFICO 01: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* "Indano" a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción A frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Interpretación:

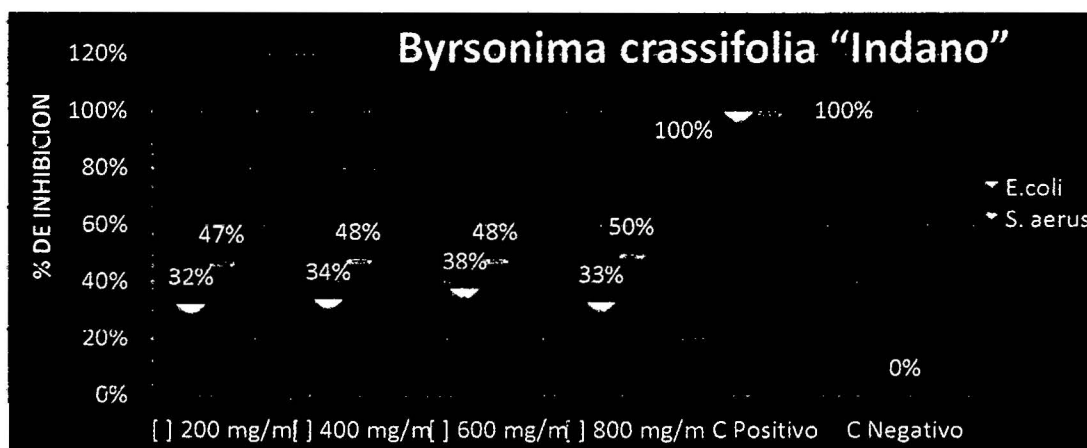
En la Tabla N° 03 y Gráfico N° 01, se observa que para la Fracción A la concentración de 200 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 30% y 51% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

A las concentraciones de 400 mg y 600 mg se obtuvo porcentajes (36% y 52%) para *Escherichia coli* como para *Staphylococcus aureus*, respectivamente, a 600 mg se obtuvo porcentajes (36% y 115%) y a concentración de 800 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 36% y 123% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

TABLA N° 04: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción B frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| CONCENTRACIÓN [mg] | FRACCIÓN B | | | | | |
|-----------------------|------------|-----|-------------------------|-----------------------------|------|--------------|
| | | | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aerus</i> | | |
| | X | +DS | % INHIBICIÓN | X | + DS | % INHIBICIÓN |
| 200 | 7. | 0.2 | 32 | 11 | 0 | 47 |
| 400 | 8 | 0 | 34. | 11 | 0.2 | 48 |
| 600 | 8. | 0.3 | 37. | 11 | 0.1 | 48 |
| 800 | 7. | 0.4 | 33 | 11 | 0.4 | 50 |

GRÁFICO 02: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción B frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Interpretación:

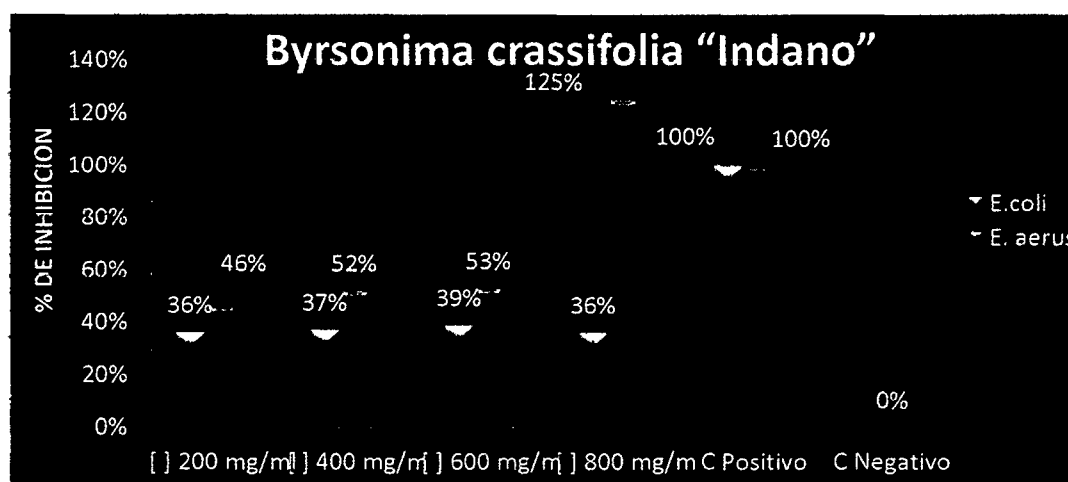
En la Tabla N° 04 y Gráfico N° 02, se observa que para la Fracción B a la concentración de 200 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 32% y 47% para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente; a las concentraciones de 400 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 34% y 48% para las mismas bacterias, respectivamente; mientras que a la concentración de 600 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 37% y 48% para *E.*

coli y *S. aureus*, respectivamente; y a la concentración de 800 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 33% y 50% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

TABLA N° 05: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción C frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| FRACCIÓN C | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------|-----|--------------|------------------------------|-----|--------------|
| CONCENTRACIÓN [mg] | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
| | X | DS | % INHIBICIÓN | X | DS | % INHIBICIÓN |
| 200 | 8 | 0 | 36 | 10.6 | 0.4 | 46 |
| 400 | 8 | 0.4 | 37 | 11.6 | 0.4 | 52 |
| 600 | 9 | 0 | 39 | 12 | 0.4 | 53 |
| 800 | 8.4 | 0 | 36 | 25 | 0.5 | 125 |

GRÁFICO 03: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción C frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Interpretación:

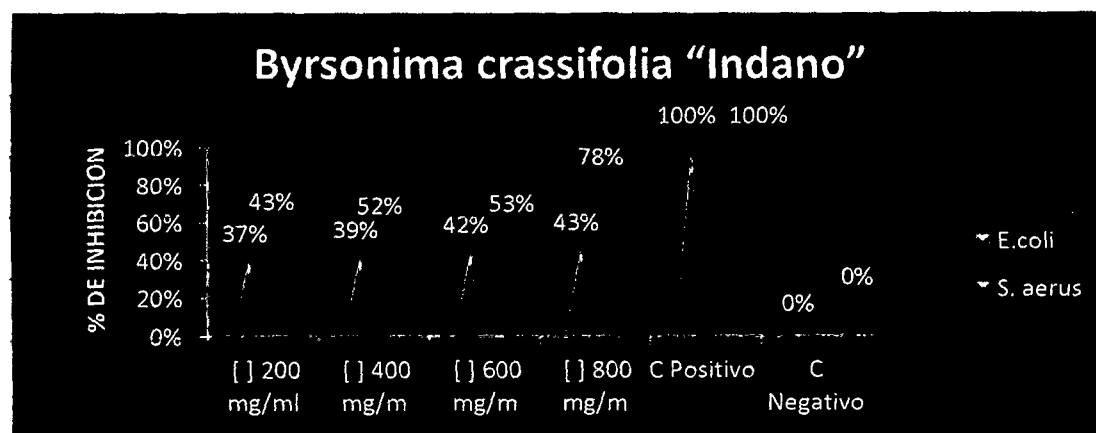
En la Tabla N° 05 y Gráfico N° 03, se observa que para la Fracción C a la concentración de 200 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 36% y 46% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente; a las concentraciones de 400 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 37% y 52%, respectivamente, frente a

las mismas bacterias. Mientras que a la concentración de 600 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 39% y 53% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente; y a la concentración de 800 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 36% y 125% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

TABLA N° 06: : Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción D frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| CONCENTRACIÓN [mg] | FRACCIÓN D | | | | | |
|-----------------------|------------|-----|-------------------------|-------|-----------------------------|----|
| | | | <i>Escherichia coli</i> | | <i>Staphylococcus aerus</i> | |
| | X | DS | % INHIBICIÓN | X +DS | % INHIBICIÓN | |
| 200 | 8 | 0.4 | 37 | 10 | 0 | 43 |
| 400 | 9 | 0 | 39 | 11 | 0.4 | 52 |
| 600 | 9 | 0.4 | 42 | 12 | 0.4 | 53 |
| 800 | 10 | 0 | 43 | 16 | 0.4 | 78 |

GRÁFICO 04: Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico Fraccionado de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a Concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg de la Fracción D frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Interpretación:

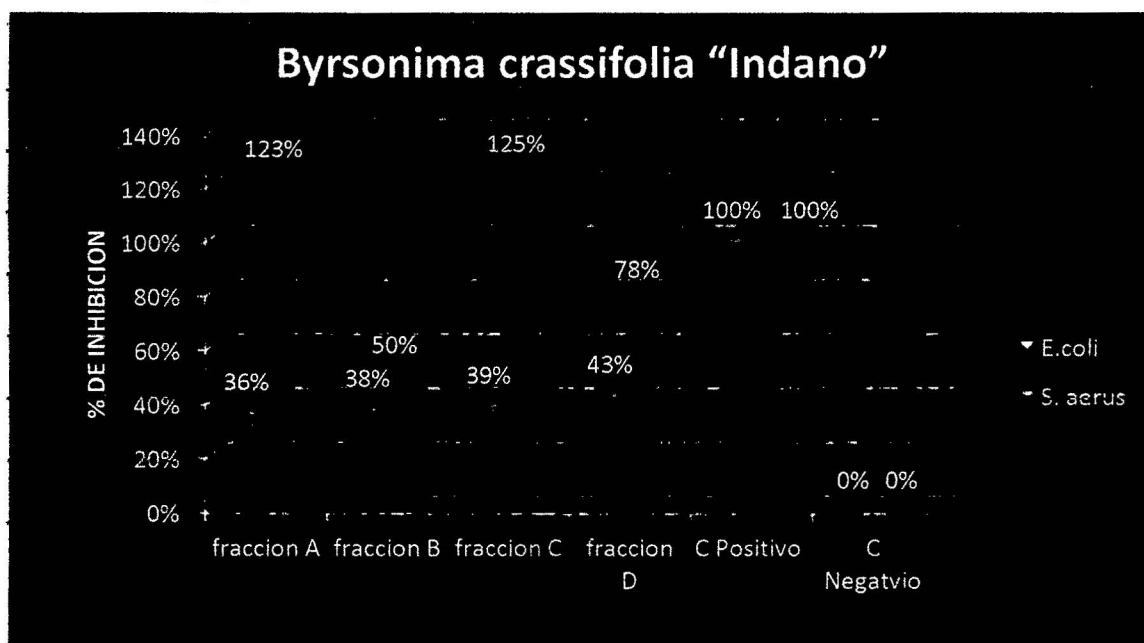
En la Tabla N° 05 y Gráfico N° 03, se observa que para la Fracción D a la concentración de 200 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 37% y 43%, respectivamente, frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; a la concentraciones de 400 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 39% y 52%,

respectivamente, para cada bacteria; mientras que a la concentración de 600 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 42% y 53% frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente; y a la concentración de 800 mg se obtuvo porcentajes de inhibición de 43% y 78% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

TABLA N°07: Comparación del Grado de Inhibición de las Fracciones A, B, C y D del Extracto Etanólico de cortezas de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a la concentración de 800 mg frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| FRACCION | <i>Escherichia coli</i> | | <i>Staphylococcus aerus</i> | |
|----------|-------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| | CONCENTRACION mg/ml | %INHIBICION | CONCENTRACION mg/ml | %INHIBICION |
| A | 800 | 42 | 800 | 123 |
| B | 800 | 33 | 800 | 50 |
| C | 800 | 36 | 800 | 125 |
| D | 800 | 43 | 800 | 78 |

GRÁFICO 05: Comparación del Grado de Inhibición de las Fracciones A, B, C y D del Extracto Etanólico de cortezas de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a la concentración de 800 mg frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Interpretación:

- Como se observa en la Tabla N° 07, comparando el Grado de Inhibición de las Fracciones A, B, C y D del extracto etanólico de cortezas de *Byrsonima crassifolia* “Indano” a la concentración de 800 mg frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se obtuvo como resultado que frente a *Escherichia coli* no presentó actividad antibacteriana tomando como referencia el Cuadro de Determinación de La Actividad Antibacteriana Según el Porcentaje de Inhibición (Cuadro N° 03, pág.66)
- Frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, se obtuvo como resultado que solamente con las fracciones A, C y D presentó actividad antibacteriana, de acuerdo con el mismo (Cuadro N° 03, pág.66).

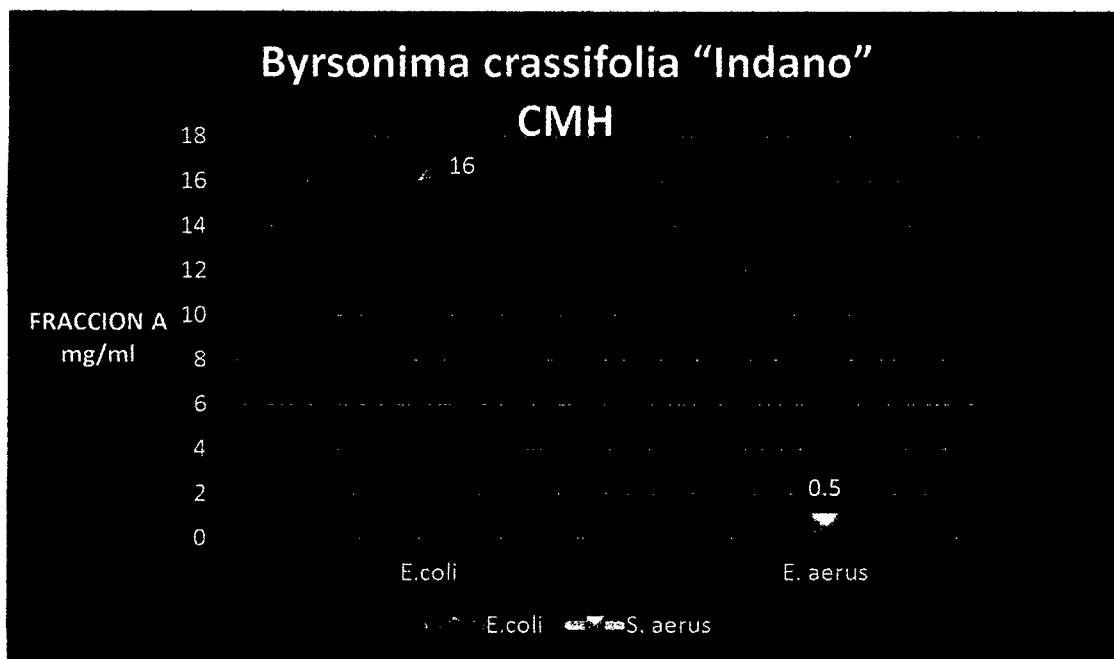
1.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO FRACCIONADO DE *Byrsonima crassifolia* “INDANO” FRENTE A *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.

TABLA N° 08: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción A de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| FRACCIÓN | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|----------|-------------------------|------------------------------|
| | CMI (mg/ml) | |
| A | 16 | 0,5 |



GRÁFICO N° 06: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción A de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



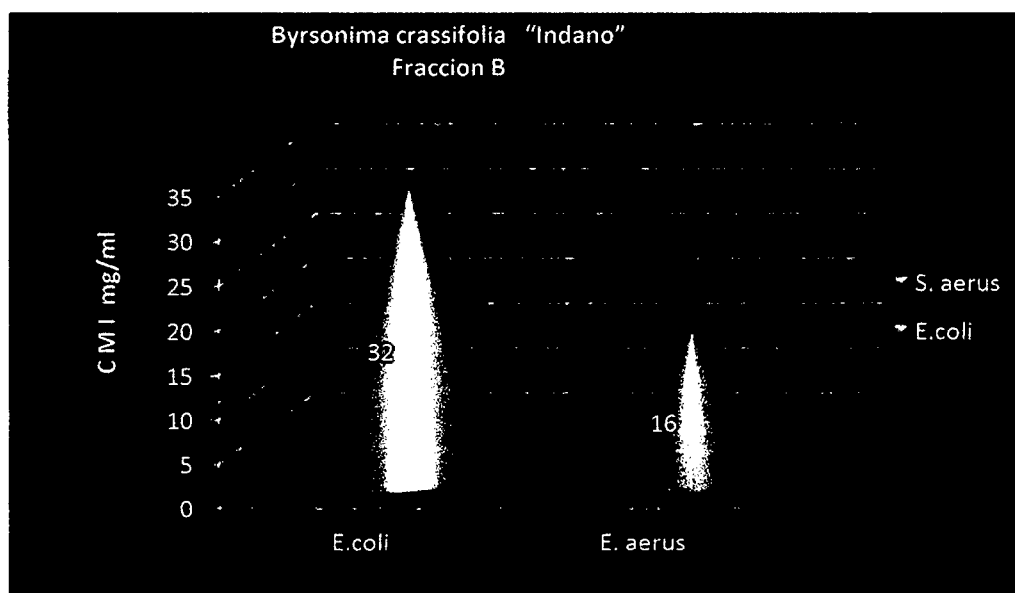
Interpretación:

- En la Tabla N° 08 y Gráfico N° 06 se observa que la Fracción A presenta una C.M.I. de 16 mg/ml frente a *Escherichia coli*.
- La misma Fracción A mostró una C.M.I. de 0.5 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*.

TABLA N° 09: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción B de la corteza de *Byrsonima crassifolia* "Indano" frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

| FRACCIÓN | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|----------|-------------------------|------------------------------|
| | CMI (mg/ml) | |
| B | 32 | 16 |

GRÁFICO N° 07: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción B de la corteza de *Byrsonima crassifolia* "Indano" frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aerus*



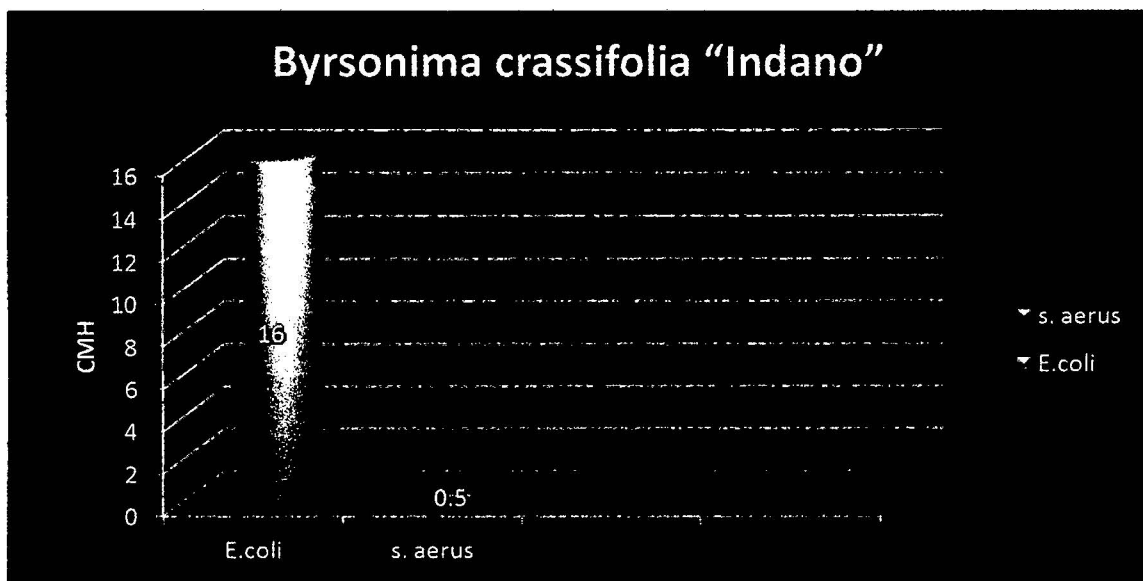
Interpretación:

- En la Tabla N° 08 y Gráfico N° 07 se observa que la Fracción B presentó una C.M.I. de 32 mg/ml frente a *Escherichia coli*.
- La misma Fracción B presentó C.M.I. de 16 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*.

TABLA N° 10. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción C de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

| FRACCIÓN | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|----------|-------------------------|------------------------------|
| | CIM (mg/ml) | |
| C | 16 | 0.5 |

GRÁFICO N° 08: Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción C de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*



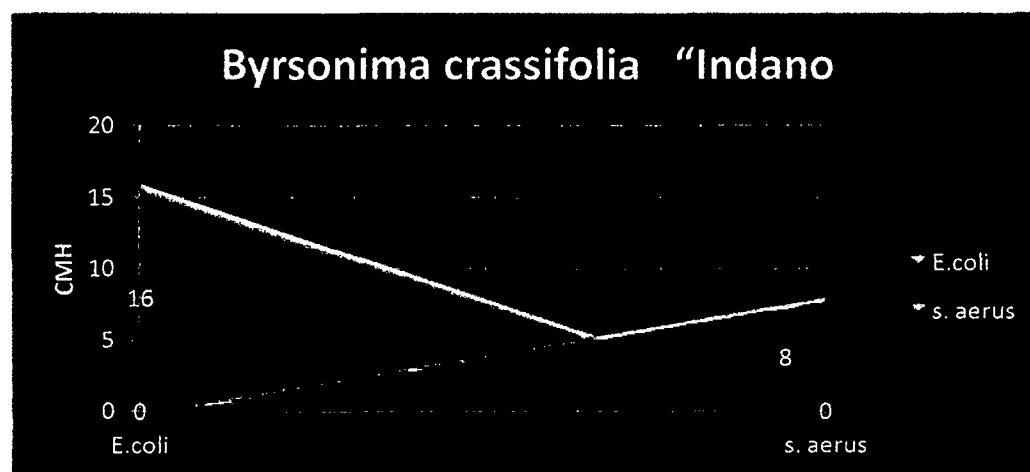
Interpretación:

- En la Tabla N° 10 y Gráfico N° 08 se observa que la Fracción C presentó una C.M.I. de 16 mg/ml frente a *Escherichia coli*;
- La misma Fracción C presentó una C.M.I. de 0.5 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*.

TABLA N° 11. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción D de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

| FRACCIÓN | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|----------|-------------------------|------------------------------|
| D | 16 | 8 |

GRÁFICO N° 09. Concentración Mínima Inhibitoria (en mg/ml) de la fracción D de la corteza de *Byrsonima crassifolia* “Indano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Interpretación:

- En la Tabla N° 11 y Gráfico N° 09 se observa que la Fracción D presentó una C.M.I. de 16 mg/ml frente a *Escherichia coli*;
- La misma Fracción B presentó una C.M.I. de 8 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*.

II. DISCUSIÓN

Bautista, F. y González, E., en su tesis mencionan haber realizado un análisis cualitativo y cuantitativo de cortezas *Byrsonima crassifolia* (Nance), encontrando taninos. En el presente trabajo de investigación también se encontró taninos al realizar el tamizaje fitoquímico; sin embargo, también se encontró lactonas, flavonoides y azúcares reductores, metabolitos secundarios que dichos investigadores no los mencionan.

Fernández, M. en su investigación sobre *Byrsonima crassifolia* L. H.B.K., realizaron el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de corteza por cromatografía en capa fina, encontrando presencia de alcaloides, compuestos fenólicos y triterpenos. En el extracto diclorometano de corteza, encontraron presencia de taninos en alta concentración, aceites esenciales, triterpenos y saponinas.

Habiéndose realizado el presente trabajo de investigación, con extracto etanólico de corteza de *Byrsonima crassifolia*, se encontró lactonas, taninos, flavonoide y azúcares reductores, no encontrándose alcaloides, compuestos fenólicos ni triterpenos; tampoco aceites esenciales ni saponinas.

Rivero-Cruz, J. Fausto; Sánchez-Nieto, Sobeida; et al, en su investigación "Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*", realizado con corteza de *Byrsonima crassifolia*, encontraron presencia de ocho compuestos (β -amirina (1), betulina (2), ácido betulínico (3), ácido oleanólico (4), quercetina (5), (-)-epicatequina (6), ácido gálico (7) y β -sitosterol en la fracción de diclorometano derivada del extracto metanólico de la planta. Evaluaron todos los compuestos aislados para determinar su actividad antibacteriana contra un panel de doce bacterias (*Staphylococcus aureus* 375, *S. aureus* 310 (MR), *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* 379 (VR), *Bacillus subtilis* 327, *Escherichia coli* ipm 389, *E. coli* 442, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* 425, *Pseudomonas aeruginosa* 339, *Streptococcus mutans* y *Phorphyromonas gingivalis*) y *Candida albicans* 54. Los compuestos aislados inhibieron el crecimiento de las bacterias a concentraciones en el rango de 64 a 1088 $\mu\text{g/ml}$.

El presente trabajo de investigación se realizó con extractos etanólicos fraccionados de corteza de *Byrsonima crassifolia*, encontrándose mediante el ensayo fitoquímico lactonas, taninos, flavonoides y azúcares reductores, no así los compuestos encontrados por Rivero-Cruz. Asimismo, solamente se trabajó con dos bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. No se efectuó el aislamiento de los compuestos encontrados ni tampoco fueron confrontados con las bacterias mencionadas. Solamente la fracción etanólico (C) de *Byrsonima crassifolia* a 800 mg presentó inhibición bacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, más no frente a *Escherichia coli*.

Guerra, J. y Pozo, W, en su tesis “Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* “Indano” mediante el método de difusión en agar” concluye que el extracto etanólico de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) evaluado mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, no presentó actividad antibacteriana. Con el método de macrodilución obtuvo una Concentración Mínima Inhibitoria de 16 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente, clasificándolo como inactivo.

En el presente trabajo de investigación, realizado con extracto etanólico fraccionado de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano), también mediante el método de difusión en agar, sí se encontró actividad antibacteriana con la fracción C (a 800 mg) solamente frente a *Staphylococcus aureus*.

Con el método de macrodilución se obtuvo una Concentración Mínima Inhibitoria de 0.5 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, clasificándose como activo.

II. CONCLUSIONES

En el extracto etanólico de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) se encontraron los siguientes metabolitos secundarios: Lactonas, taninos, flavonoides y azúcares reductores.

La fracción C (a 800 mg) de extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, formando un halo de inhibición bacteriana de 25 mm con un porcentaje alto de inhibición (125%).

La concentración de 800mg/ml de la fracción D presentó una actividad antibacteriana moderada frente a *Staphylococcus aureus*, cuyo halo de inhibición dio un porcentaje de inhibición del 78%.

No se observó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* en ninguna de las fracciones etanólicas de *Byrsonima crassifolia*.

La Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* fue de 0.5 mg/ml, en una rango de 0.25 a 32 mg/ml con la fracción etanólica C de *Byrsonima crassifolia*; mientras que la Concentración Mínima Inhibitoria para *Escherichia coli* por el método de macrodilución, no presentó ninguna actividad frente a las diversas fracciones.

El presente trabajo de investigación *in vitro* permitió determinar que el extracto etanólico fraccionado de *Byrsonima crassifolia* "Indano" a 800 mg presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar, demostrándose en parte la hipótesis planteada.

IV.- RECOMENDACIONES

- Realizar los cuadros estadísticos respectivos de acuerdo a los resultados obtenidos
- Realizar nuevos diseños de ensayos antibacterianos con diferentes controles positivos y otras cepas de bacterias con esta especie vegetal con el objetivo de profundizar su estudio.
- Proponer nuevos estudios de actividad antimicótica frente a otros agentes patógenos causantes de infecciones vaginales.
- Realizar nuevos estudios de la actividad antibacteriana y antimicótica de otros órganos de la planta.
- realizar estudios farmacológicos con todos los metabolitos secundarios aislados de la planta.



UNAP

Capítulo V

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mejía K. & Rengifo, E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana 19.
2. Urbizagástegui R, Lane-Urbizagástegui S. El crecimiento de la literatura sobre plantas medicinales en el Perú. Rev .AIBDA. 2008.
3. Estrella, E. Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas Tratado de Cooperación Amazónica: Secretaría Pro Tempore. Lima. 1995.
4. Kasper, L.; Braunwald, E.; Fauci, A.; Hauser, S.; Longo, L.; Jameson, L.; Isselbacher. E. Eds Harrison Principios de medicina interna. 16ª Edición. Sección 5. Capítulo 120.
5. Obregón, L. Fitoterapia: Importancia de su desarrollo al servicio de salud. 2003. Lima, Perú.
6. Burigo, M. "O resgate da tradição fitoterapêutica" En salud y población indígena de la amazonia. Quito. 1993. Cap. II: 47 – 59.
7. Ortiz, H. Actividad Antifúngica de los Extractos Etanólicos de la Flor de *Bourreria huanita* y la Hoja de *Lippia graveolens* y sus Particiones Hexánica, Clorofórmica, Acetato de Etilo y Acuosa Contra los Hongos. Informe de Tesis presentado para optar el título de Química Bióloga. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2006.
8. Cáceres .L, efecto terapéutico del extracto de nance sobre candidosis. (1991)
9. Loaiza, R. Estimulación de la germinación del nance (*Byrsonima crassifolia*) con giberelinas y agua caliente. 2004.

Disponible en:
<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0132/f01647/g008174/s024783.htm>
10. Silva. *Byrsonima crassifolia* (L.)H.B.K estudio fitoquímico realizado en Brasil-Pará 2007.



11. Bautista, F; González, E. *Análisis cualitativo y cuantitativo de taninos de Byrsonima crassifolia (Nance), Pithecollobium dulce (Mongollano) y de Punica granatum (Granado)*. 2007.

Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3144>

12. Albiter, J. Caracterización morfológica de fruto y semilla de Nanche *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth y su relación con la capacidad germinativa. 2009.

Disponible: <http://hdl.handle.net/10521/1180>

13. Rivero J sanchez f antibacterial compound isolated from *Byrsonima crassifolia* facultad de quimica de la Universidad autonoma de mexico 2009. Fausto; J, Sánchez S., Benítez, C, Ibarra C., Rojas A., Rivero B. Antibacterial Compounds Isolated From *Byrsonima crassifolia*. Revista Latino-americana de Química. 2009.

14. Fernandez M *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K :estudio fitoquímico y farmacológico realizado universidad de Madrid 2012.

15. Guerra, S. y Pozo, W. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* "Indano" mediante el método de difusión en agar". Tesis para optar el grado de químico farmacéutico 2013.

16. Brack, A. Plantas utilizadas en el Perú en relación con la salud humana. En salud y población indígena de la Amazonia, Quito, 2 vol; 61-175.

17. Mejía, K. y Rengifo, E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana, 1995.

18. Pennington, T. D. y Sarukhán, J. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp: 304 -305, 2005

19. Martínez-Vázquez, M., González-Esquinca, A.R., Cazares Luna, L., Moreno Gutiérrez, M.N., García-Argáez, A.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. J. Ethnopharmacol., 66: 79 - 82, 1999.

20. Nota científica: Uso de Nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) kunth) en gelatina artesanal para niños.

Disponible en: adriana.caballero@unicach.mx

21. Moreno G., M.N. "El Nance [(*Byrsonima crassifolia* L) H.B.K.] como recurso natural antimicrobiano en enfermedades gastrointestinales y respiratorias". Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 2000. Pág. 74,
22. García.A. Y García, J. "Contribución al estudio etnobotánico del Nanche *Byrsonima spp.*, distribución geográfica y alternativas de conservación de su plasma germinal". 1992. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Pág. 139.
23. Juárez D. La Familia Malpighiaceae en el estado de Morelos. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos. 1998. Pág. 90.
24. Paiva, S.R., Figueiredo, M.R., Aragão, T.V., Kaplan, Ma.C. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isclated from *Plumbago species*. 2003.
25. Campbell, J. South American fruits deserving further attention. *In*: J. Janick (ed.), progress in new crops. ASHS Press. Arlington, VA. USA. 1996. Pág. 431-439.
26. Sánchez,S., Beníteza,G, Xóchitl Ca, Ibarra,C Roja, A and Rivero-A Received May 2009; Accepted August 2009.
27. Fazeli, M.R., Amin, G., Attari, M.M.A., Ashtiani, H., Jamalifar, H., SAMADI, N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*. 18: 646-649, 2007.
28. Radulovic, N., Stankov, G., Smelcerovic, A., Spiteller, M., Asakawa, Y. Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chem.*, 103(1): 15-21, 2007
29. RIOS, J.L., RECIO, M.C., Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 100: 80-84, 2005.
30. Página de consulta :
<http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/16.-%20Estafilococos.pdf> acceso día 28 de enero de 2013, 17:45.
31. Sacsquispe, R. Velásquez, J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.

32. Rojas, J., Garcia, A., Lopez, A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Marzo de 2005; 4(2): 28-332.
33. ANDREWS, J.M. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *J. Antimicrob Chemother*, Vol. 48(31), pp.5, 2001.
34. COWAN, M. 1999. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*. 12(4): 564-582.
35. KONTIOKARI, T., SUNDQVIST, K.A.J, NUUTINEN, M., POKKA, T., KOSKELA, M., UHARI, M. 2001. Randomised trial of cranberrylingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *British Medical Journal*. 322(30): 1-5.

ANEXO N° 01

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- ✓ Llevar puesta el mandil de laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer completamente cerrada.
- ✓ Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar la sesión práctica.
- ✓ Lavar las manos con agua y jabón antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.
- ✓ Evitar llevar al laboratorio, accesorios que podrían ser fuente de contaminación.
- ✓ Utilizar mascarilla y gorra en el momento trabajar con bacterias y hongos.
- ✓ No comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales o utensilios, en ningún área del laboratorio.
- ✓ Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica. Si usted tiene alguna duda, dirijase al profesor.
- ✓ Mantener el área de trabajo ordenada, libre de libros, cuadernos u objetos personales, exceptuando aquellos equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo práctico.
- ✓ Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero. Nunca debe dejar éste desatendido.

- ✓ Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectivo lugar una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos al profesor.
- ✓ Colocar los materiales de vidrio contaminados en los recipientes dispuestos para tal fin, por ejemplo: las pipetas, tubos y placas de Petri en las ollas de desecho, etc.
- ✓ No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
- ✓ No devolver sustancias a sus envases originales.
- ✓ Emplear la pipeta al medir líquidos. Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. De igual manera las pipetas tendrán tapones de algodón para reducir la contaminación de estos dispositivos de pipeteo.
- ✓ Realizar solamente aquellas actividades indicadas por el profesor, no llevar a cabo experimentos no autorizados.
- ✓ Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.), ninguno puede ser catalogado como menor.
- ✓ Reducir al mínimo la formación de aerosoles durante la realización de cualquier trabajo práctico.
- ✓ Extremar las precauciones cuando se utilicen agujas y jeringas para evitar la inoculación accidental y la generación de aerosoles durante su manipulación y desecho.
- ✓ Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.




FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Esquina Pevas/Nanay -
E-mail: cgrandezii@hotmail.com.
Iquitos-Perú

CERTIFICACION

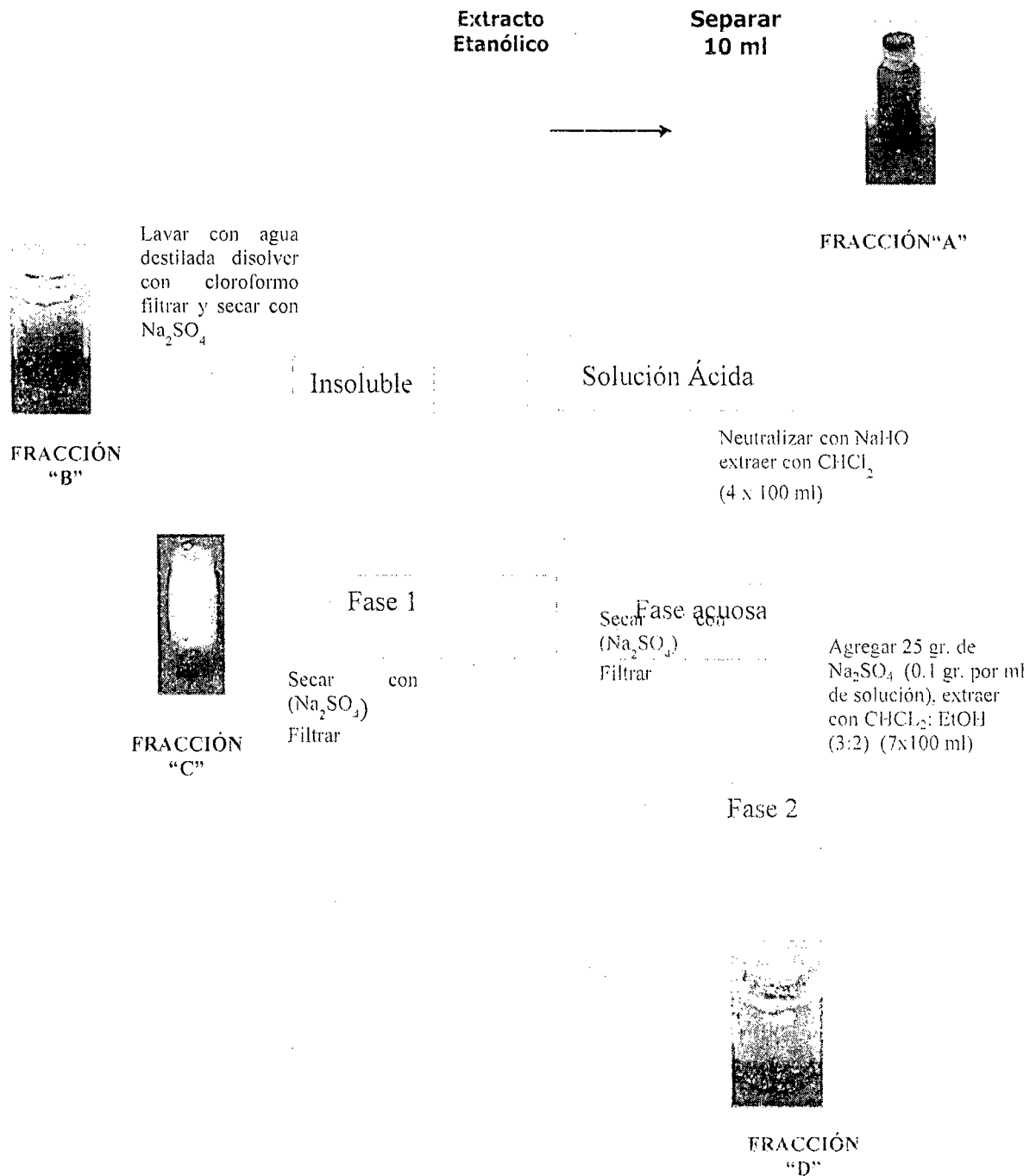
Consta por el presente que el suscrito Blgo. César A. Grández Rios, con Número de colegiatura 3052, consultor Botánico del Ministerio de Agricultura (Dirección Forestal y Fauna) que, la especie presentado a la vista por el Dr. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, corresponde a la especie de *Byrsonima crassifolia* (L) Kunth, se expide el presente a solicitud del interesado para los fines que crea conveniente.

IQUITOS 04 DE JUNIO DEL 2014

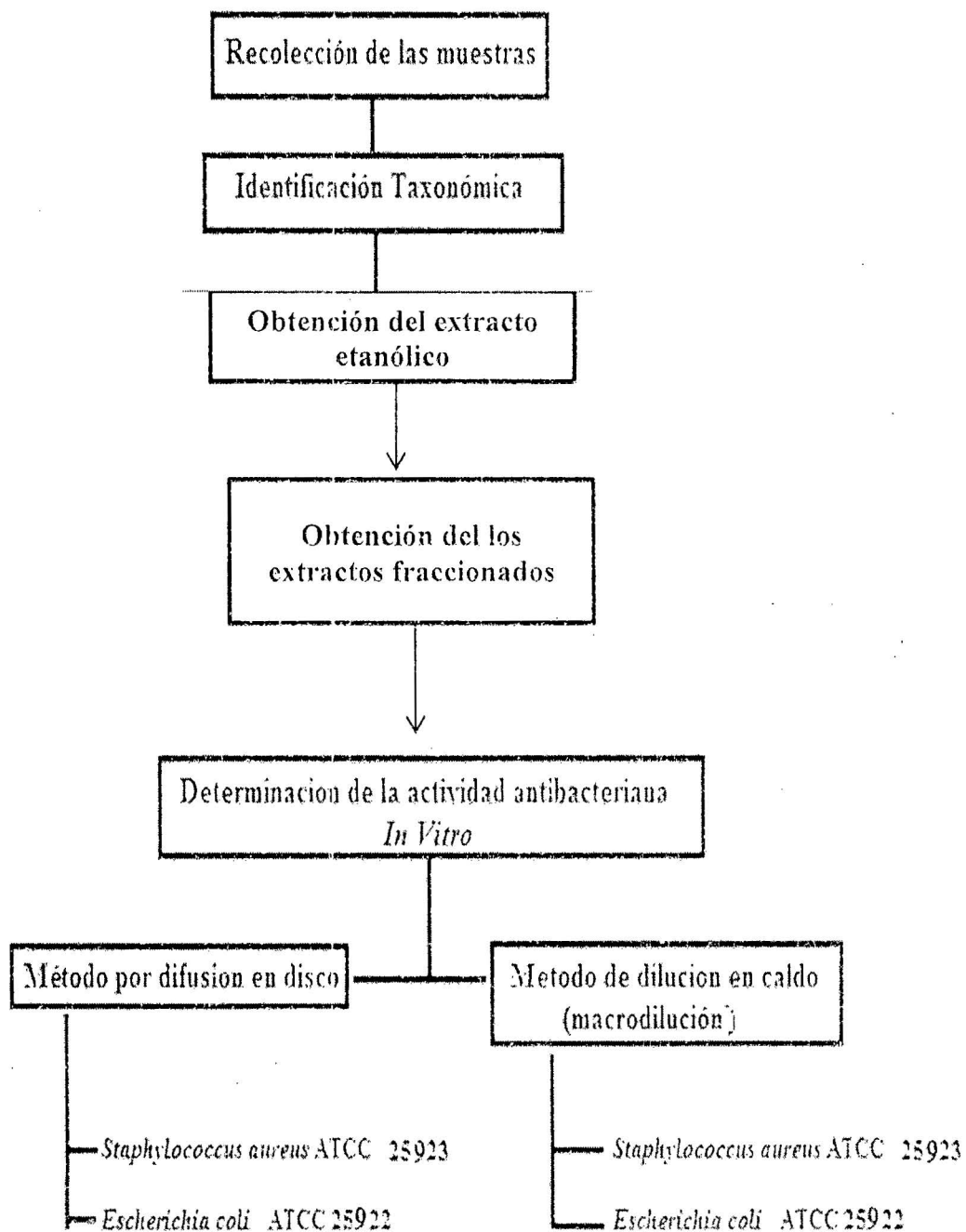


BLGO. CESAR A. GRANDEZ RIOS
CBP N° 3052

**ESQUEMA N°02: FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANOLICO
DE CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (Indano).**



ESQUEMA N°04: FLUJOGRAMA DEL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



ANEXO N°03

Obtención del extracto etanolico de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano).

Foto N°01: Cortezas de Indano



Foto N°02: Maceración de las cortezas

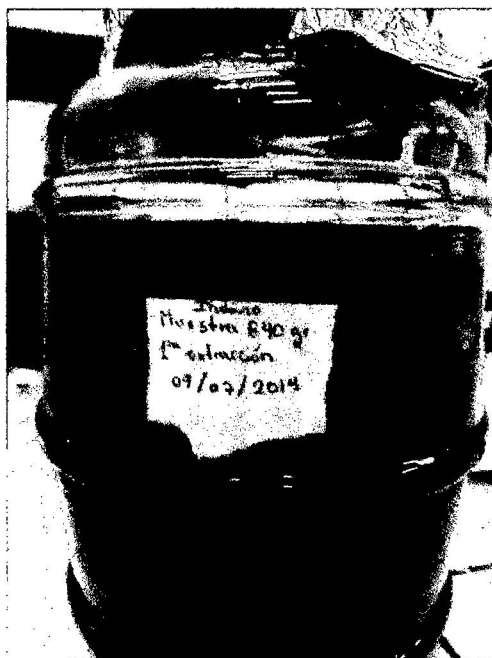


Foto N°03: Filtración de la muestra (Cortezas de Indano) en maceración.



FotoN°04: Extracción por rotavapor del extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* (Indano).

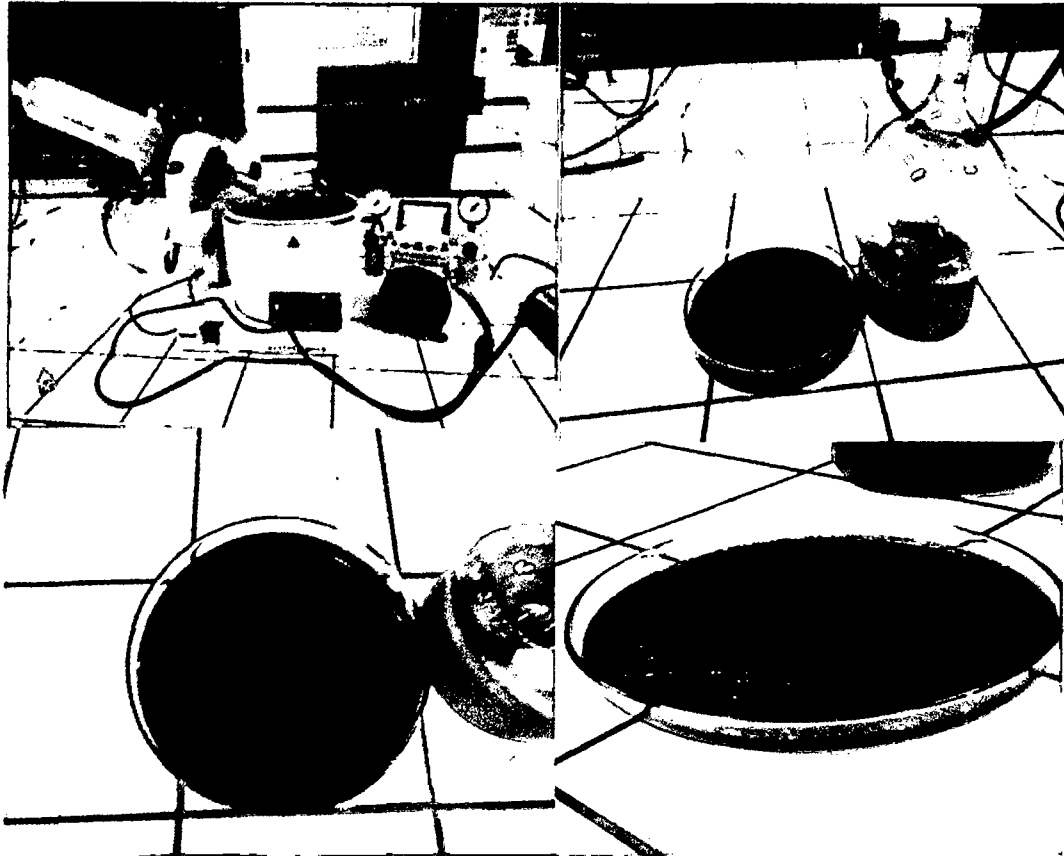


Foto N°05: Molienda del extracto etanólico de corteza de *Byrsonima Crassifolia* (Indano).

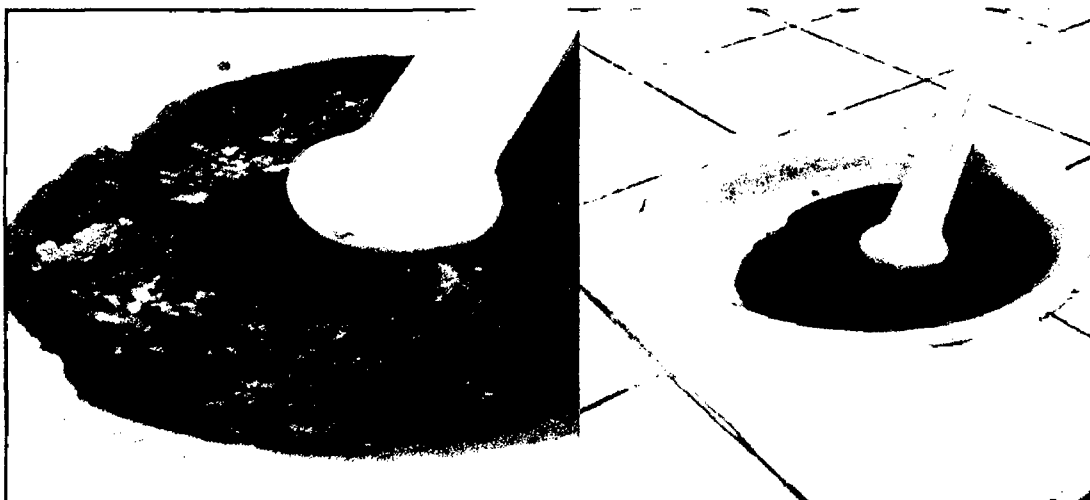
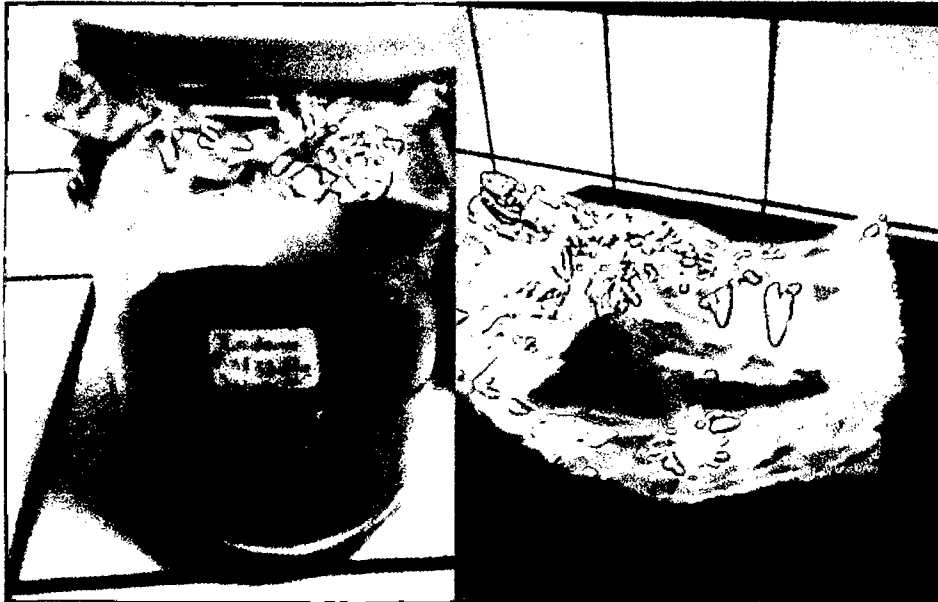


Foto N°06: Obtención del extracto etanolico de corteza de *Byrsonima Crassifolia* (Indano).



ANEXO N°04:
Obtención de fracciones a partir del extracto etanólico de la corteza de
***Byrsonima crassifolia* (Indano)**

FotoN°07: obtención de la fracción A



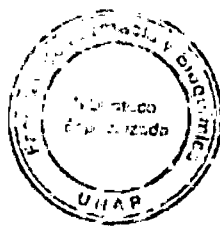
FotoN°08: obtención de la fracción B (Ácida).



FotoN°09: separación de las fases para la obtención de la fracción C



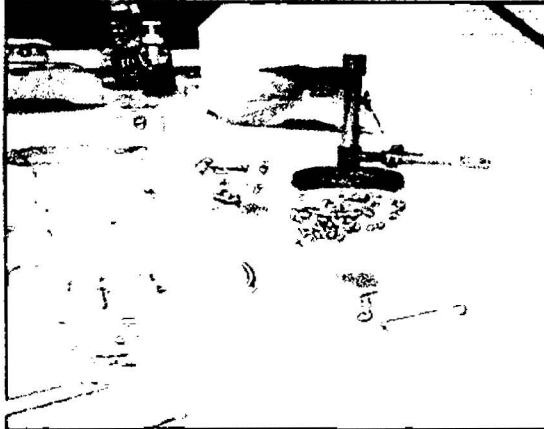
FotoN°10: Secado para la obtención de la fracción C (Neutra).



ANEXO N°05:

Realización de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico fraccionado de corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) por el método de difusión en discos.

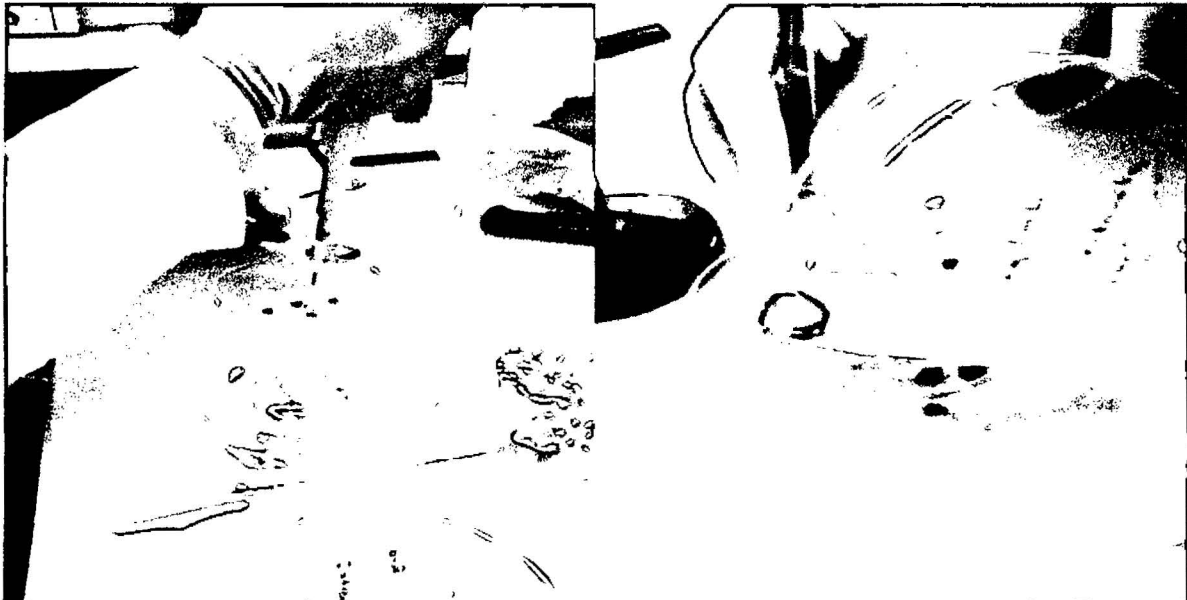
Foto N°11: Colocación de los discos en las placas respectivas.



FotoN°12: Comparación del inoculo con la solución de McFarland



Foto N°13: Colocación de las respectivas concentraciones (200, 400,600 y 800mg/ml) del extracto etanólico fraccionado de la muestra (Indano) a los discos.



ANEXO N°06

Lectura De Los Resultados De La Actividad Antibacteriana Por El Método De Difusión En Discos Frente A *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.

Foto N°14: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción A frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/MI

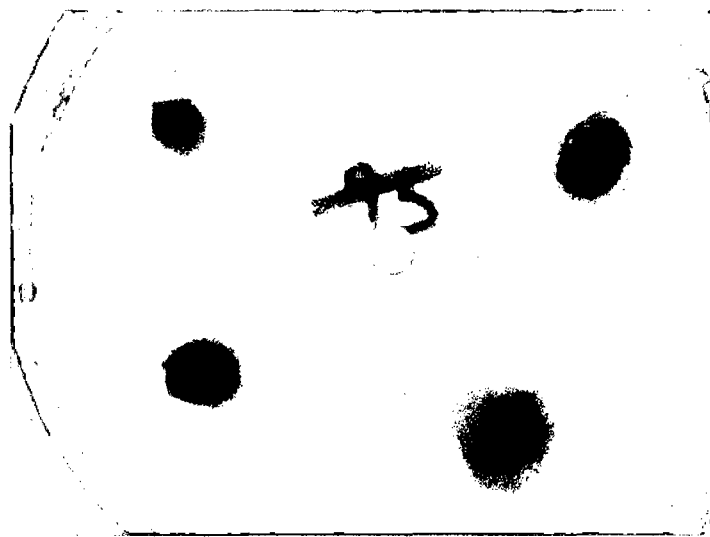


Foto N°15: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción B frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml

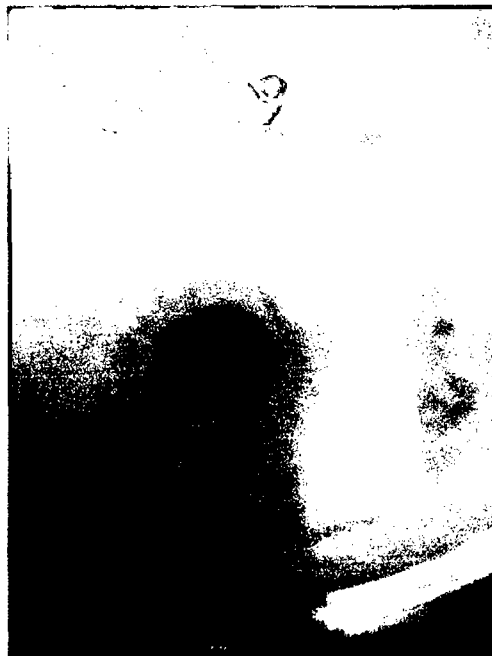


Foto N°16: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción C frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/mL



Foto N°17: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción D frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml.



Foto N°18: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción A frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/mL



Foto N°19: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción B frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/mL

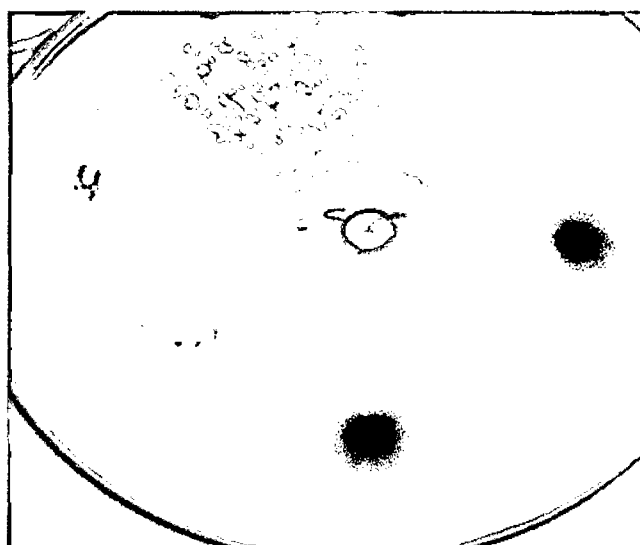


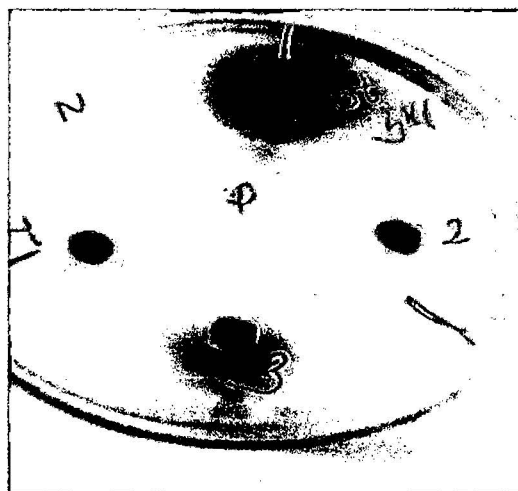
Foto N°20: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción C frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/ml



Foto N°21: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción D frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 400 600 y 800 mg/mL



Foto N°22: Actividad antibacteriana de la corteza de (Indano) fracción C frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 800 mg/ml.



ANEXON°07:

Lectura De Los Resultados De La Actividad Antibacteriana Por El Método De Macrodilución (CMI) *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.

Foto N°23: Muestra de la Concentración Mínima Inhibitoria De Las Fracciones frente a *Escherichia coli*

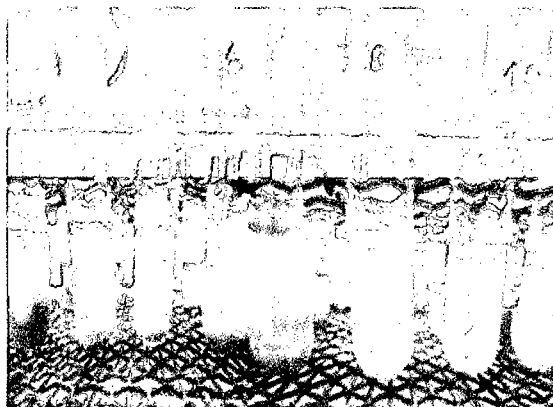


Foto N°24: Concentración Mínima Inhibitoria De La Fracción A a concentración 0.5 (tubo N°07) frente a *Staphylococcus aureus*.

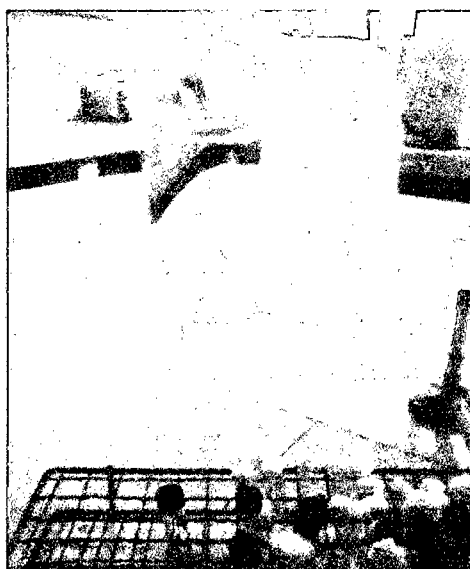


Foto N°27: Concentración Mínima Inhibitoria Del control positivo (Gentamicina)
Frente a *Staphylococcus aureus*.

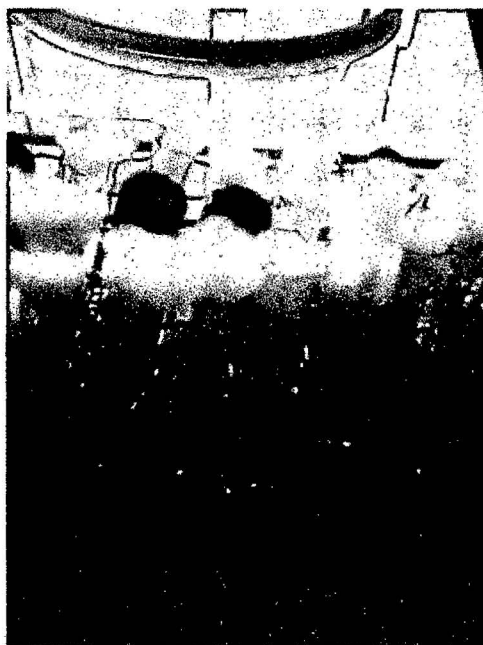


Foto N°26: Concentración Mínima Inhibitoria Del control positivo (Gentamicina)
Frente a *Escherichia coli*.



168