

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE
EXTRACTOS VEGETALES DE LAS ESPECIES DE *Tabernaemontana* FRENTE
A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa*, DE LA REGIÓN
LORETO, PERÚ”**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

Bach. Cecilia De Fátima Barbarán Urresti

ASESORES:

Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá, Mg.

Dr. Alvaro Tresierra Ayala

Ing. Jorge Manases Ríos, Mg.

IQUITOS-PERÚ

2014

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro*
DE EXTRACTOS VEGETALES DE LAS ESPECIES DE
Tabernaemontana FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y
Pseudomonas aeruginosa, DE LA REGIÓN LORETO, PERÚ”**

Bach. Cecilia de Fátima Barbarán Urresti

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos vegetales de las especies de *Tabernaemontana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvieron extractos etanólicos de hojas, corteza y raíz de 4 especies del género *Tabernaemontana* (*T. macrocalyx*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*), determinándose que las hojas de *T. maxima* y *T. markgrafiana* mostraron mayor rendimiento en la producción del extracto (20.6 y 20.4 %, respectivamente). El screening fitoquímico de los 12 extractos etanólicos mostró que los alcaloides estuvieron presentes en mayor concentración; sin embargo, en algunos extractos también se registró la presencia de otros metabolitos con posible actividad antimicrobiana como es el caso de aminas y aminoácidos, flavonas, triterpenos, etc.

Al determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos frente a cinco cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, por el método de difusión en agar (Técnica Kirby - Bauer), se observó que *T. maxima* y *T. markgrafiana* mostraron actividad frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Las hojas de *T. heterophylla* no mostró actividad frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Palabras claves: extractos etanólicos, screening fitoquímico, actividad antibacteriana.

“EVALUATION OF THE *in vitro* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF *Tabernaemontana* SPECIES ON *Staphylococcus aureus* AND *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS, LORETO, PERÚ”

Bach. Cecilia de Fátima Barbarán Urresti

Abstract

The *in vitro* antibacterial activity of extracts of *Tabernaemontana* species on *staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa* strains, was evaluated. Ethanolic extracts were obtained from leaves, cortex and roots of four *Tabernaemontana* species (*T. macrocalyx*, *T. heterophylla*, *T. maxima* and *T. markgrafiana*). The best yield for the extract production was observed using leaves of the *T. maxima* and *T. markgrafiana* (20.6 and 20.4 %, respectively). The phytochemical screening of 12 ethanolic extracts showed that alkaloids were in the highest concentrations; however, in some extracts were showed the presence of other metabolites with possible antimicrobial activity such as amines and aminoacids, flavones, triterpens, etc.

The *in vitro* antibacterial activity of the extracts against five *Staphylococcus aureus* and five *Pseudomonas aeruginosa* strains was determined for agar diffusion method (Kirby – Bauer technic). It was observed that *T. maxima* and *T. markgrafiana* showed activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The leaves of *T. heterophylla* do not showed activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Key words: Ethanolic extracts, screening phytochemical, antibacterial activity.

Dedicatoria

A mi mamá Gina, a mi abuelita
Lutgarda, a mis hermanas
Jahaira, Betsy y Evelyn, a pesar
de la distancia siempre juntas.

INDICE

RESUMEN

ABSTRAC

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN	10
1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	11
1.3. OBJETIVOS	12

CAPITULO II

2.1. MARCO TEÓRICO	14
2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES	38
2.3. HIPÓTESIS	40

CAPITULO III

3.1. MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	42
3.2. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	
3.4. MATERIALES	50
3.5. ANÁLISIS DE DATOS	53
3.6. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS	53

CAPITULO IV

4.1. RESULTADOS	55
4.2. DISCUSIÓN	71
4.3. CONCLUSIONES	74
4.4. RECOMENDACIONES	75

CAPITULO V

5.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	77
5.2. ANEXOS	83

INDICE DE FIGURAS

Figura n° 1:	Hojas <i>Tabernaemontana macrocalix</i>	19
Figura n° 2:	Hojas <i>Tabernaemontana heterophylla</i> .	20
Figura n° 3:	Hojas <i>Tabernaemontana maxima</i> .	21
Figura n° 4:	Hojas <i>Tabernaemontana markgrafiana</i> .	22
Figura n° 5:	Método turbidimétrico o ensayo en tubo	23
Figura n° 6:	Control positivo usado en el método de difusión en placa	24
Figura n° 7:	<i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura n° 8:	Infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	28
Figura n° 9:	Eventos patogénicos causadas por <i>S. aureus</i>	29
Figura n° 10:	Determinantes de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	31
Figura n° 11:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura n° 12:	Los antibióticos pueden dejar de curar	35
Figura n° 13:	Resistencia a los antibióticos	37

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1:	Metodología para el Screening fitoquímico	45
Tabla N° 2:	Porcentaje de rendimientos de los extractos obtenidos	55
Tabla N° 3:	Resultados del Screening fitoquímico de las especies en estudio	57
Tabla N° 4:	Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por actividad de los extractos vegetales empleados	59
Tabla N° 5:	Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> por actividad de los extractos vegetales empleados	60
Tabla N° 6:	Porcentaje de actividad de los extractos vegetales ensayados frente a las cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .	62

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico N° 1:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de <i>Pseudomonasaeruginosa</i> por actividad de las hojas de las especies seleccionadas.	63
Gráfico N° 2:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .por actividad las hojas de las especies seleccionadas.	64
Gráfico N° 3:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por actividad de la corteza de las especies seleccionadas.	65
Gráfico N° 4:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .por actividad las cortezas de las especies seleccionadas.	66
Gráfico N° 5:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por actividad de las raíces de las especies seleccionadas.	67
Gráfico N° 6:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .por actividad las raíces de las especies seleccionadas.	68
Gráfico N° 7:	Diámetro del halo de inhibición (mm) de las partes de la planta de las especies seleccionadas frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	69

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1:	Esquema del diseño de la investigación.	83
ANEXO N° 2:	Ubicación de la recolección de las muestras.	84
ANEXO N° 3:	Muestras vegetales.	86
ANEXO N° 4:	Esquema de preparación de extractos etanólicos.	88
ANEXO N° 5:	Screening Fitoquímico.	89
ANEXO N° 6:	Método de difusión en agar.	98
ANEXO N° 7:	Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar.	99
ANEXO N° 8:	Preparación de los discos de sensibilidad.	100
ANEXO N° 9:	Ajuste y aplicación del inóculo.	101
ANEXO N° 10:	Aplicación de los discos.	103
ANEXO N° 11:	Lectura de la actividad antibacteriana.	105

CAPITULO I



1.1. INTRODUCCIÓN

Con la aparición de los antibióticos, en la terapéutica médica se hizo patente el problema de la resistencia bacteriana, lo cual era un hecho desconocido hasta ese momento para los seres humanos, pero existente en el mundo microbiano.¹

Durante los últimos años, algunas cepas de especies bacterianas, como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, se han convertido en un gran reto para la antibioticoterapia, dado a que vienen mostrando multirresistencia a los antibióticos de frecuente uso para controlar sus procesos infecciosos, por ello gran parte de los estudios que tienden a la búsqueda de alternativas, distintas a los antibióticos, utilizan como herramientas biológicas a estas especies bacterianas.

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial, incluso diferentes organizaciones internacionales como la Asamblea Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, vienen proponiendo alternativas de solución frente a este problema, a través de su proyecto “Salud y Medicina Tradicional”, el cual busca apostar como método alternativo y seguro, el tratamiento de las enfermedades infecciosas con fitomedicamentos.^{2,3}

Es importante mencionar que desde la antigüedad, el hombre ha utilizado plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia a los microorganismos y evitar los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos^{4, 5, 6}. En la actualidad, más del 80% de la población mundial utiliza plantas como su fuente primaria de agentes medicinales, obteniendo resultados más que favorables. Probablemente, esto se deba a que las plantas medicinales y sus derivados presentan principios activos que les confieren una complejidad de propiedades medicinales, entre ellas la acción antimicrobiana. Por tal motivo algunas especies son consideradas como alternativa para el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas^{7,8}.

Es importante resaltar que la farmacopea peruana considera muchas plantas con aplicaciones curativas. Diversos investigadores han señalado que en nuestro país existen más de 3,000 especies medicinales, por lo que la cantidad abrumadora de medicinas originadas por este tipo de plantas debiera convencer a los científicos del valor y alcance de la investigación etnobotánica, ecológica, fitogeográfica, fitoquímica y farmacológica, a fin de lograr su validación científica⁹.

Además la Amazonía peruana, es reconocida como una megabiodiversa región, poseedora de una riqueza florística, en la que existen especies nativas de *Tabernaemontana* utilizadas tradicionalmente por sus potenciales propiedades medicinales, sin embargo, pese a ello, pocos estudios han sido realizados en torno a esta temática, de allí que, cualquier tipo de investigación relacionada con la evaluación de la actividad antimicrobiana de sus extractos vegetales, constituiría un gran aporte para la ciencia, más aún si se incluyen en dichos estudios plantas nativas de la región y así, conocer su eficacia y su potencial como fuentes de nuevas drogas, y así descubrir nuevos compuestos que sean más eficaces, de menor toxicidad y con un bajo costo comparados con los antibióticos usados actualmente en la práctica clínica¹⁰.

1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentarán actividad antibacteriana *in vitro* los extractos vegetales de las especies de *Tabernaemontana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, de la región Loreto, Perú?

1.3. OBJETIVOS

GENERAL:

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos vegetales de las especies de *Tabernaemontana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, de la región Loreto, Perú.

ESPECIFICOS:

- Recolectar las hojas, corteza y raíz de las especies del género *Tabernaemontana*.
- Obtener el extracto etanólico de las hojas, corteza y raíz de las especies del género *Tabernaemontana*.
- Determinar los diversos metabolitos secundarios existentes en los extractos etanólicos de las especies del género *Tabernaemontana* mediante Screening fitoquímico.
- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de Difusión en agar (Técnica Kirby - Bauer).

CAPITULO II



2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1 ANTECEDENTES

Van Beek *et al.* (1984), estudiaron las actividades antibacteriana y antifúngica de extractos etanólicos de 19 especies de *Tabernaemontana*, mediante la prueba de difusión en agar, 18 especies mostraron actividad contra bacterias Gram positivas, 14 especies contra bacterias Gram negativas, 5 especies contra levaduras y 6 especies contra mohos. Diversas partes de las plantas han sido examinadas, determinando que la corteza de la raíz y la corteza del tallo fueron las que mostraron la mayor actividad. Además se evaluó la actividad antiamebiana de 15 especies, registrando que tres especies mostraron una actividad significativa en 0,5 mg / ml. Sólo dos de las 14 especies examinadas para actividad antiviral mostró actividad significativa contra un solo virus¹¹.

Nielsen *et al.* (1994), identificaron la presencia de 5 triterpenos acetilados pentacíclicos y 24 alcaloides monoterpreno indólicos en la corteza de *Tabernaemontana markgrafiana*, y los mayores alcaloides encontrados fueron: coronaidina, 5,6 dehydro coronaidina, 3R metoxi coronaidina, 3R baocangina, y el 10, 11 dimetoxi chipina.¹²

Bargardi *et al.* (2001), registraron que extractos crudos metanólicos y etanólicos de corteza del tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC, tenían actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*¹³.

Barbosa *et al.* (2002), evaluaron 38 extractos orgánicos y acuosos obtenidos de 11 especies de Apocynaceas amazónicas, utilizando el método de micro dilución en caldo contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Los extractos orgánicos obtenidos de la especie *Tabernaemontana angulata* presentaron actividad contra la bacteria Gram positiva *S. aureus*. La concentración inhibitoria mínima verificada para este extracto varió de 2,50 a 1,25 mg/mL. El cloramfenicol fue utilizado como el antimicrobiano patrón. El análisis fitoquímico indicó la presencia de triterpenos y alcaloides en el extracto orgánico activo¹⁴.

Guida *et al.* (2003), desarrollaron un estudio con extractos secos metanólicos y fracción alcaloidea obtenidos de la corteza del tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., por el método de difusión de Kirby-Bauer, logrando detectar actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter lwoffii*.¹⁵

Tabernaemontana divaricata, es una planta que abunda en los países tropicales y que es utilizada comúnmente en medicina tradicional; sin embargo, no se dispone de ningún artículo que discuta sus propiedades farmacológicas, por ello, Pratchayasakul *et al.* (2008), elaboraron una revisión sobre la etnobotánica y la etnofarmacología de *T. divaricata*, así como sus posibles beneficios terapéuticos, especialmente de sus constituyentes alcaloidales y no alcaloidales. En esta revisión se incluyó las características de 66 alcaloides aislados e identificados de esta planta. Constituyentes no alcaloidales, incluyendo las enzimas, aceite pirolítico, hidrocarburos, terpenoides y ácidos fenólicos también han sido documentados. Aspectos quimiotaxonómicos de cada alcaloide, así como información sobre la farmacología de los extractos crudos y alcaloides individuales de *T. divaricata* se han reunido y evaluado. Estos autores además sostienen que las propiedades benéficas de *T. divaricata* son antioxidantes, anti-infecciosas, acción anti-tumoral, analgesia y mejora de la actividad colinérgica tanto en el sistema nervioso central como en el periférico¹⁶.

Ruttoh *et al.* (2009), estudiaron el tamizaje antibacteriano y fitoquímico del extracto metanólico, extracciones secuenciales (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) y fracciones ricas en alcaloides de *Tabernaemontana stapfiana*. El tamizaje fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos y saponinas que han sido asociadas con actividad antimicrobiana. Los extractos metanólicos del tallo y la corteza de la raíz mostraron actividad contra la cepa multidrogoresistente de *Staphylococcus aureus*, con una concentración inhibitoria mínima que fluctuaba desde 15.6 a 500 µg/ml y una concentración bactericida mínima que fluctuaba desde 31.25 a 500 µg/ml.¹⁷

Pallant (2010), mediante un análisis de cromatografía de gases - espectrometría de masa, identificó la presencia de alcaloides indólicos, voacangina y dregamina, como principales componentes de extractos de raíz de *Tabernaemonta. elegans*. Su actividad antibacteriana estuvo limitada a bacterias Gram positivas y especies de *Mycobacterium*.¹⁸

Duru *et al.* (2010), determinaron la actividad antimicrobiana de *Tabernaemontana pachysiphon* frente de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Fusarium phoseolida*, por el método de difusión en agar, obteniendo actividad frente a *S. aureus* y *E. coli*. El screening fitoquímico mostró la presencia de metabolitos como alcaloides, saponinas, resinas, flavonoides, polifenoles y carbohidratos.¹⁹

Ashikur *et al.* (2011), evaluaron la actividad antibacteriana de hojas de *Tabernaemontana divaricata* frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. El análisis fitoquímico de las hojas secas indicó la presencia de esteroides, taninos, saponinas, gomas y azúcares reductores. El interés farmacológico y el uso de esta planta en medicina tradicional condujo a estos autores a estudiar su posible actividad antibacteriana, para lo cual ensayaron diversos extractos (etanol, éter de petróleo, éter dietílico, metanol y acuoso), los cuales registraron que poseen una potencia máxima contra agentes patógenos. *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros.²⁰

López *et al* (2011), al evaluar la actividad antimalárica *in vitro* de 50 extractos de plantas de la amazonía peruana, entre ellas especies de *Tabernaemontana*, determinaron que el rendimiento en la producción del extracto etanólico de *T. heterophylla* (hojas) fue 3,5%, de *T. macrocalyx* (tallo) fue 4,6% y de *T. macrocalyx* (hojas) fue 44,7%. El screening fitoquímico de los extractos mostró que estas especies poseen un alto contenido de alcaloides.

Perea (2012), con la finalidad de determinar la actividad antimalárica *in vitro* de extractos etanólicos y fracciones alcaloidales de especies de la familia *Apocynaceae*, obtuvieron 26 extractos (etanólicos y alcaloidales), a partir de diferentes estructuras vegetales. Para el caso de *T. maxima* emplearon hojas, ramas y raíces, logrando obtener 3 extractos etanólicos, 3 fracciones alcaloidales y 2 residuos alcaloidales básicos; de los cuales solo 1 extracto etanólico y las 3 fracciones alcaloidales mostraron ser activos. Los rendimientos en la producción de extractos etanólicos de hojas, ramas y raíces de *T. maxima* fueron 11.70%, 2.20% y 4.27%, respectivamente.²²

Sathishkumar *et al.* (2012), evaluaron la actividad antibacteriana y anti-fúngica *in vitro* de diferentes extractos de hojas de *Tabernaemontana heyneana*, determinando inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* ($26 \pm 1,0$ mm) y *Salmonella typhi* ($9,0 \pm 2,0$ mm). Del mismo modo, se observó el efecto máximo y mínimo antifúngico contra *Rhizopus mucor* ($25 \pm 0,0$ mm) y *Trichoderma viridans* ($6,0 \pm 1,0$ mm), respectivamente. Entre los disolventes, el metanol demostró ser el mejor en la extracción de compuestos antimicrobianos, el etanol y los sistemas acuosos mostraron moderada extracción y el cloroformo mostró ser pobre en la extracción de componentes antimicrobianos. Los resultados globales demostraron que las hojas de *T. heyneana* poseen importante actividad antibacteriana y pobre antifúngica²³.

Thombre *et al.*, (2013), evaluaron la actividad antioxidante y antibacteriana de *Vitex negundo* L. and *Tabernaemontana divaricata* L., observando que los extractos de hojas de *V. negundo* L. presentaban mayor actividad antioxidante en comparación con *T. divaricata* L. Ambos extractos de plantas mostraron un amplio espectro de actividad antibacteriana. Además expresaron que los dos arbustos poseen una potencial actividad en la industria farmacéutica y medicinal debido a sus fitoconstituyentes, antioxidantes y actividades antibacterianas²⁴.

2.1.2 GENERO TABERNAEMONTANA

La familia *Apocynaceae*, tomando en cuenta la inclusión de las *Asclepiadaceae* como lo han sugerido estudios moleculares y filogenéticos recientes^{25,26}, es una de las más grandes de las Angiospermas, con un total de alrededor de 355 géneros y 3700 especies, distribuidas principalmente en las regiones tropicales. Bajo este concepto de unificación, cinco subfamilias fueron propuestas por Endress y Bruyns (2000)²⁶, quedando los géneros tradicionalmente tratados como *Apocynaceae* a las subfamilias *Apocynoideae* y *Rauvolfioideae*.²⁷

Genero *Tabernaemontana*, este género consta de 100-110 especies de plantas, con flores blancas y pertenecientes a la familia *Apocynaceae*, con una distribución tropical. Son arbustos y árboles que alcanza 1-15 metros de altura. Las hojas son perennes opuestas de 3-25 cm de longitud. Las flores son olorosas, blancas de 1-5 cm de diámetro. Algunos miembros del género *Tabernaemontana* se usan como aditivo para algunas versiones de la bebida psicodélica Ayahuasca.²⁸

Se han realizados estudios donde se han encontrado múltiples compuestos presentes en este género; metabolitos secundarios que bien podrían ser causales de una posible actividad antibacteriana. Existen referencias sobre su uso popular en la desinfección de heridas, infecciones de gargantas, ojos, uñas, gonorrea, también en diarreas y frente a infecciones por parásitos¹¹. Las especies de *Tabernaemontana* según su clasificación taxonómica pertenecen al reino *Plantae*, a la división *Magnoliophyta*, a la clase *Magnoliopsida*, al orden *Gentianales* y a la familia *Apocynaceae*.²⁹

Tabernaemontana macrocalix

a. Descripción taxonómica³⁰

Reino	: <i>Plantae</i>
División	: <i>Magnoliophyta</i>
Clase	: <i>Magnoliopsida</i>
Orden	: <i>Gentianales</i>
Familia	: <i>Apocynaceae</i>
Género	: <i>Tabernaemontana</i>
Especie	: <i>T. macrocalix</i>
Distribución	: Loreto, Madre de Dios, San Martín



Figura n°1: Hojas
Tabernaemontana macrocalix

b. Descripción morfológica

Arbustos hasta 4 m; ramitas glabras. Hojas lanceoladas, 18–28 × 6–9 cm, ápice cuspidado, base subobtusada, glabras en ambas caras, venas secundarias 17–22 pares, venación terciaria inconspicua; pecíolos 5–10 mm de largo. Cimas paucifloras; lóbulos calicinos glabros, elípticos, 10–12 mm de largo; corola blanco amarillenta, tubo recto, ca. 35 mm de largo. Mericarpos oblongos a cilíndricos, curvados, ca. 5 cm de largo, lisos. H: en tierra firme, bosque primario (SUC). Nv: yacusanango.³¹

La *T. macrocalix* es llamado también lobo sanango, perro siuca, sanango, es utilizado tradicionalmente como analgésico, antiinflamatorio, antiséptico, diurético, emético, fiebre, obesidad, reumatismo, sedante cardiaco (antiarrítmico) y sífilis.^{32,33}

Tabernaemontana heterophylla

a. Descripción taxonómica³⁰

Reino	: <i>Plantae</i>
División	: <i>Magnoliophyta</i>
Clase	: <i>Magnoliopsida</i>
Orden	: <i>Gentianales</i>
Familia	: <i>Apocynaceae</i>
Género	: <i>Tabernaemontana</i>
Especie	: <i>T. heterophylla</i>
Distribución	: Loreto, Madre de Dios, San Martín



Figura n°2: Hojas
Tabernaemontana heterophylla

b. Descripción morfológica

Arbustos hasta 4 m; ramitas pubérulas. Hojas usualmente anisofilas, lanceoladas o oblongo-lanceoladas, 6–13 × 1.5–4.5 cm, ápice cuspidado a caudado, base atenuada a obtusa, glabras en ambas caras, venas secundarias 9–13 pares, venación terciaria inconspicua; pecíolos 0–5 mm de largo. Cimas paucifloras; lóbulos calicinos glabros, ovado-lanceolados, 2–5 mm de largo; corola blanca, tubo recto, ca. 12 mm de largo. Mericarpos lanceolados curvados, ca. 3.7 × 1.5 cm, muriculados. H: en tierra firme, bosque primario (SUC). Nv: caballo sanango.³¹

Tabernaemontana maxima

a. Descripción taxonómica³⁰

Reino	: <i>Plantae</i>
División	: <i>Magnoliophyta</i>
Clase	: <i>Magnoliopsida</i>
Orden	: <i>Gentianales</i>
Familia	: <i>Apocynaceae</i>
Género	: <i>Tabernaemontana</i>
Especie	: <i>T. maxima</i>
Distribución	: Amazonas, Loreto



Figura n°3: Hojas *Tabernaemontana maxima*

b. Descripción morfológica

Árbol de altura de 35 metros con un diámetro a la altura del pecho de 80 a 120 cm, de fuste abultado en la base y aletas grandes que alcanzan hasta 1,5 metros de altura; con ramificación de la copa en el segundo o tercer tercio. Corteza externa agrietada, las hojas están compuestas, glabras, digitadas de cinco folíolos, alternas y dispuestas en espiral, ápice agudo acuminado, con borde entero y nervios secundarios visibles. Flores vistosas y grandes de 12 a 20 centímetros de longitud, hermafroditas.³¹

Tabernaemontana markgrafiana

a. Descripción taxonómica³⁰

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Gentianales
Familia	: APOCYNACEAE
Género	: <i>Tabernaemontana</i>
Especie	: <i>T. markgrafiana</i>
Distribución	: Amazonas, Loreto, Ucayali



Figura n°4: Hojas *Tabernaemontana markgrafiana*

b. Descripción morfológica

Arbustos hasta 4 m; ramitas glabras con médula amplia. Hojas lanceoladas, 20–40 × 8–15 cm, ápice agudo, base subobtusada a cuneada, glabras en ambas caras, venas secundarias 13–21 pares, venación terciaria conspicua; pecíolos 0.5–1.5 cm de largo. Cimas paucifloras; lóbulos calicinos elípticos, ca. 4 × 3 mm; corola amarillenta, tubo retorcido, ca. 24 mm de largo. Mericarpos elipsoides a subglobosos, ca. 3 × 2 cm, con tres costas ventrales, pubérulos, lisos. H: en planicie inundable estacional (YAN). U: frutos comestibles. Ny: sanango.³¹

2.1.3 METODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Existen sustancias generalmente de origen natural cuya efectividad biológica no puede ser determinada por sus propiedades químicas o fisicoquímicas. En ese caso, para evaluar su actividad, se emplean métodos de dosificación biológica. En estos se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones. Se obtiene así un valor de potencia relativo a un estándar de referencia.³⁴ Los dos métodos más comúnmente usados para evaluación de actividad antimicrobiana son:

A. Método turbidimétrico o ensayo en tubo

Se basa en la incubación de un medio de cultivo líquido inoculado con un microorganismo sensible al antibiótico en presencia de una concentración conocida del agente antimicrobiano. Luego de un tiempo adecuado se detiene el crecimiento y se evalúa el mismo por medidas turbidimétricas. El uso de un espectrofotómetro o un fotocolorímetro para medir los cambios de densidad óptica en base a la mayor o menor turbidez producida por el crecimiento microbiano, evita la posible subjetividad de lecturas en una escala nefelométrica de McFarland. La base cuantitativa del ensayo es la relación entre la concentración del antibiótico y la densidad óptica del medio de cultivo en donde hubo crecimiento microbiano.³⁵



Figura n°5: Método turbidimétrico o ensayo en tubo

B. Método de difusión en placa

Se basa en la difusión radial de una solución de extracto o de antibiótico desde un reservorio a través de una capa de agar que ha sido inoculada con un microorganismo sensible al antibiótico. Se confrontan diferentes medidas de la sustancia a ensayar en placas con medios de cultivo sólido inoculado con microorganismos adecuados. Las placas se incuban para permitir el desarrollo del microorganismo. Durante la incubación, el antibiótico difunde desde su reservorio (que puede ser un disco de papel filtro, un pozo excavado en el mismo medio de cultivo con inóculo bacteriano, o pequeños cilindros colocados en la superficie del medio) mientras la población microbiana aumenta por división celular. La respuesta obtenida es una zona clara o halo de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los reservorios. El límite de la zona de inhibición se forma cuando se alcanza la concentración crítica del antibiótico, es decir, la mínima concentración que inhibe el crecimiento de la población microbiana presente. Los halos de inhibición se miden con la mayor precisión posible: se utiliza regla, vernier ó un sistema de ampliación de imagen y proyección sobre una pantalla. La base cuantitativa del ensayo es la relación entre el diámetro de la zona de inhibición y la concentración del antibiótico. La determinación de sensibilidad por difusión en agar es habitualmente suficiente; sin embargo, en ciertas situaciones se recomienda la determinación del MIC por métodos turbidimétricos.³⁶ El gradiente de concentración es inversamente proporcional a la distancia de la fuente y depende del volumen de la sustancia en ella, y el crecimiento de microorganismos depende de la población inicial y de la velocidad de crecimiento.³⁴



Figura n°6: Control positivo usado en el método de difusión en placa.

2.1.4 BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares 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. En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el tracto digestivo. Aunque el efecto protector del sistema inmune hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas, incluyendo cólera, sífilis, lepra, tifus, difteria, escarlatina, etc.³⁷

Pseudomonas aeruginosa junto a *Staphylococcus aureus* son los principales patógenos nosocomiales. La incidencia de *P. aeruginosa* en infecciones en hospitales es de alrededor del 0,4%, ocupa el cuarto lugar en la frecuencia de los patógenos más aislados en infecciones nosocomiales con un 10,1% de las infecciones adquiridas en medios intrahospitalarios.³⁸

Staphylococcus aureus

a. Generalidades del Género *Staphylococcus*

Los cocos se asociaron por primera vez a enfermedades humanas cuando fueron observados en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos.

En 1880 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston demostró que cocos agrupados en forma de racimo eran la causa de ciertos abscesos piógenos en humanos. Louis Pasteur arribó a una conclusión similar al mismo tiempo, pero en París.

En el año 1882, Ogston llamo a estos cocos “*Staphylococcus*”, derivando el nombre de los términos griegos staphile (racimo de uvas) y kokkus (frutilla). Morfológicamente, Ogston propuso este término de manera de poder diferenciarlos de los estreptococos, formadores de cadenas.³⁹

El género *Staphylococcus* son Gram +, catalasa +, de 0.7 a 1.2µm de diámetro, son aerobios facultativos, pocas especies forman capsulas y tienen la capacidad de hacer hemólisis beta, no son móviles, los cultivos tienen un pigmento dorado por beta caroteno y amarillo por sarcinoxantinas. El diamino ácido en el peptidoglicano es la L-lisina. Este género posee alrededor de 30 especies.⁴⁰ Por su ubicuidad y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos; se confiere énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *staphylococcus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales.^{41, 42}

b. Características de *Staphylococcus aureus*^{43, 44, 45}

- ✓ Cocos Gram +.
- ✓ Forma esférica u ovoide y diámetro alrededor de 1µm, se agrupan en racimos
- ✓ Crece mejor en presencia de oxígeno, a T° óptima de 30°C a 37°C, en un rango de pH entre 7.0 y 7.5, en concentración de NaCl de 10% (concentración óptima).
- ✓ Las colonias son lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde crema a amarillo. La producción de pigmento (dorado, amarillo a veces blanca) se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente.
- ✓ Termodúricos.- resistentes a temperaturas de 80°C por una hora.
- ✓ Son resistentes a la desecación, muchos antisépticos y crean resistencia a los antibióticos fácilmente.

Se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *St. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada.⁴⁵

c. Hábitat

S. aureus se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc. A pesar que *St. aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño. Existen ocasiones en que este equilibrio se puede romper. Desde las narinas, los portadores pueden transferir bacterias a diferentes sectores de la piel, aunque habitualmente existe resistencia a la colonización de la piel intacta. Sin embargo, un traumatismo (muchas veces desapercibido) puede dar una puerta de entrada al microorganismo. En caso de infección, por tanto, puede ser muchas veces de origen endógeno.⁴⁶

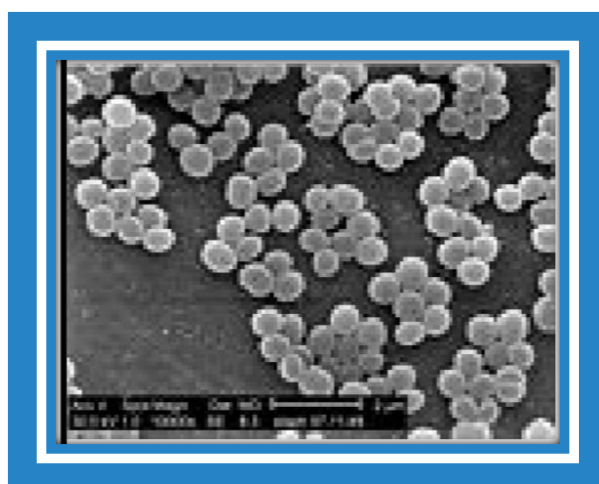


Figura n°7: *Staphylococcus aureus*

d. **Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus***^{40,47}

Staphylococcus aureus produce infecciones de dos maneras:

1. En forma directa, por invasión y posterior destrucción tisular local (proceso supurado), o luego de haberse diseminado por vía sanguínea.
2. A través de efectos de toxinas.

TIPOS DE INFECCIÓN QUE PRODUCE <i>S. aureus</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Superficial 	<ul style="list-style-type: none"> • Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia • Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, celulitis, linfangitis, linfadenitis, etc.
<ul style="list-style-type: none"> ✓ <u>Invasión directa</u> ○ Profunda 	<ul style="list-style-type: none"> • Artritis séptica • Osteomielitis • Piomiositis
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diseminación por vía sanguínea 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacteriemia con o sin shock o falla multiorgánica. • Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, bazo, retroperitoneo, riñón, tracto genital, etc.)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Enfermedades mediadas por toxinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de piel escaldada. • Intoxicación alimentaria. • Síndrome del shock tóxico.

Figura n°8: Infecciones producidas por *S. aureus*



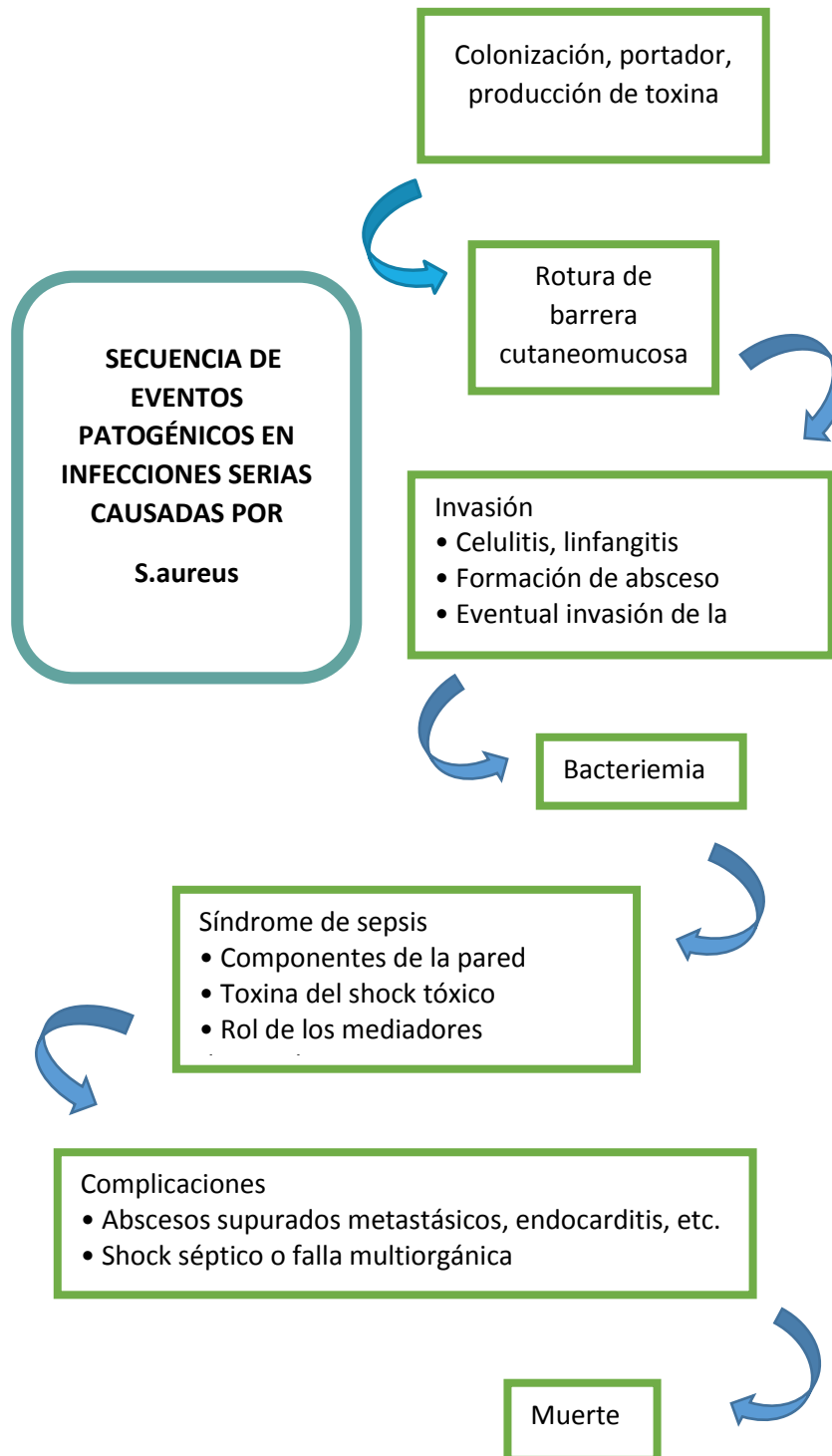


Figura n°9: Secuencia de eventos patogénicos en infecciones serias causadas por *S.aureus*

Grupos de riesgo^{46, 48}

- Defectos de quimiotaxis leucocitaria congénitos o adquiridos (diabetes mellitus, artritis reumatoidea).
- Defectos de opsonización por anticuerpos (hipogamaglobulinemia).
- Defectos en la muerte intracelular luego de la fagocitosis (enfermedad granulomatosa crónica).
- Heridas de piel (quemaduras, incisiones quirúrgicas, eczema).
- Presencia de cuerpos extraños (suturas, vías venosas, prótesis).
- Infecciones por otros agentes, particularmente virus (influenza).
- Enfermedades crónicas como alcoholismo, falla renal crónica, enfermedades malignas, etc.

Determinantes de patogenicidad^{49, 50}

S. aureus pueden ser divididos en tres grupos:

- a) Componentes de la pared celular.
- b) Enzimas.
- c) Toxinas.

<i>Staphylococcus aureus</i>	DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD	PROPIEDADES
Componentes de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> ○ Peptidoglicano ○ Ácidos teicoicos ○ Proteína A ○ Cápsula mucoide 	<ul style="list-style-type: none"> ● Activación del complemento ● Antifagocítica ● Antifagocítica ● Adherencia
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Coagulasa ○ Estafiloquinasas ○ Hialuronidasa ○ Lipasas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Formación de absceso ● Destrucción del coagulo ● Invasión hística ● Colonización
Toxinas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hemolisinas ○ Leucocidina ○ Toxina exfoliatina ○ Toxina del shock tóxico ○ Enterotoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Rotura de la membrana celular ● Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos ● Epidermólisis ● Shock ● Intoxicación alimentaria

Figuran°10: Determinantes de patogenicidad de *S. aureus*

Pseudomonas aeruginosa

a. Generalidades del Género Pseudomonas

Son bacilos Gram negativos, móviles por flagelos polar (de 2 a 3 flagelos), son aerobios obligados; presentan fimbrias en toda su superficie para adherirse a las células. Algunos dan un aspecto mucoso en los cultivos y se aíslan con frecuencia de pacientes con fibrosis quística debido a un exceso de alginato y de exopolisacárido que se encuentran en los tejidos. Son bacterias que habitan en los suelos y en las aguas; están distribuidas ampliamente en la naturaleza.⁴⁴

b. Características de Pseudomonas aeruginosa^{44, 51}

- Bacilo Gram -, no fermentador.
- Aerobio estricto.
- Ambiental ubicuo - Patógeno Oportunista.
- Tamaño y complejidad del genoma.
- Versatilidad metabólica y Capacidad de adaptación al microambiente.
- Crece en rangos de T° que van desde 20 C° a los 42C°.
- Forma colonias grandes de bordes irregulares, mucoides de coloración verdosa debido al pigmento piocianina, olor característico a uvas debido a que produce trimetilamida.
- Oxida la glucosa pero no tiene acción sobre otros carbohidratos.
- Son oxidasa +, indol -.

c. Hábitat

Es una bacteria dispersa en el ambiente, habitualmente presente en el suelo, el agua y superficies, con emergente relevancia como patógeno oportunista causante de infecciones en pacientes hospitalizados inmunodeprimidos. Su elevada resistencia a los antibióticos facilita su actividad devastadora.

Es resistente también a una gran variedad de agentes físicos y químicos, lo cual influye en la alta frecuencia de aislamiento observada y en que sea considerado un patógeno nosocomial primario.⁵²



Figura n°11: *Pseudomonas aeruginosa*

d. Infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*⁵¹

- Neumonía Nosocomial Comunidad – Condición predisponente (EPOC)
- Infecciones del Tracto Urinario
- Infecciones de piel y partes blandas (Heridas, quemaduras)
- Produce infecciones del sistema respiratorio.
- Dermatitis, endocarditis, infecciones gastrointestinales.
- una variedad de infecciones sistémicas especialmente en pacientes con cáncer, fibrosis quística o SIDA, llegando a una mortalidad del 50%.

Para un patógeno oportunista como *P. aeruginosa*, la infección comienza luego de la alteración de los mecanismos normales del sistema inmune del hospedero y se caracteriza por su invasividad.^{53, 54}

El proceso infeccioso se produce generalmente en tres etapas fundamentales: Unión bacteriana (colonización), Invasión local, Enfermedad sistémica diseminada.³⁸

Grupos de riesgo

La habilidad de *P. aeruginosa* de invadir los tejidos una vez implantada depende de su resistencia al sistema inmune del hospedero, y a las enzimas extracelulares y toxinas que ella produce en su metabolismo, que rompen las barreras físicas y contribuyen a la invasión bacteriana.⁵⁵

- Pacientes hospitalizados (ARM, sondas)
- Individuos inmunosuprimidos (neutropénicos)
- Personas con quemaduras graves extensas
- Individuos con condiciones predisponentes EPOC Pacientes Fibroquísticos.⁵⁶

Factores de Virulencia⁵⁶

- Adherencia – Flagelo y fimbrias (o pili), matriz exopolisacárida
- Daño e invasión – Acción directa de Toxinas y exoenzimas
 - Mediado por la respuesta inflamatoria

En la etapa de invasión de los tejidos este microorganismo produce enzimas y toxinas que le permite implantarse. Entre ellas las más importantes son: La elastasa, la proteasa alcalina, la hemolisina (fosfolipasa y lecitinasa), la leucocidina, los sideróforos y el sistema de captación de sideróforos, la exotoxina A, la exoenzima S y las endotoxinas.^{57,58}

El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es el principal componente de la envoltura celular, representa la base química de su seroespecificidad somática y es uno de los principales determinantes de la virulencia de este microorganismo.^{59, 60}

2.1.5 RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia antimicrobiana es un problema de carácter mundial que afecta a todos los grupos poblacionales, especialmente a los niños. El uso irracional de los antimicrobianos ha derivado en la emergencia y diseminación de microorganismos que son resistentes a drogas de primera línea, baratos y efectivos. Las principales enfermedades en donde se expresa esto es en la enfermedad diarreica, infecciones del tracto respiratorio, meningitis, infecciones de transmisión sexual y las infecciones adquiridas en el hospital.⁶¹

Se estima que el consumo anual de antibióticos a nivel mundial es de 100 a 200 x 10⁶ kg. A su vez, las tres cuartas partes de este consumo de antimicrobianos en la comunidad está destinado al manejo de las infecciones respiratorias agudas, el 80% de las cuales son bronquitis, faringitis, laringitis y amigdalitis, enfermedades frecuentes en la infancia, que en su mayoría tienen un origen viral y por tanto no requieren antimicrobianos. Esto denota que el grupo poblacional más expuesto a la presión selectiva por el uso de antimicrobianos son los niños.⁶¹



Figura n°12: Los antibióticos pueden dejar de curar

Los microbios han evolucionado más de 3,5 millones de años y son, posiblemente, los organismos más adaptables en la tierra. Las bacterias han adquirido varios mecanismos adicionales de intercambiar material genético horizontalmente.

Por lo que cuando se enfrentan a productos químicos hostiles (antibióticos) responden con una fuerza igual y opuesta. Lo que explica la evolución de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos β -lactámicos en los últimos 70 años en dos especies de bacterias, *Staphylococcus aureus*, un patógeno altamente evolucionados humanos, y *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno nosocomial oportunista.⁶²

En las infecciones intrahospitalarias, los agentes infecciosos más importantes son el *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* y otros. Está demostrado también que las infecciones adquiridas en las Unidades de Cuidados Intensivos, tienen una mayor probabilidad de ser causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. Las consecuencias de estas infecciones son fallas en la respuesta al tratamiento (enfermedad prolongada y mayor riesgo de muerte), periodos más largos de infectividad y rotación a drogas de segunda o tercera línea que son más caras y más tóxicas.⁶¹

La emergencia y diseminación de bacterias resistentes ha mostrado impacto en la morbilidad y mortalidad de los pacientes y en el consumo de recursos económicos. Conocer el fenómeno y sus consecuencias es un paso fundamental para lograr la movilización de los actores implicados en su contención.⁶³ Se argumenta que las desigualdades y las fuerzas del mercado facilita y acelera la disminución de la eficacia de los antibióticos que dentro de los próximos 5-10 años las infecciones de la comunidad, así como adquiridas en el hospital se volverán intratables.⁶³

Los seres humanos hemos acelerado el progreso de la ineficacia de los antibióticos. Las últimas generaciones de pacientes en todo el mundo han sido criadas con la convicción tácita de que los microbios son causantes de enfermedades. Esto ha dado lugar a un patrón de cambio de forma abrumadora en relación con el comportamiento de búsqueda de antibióticos, especialmente en las sociedades más pobres. En él se explica la creciente demanda de tratamientos con antibióticos, que, al mismo tiempo, se juntó con la disponibilidad de compuestos genéricos producidos en comunidades emergentes de mercado.

Por lo tanto, no será ninguna sorpresa que habrá un aumento masivo en el consumo de antibióticos mientras que los antibióticos se convierten en mercancías en mercados no regulados. Esto a su vez se traducirá en aumento de la resistencia de estos antibióticos. En las regiones del mundo con baja cobertura de saneamiento, sistemas de vigilancia y control de infecciones asociadas al cuidado de la salud deficientes o ausentes, se fomentará la propagación de bacterias resistentes, y ya no únicamente las de los hospitales sino también las de la comunidad.⁶¹

Se puede hacer frente a esta condición de resistencia con una buena gobernanza a través del manejo clínico y la auditoría de la prescripción de antimicrobianos en los hospitales. En un período de aumento de la amenaza, la innovación (nuevos medicamentos y tecnologías) parece estar en declive. Hoy son motivo de grave preocupación que el actual modelo económico no es capaz de responder adecuadamente. Los gobiernos deben reconocer y abordar este hecho.⁶⁴

La amenaza de los microorganismos resistentes a los antimicrobianos se está acumulando y esto va en aceleración. Esto demuestra una vez más que el enfoque de salud debe llevar a la prevención de los procesos infecciosos, no es suficiente con abaratar los costos de los medicamentos es indispensable mejorar las condiciones de salubridad, agua potable y alimentación de la población. Y sobre todo educar a los pacientes, enseñarles a utilizar apropiadamente los servicios de salud así como los antibióticos.⁶³



Figura n°13: La resistencia a los antibióticos cada vez es mayor, por lo que las plantas medicinales constituyen son una buena opción de productos antimicrobianos

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Extractos etanólicos de *Tabernaemontana macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*.

VARIABLE DEPENDIENTE

- Actividad antibacteriana *in vitro*.

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICES	ESCALA
Extractos de <i>T. macrocalix</i> , <i>T. heterophylla</i> , <i>T. maxima</i> , <i>T. markgrafiana</i> . (V. INDEPENDIENTE)	Obtenidos por maceración con etanol a partir de hoja, corteza y raíz de cada especie vegetal.	Tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de cada especie	Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos y Metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos	Peso de los extractos obtenidos en relación de muestra vegetal inicial	Tipo de variable: Cuantitativa
Actividad Antibacteriana <i>in vitro</i> . (V. DEPENDIENTE)	Capacidad del extracto de inhibir el crecimiento de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de cultivos <i>in vitro</i> .	Determinación de la actividad antibacteriana por el método de Difusión en agar (positivo y negativo).	Halo de Inhibición	Presencia de Halo de inhibición: Tiene actividad antibacteriana _____ Ausencia de Halo de inhibición: No tiene actividad antibacteriana	Tipo de variable: Cualitativa

2.3. HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de *Tabernaemontana macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana* presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPITULO III



3.1. MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1 METODO DE INVESTIGACION

TIPO DE ESTUDIO

Cualitativo: Se utilizaron métodos de recolección de datos sin medición numérica, como las descripciones y las observaciones.

Experimental: Se estableció la relación de causa y efecto a través de procedimientos controlados donde se manipularán y controlarán las variables.

Prospectivo: Se determinó la relación entre las variables sobre los resultados obtenidos. Se registrará los hechos ocurridos a partir de la fecha de ejecución.

3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

En el presente trabajo se utilizó un diseño de investigación de laboratorio o experimental. Los extractos se obtuvieron por maceración en etanol, posteriormente se realizó la identificación de metabolitos secundarios (screening fitoquímico) y la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de hojas, corteza y raíz de 4 especies de *Tabernaemontana*. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar (técnica Kirby - Bauer), empleando cepas bacterianas nativas aisladas del Hospital Apoyo Iquitos, Se determinó la presencia de metabolitos secundarios y se relacionó la presencia de ellos con la posible actividad antibacteriana *in vitro*. Se consideró activo la presencia de halo de inhibición formado alrededor de los discos. (ANEXO N°1)

3.2. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.2.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA VEGETAL

Las muestras de *Tabernaemontana macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana* fueron recolectadas en la localidad de Manacamiri, ubicada en el margen derecha del Río Nanay, geográficamente se encuentra situada en las coordenadas UTM 9583780, a una altitud aproximada de 102 m.s.n.m y políticamente se encuentra en el Distrito de Punchana, Provincia de Maynas, Región Loreto.(ANEXO N°2, Cuadro n°1)

La identificación de las muestras se realizó en el *Herbarium Amazonense* de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), por un botánico y validadas con las exicatas existentes, los códigos con los que fueron registradas estas especies se indica en ANEXO N°2, Cuadro n°2. Posteriormente, las muestras de *Tabernaemontana macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*(ANEXO N°3), fueron procesadas en el Centro de Investigación de Recursos Naturales Antiparasitarios – CIRNA; ubicado en el Psje. Los Paujiles S/N, AA HH Nuevo San Lorenzo, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

3.2.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS

Las muestras vegetales fueron seleccionadas y cortadas en trozos pequeños para ponerlas a secar totalmente a temperatura ambiente (21°C-25°C). Posteriormente, se realizó la molienda de cada muestra vegetal. Se pesó 40g. de cada una de las muestras vegetales; se maceraron con etanol destilado en un envase de vidrio durante 48 h, el macerado se filtró. (ANEXO N° 4)

La concentración de las muestras vegetales se realizó por eliminación del solvente a presión reducida en un rotavapor; a 60°C y a una presión de 690 mm de Hg, y se obtuvo los extractos etanólicos de cada muestra.

La extracción se realizó hasta agotación, los productos obtenidos se colocaron en placas de Petri y se dejó secar a temperatura ambiente; luego se pesó y se calculó el porcentaje de rendimiento de cada extracto. Se colocó en un vial, previamente rotulado, para su conservación. (ANEXO N° 4)

3.2.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO^{65, 66}

Los extractos obtenidos de las cuatro especies vegetales se sometieron a reacciones químicas para determinar, de forma cualitativa, los metabolitos secundarios que estaban presentes en las muestras vegetales. (ANEXO N°5)

Tabla N°1: Metodología para la determinación de los metabolitos primarios y secundarios de especies Vegetales.

Tipos de compuestos	Grupo Fitoquímico		Reactivos	Procedimiento	Resultados
Compuestos de metabolismo primario	Glúcidos		Alfa naftol al 10%, H ₂ SO ₄	0,5 mL de extracto acuoso se le añade 2 gotas de una solución al 10% de α-naftol en etanol y 0,5 mL de H ₂ SO ₄ c, resbalando por las paredes.	(+) la formación de un anillo de color violeta en la interfase
	Grasas y mucílagos		Etanol al 96%	Se adiciona un exceso de alcohol a 96% a 0,5 mL de extracto acuoso.	La formación de un precipitado floculento confirma su presencia.
	Lípidos y ceras		(Sudán III)	1 mL del extracto hexánico se evapora hasta sequedad en presencia de la disolución de sudán III	(+)La aparición de gotas oleosas de coloro rojo oscuro.
	Aminas y aminoácidos		Ninhidrina, Etanol.	A 1mL de extracto etanólico se le adiciona 1mL de ninhidrina al 5% en etanol, se calienta de 5 a 10 minutos en baño maría.	La aparición de un color azul violeta indica la presencia de aminas.
Compuestos fenólicos	Cumarinas	Volátiles	KOH	Se calienta 1 mL de la solución etanólica en baño maría, cubriendo con un trozo de papel filtro previamente impregnado con una solución de KOH diluida	(+) La fluorescencia verde limón del papel filtro a la luz UV.
		Fijas	KOH	Se siembra dos puntos en un papel filtro del extracto etanólico, a uno de ellos se lo agrega KOH diluido	(+) La fluorescencia azulada del papel filtro a la luz UV de punto que contiene la muestra.
	Flavonoides	Flavonas	HCL (c) y Cinta de Mg	A 1mL de extracto etanólico se le adiciona II ó III gotas de HCL (c) y un fragmento de cinta de Mg.	(+) Color anaranjado
		Flavononas	HCL (c) y Cinta de Mg		(+) Color rojo
		Flavanoles	HCL (c) y Cinta de Mg		(+) Color rojo azulado
F y Xantonas		HCL (c) y Cinta de Mg	(+) Color violeta		

Compuestos fenólicos	Antocianinas		HCl al 37%, Alcohol isoamílico	A 1mL del extracto acuoso, se adiciona 2mL de HCl al 37%, se calienta en baño maría durante 30 minutos, se enfría y se le añade alcohol isoamílico, agitando vigorosamente.	La aparición de un color rojo en la fase alcohólica confirma la existencia de antocianinas.
	Leucoantocianinas		HCL concentrado	Se calienta 1mL de extracto etanólico en presencia de HCl (c)	(+)La aparición de un color rojo o naranja
	Taninos	Pirogálicos	HCl c y Formaldehido	1 mL de extracto etanólico se le añade unas gotas de HCl (c) y 1 mL de formaldehido, hervir durante varios minutos.	(+)La presencia de un precipitado
		Catéquicos	FeCl ₃	La solución se filtra y se añade FeCl ₃ al 1%	(+) La formación de un color azul
	Antraquinonas		NaOH 1 N	1mL de extracto clorofórmico se le añade 1mL de NaOH 1N agitar para que se mezcle.	(+) si la fase acuosa se torna de color rojizo
Terpenos y esteroides	Triterpenos		Anhídrido acético, H ₂ SO ₄ (c)	A 1mL de extracto acuoso, se añade 1mL de anhídrido acético y 0,5mL de H ₂ SO ₄ (c), dejándolo caer por la pared del tubo.	(+) la formación de un anillo rojizo en la interface
	Esteroles		Anhídrido acético, H ₂ SO ₄ (c)	A 1mL de extracto acuoso, se añade 1mL de anhídrido acético y 0,5mL de H ₂ SO ₄ (c), dejándolo caer por la pared del tubo.	(+) La formación de una coloración verdosa en la fase superior.
	Saponinas		Agua caliente	Preparar una sol. al 10% de extracto en agua hirviendo, agitar por 1 minuto cuando esta fría	(+) La persistencia de 1cm de espuma después de 30 min.
Alcaloides	Bouchardat		KI, yodo metálico	A 1mL del extracto etanólico se disuelve en unas solución 0.5 N de H ₂ SO ₄ y se le agrega los siguientes reactivos	(+) Precipitado rojo ladrillo
	Mayer		MgCl ₂ , KI		(+) Precipitado blanco amarillento
	Hager		Ácido pícrico al 1%		(+) Precipitado amarillo limón
	Dragendroff		Subnitrate de bismuto, HNO ₃ , KI		(+) Precipitado castaño rojizo

3.2.4 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.^{67, 68}

Se midió la sensibilidad de cinco cepas de, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a la concentración de 1 mg/μl. de cada extracto. La prueba de sensibilidad de cada microorganismo se realizó por triplicado. (ANEXO N°6)

Preparación de la concentración de los discos

Se pesó 400 mg. de cada extracto vegetal, se disolvió en 400 μl de agua destilada estéril y SE obtuvo la solución stock a una concentración de 1 mg/μl. A partir de esta solución stock se preparó los discos con la concentración de 15 mg/μl. (ANEXO N°7).

Preparación de los discos de sensibilidad

Los discos se prepararon utilizando papel Whatman N° 3 y un perforador convencional. Estos fueron autoclavados a 121 ° C a 15 libras de presión por espacio de 15 minutos. Luego de haber sido esterilizados y enfriados los discos, se procedió a agregar a cada uno de ellos 15 μl de las soluciones stock de los extractos vegetales, los que se dejaron secar a 37 °C por espacio de 24 h. Se empleó como control, discos de antibióticos de tetraciclina para *S. aureus* y cefepime para *P. aeruginosa* (ANEXO N°8).

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

- Para 10 ml de estándar 0,5 McFarland se agregó en un tubo de ensayo con tapa de rosca 0,5 ml de una solución de BaCl₂ 1% P/V (1g. /100 ml.) a 9,95 ml de una solución de H₂SO₄ 1% V/V en constante movimiento para mantener la suspensión. Se verificó la densidad correcta del estándar.

- Se ajustaron bien las tapas o tapones y se conservó en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Antes de ser usado se agitó vigorosamente dicho estándar, de preferencia con la ayuda del vórtex.

Ajuste y aplicación del inóculo

- Se sembraron los microorganismos en Caldo Tripticasa Soya e incubaron por espacio de 18 a 24 horas. Luego, se repicaron en placas con TSA e incubaron por espacio de 18 a 24 horas para obtener cultivos jóvenes.
- Luego, se procedió a preparar la suspensión de gérmenes en suero fisiológico al 0,8 %, se ajustó la turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland para obtener una concentración aproximada de 1.5×10^8 gérmenes/ml.
- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo para cada microorganismo, se tomó una alícuota de 0,1 ml y se colocó en la superficie seca de la placa de Petri con agar Mueller Hinton y diseminó sobre la superficie con la ayuda de un hisopo estéril, para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido. Luego, se procedió a la aplicación de los discos.(ANEXO N° 9)

Aplicación de los discos

- Se colocó los discos preparados con los extractos vegetales y el disco de sensibilidad estándar (control positivo), sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- Se distribuyó a los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar.
- Se incubaron las placas en posición invertida a 37° C por 18 a 24 horas.
- Transcurrido dicho periodo de incubación, se realizó la lectura de los resultados con el apoyo de la regla de Vernier (ANEXO N°10).

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1 POBLACION VEGETAL

La población estuvo constituida por las especies vegetales: *Tabernaemontana macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*, que se encontraron en la localidad de Manacamiri, Distrito de Punchana, Provincia de Maynas, Región Loreto (ANEXO N° 3).

3.3.2 MUESTRA

La muestra, estuvo constituida por las hojas, corteza y raíz de las especies de *Tabernaemontana macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*. Especímenes vegetales seleccionados en el punto de recolección específico de la localidad de Manacamiri, Distrito de Punchana, Provincia de Maynas, Región Loreto.

CRITERIOS DE INCLUSION:

- Material vegetal correctamente identificado.
- Material vegetal en buen estado de conservación.
- Que no presenten contaminación por microorganismos.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Especies vegetales que no correspondían al género *Tabernaemontana*.
- Material vegetal que no poseía una correcta identificación taxonómica.
- Material vegetal que se encontraba en mal estado de conservación y que presentaba signos visibles de descomposición microbiana.

3.4. MATERIALES

3.4.1 Materiales de laboratorio y otros

- Asa bacteriológica de Kölle
- Balón (vol. 1000 ml; boca: 29/32)
- Baquetas
- Capilares
- Embudos.
- Espátula.
- Envase (Para macerar)
- Espátulas
- Espátulas de Drigalsky (vidrio)
- Frascos de vidrio.
- Gradilla
- Matraz de Erlenmeyer.
- Mechero.
- Micropipetas
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel higiénico
- Papel Whatman N°3.
- Picetas.
- Pinzas
- Pipetas Pasteur
- Placas de Petri.
- Probeta 10, 50 y 100 ml.
- Vernier.
- Soporte universal
- Tubos de ensayo.
- Vasos de precipitado 5, 10, 50, 100, 500 ml.
- Viales pequeños

3.4.2 Equipos

- Agitador Magnético
- Autoclave
- Balanza analítica electrónica digital
- Bomba de vacío.
- Estufa.
- Horno
- Incubadora
- Lámpara de UV
- Micropipetas.
- Refrigeradora
- Rotavapor.
- Vórtex VM-1000

3.4.3 Reactivos y Medios de Cultivo

Reactivos para tamizaje fitoquímico

- Alfa naftol al 10%.
- Ácido Sulfúrico H_2SO_4 cc.
- Ácido Clorhídrico HCl cc
- Ácido nítrico HNO_3
- Acido pícrico
- Alcohol isoamílico
- Anhídrido acético
- Cinta de magnesio Mg.
- Cloruro férrico $FeCl_3$
- Cloruro de magnesio $MgCl_2$
- Disolución de cloruro de antimonio al 20% (Carr-price).
- Etanol al 96%, Formaldehido
- Hidróxido de potasio KOH

- Hidróxido de sodio NaOH
- Ioduro de potasio KI , Yodo metálico
- Molibdato de sodio al 1% en H₂SO₄
- Ninhidrina
- Reactivo de Bouchardat
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner.
- Subnitrito de bismuto
- Sudán III

Reactivos y medios de cultivo para determinar actividad antibacteriana

- Agar Müller-Hinton
- Agar Tripticasa de Soya.
- Caldo Tripticasa Soya (TSB)
- Cloruro de sodio
- Nefelómetro de Mc Farland (ácido sulfúrico + cloruro de bario)

3.4.4 Material vegetal y microorganismos

- Hojas, corteza y raíz de *Tabernaemontana. macrocalix*, *T. heterophylla*, *T. maxima*, *T. markgrafiana*.
- Cinco cepas nativas de *Staphylococcus aureus* aisladas del hardware de computadoras del Hospital de Apoyo Iquitos.
- Cinco cepas nativas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas del hardware de computadoras del Hospital de Apoyo Iquitos.

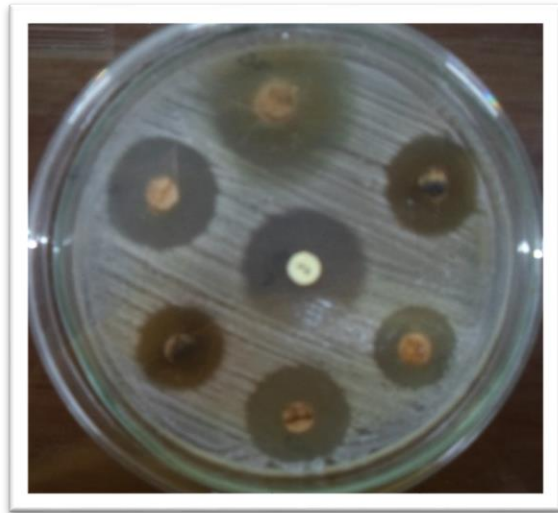
3.5. ANÁLISIS DE DATOS

Para la realización de la presente investigación se utilizó estadística descriptiva e inferencial. Se determinó la media, desviación estándar. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS v 18.0 y los resultados obtenidos fueron representados en tablas y gráficos.

3.6. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS

En el laboratorio de microbiología del CIRNA-UNAP se realizaron los ensayos experimentales, dichas instalaciones poseen un medio ambiente de trabajo especial, en las cuales se debe evitar la exposición a riesgos que impliquen la adquisición de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ello, se trabajó tomando en consideración estrictas medidas de bioseguridad.

CAPITULO IV



4.1. RESULTADOS

- Se obtuvo extractos etanólicos de 40g. de cada muestra, los productos finales se pesaron y se calculó los porcentajes de rendimiento de cada extracto etanolico.(Tabla N°2)

% DE RENDIMIENTO:

- PF = Peso final
- PI = Peso inicial

$$\%R = PF/PI \times 100$$

Tabla N°2: Porcentaje de rendimientos de los extractos obtenidos.

ESPECIE	Parte de la planta	Peso del extracto (g.)	% de rendimiento
<i>Tabernaemontana macrocalix</i>	Hoja	6.0800	15.2
	Corteza	1.1813	3.0
	Raíz	1.1379	2.8
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hoja	6.7076	16.8
	Corteza	1.9708	4.9
	Raíz	1.4297	3.6
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hoja	8.2361	20.6
	Corteza	5.0726	12.7
	Raíz	3.2928	8.2
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hoja	8.1566	20.4
	Corteza	5.4331	13.6
	Raíz	3.6493	9.1

- El resultado del screening fitoquímico de los 12 extractos etanólicos fueron:

Mayor concentración de alcaloides en todos los extractos; amins y aminoácidos en *T. macrocalyx* (corteza y raiz), y *T. markgrafiana* (corteza); flavonas en *T. heterophylla* (corteza); leucoantocianinas en *T. macrocalyx* (corteza); y triterpenos en *T. macrocalyx* (raiz) *T. markgrafiana* (corteza). En mediana concentración glúcidos, triterpenos y esteroides; en poca concentración cumarinas y taninos; y no se encontró presencia de flavonoles, flavononas, catequicos y antraquinonas (Tabla N° 3).

Tabla N°3: Resultados del Screening fitoquímico de las especies de *Tabernaemontana* en estudio.

TIPO DE COMPUESTOS		<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>			<i>Tabernaemontana heterophylla</i>			<i>Tabernaemontana maxima</i>			<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>			
		Hoja	Cort.	Raíz	Hoja	Cort.	Raíz	Hoja	Cort.	Raíz	Hoja	Cort.	Raíz	
Compuestos de metabolismo primario	Glúcidos		-	+	++	++	+	++	++	++	+	+	++	+
	Grasas y Mucílagos		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Lípidos y Ceras		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Aminas y Aminoácidos		+	+++	+++	-	+	++	+	++	+	-	+++	++
Compuestos fenólicos	Cumarinas	Volátiles	++	+	++	+	-	-	-	-	-	+	+	++
		Fijas	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	+	+
	Flavonoides	Flavonas	-	+	+	-	+++	-	-	-	++	-	+	-
		Flavonoles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Flavononas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Antocianinas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leucoantocianinas		-	+++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Taninos	Pirogálicos	++	++	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-
		Catéquicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Terpenos y esteroides	Triterpenos		-	+	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
	Esteroles		-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
	Saponinas		++	-	-	-	-	++	-	-	+	+	-	++
Alcaloides		Draguendorf	+	++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++

Contenido: (+) Poco; (++) Medio; (+++) Abundante y (-) Negativo.

- En las tablas N° 4 y N° 5, se observa el registro de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm), de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, por actividad de los extractos vegetales empleados. Se determinó la media y desviación estándar.

Tabla N°4: Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por actividad de los extractos vegetales empleados.

Muestra (extracto, antibiótico)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
		Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Cepa 5	
		N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
	Corteza	3	8.0 \pm 1.0	3	7 \pm 0.0	3	7.7 \pm 1.2	3	7.0 \pm 0.0	3	7.0 \pm 0.0
	Raíz	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
	Corteza	3	9.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
	Raíz	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hojas	3	14.3 \pm 0.6	3	10.3 \pm 1.2	3	8.0 \pm 1.0	3	8.0 \pm 1.7	3	7.0 \pm 0.0
	Corteza	3	11.0 \pm 1.0	3	9.3 \pm 0.6	3	9.0 \pm 0.0	3	9.7 \pm 1.2	3	0.0 \pm 0.0
	Raíz	3	9.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	8.3 \pm 1.2	3	0.0 \pm 0.0
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
	Corteza	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
	Raíz	3	9.7 \pm 0.6	3	0.0 \pm 0.0	3	9.5 \pm 0.5	3	8.3 \pm 0.6	3	0.0 \pm 0.0
Cefepime	Antibiótico	3	33.7 \pm 1.5	3	32.3 \pm 1.5	3	33.7 \pm 1.5	3	28.7 \pm 2.5	3	32.3 \pm 0.6

Tabla N°5: Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de las cepas de *Staphylococcus aureus* por actividad de los extractos vegetales empleados.

Muestra (extracto, antibiótico)		<i>Staphylococcus aureus</i>									
		Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Cepa 5	
		N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.	N	Media \pm D.Est.
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	3	0.0 \pm 0.0	3	9.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	9.3 \pm 2.1	3	0.0 \pm 0.0
	Corteza	3	7.0 \pm 0.0	3	10.3 \pm 1.5	3	0.0 \pm 0.0	3	11.3 \pm 1.2	3	0.0 \pm 0.0
	Raíz	3	12.0 \pm 1.0	3	13.3 \pm 2.9	3	13.3 \pm 2.9	3	19.7 \pm 0.6	3	12.7 \pm 2.1
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0	3	0.0 \pm 0.0
	Corteza	3	16.7 \pm 0.6	3	16.3 \pm 3.1	3	15.7 \pm 0.6	3	22.3 \pm 0.6	3	17.3 \pm 1.5
	Raíz	3	19.3 \pm 1.2	3	19.0 \pm 2.6	3	19.3 \pm 0.6	3	24.7 \pm 0.6	3	21.3 \pm 1.2
<i>Tabernaemontana máxima</i>	Hojas	3	14.7 \pm 4.0	3	21.7 \pm 0.6	3	14.7 \pm 5.0	3	17.3 \pm 0.6	3	15.7 \pm 0.6
	Corteza	3	22.0 \pm 2.3	3	25.3 \pm 0.6	3	23.3 \pm 4.2	3	23.0 \pm 0.0	3	23.0 \pm 1.7
	Raíz	3	15.7 \pm 0.6	3	17.7 \pm 2.5	3	21.7 \pm 0.6	3	18.0 \pm 1.0	3	17.0 \pm 0.0
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	3	15.0 \pm 2.0	3	17.3 \pm 1.2	3	19.3 \pm 1.5	3	18.3 \pm 1.5	3	17.0 \pm 1.0
	Corteza	3	23.3 \pm 3.1	3	26.7 \pm 2.5	3	19.7 \pm 1.2	3	25.0 \pm 7.2	3	27.3 \pm 2.1
	Raíz	3	19.0 \pm 2.6	3	23.3 \pm 0.6	3	24.7 \pm 1.2	3	20.7 \pm 2.3	3	21.3 \pm 2.1
Tetraciclina	Antibiótico	3	23.3 \pm 0.6	3	27.0 \pm 1.7	3	11.7 \pm 0.6	3	27.7 \pm 1.5	3	25.0 \pm 1.0

- En la Tabla N° 6, se registra el porcentaje de actividad de los extractos vegetales ensayados frente a las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Al analizar los resultados de los extractos frente a las cepas de *P. aeruginosa* se observa que la corteza de *T. macrocalyx* y las hojas de *T. maxima* mostraron actividad frente al 100 % de las cepas. la corteza de *T. maxima* mostró actividad contra el 80 % de las cepas, la raíz de *T. markgrafiana* mostró actividad frente al 60 %, mientras que los extractos de la raíz de *T. maxima* y de la corteza de *T. heterophylla* fueron activos contra menos del 50 % de las cepas.

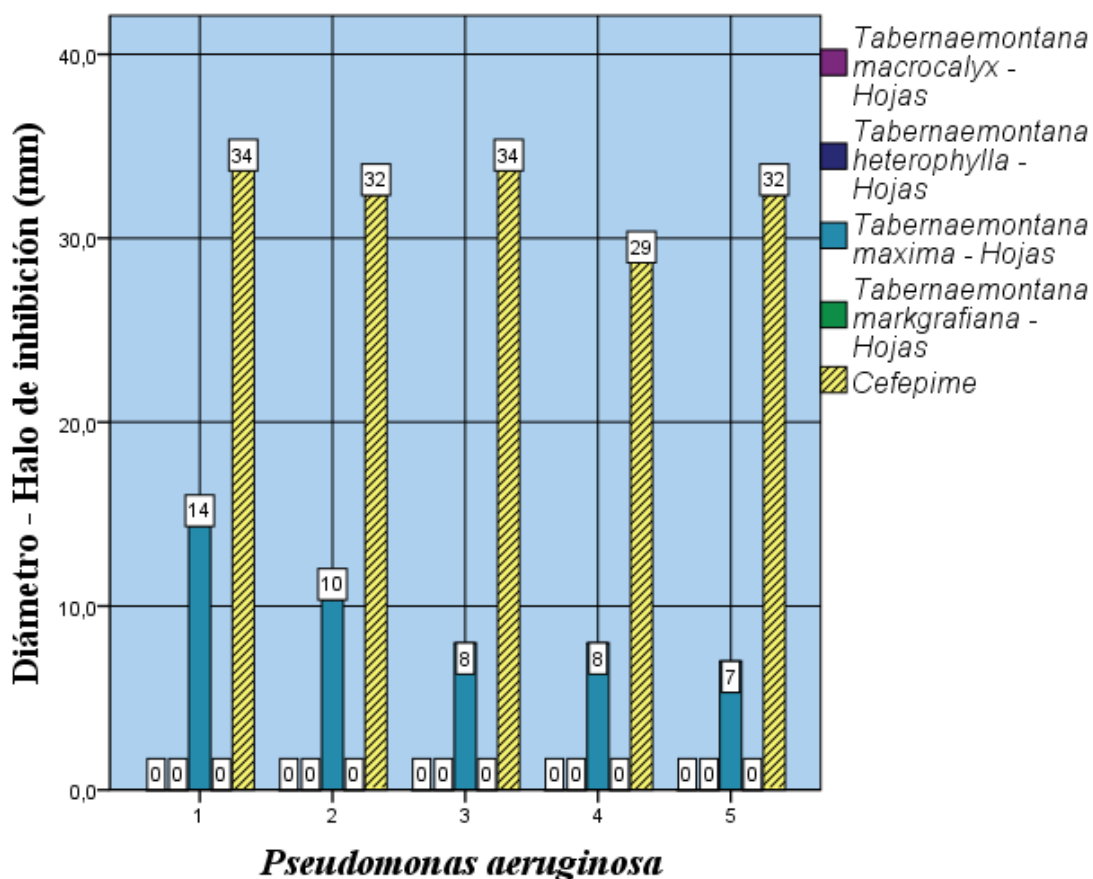
Se observa que el extracto etanólico de las hojas de *T. heterophylla* no presentó actividad contra las cepas de las bacterias estudiadas, a excepción del extracto mencionado, los extractos evaluados tuvieron mayor actividad frente a cepas aisladas de *S. aureus*, 9 de los 12 extractos mostraron actividad frente al 100 % de las cepas de *S. aureus*, 1 extracto mostro actividad contra el 60 % de las cepas (Corteza de *T. macrocalyx*) y 1 extracto mostró actividad contra el 40% de las cepas (Hojas de *T. macrocalyx*).

Tabla N°6: Porcentaje de actividad de los extractos vegetales ensayados frente a las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Especie	Parte de la Planta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		N° de cepas evaluadas	N° de cepas con halo de inhibición	% de cepas con halo de inhibición	N° de cepas evaluadas	N° de cepas con halo de inhibición	% de cepas con halo de inhibición
<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	5	0	0.0	5	2	40.0
	Corteza	5	5	100.0	5	3	60.0
	Raíz	5	0	0.0	5	5	100.0
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	5	0	0.0	5	0	0.0
	Corteza	5	1	20.0	5	5	100.0
	Raíz	5	0	0.0	5	5	100.0
<i>Tabernaemontana maxima</i>	Hojas	5	5	100.0	5	5	100.0
	Corteza	5	4	80.0	5	5	100.0
	Raíz	5	2	40.0	5	5	100.0
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	5	0	0.0	5	5	100.0
	Corteza	5	0	0.0	5	5	100.0
	Raíz	5	3	60.0	5	5	100.0

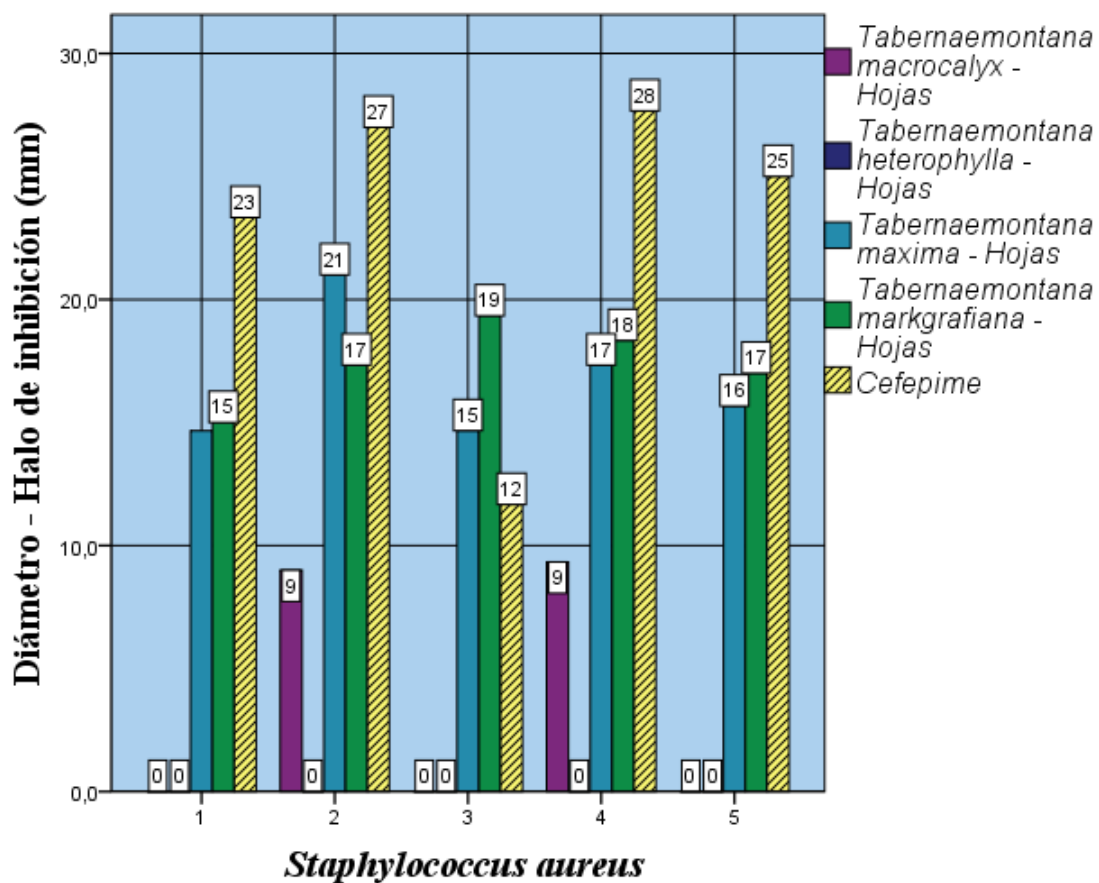
Se realizó gráficos donde se representan los diámetros de los halos de inhibición (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por actividad de los extractos de las especies seleccionadas, mediante barras.

Gráfico N°1: Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por actividad de las hojas de las especies seleccionadas



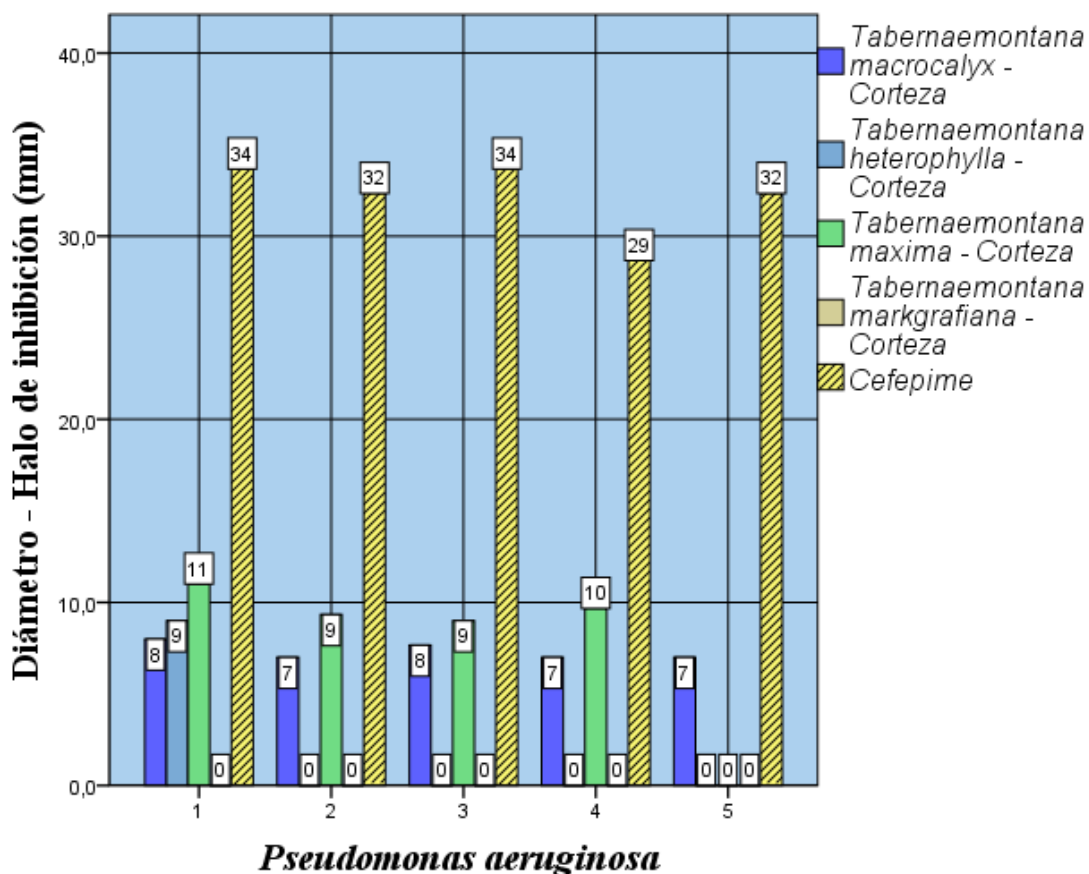
En este gráfico se observa que las hojas de *T. máxima*, tuvieron actividad frente al 100% de las cepas, mientras que las hojas de *T. macrocalyx*, *T. heterophylla* y *T. markgrafiana*, no tuvieron actividad frente a las cepas de *P. aeruginosa*.

Gráfico N° 2: Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de *Staphylococcus aureus* por actividad las hojas de las especies seleccionadas



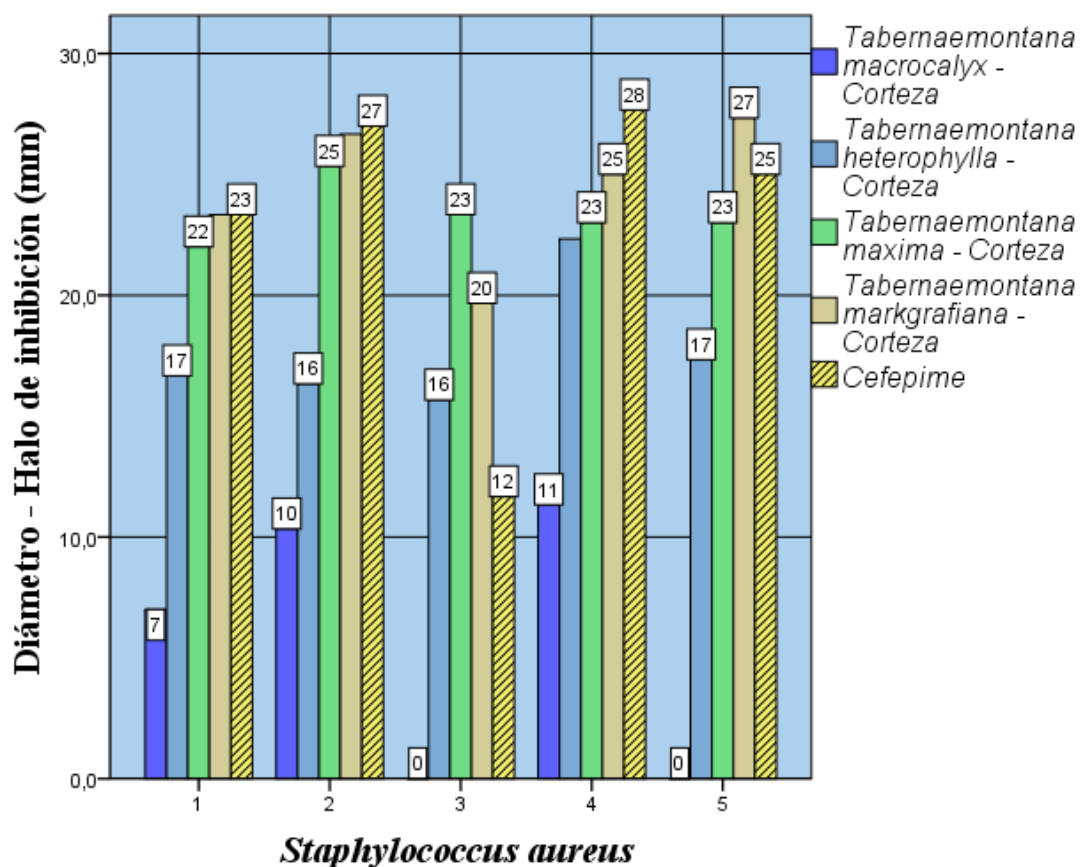
En este grafico se observa que las hojas de *T. maxima* y *T. markgrafiana* tuvieron actividad frente al 100% de las cepas; las hojas de *T. macrocalix* frente al 40% de las cepas; *T. heterophylla* no tuvo actividad frente a las cepas de *S. aureus*.

Gráfico N° 3: Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por actividad de la corteza de las especies seleccionadas



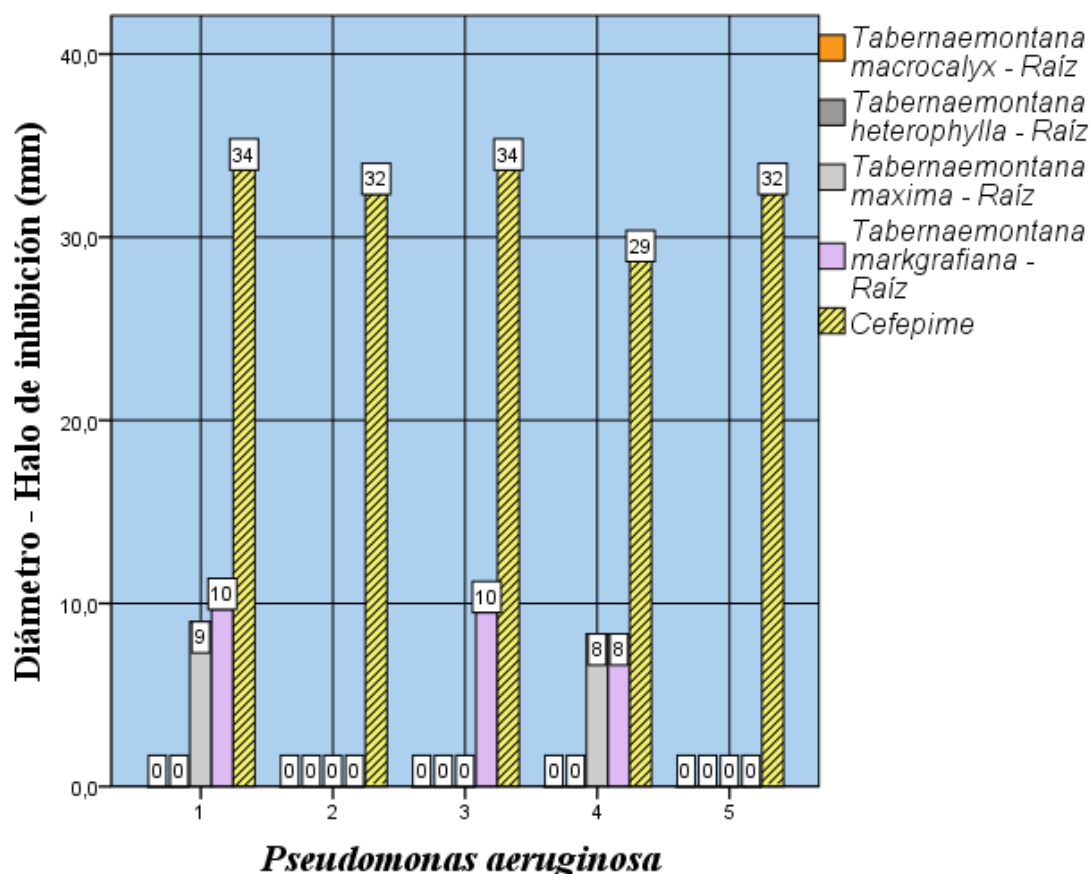
En este gráfico se observa que la corteza de *T. macrocalyx* tuvo actividad frente al 100% de las cepas; la corteza de *T. maxima* frente al 80% de las cepas; *T. heterophylla* frente al 20% y *T. markgrafiana*, no tuvo actividad frente a las cepas de *P. aeruginosa*.

Gráfico N° 4: Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de *Staphylococcus aureus* por actividad las cortezas de las especies seleccionadas



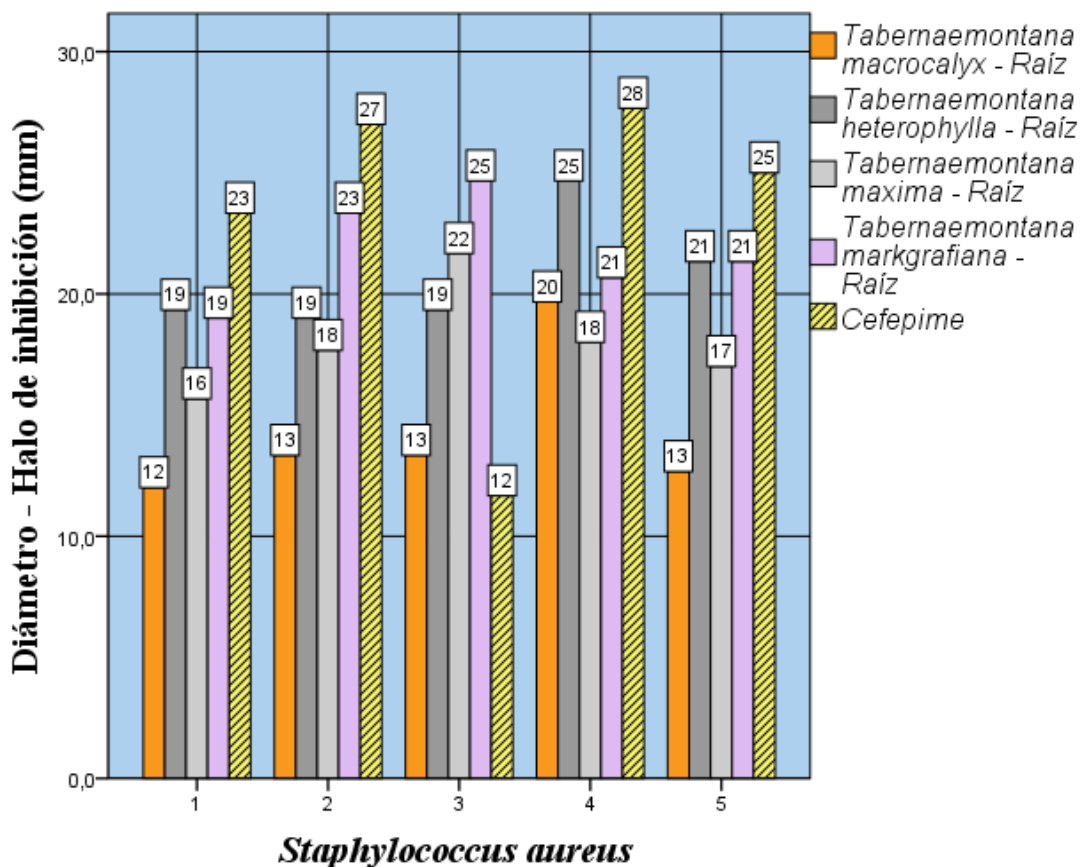
En este grafico se observa que la corteza de *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana* tuvieron actividad frente al 100% de las cepas de *S. aureus*; la corteza de *T. macrocalyx* tuvo actividad frente al 60% de las cepas de *S. aureus*.

Gráfico N° 5: Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por actividad de las raíces de las especies seleccionadas



En este grafico observamos que la raíz de *T. markgrafiana* tuvo actividad frente al 60% de las cepas; la raíz de *T. maxima* frente al 60% de las cepas; *T. heterophylla* y *T. macrocalyx*, no tuvieron actividad frente a las cepas de *P. aeruginosa*.

Gráfico N° 6: Diámetro del halo de inhibición (mm) de las cepas de *Staphylococcus aureus* por actividad las raíces de las especies seleccionadas



En este gráfico observamos que la raíz de todas las especies evaluadas tuvo actividad frente al 100% de las cepas de *S. aureus*.

- Representación de los halos de inhibición (mm) de la totalidad de extractos etanólicos estudiados frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Gráfico N° 7) y *Staphylococcus aureus* (Gráfico N° 8)

Gráfico N° 7: Diámetro del halo de inhibición (mm) de la totalidad de extractos etanólicos estudiados frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

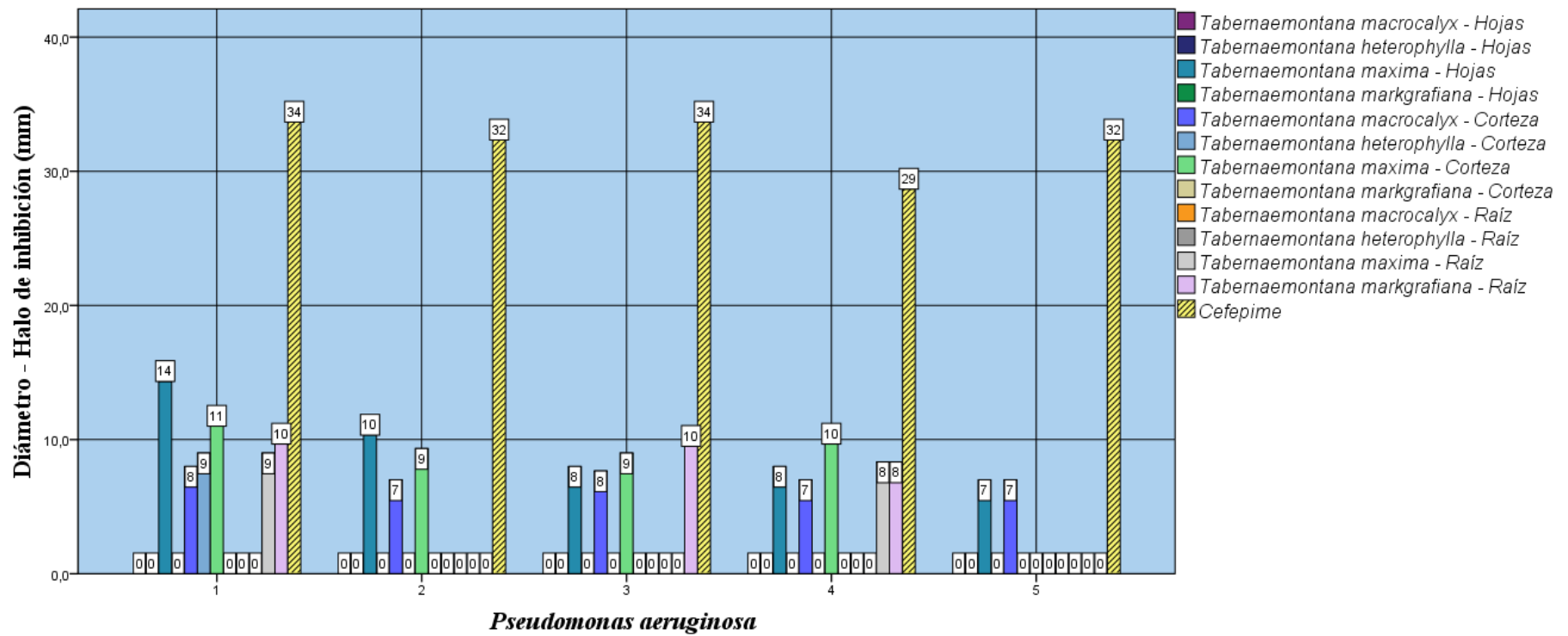
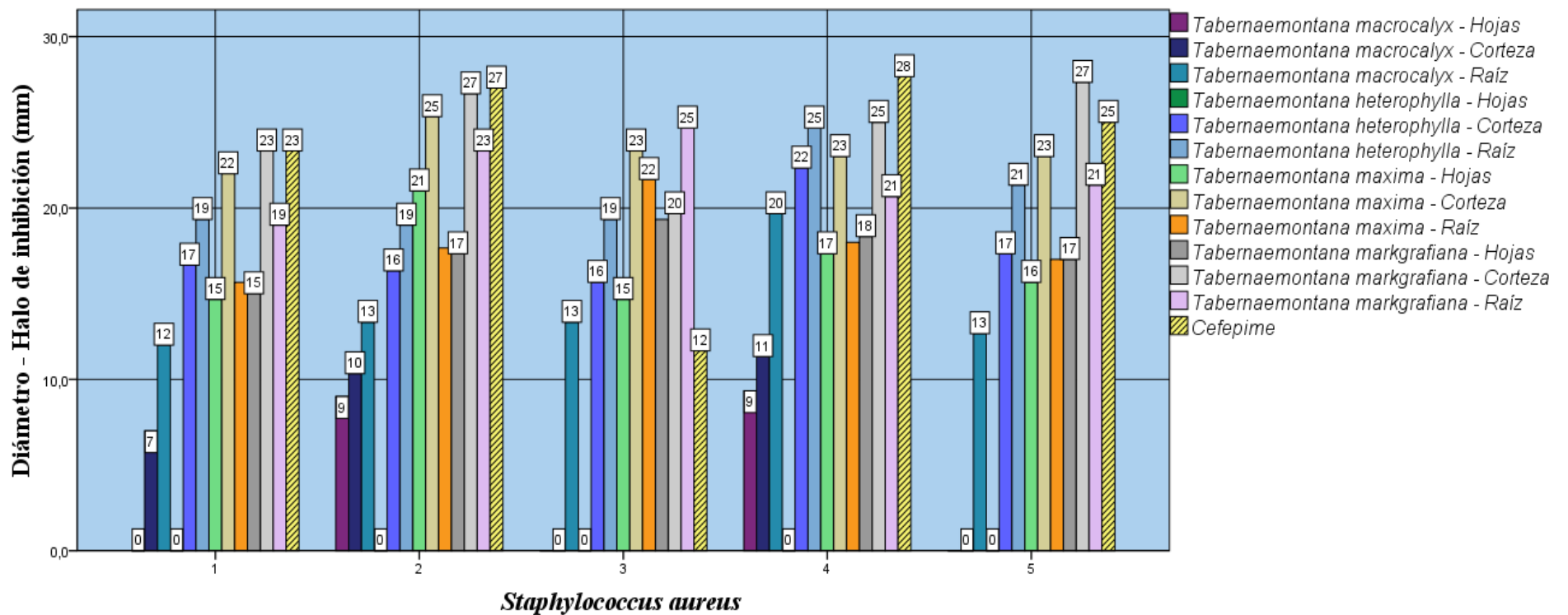


Gráfico N° 8: Diámetro del halo de inhibición (mm) de la totalidad de extractos etanólicos estudiados frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*



4.2. DISCUSIÓN

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a aislados intrahospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mediante el método de difusión en agar, previa realización del screening fitoquímico, de los extractos de las hojas, corteza y raíz de cuatro especies del género *Tabernaemontana* (*Tabernaemontana macrocalyx*, *T. heterophylla*, *T. maxima* y *T. markgrafiana*).

Las hojas de *T. maxima* y *T. markgrafiana* mostraron mayor rendimiento en cuanto a la obtención de extractos etanólicos (20.6 y 20.4 %, respectivamente; Tabla N° 2), resultados que se diferencian del obtenido por Perea²², quien logró obtener un extracto etanólico de hojas de *T. maxima*, pero con un porcentaje de rendimiento menor (11.7 %). El rendimiento en la producción de los extractos de las hojas de *T. macrocalyx* y *T. heterophylla* fue de 15.2 % y 16.8 %, respectivamente, valores que difieren con los registrados por López *et al*²¹, quienes obtuvieron extractos etanólicos de las hojas de estas especies vegetales, pero con porcentajes de rendimiento de 44.7% y 3.5%, respectivamente.

El screening fitoquímico mostró que las especies del género *Tabernaemontana*, analizadas en este estudio, son ricas en alcaloides (Tabla N° 3). Al respecto, Pratchayasakul *et al*¹⁶, determinaron que los alcaloides que poseen las especies de este género, son en su mayoría indólicos, como es el caso de la conofilina, la coronaridina, la difforlemenina, tabernulosina, vincadifina, tabernaemontanina, voacangina y 11-methoxy-N-metil dihidropericiclivina, los cuales han sido aislados e identificados en extractos de *T. glandulosa* y *T. divaricata*. Por otro lado, Pallant¹⁸ y Nielsen *et al*¹², también determinaron la presencia de alcaloides indólicos como principales componentes de los extractos de la raíz de *T. elegans* y *T. margrafiana*, respectivamente.

Además, en este estudio se ha demostrado la presencia de carbohidratos en la mayoría de extractos (Tabla N° 3), coincidiendo con lo reportado por Duru *et al*¹⁹ quienes demostraron la presencia de carbohidratos en *T. pachysiphon*.

En la mayoría de extractos obtenidos en el presente estudio, se determinó la ausencia de metabolitos como grasas, mucílagos, lípidos, ceras, flavonoles, flavononas, antoncianinas, taninos catéquicos y antraquinonas; aunque se observó también la presencia de metabolitos como cumarinas, flavonas, taninos pirogálicos, triperpenos, esteroles y saponinas, aunque en menores cantidades. Estos resultados mayormente coinciden con los registrados por López *et al.*²¹, quienes determinaron la presencia de saponinas y cumarinas en *T. macrocalyx* y *T. heterophylla*, pero en bajas concentraciones. Estudios realizados por Rutttoh *et al.*¹⁷, demostraron que *T. stapfiana* presentaba diversos alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos y saponinas, como posibles sustancias antimicrobianas.

Adicionalmente, en el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos de dichas especies vegetales frente a cinco aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y cinco de *Staphylococcus aureus* procedentes del Hospital Apoyo Iquitos - Loreto.

Al parecer, los extractos vegetales empleados fueron más activos frente a las cepas de *S. aureus* que frente a las cepas de *P. aeruginosa* ensayadas (Tabla N°6), especialmente aquellos que fueron obtenidos de las hojas, cortezas y raíces de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, ya que estos mostraron 100% de actividad frente a todas las cepas de *S. aureus*. Tomando en consideración que las cepas bacteriana utilizadas es este estudio, al ser procedentes de un centro hospitalario, muchas de ellas podrían ser multidrogresistentes, por lo que se podría pensar que los extractos de estas dos especies vegetales constituirían sustitutos a los antibióticos, especialmente cuando estos compuestos sean ineficaces en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Al respecto, estos resultados tienen cierta relación con lo registrado por Rutttoh *et al.*¹⁷, quienes determinaron que los extractos metanólicos del tallo y la corteza de la raíz de *T. stapfiana*, mostraron actividad contra una cepa multidrogresistente de *S. aureus*.

Con respecto a la actividad de los extractos vegetales de *Tabernaemontana* frente a las cepas de *P. aeruginosa*, se puede afirmar que solo los extractos de corteza de *T. macrocalyx* y hojas de *T. maxima* fueron activos frente a la totalidad de cepas de esta especie bacteriana.

Por otro lado, cabe mencionar que *T. heterophylla* no mostró actividad contra ninguna de las cepas bacterianas estudiadas, ya que los extractos de sus hojas, corteza y raíz fueron ineficaces contra dichas bacterias (Tabla N° 6; Gráfico N° 1 y N° 2).

Diversos investigadores como Murphy⁶⁹, Mendoza *et al*⁷⁰, han responsabilizado a diversos metabolitos (aminas y aminoácidos, triterpenos, cumarinas fijas, alcaloides, etc), como los poseedores de actividad antimicrobiana. Con el propósito de determinar la presencia de algún metabolito de los extractos vegetales al que se podría atribuir la actividad antibacteriana de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, se realizó un análisis exhaustivo a los resultados del screening fitoquímico de los extractos etanólicos de dichas especies (Tabla N° 3), se aprecia que *T. máxima*, a nivel de sus hojas, corteza y raíz, posee cumarinas fijas; del mismo modo, *T. markgrafiana*, a nivel de sus hojas, posee saponinas, mientras que a nivel de su corteza y raíz, posee aminas y aminoácidos, metabolitos que estuvieron ausentes en las hojas de *T. heterophylla*. Esto podría explicar el fenómeno por el cual **los extractos de *T. maxima* y *T. markgrafiana* poseían actividad frente a todas las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa***, situación que no sucedía con *T. heterophylla*, la cual, tal como se mencionó anteriormente el extracto de sus hojas no poseía actividad frente a las especies bacterianas estudiadas.

Finalmente, las especies de *T. maxima* y *T. markgrafiana* mostraron ser fuentes promisorias para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos, su acción antimicrobiana es respaldada por un buen rendimiento en la producción del extracto etanólico (Tabla N° 2).

4.3. CONCLUSIONES

- Las hojas de *Tabernaemontana maxima* y *Tabernaemontana markgrafiana* mostraron mayor rendimiento en la producción de extracto etanólico.
- El screening fitoquímico permitió determinar la presencia de metabolitos con posible capacidad antibacteriana en las cuatro especies de *Tabernaemontana* estudiadas.
- *Tabernaemontanamaxima* y *Tabernaemontana markgrafiana* mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las hojas de *Tabernaemontana heterophylla* no mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

4.4. RECOMENDACIONES

- ✓ Se sugiere realizar mayores estudios en los que se considere determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de estos extractos a fin de conocer a mayor detalle su eficacia.
- ✓ Realizar la prueba de actividad antibacteriana frente a otras especies de importancia clínica.
- ✓ Continuar la investigación del género *Tabernaemontana* y/o familia *Apocynaceae*, con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre su actividad antimicrobiana.
- ✓ Determinar la composición química de las sustancias naturales de las especies vegetales de *Tabernaemontana* a fin de precisar a los metabolitos responsables del efecto antibacteriano.

CAPITULO V



5.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jacoby G, Archere G. 1991. New mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. NEJM 324: 601-612.
2. WHO. 1991. WHO Policy System Eighty-Seventh Session EB87.R24 Traditional Medicine and Modern Health Care. Geneva. January 14-25
3. WHO (1996), "Traditional Medicine" Fact Sheet N° 134, September 1996
4. Ali-Shyayeh M, Yaghmour R, Faidi Y, Salem K, Al-Nuri M. 1998. Antimicrobial Activity of 20 Plants used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area. J. of Ethnopharmacol. 60: 265-271.
5. De Los Ríos C, Hidalgo D, Quintero M, Márques G, Crescente O. 1999. Estudio preliminar *in vitro* de la actividad biológica de *Chromolaena voglii* (Robinson) H. Huber. Revista de la Facultad de Farmacia. 36:22-5.
6. Sanabria A, Mendoza A y Moreno A. 1998. Actividad microbiana *in vitro* de *angiospermas colombianas*. Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas 27: 47-51.
7. Palomino M, Uribe C. 2007. Determinación de la Actividad Antimicrobiana *In Vitro* de los Extractos Etanólico e Hidroalcohólico de las semillas de *Carica Papaya L.* Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica, Facultad De Farmacia Y Bioquímica. Ica-Perú.
8. Reynel C, Pennington R, Pennington T, Flores C, Daza A. 2003. Árboles útiles de la Amazonía Peruana.
9. Araujo J, Salas R, 2008. Actividad Antimicrobiana de Plantas. Revista Científica de La Universidad Científica del Sur, Lima - Perú.
10. Sangama D, Espinoza G. 2009. "Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de extractos y fracciones de nueve especies vegetales de la Amazonía Peruana sobre formas parasitarias de Plasmodium, Leishmania y Tripanosoma". Tesis de Pre-grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
11. Van Beek T, Deelder A, Verpoorte R, Baerheim A. 1984. Antimicrobial, Antiamoebic and Antiviral screening of some *Tabernaemontana* species", Planta Med. 50: 180-185.

12. Nielsen H, Hazell A, Hazell R, Ghia F, Torssei K. 1994. Indole alkaloids and terpenoids from *Tabernaemontana markgrafiana*. *Phytochemistry*, Vol.37, N°6. Pp 1729 - 1735
13. Bargardi S, Kramer F, Medvedeff M, Jordá G, Guida A. 2001. Actividad antibacteriana de *Peschiera australis* (Muell) Miers sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. *Revista de Ciencia y Tecnología, UNAM*. Año4/N°4ª.
14. Barbosa I, Marianne E, Kaneko T, Taba M, Naim R, Drauzio A. 2002. Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38: 89-94.
15. Guida A, De Battista G, Bargardi S. 2003. Actividad antibacteriana de alcaloides de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. Misiones, Argentina. *Ars Pharmaceutica*, 44: 167-173.
16. Pratchayasakul W, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn S. 2008. Ethnobotany & ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. *Indian J Med Res* 127: 317-335
17. Ruttoh E, Tarus P, Bii C, Machocho A, Karimie L and Okemo P. 2009. Antibacterial Activity of *Tabernaemontana stapfiana* Britten (Apocynaceae) Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (AJTCAM)* 6: 186-194
18. Pallant C. 2010. Bioactivity of the alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans* (Stapf.). A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree *Magister Scientiae* in Pharmacology. University of Pretoria. 112 p.
19. Duru C, Mbata T. 2010. The antimicrobial activities and phytochemical screening of ethanolic leaf extracts of *Hedranthera barteri* Hook and *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf. *Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering* Vol. 2(1), pp. 1-4
20. Ashikur R, Hasanuzzaman M, Mofizur R, Zahan S, Muhuri R. 2011. Evaluation of Antibacterial Activity of Study of Leaves of *Tabernaemontana divaricata* (L.). *Internat. Res. J. of Pharm.* 2: 123-127.

21. Lopez J, Tulumba P. 2011. Evaluación de la Actividad Antimalárica in Vitro de 50 Extractos de Especies Vegetales de la Amazonía Peruana por Citometría de Flujo-LIPNAA-2011. Tesis de Pre-grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
22. Perea R. 2012. Evaluación de la Actividad Antimalarica In Vitro de Extractos de Especies Vegetales de la Familia Apocynaceae de la Amazonia Peruana por Citometria de Flujo LIPNAA - 2012. Tesis de Pre-grado. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
23. Sathishkumar T, Baskar R, Rajeshkumar M. 2012. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of *Tabernaemontana heyneana* Wall. Leaves. India. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2: 107-111.
24. Thombre R, Jagtap R, Patil N. 2013. Evaluation of phytoconstituents, antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of *Vitexnegundo* L. and *Tabernaemontana divaricate* L. Int J Pharm Bio Sci. 4: 389 – 396.
25. Endress, M. E. & B. F. Hansen. 2007. Pinochia, a new genus of *Apocynaceae*, *Apocynoideae*, from the Greater Antilles, Mexico, and Central America. Edinburgh Journal of Botany 64: 270-274.
26. Endress, M. E. & P. Bruyns. 2000. Arevised classification of the *Apocynaceae* s.l. Botanical Review (Lancaster) 66: 1-56.
27. Sennblad, B. & B. Bremer. 1996. The familial and subfamilial relationships of *Apocynaceae* and *Asclepiadaceae* evaluated with rbcL data. *Pl. Syst. E* vol. 202: 153-175.
28. Field Mus. Nat. Hist. 1994. *Tabernaemontana markgrafiana* J.F. Macbr. Lectotipo (designado por Leeuwenberg, 1994). Revis. *Tabernaemontana* 2: 430.
29. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 2010. Programa de Investigación de Biodiversidad Amazónica. “Proyecto: Prospección y evaluación de sustancias bioactivas y productos naturales Sub-proyecto: Conocimientos para el aprovechamiento sostenible de las plantas medicinales. Base De Datos Plantas Medicinales.
30. Ministerio del Ambiente del Perú. 2010. Flora del Perú: Actualización de datos. Perú.
31. Vasquez. 1997. Florura de las reservas biológicas de Iquitos, Perú

32. Brako L, Zaruchi, J. 1996. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Missouri Botanical Garden. 1286 p.
33. Clavo M, *et al.* 2003. Plantas Medicinales: usadas por mujeres Nativas y Mestizas en la Región Ucayali. Pucallpa-Perú. 124 0070.
34. Araujo J, Salas R, 2008. Actividad Antimicrobiana de Plantas. Revista Científica de La Universidad Científica del Sur, Lima - Perú.
35. Ota C, Muzetti P, Schimidet C, Tsunezi M. 1998. Actividade da própolis sobre bacterias isoladas da cavidade bucal. LECTA, Braganca Paulista. 16: 73-77.
36. Harvey A. 2000. Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. Drug Discovery. 5. Review.
37. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Microbiologia Medica. 14:9-24
38. Prutit BA, Manus AT. 1998. Kim SH, Goodwing CW. 1998. Burn Wound Infections: Current Status. World J. Surg. 22: 135-145.
39. Sheagren J, Schaberg D, Staphylococci. 1998. En Infectious Diseases. Gorbach, Barlett and Blacklow. Ed WB Saunders. 1697-1703
40. Waldwogel F. 2000. *Staphylococcus aureus* (including sthaphylococcus toxix shock), Mandell, Douglas & Bennett J. E, Dolin R. eds. Fifth ed, Churchill Livingstone, Philadelphia, Chapter 183: 2069 – 81.
41. Emori T , Gaines R . 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the micribiology laboratory. Clin micribiol rev. 6: 428-442.
42. Spink W, Ferris V. 1945. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. Science. 102-221
43. S. Meter. 1986. Bergey manual of sistematic bacteriology. Williams & Wilkinns edit. New York. Vol 2. 1013- 1182
44. Ramirez G. 2003. Apuntes de microbiologia y bacteriología. Unidad de medicina tropical y enfermedades infecciosas. Instituto de ciencias básicas. Facultad de medicin. Colegio Mayor de nuestra señora del rosario. Bogota. 105-252
45. Archer G. 2000. *Staphylococcus epidermidis* and Other Coagulase-Negative Staphylococci. Mandel, Douglas, Bennet Principles and Practice of Infectious diseases... Ed WB Saunders.
46. Maradan C., Moreira B., Boyle-Vavra S. et al. 1997. Antimicrobial resistance in Staphylococci. Infectious Diseases of North America. Vol.11 4:813-841.

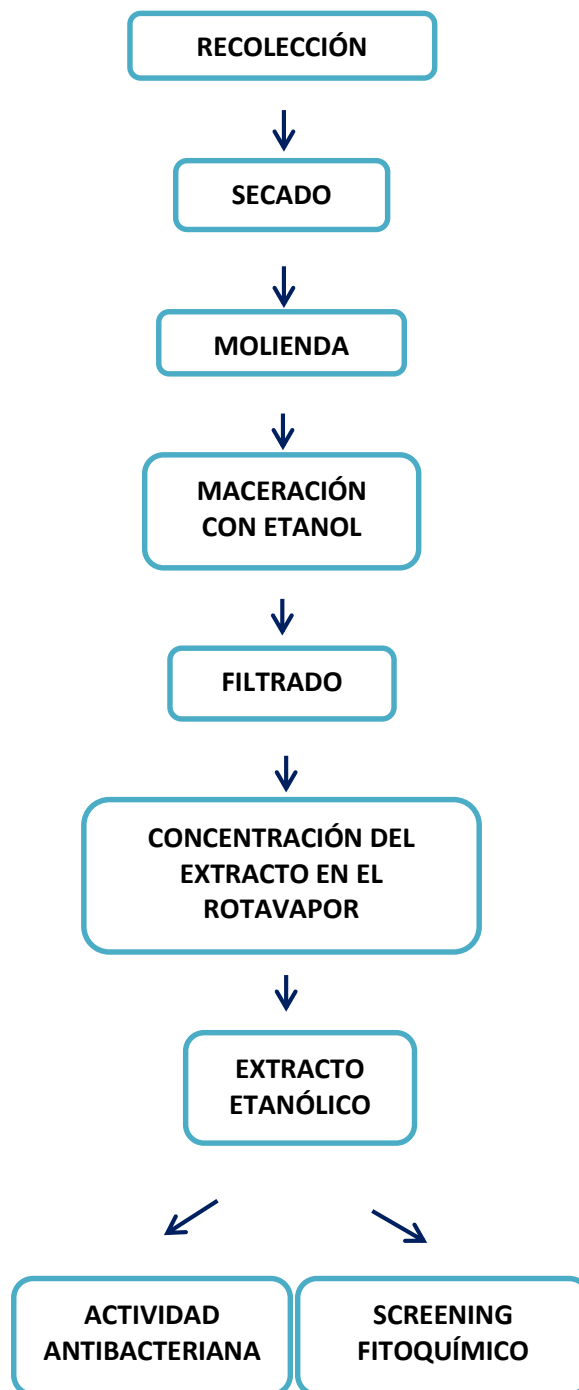
47. Herrera V, Henriquez M, Vidal N. 1984. Portadores de *Staphylococcus aureus* en el servicio de cirugía. Revista Médica de Chile. 112: 242-246.
48. Chambers H. 1997. Methicilin Resistance in Sthaphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clin. Microbiol. Rev. Vol.10. 4: 781-791.
49. Hiramatsu K. 1998. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med. 104: 5A, 7S-10S
50. Prieto J, Gomez-Lus ML. 1996. Género *Staphylococcus*. Microbiología Médica. Garcia-Rodriguez, Picazo. Ed Doyma. 179-191.
51. Boletín Epidemiológico De La Vigilancia De Infecciones Intrahospitalarias. 2012, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica alerta de la diseminación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno nosocomial en expansión. HOSPITAL REGIONAL HUACHO (Vol.27 Núm. 05).
52. Trilla A., Barrio JL. Infecciones nosocomiales. En Farreras y Rozman. Medicina Interna. España: Ediciones Mosby- Doyma Libros S.A. [Ed. en CD-ROM]. Decimotercera edición. 1996; 2553-2558.
53. Rumbaugh K, Hamood A, Griswold J. 1999. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates for possible variations within the virulence genes exotoxin A and Exoenzyme S. Journal of Surgical Reseach. 82:95- 105.
54. Kamath S, Kapatral V, Chakrabarty. 1998. Cellular funtion of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. Molecular Microbiology. 30(5): 933-941.
55. Johansen H. 1996. Potential of preventing *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. Experimental studies in animals. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 63(104).
56. Gómez M, 2003. Patogénesis de las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Dpto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología Facultad de Medicina, UBA-CONICET.
57. Hamood A. 1992. Isolation and characterization of toxin A excretion deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PA O1. Infection and Immunity. 60 (2):510-517.

58. Jaffar M. 1995. Production of elastase, exotoxin A and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Clinical Microbiology*. 33(4):924- 929.
59. Kholodkova E. 1991. The serological characteristic of the antigens of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with a *Pseudomonas* infection during immunotherapy. *Zh- Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 8(8):59-61.
60. Groarty E, Rivera M. 1990. Growth-dependent alterations in production of serotype-specific and common antigen lipopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and Immunity*. 58(4):1030-1037
61. Instituto Nacional de Salud. 2007. Informe de la resistencia antimicrobiana en hospitales en Perú – 2007
62. Sykes S. 2010. The 2009 Garrot Lecture: The Evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65: 1842 – 1852.
63. Jeannete Zurita J. 2011. Epidemiología de la resistencia bacteriana. Facultad de Medicina PUCE. Hospital Vozandes Quito.
64. Wise R.2006. Antimicrobial Resistance: Paradox, actions and economics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57: 1024 – 1025
65. Kuklisnky C. 2000. “Farmacognosia”. Ediciones Omega S.A. Barcelona-España
66. Osorio E. 2009. Aspectos basicos de Farmaconogsia. Universidad de Antioquia. Facultad de Quimica Farmaceutica. 83: 41-62
67. Instituto Nacional de Salud. 2002. “Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión”. Serie de Normas Técnicas N° 30 Perú. 3: 13-19.
68. Gamazo C, Lopez-Goñi I, Díaz R. 2005. Manual práctico de microbiología. Editorial Manson. 3° Edición. España. 230 p.
69. Murphy M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564.
70. Mendoza L, Wilkens M, Urzua A. 1997. Antimicrobial study of there sinousexu dates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chile an *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol*. 58:85–88.

5.2. ANEXOS

ANEXO N° 1

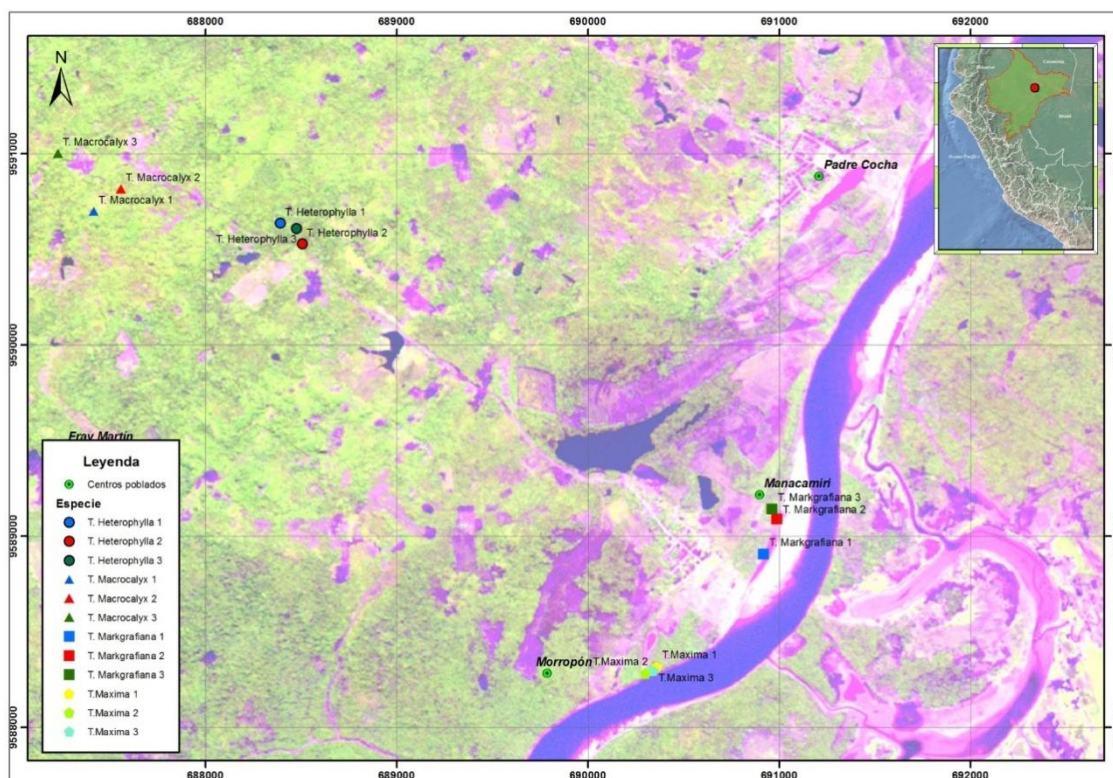
ESQUEMA DEL DISEÑO DE LA INVESTIGACION



ANEXO N° 2

UBICACIÓN DE LA RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Área de Manacamiri (Punchana), Loreto, Perú.



Fueron recolectadas en la localidad de Manacamiri, ubicada en el margen derecha del Río Nanay, geográficamente se encuentra situada en las coordenadas UTM 9583780, a una altitud aproximada de 102 m.s.n.m y políticamente se encuentra en el Distrito de Punchana, Provincia de Maynas, Región Loreto.

Cuadro n° 1: Coordenadas de recolección de las especies vegetales

ESPECIE	UTM	Altitud (msnm)
<i>Tabernaemontana macrocalix</i>	9590813	137
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	9590599	111
<i>Tabernaemontana maxima</i>	9588282	95
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	9589090	96

Accesibilidad.

Para llegar a la localidad de Manacamiri desde la ciudad de Iquitos se requiere viajar aproximadamente 1 hora en embarcaciones fluviales saliendo del puerto Nanay y 10 minutos desde el puerto de Moronacochoa.



Foto n° 1: Viaje a la localidad de Manacamiri



Foto n° 2: Manacamiri

Identificación taxonómica de las especies.

Las cuatro especies del Genero *Tabernaemontana*, fueron identificados por un botánico y contrastado con las exicata existente en el *Herbario Amazonense* de la UNAP.

Cuadro n° 2: Número de Exicatas de las especies en estudio.

ESPECIE	<i>T. Macrocalyx</i>	<i>T.Heterophylla</i>	<i>T. Maxima</i>	<i>T.markgrafiana</i>
N° Exicatas	37484	37477	28570	38269

ANEXO N° 3

MUESTRAS VEGETALES

Tabernaemontana macrocalix



Foto n° 3: Hojas
Tabernaemontana macrocalix



Foto n° 4: Raíz
Tabernaemontana macrocalix

Tabernaemontana heterophylla



Foto n° 5: Hojas
Tabernaemontana heterophylla



Foto n° 6: Raíz
Tabernaemontana heterophylla

Tabernaemontana máxima



Foto n° 7: Hojas
Tabernaemontana maxima



Foto n° 8: Raíz
Tabernaemontana maxima

Tabernaemontana markgrafiana



Foto n° 9: Hojas
Tabernaemontana markgrafiana



Foto n° 10: Raíz
Tabernaemontana markgrafiana

ANEXO N° 4

ESQUEMA DE PREPARACION DE EXTRACTOS ETANOLICOS



muestra vegetal
ca y molido



concentracion del
extracto

ANEXO N° 5

SCREENING FITOQUIMICO

Algunos materiales utilizados para el screening fitoquímico



Foto n°11: Reactivos utilizados en el screening fitoquímico



Foto n° 12: Balanza analítica



Foto n°11: cocina digital



Foto n°12: Materiales de vidrio

ESQUEMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS

PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE ESPECIES VEGETALES

GLÚCIDOS

0,5 ml. de extracto acuoso
(extracto etanólico disuelto en
0,5ml de H₂O destilada)

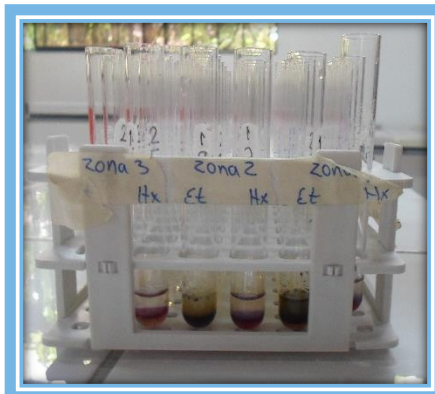


Se
adiciona
→



A 0,5 ml. de extracto acuoso se le añade II gotas
de una sol. al 10% de α -naftol en etanol

0,5 ml. de H₂SO₄ c, resbalando
por las paredes.



Rx (+) la formación de un anillo de color violeta en la interfase

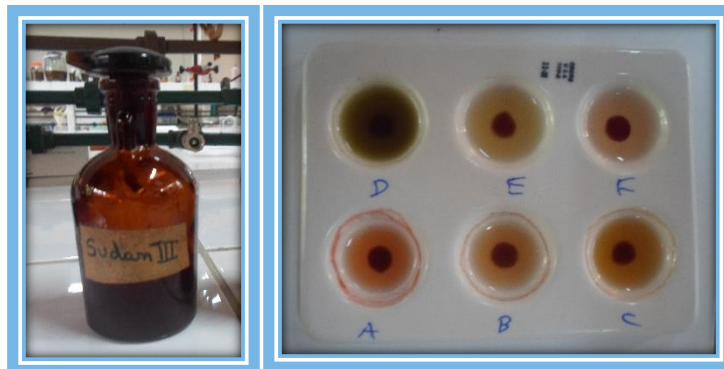
LÍPIDOS Y CERAS



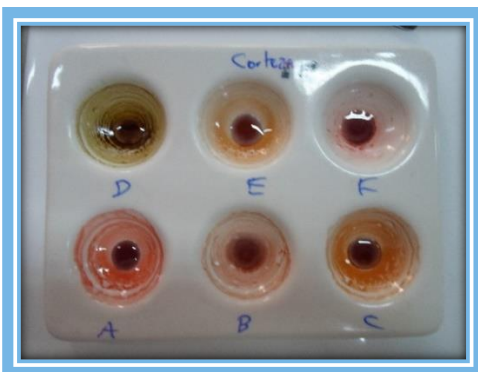
1 ml. del extracto hexánico (extracto etanólico disuelto en 1ml de hexano) se coloca en tubos



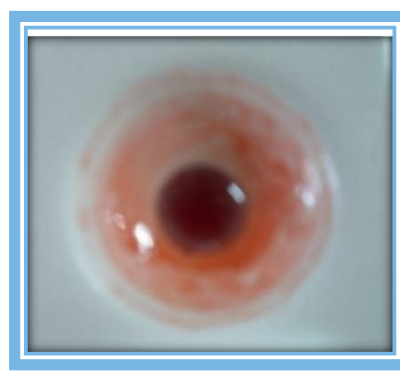
El extracto hexánico se coloca en placas con hendiduras



Agregar 2 a 3 gotas de Reactivo Sudan

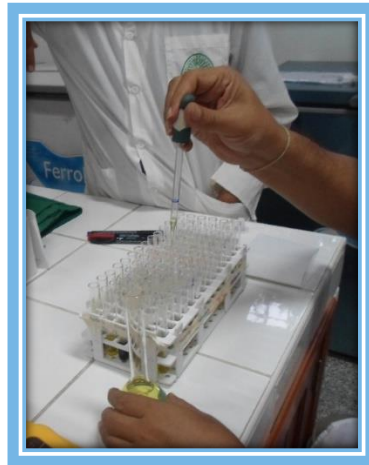


Se evapora el extracto hexánico a sequedad



Rx (+) Aparición de gotas oleosas

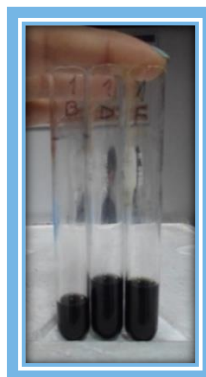
AMINAS Y AMINOÁCIDOS



A 1ml. de extracto etanólico se lo adiciona 1ml. de ninhidrina al 5% en etanol

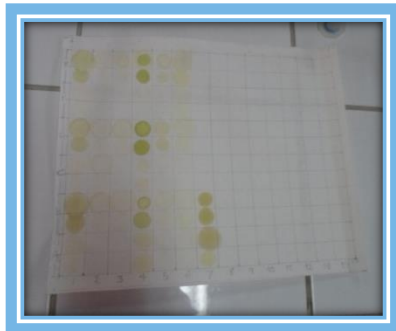


Se calienta de 5 a 10 min en baño maría.

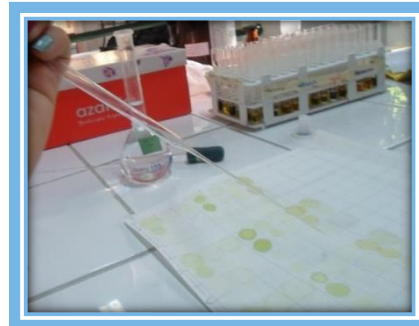


La aparición de un color azul violeta Indica la presencia de aminas.

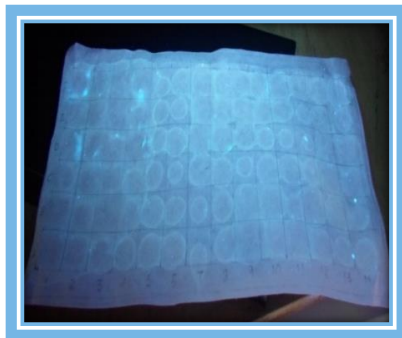
CUMARINAS



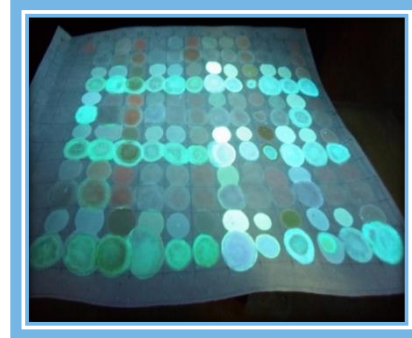
Se siembra dos puntos en un papel filtro del extracto Etanólico,



En un punto de la siembra se le agrega KOH diluido



La fluorescencia verde limón del papel filtro a la luz UV Rx (+). Para **cumarinas volátiles**

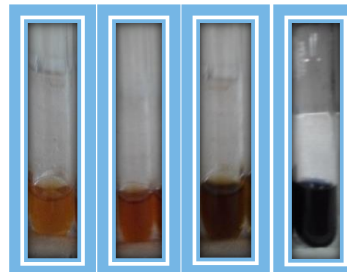


La fluorescencia azulada del papel filtro a la luz UV de punto que contiene la muestra Rx (+). para **cumarinas fijas**

FLAVONOIDES

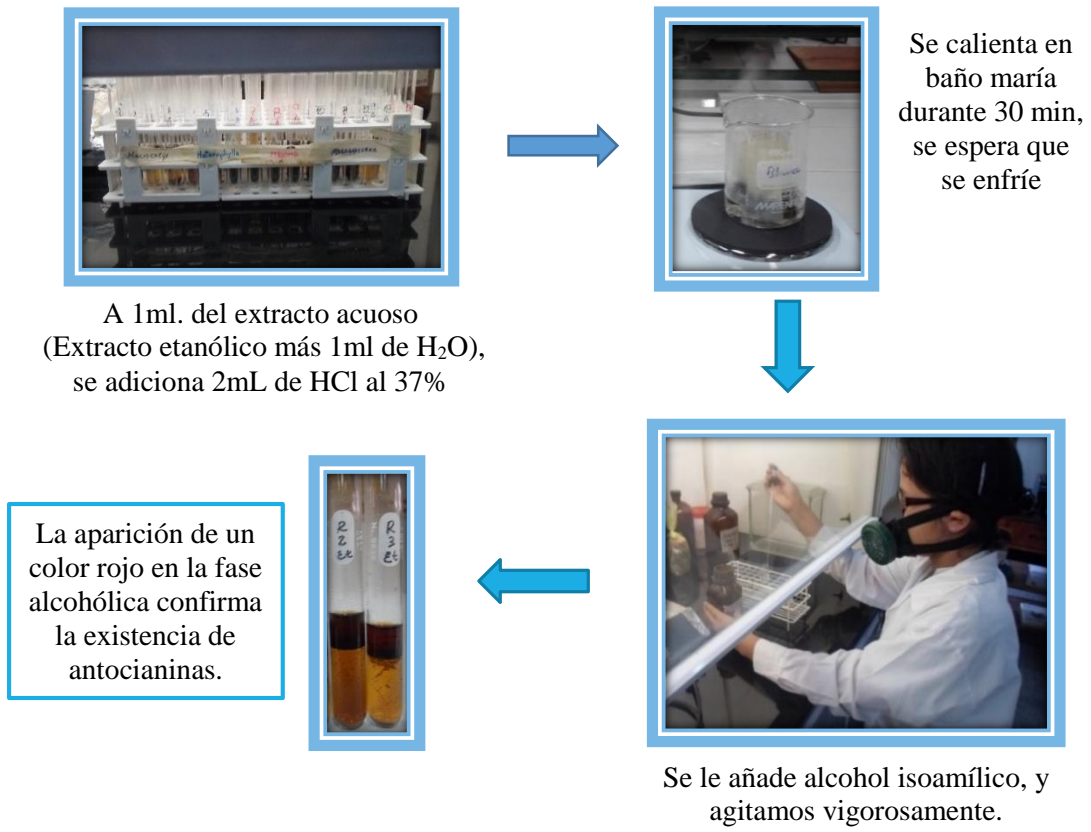


A 1ml. de extracto etanólico se le adiciona II ó III gotas de HCl (c) y un fragmento de cinta de Mg.

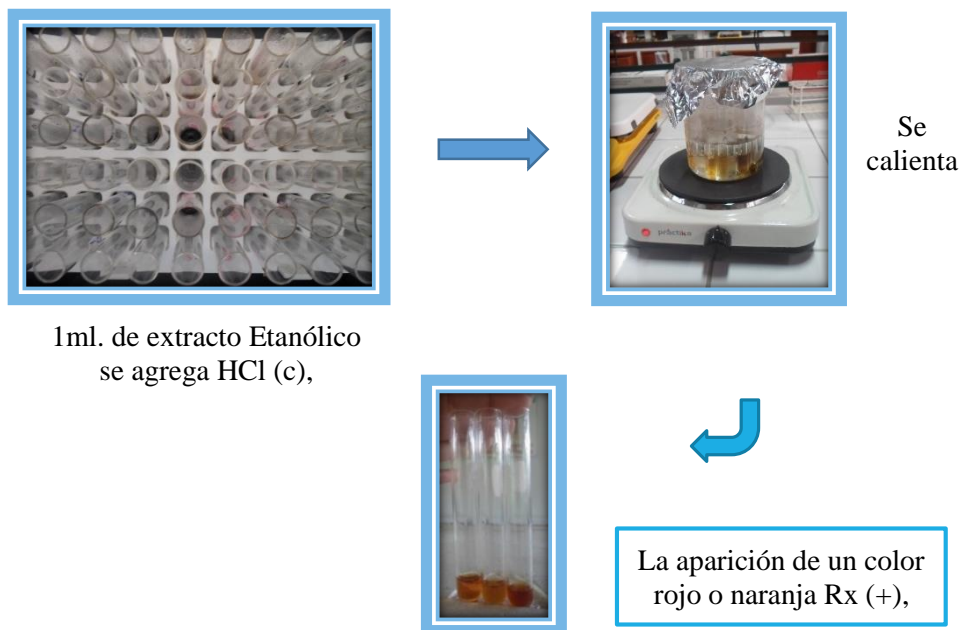


Flavonas: R(+) Anaranjado
Flavononas:R(+) Color rojo
Flavonoles:R(+) Rojo azulado
F y Xantonas:R(+) Violeta

ANTOCIANINAS



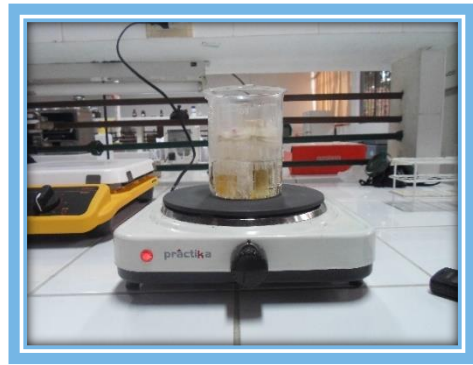
LEUCOANTOCIANINAS



TANINOS



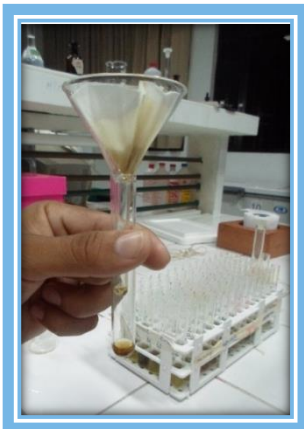
1 ml. de extracto etanólico se le añade unas gotas de HCl (c) y 1 ml. de formaldehido



Hervir durante varios minutos



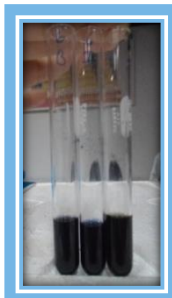
Pirogálicos: La presencia de un Precipitado Rx (+)



La solución se filtra

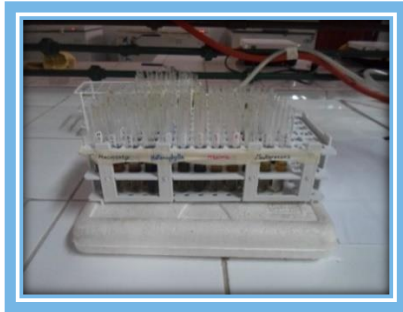


Se añade FeCl_3 al 1%



Catéquicos: La formación de un color azul Rx (+)

ANTRAQUINONAS



1ml.de extracto clorofórmico extracto etanólico más 1ml de cloroformo)



Se le añade 1ml. de NaOH 1N, Agitar para que se mezcle



Rx (+) si la fase acuosa se torna de color rojizo

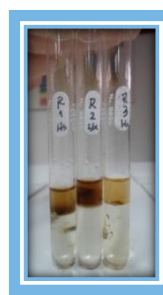
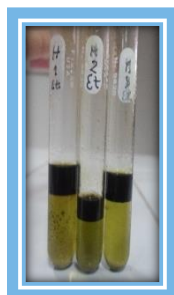
TRITERPENOS Y ESTEROLES



A 1ml. de extracto acuoso (Extracto etanolico disuelto en H₂O destilada) Se añade 1mL de anhídrido acético y 0,5mL de H₂SO₄ (c), dejándolo caer por la pared del tubo.

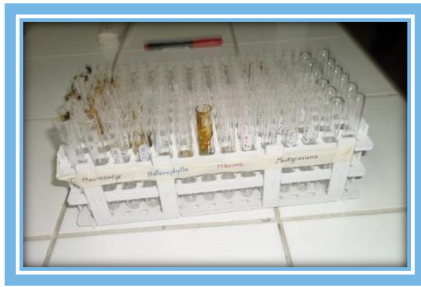


Esteroles:
(+) La formación de una coloración verdosa en la fase superior.



Triterpenos:
(+) La formación de un anillo rojizo en la interface

SAPONINAS



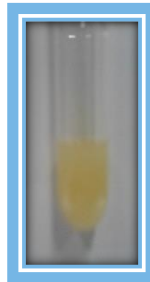
1mg. de extracto etanólico



Se le agrega 1ml de agua hirviendo; agitar por 1 minuto cuando este fría



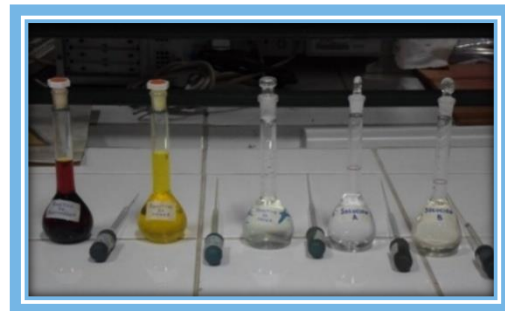
La persistencia de 1cm de espuma después de 30 min, Rx (+)



ALCALOIDES



A 1ml. del extracto etanólico se disuelve en una solución 0.5 N de H_2SO_4



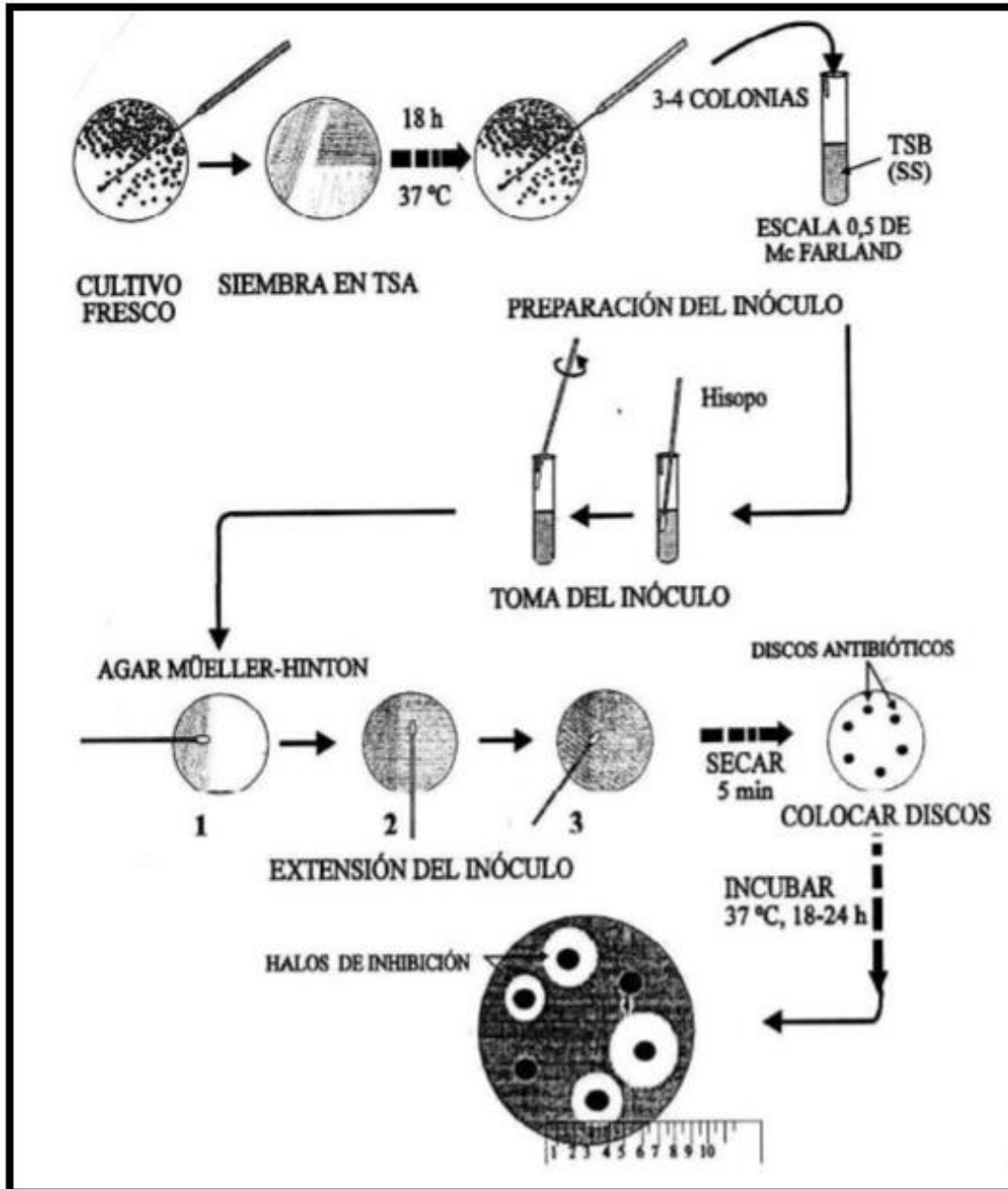
Se le agrega los siguientes reactivos Bouchardat, Mayer, Hager, Dragendroff (Solución A y Solución B)

Bouchardat: (+) Pp rojo ladrillo
Mayer: (+) Pp blanco amarillento
Hager: (+) Pp amarillo limón
Dragendroff: (+) Pp castaño



ANEXO N° 6

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.



ANEXO N° 7

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

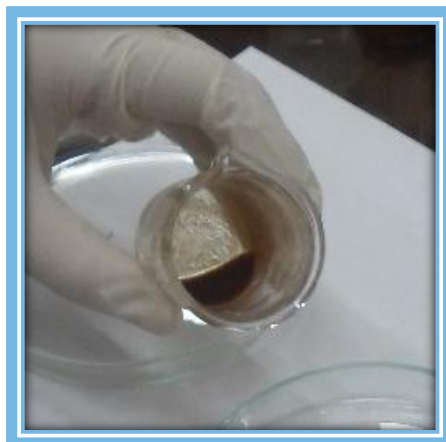
Preparación de la concentración de los discos



Se pesó 400 mg. de cada extracto vegetal



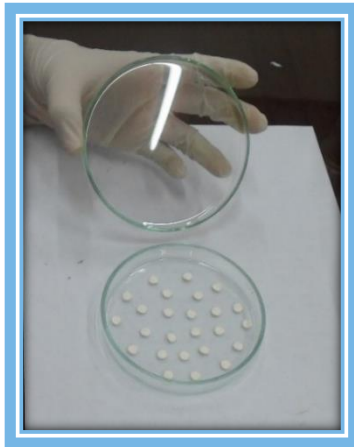
Se disolvió en 400 μ l de agua destilada estéril



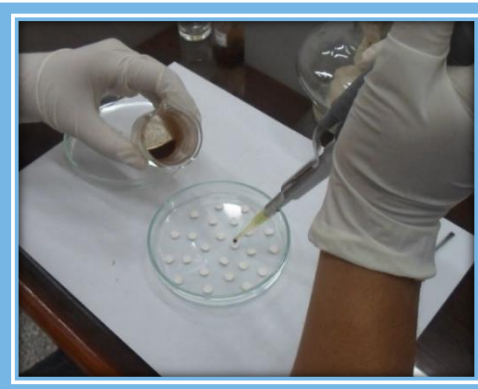
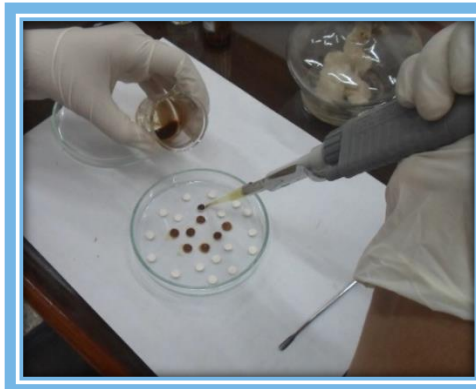
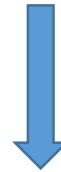
Obtuvimos la solución stock a una concentración de de 1 mg/ μ l)

ANEXO N° 8

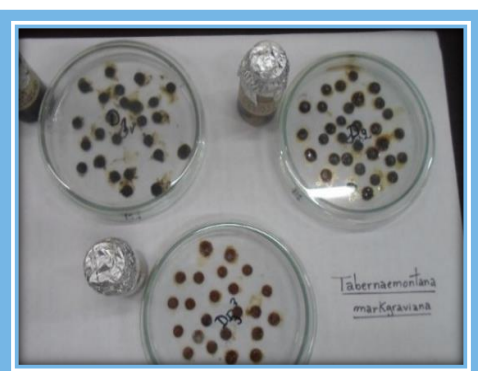
Preparación de los discos de sensibilidad



Los discos se prepararon utilizando papel Whatman N° 3 y un perforador convencional. Estos fueron autoclavados a 121 °C a 15 libras de presión por espacio de 15 minutos



Se procedió a agregar a cada uno de ellos 15 µl de las soluciones stock de los extractos vegetales,



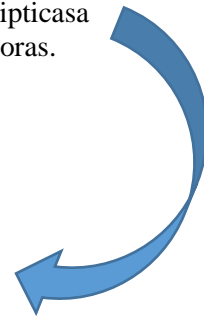
Se tuvo cuidado con impregnar homogéneamente por todo el disco y se dejaron secar a 37 °C por espacio de 24 h

ANEXO N° 9

Ajuste y aplicación del inóculo



Sembramos los microorganismos en Caldo Tripticasa Soya e incubamos por espacio de 18 a 24 horas.



Se repicaron en placas con TSA

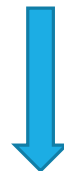




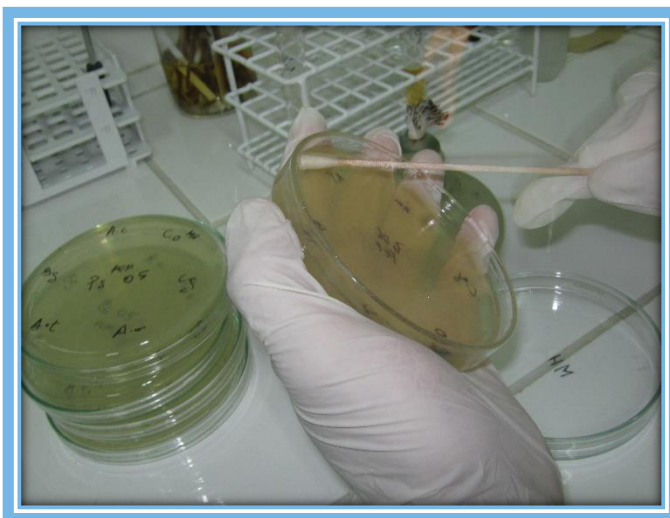
Incubamos por espacio de 18 a 24 horas para obtener cultivos jóvenes.



Luego se procedió a preparar la suspensión de gérmenes en suero fisiológico al 0,8 % se ajustó la turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland



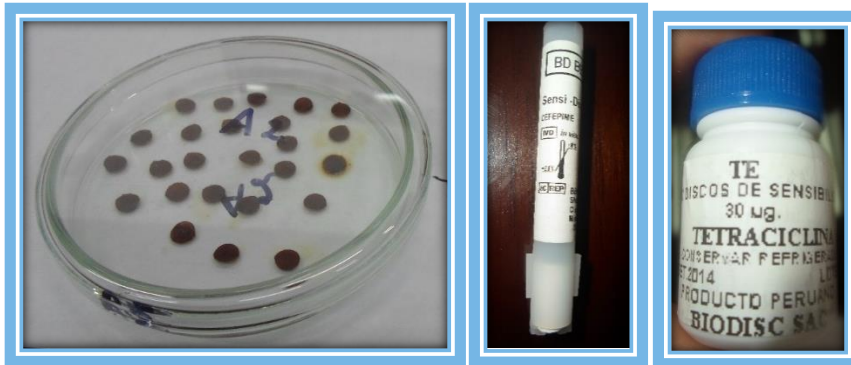
Después de 15 min.



Se tomó una alícuota y se colocó en la superficie seca de la placa con agar Mueller Hinton y disemino por la superficie con un hisopo estéril a para asegurar una distribución uniforme del inóculo

ANEXO N° 10

Aplicación de los discos



Discos preparados con los extractos vegetales y el disco de sensibilidad estándar (cefepime y tetraciclina)

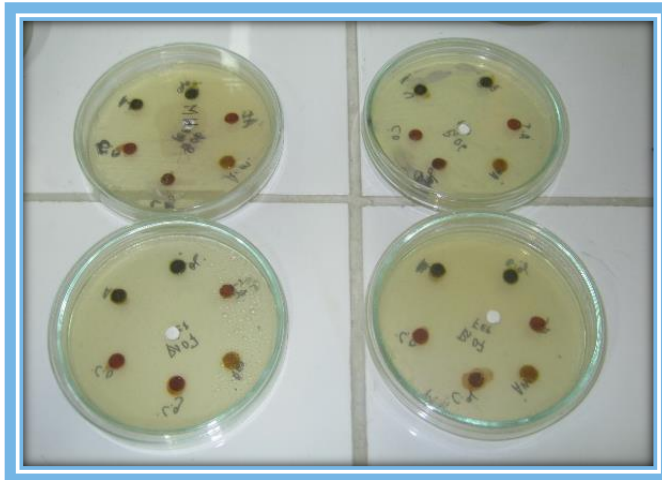
Se Colocó



Sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar



Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro para evitar la superposición de las zonas de inhibición



Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar



Incubamos las placas en posición invertida a 37° C por 18 a 24 horas.



Realizamos la lectura de la siembra

ANEXO N° 11**LECTURA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* en los extractos etanolicos frente a 5 cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Foto n° 13: Se utilizó la regla de Vernier para medir los halos de inhibición.



Cuadro n° 3: Rotulación de las placas para la actividad antibacteriana de los extractos

<i>Tabernaemontana macrocalyx</i>	Hojas	A1
	Corteza	A2
	Raíz	A3
<i>Tabernaemontana heterophylla</i>	Hojas	B1
	Corteza	B2
	Raíz	B3
<i>Tabernaemontana máxima</i>	Hojas	C1
	Corteza	C2
	Raíz	C3
<i>Tabernaemontana markgrafiana</i>	Hojas	D1
	Corteza	D2
	Raíz	D3

Resultados: *Pseudomonas aeruginosa*

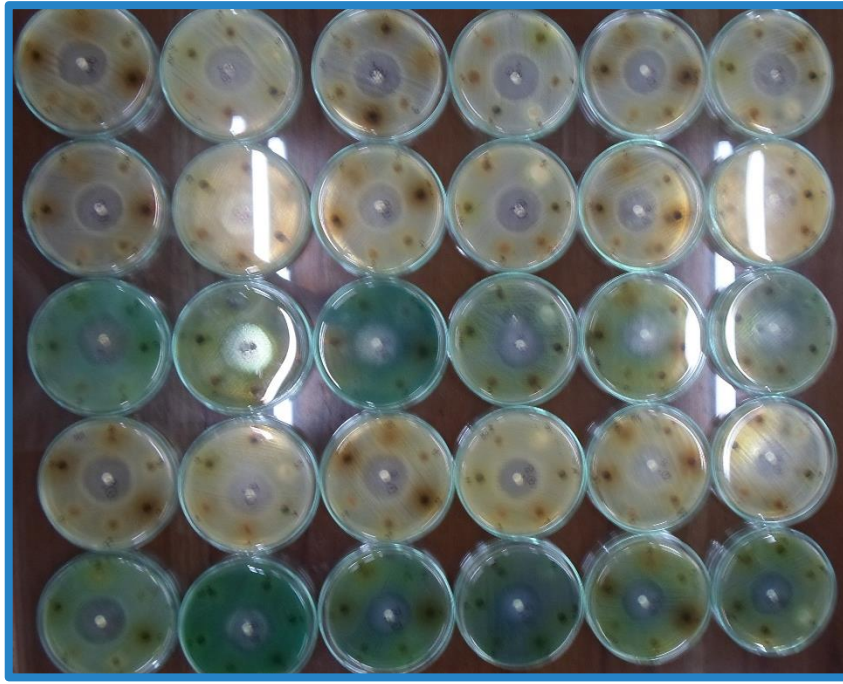


Foto n°14: 12 extractos etanolicos frente a 5 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

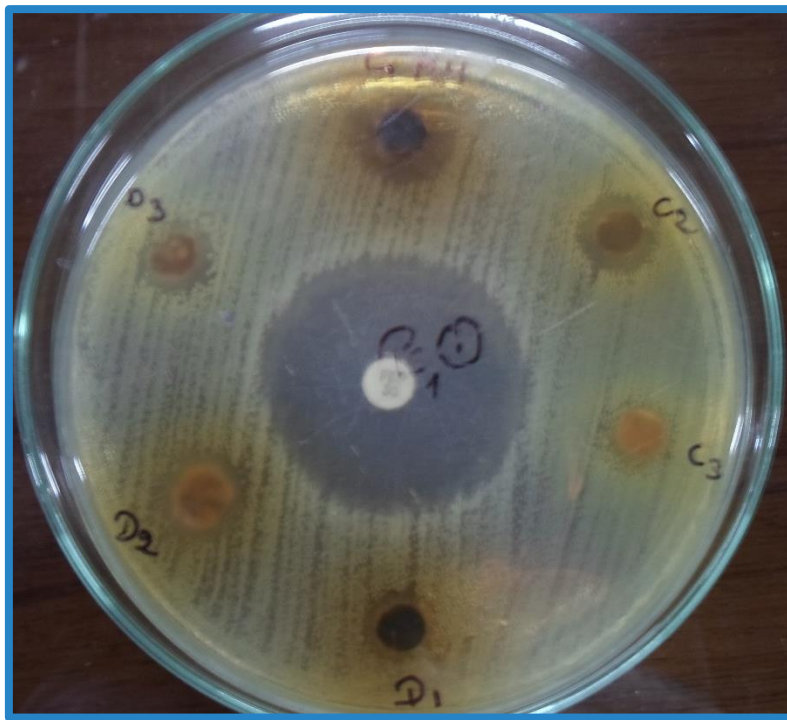


Foto n°15: Resultados de extracto etanolicos de *T. macrocalyx* y *T. máxima*



Foto n°16: Corteza de *T. macrocalyx* tuvo 100% de actividad frente a las 5 cepas.

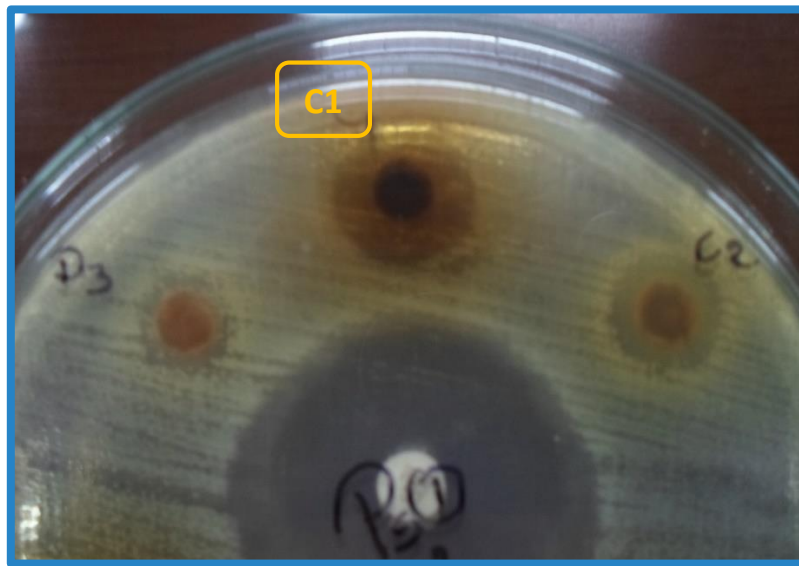


Foto n°17: Las hojas de *T. máxima*, tuvo 100% de actividad frente a las 5 cepas

Resultados: *Staphylococcus aureus*

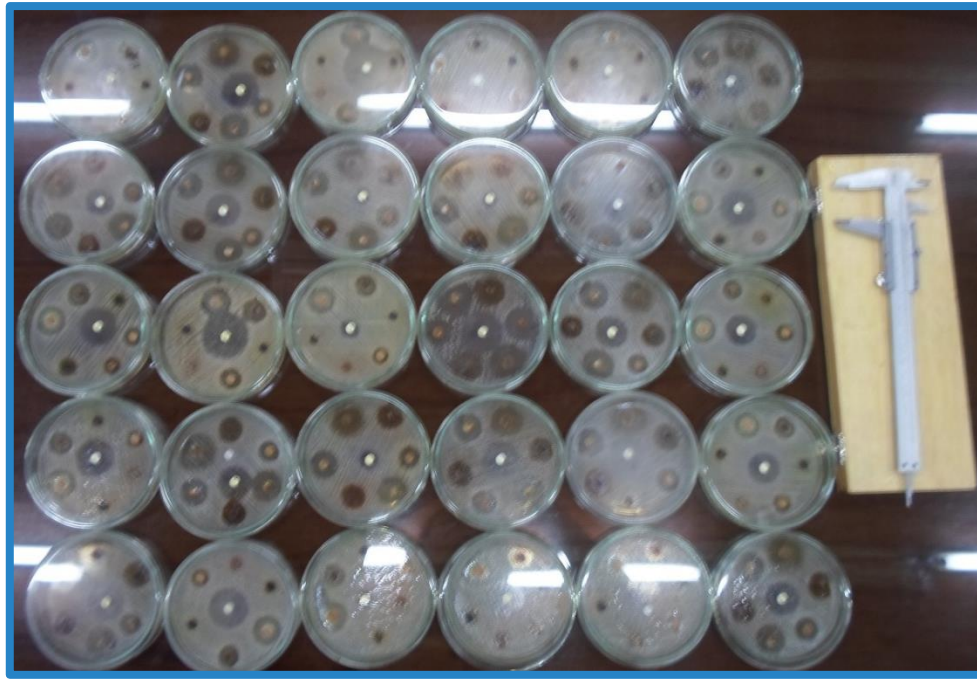


Foto n°18: 12 extractos etanolicos frente a 5 cepas de *Staphylococcus aureus*

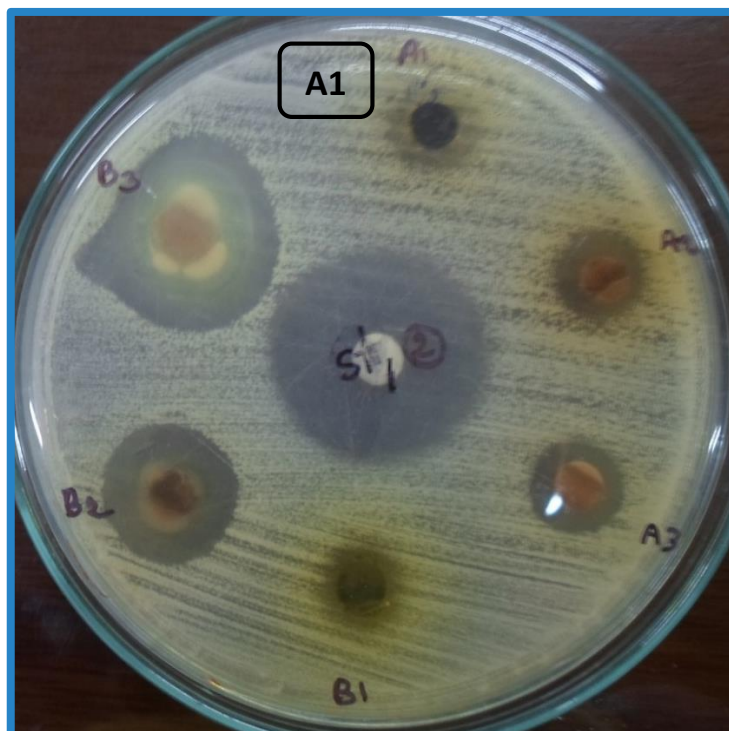


Foto n°19: Las hojas de *Tabernaemontana macrocalyx*, tuvo 100% de actividad frente a las 5 cepas

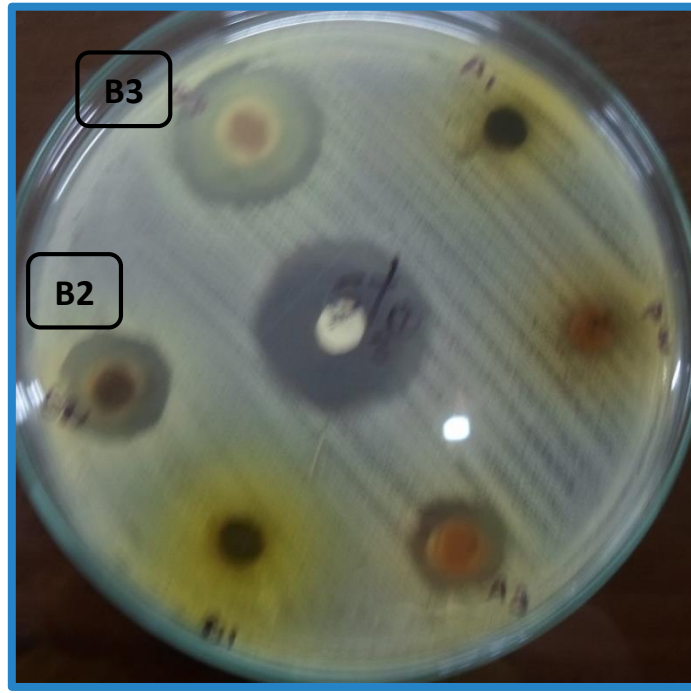


Foto n°20: La corteza y raíz de *T. heterophylla*, tuvo 100% de actividad frente a las 5 cepas

Las hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, tuvo 100% de actividad frente a las 5 cepas

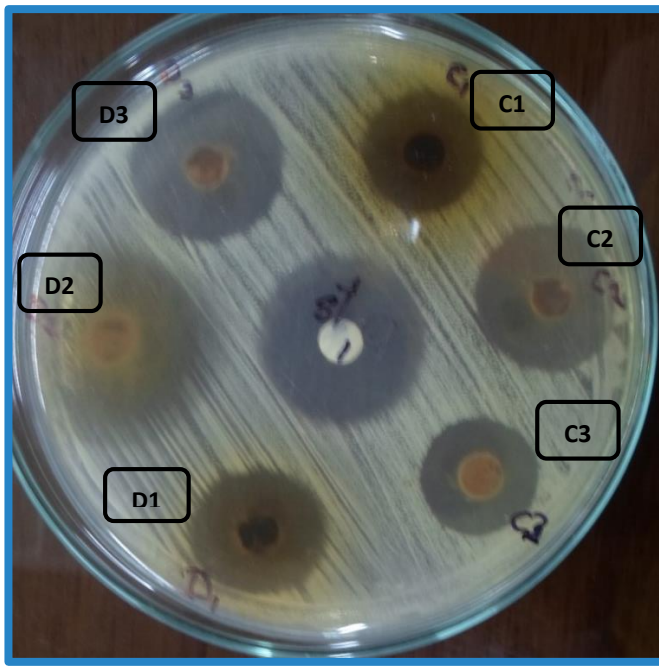


Foto n°20:

CEPA 1: Las hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, tuvo 100% de actividad.

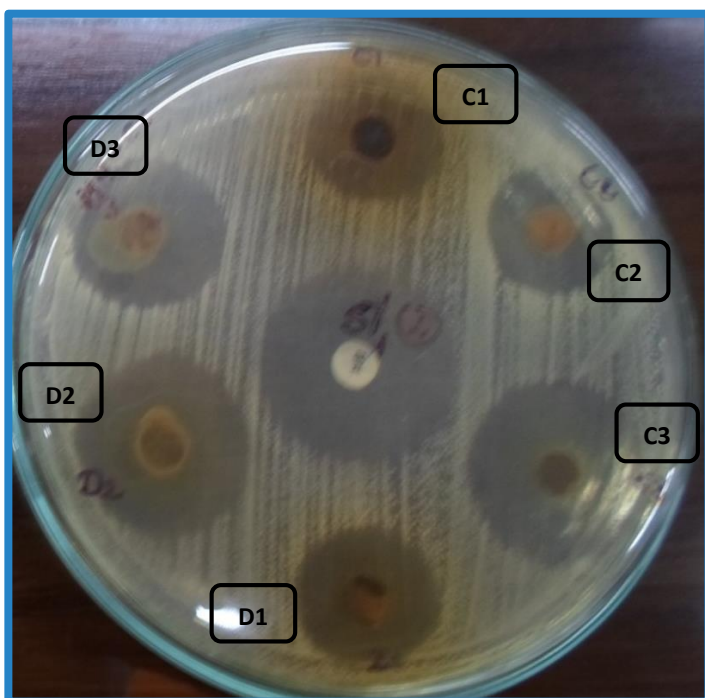


Foto n°21:

CEPA 2: Las hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, tuvo 100% de actividad.

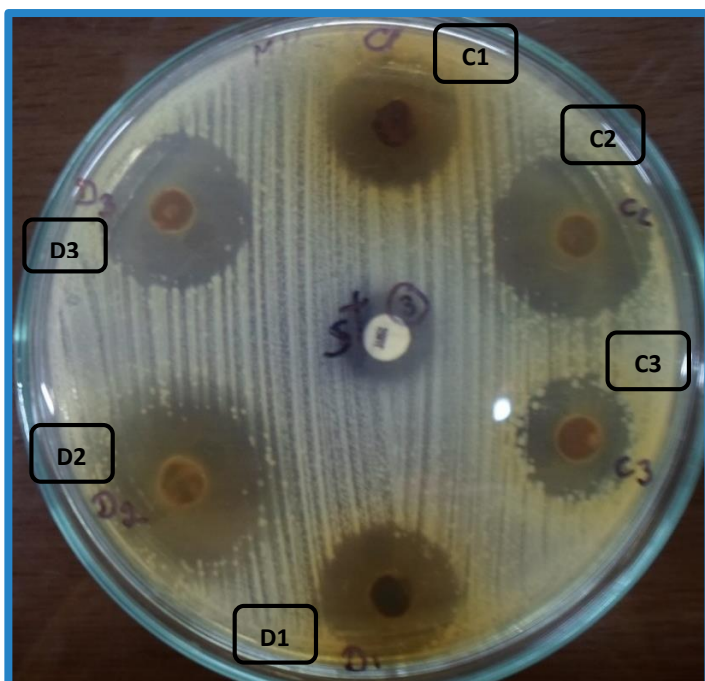


Foto n°22:

CEPA 3: Las hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, tuvo 100% de actividad.

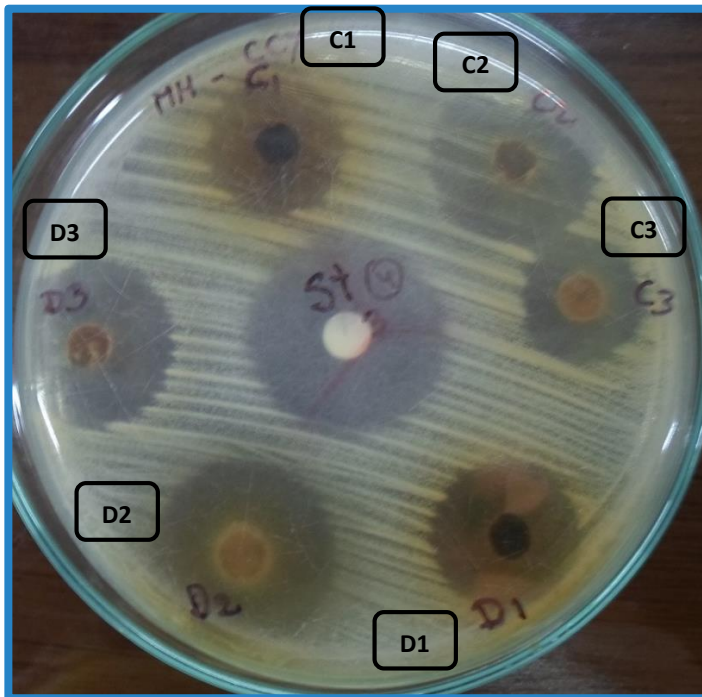


Foto n°23:

CEPA 4: Las hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, tuvo 100% de actividad.

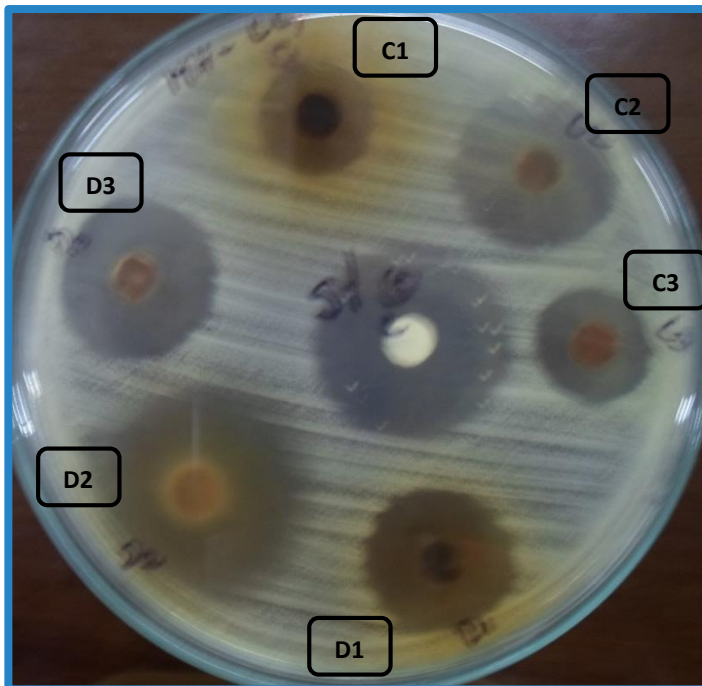


Foto n°24:

CEPA 5: Las hojas, corteza y raíz de *T. maxima* y *T. markgrafiana*, tuvo 100% de actividad.