

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE
HOJAS Y CORTEZA DE *Vismia angusta* (PICHIRINA) SOBRE AGENTES
PATÓGENOS. IQUITOS - PERÚ, AÑO 2013”**

PRESENTADO POR:

Bach. CHAMPION CHOTA MÓNICA

Bach. VÁSQUEZ RODRÍGUEZ GÉNESIS DEL ROSARIO

ASESORES:

Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr.

CO-ASESOR:

BLGO. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.

**PROYECTO DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE QUIMICO
FARMACEUTICO**

IQUITOS –PERU

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS Y
CORTEZA DE *Vismia angusta* (PICHIRINA) SOBRE AGENTES PATÓGENOS. IQUITOS -
PERÚ, AÑO 2013**

Bach. Mónica Champion Chota

Bach. Génesis Del Rosario Vásquez Rodríguez

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta* (pichirina) sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL. Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de disco difusión (Kirby- Bauer), prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos, utilizando como control positivo la gentamicina 10 ug, y como control negativo suero fisiológico 0.9 %. Al analizar los resultados de los ensayos se observó que el extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* a concentración de 400 mg/mL demostró ser moderadamente activo frente a *Escherichia coli* (57.68 %) y frente a *Staphylococcus aureus* (59.60 %); a concentración de 300 mg/mL demostró ser moderadamente activo frente a *Escherichia coli* (53.54 %) y poco activo frente a *Staphylococcus aureus* (49.60 %) y a concentración de 200 mg/mL demostró tener poca actividad frente a *Escherichia coli* (48.45 %) y frente a *Staphylococcus aureus* (43.47 %).

En cuanto al extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* a concentraciones de 400 mg/mL demostró ser poco activo frente a *Escherichia coli* (45.45%) y frente a *Staphylococcus aureus* (43.47 %) y a concentraciones de 200 y 300 mg/mL demostró ser inactivo sobre ambas cepas evaluadas.

Además se realizó un análisis fitoquímico, el cual reveló la presencia de algunos compuestos tales como aceites esenciales, taninos, flavonoides, saponinas y quinonas que fueron encontrados mayor cantidad en la corteza de la especie vegetal *Vismia angusta* en comparación con las hojas de la misma.

Palabras claves: *Vismia angusta*, extracto acuoso, actividad antibacteriana.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY *in vitro* OF THE AQUEOUS EXTRACT OF LEAVES AND BARK OF *Vismia angusta* (PICHIRINA) ON PATHOGENIC AGENTS. IQUITOS –PERÚ, 2013

SUMMARY

In the present researching we determined the *in vitro* antibacterial activity of aqueous extract of leaves and bark of *Vismia angusta* (pichirina) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in concentrations of 200, 300 and 400 mg/mL. to determine the antibacterial activity we used the disk diffusion technical (Kirby - Bauer), test that can measure the *in vitro* susceptibility of pathogenic microorganisms, using gentamicin 10 µg. as positive control, and physiological serum 0.9% as negative control. Analyzing the results of the trials it was observed that the aqueous extract of bark of *Vismia angusta* in concentration of 400 mg/mL proved to be moderately active against *Escherichia coli* (57.68%) and against *Staphylococcus aureus* (59.60%); in concentration of 300 mg/mL it proved to be moderately active against *Escherichia coli* (53.54%) and a little active against *Escherichia coli* (48.45%) and against *Staphylococcus aureus* (43.47%).

In respect to the aqueous extract of the leaves of *Vismia angusta* in concentrations of 400 mg/mL showed be a little active against *Escherichia coli* (45.45%) and against *Staphylococcus aureus* (43.47%) and in concentrations of 200 and 300 mg/mL it showed to be inactive on both evaluated strains.

Also, a phytochemical was made, which revealed the presence of some compounds such as essential oils, tannins, flavonoids, saponins and quinones, who were found in greater quantity in the bark of the plant species *Vismia angusta* in comparison with the leaves of this plant.

Key words: *Vismia angusta*, aqueous extract, antibacterial activity

DEDICATORIA

“La paciencia no es la capacidad de esperar, sino la habilidad de mantener una buena actitud mientras esperas”

Dedico este trabajo A Dios por guiarme a lo largo de mi vida y ayudarme a mantenerme perseverante en todo este tiempo.

*Con mucho amor a mis padres Claudio y Sara, por sus cariños, apoyo incondicional, comprensión y grandes esfuerzos por sacarme adelante, A mi hermana Rocío por su apoyo anímico de continuar luchando por mis sueños y en especial a Italo Rubén, que aún en la distancia me demostró su amor, confianza y palabras de aliento en momentos que lo necesité, quien además me enseñó a tener paciencia, perseverancia y fortaleza, en los momentos que sentía desmayar.
Gracias mi amor.*

Mónica Champion Chota.

*A Dios por la vida y la fortaleza para seguir adelante.
A mis padres Luis y Elvira principalmente por darme la vida y llenarla de amor y buenos ejemplos; por confiar en mis capacidades y brindarme lo necesario para cumplir este paso, gracias a ellos soy quien soy.
A Christian Edson, mi hermano, por el apoyo y amistad.*

*A quien me ha entregado su apoyo y amor incondicional durante nuestra formación profesional,
Adrian Chávez.*

A mis amigos de siempre Andrea, Greta, Greysi y Claudio que en forma incondicional me entregan su cariño y amistad, lo que hoy en día es muy difícil encontrar sin que pidan algo a cambio.

Génesis Del Rosario Vásquez Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A nuestros asesores Q.F. Frida Enriqueta Sosa Amay Mgr y Blgo Jorge Luis Marapara Del Águila, por su ejemplo profesional y humano, su asesoría y ayuda constante en la realización del presente trabajo.

A nuestro Honorable Jurado Calificador de Tesis:

Q.F. José Daniel Torres Tejada.

Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá. Mgr.

Q.F. Brenda Soraya Urday Ruíz.

Quienes con su experiencia profesional por sus valiosas observaciones, sugerencias y facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo.

Asimismo a los Q.F. Claudio A. Apagüño Arévalo, Stephani Ferreyra Shupingahua y Adrian G. Chávez Sandoval por su amistad y apoyo constante en la culminación de nuestro Proyecto de tesis

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana – UNAP, por facilitarnos sus instalaciones (Laboratorio de Fitoquímica y al Laboratorio de Biología), equipos y materiales para así desarrollar nuestro Proyecto de Tesis.

A nuestros amigos Neyser, Roy, Italo, Filly, Sharon, Mery y Greysi gracias por su ayuda, motivación y amistad durante el desarrollo de todo nuestro Proyecto de Tesis.

A Jonathan López⁺ por su amistad, por los buenos momentos que siempre lo llevaremos en nuestros corazones a todo lugar y en todo momento.

A todo el personal docente de la universidad que de una u otra forma contribuyeron en nuestra formación profesional.

A nuestros compañeros de la universidad, con quienes nos apoyamos en los buenos y malos momentos, y de quienes guardamos los mejores recuerdos.

Al personal administrativo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNAP, por facilitarnos los trámites pertinentes.

Muchas Gracias

ÍNDICE

RESUMEN

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

- **CAPÍTULO I**

I. INTRODUCCIÓN	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.1. Descripción del Problema	17
2.2. Formulación del Problema	19
III. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos específicos	20

- **CAPÍTULO II**

I. MARCO TEÓRICO	22
1.1. Marco Referencial	22
1.2. Antecedentes	22
1.3. Marco Conceptual	27
1.3.1. Definiciones	27
1.4. Aspectos Generales de <i>Vismia angusta</i>	29
1.4.1. Clasificación taxonómica	29
A. Distribución Geográfica	29
B. Descripción Botánica	29
C. Usos Tradicionales	30
D. Composición Química	30
1.5. Bacterias	31
1.5.1. Tipos de Bacterias	31
1.6. Descripción de las cepas utilizadas	33
1.6.1. Clasificación científica <i>Escherichia coli</i>	33
i. Descripción	33
ii. Patogenia	33
iii. Virulencia	34
iv. Clasificación	34
v. Mecanismo de resistencia a los antibióticos	36

1.6.2. Clasificación científica <i>Staphylococcus aureus</i>	37
i. Descripción	37
ii. Patogenia	37
iii. Virulencia	37
iv. Mecanismo de resistencia a los antibióticos	39
1.7. Epidemiología	40
1.8. Antibióticos	41
1.8.1. Mecanismo de Acción y Clasificación	41
1.8.2. Aminoglucósidos	42
A. Mecanismo de Acción	42
B. Actividad Antibacteriana de los Aminoglucósidos	43
C. Gentamicina	44
1.8.3. Mecanismo de Resistencia a los antibióticos	46
1.9. Sensibilidad Bacteriana a los Antibióticos	50
II. DEFINICIONES OPERACIONALES	52
2.1. Variables	52
2.1.1. Variable independiente	52
2.1.2. Variable dependiente	52
2.2. Indicadores	52
2.2.1. Indicador de la Variable independiente	52
2.2.2. Indicador de la Variable Dependiente	52
2.3. Operacionalización de variables	53
III. HIPÓTESIS	55
• CAPÍTULO III	
I. METODOLOGÍA	57
1.1. Tipo de Investigación	57
1.1.1. Diseño de Estudio	57
1.2. Diseño de Investigación	57
1.3. Población y Muestra	58
1.3.1. Población Vegetal	58
1.3.2. Muestra Vegetal	58
1.3.3. Población Biológica	58
1.3.4. Muestra Biológica	59
1.4. Materiales e Instrumentos	59

1.4.1. Material Biológico	59
1.4.2. Material vegetal	59
1.4.3. Equipos	59
1.4.4. Materiales de laboratorio	60
1.4.5. Otros Materiales	61
1.4.6. Medios de Cultivo	61
1.4.7. Drogas e Insumos Químicos	61
II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	62
2.1. Preparación de la muestra vegetal	62
2.1.1. Acondicionamiento de la especie botánica	62
2.2. Obtención del Extracto Acuoso	63
2.3. Análisis Fitoquímico	63
2.4. Preparación de las concentraciones	63
2.5. Preparación de Discos de Sensibilidad	64
2.6. Prueba de Sensibilidad	64
2.7. Lectura e Interpretación de los Resultados	66
2.8. Consideraciones Éticas	67
III. ANÁLISIS E INTERPRETACION	67
3.1. Diseño y método estadístico	67
3.2. Análisis e Interpretación de Datos	67
• CAPÍTULO IV	
I. RESULTADOS	69
II. DISCUSIÓN	81
III. CONCLUSIONES	84
IV. RECOMENDACIONES	85
• CAPÍTULO V	
I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
II. ANEXOS	97

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 01	:	Valores de referencia de sensibilidad a distintos antibióticos.	51
TABLA 02	:	Clasificación de la actividad antibacteriana según el Porcentaje de inhibición.	66
TABLA 03	:	Tamizaje Fitoquímico del extracto acuoso de la muestra botánica de <i>Vismia angusta</i> .	69
TABLA 04	:	Promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso de corteza de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	71
TABLA 05	:	Porcentaje de inhibición del extracto acuoso de corteza de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	73
TABLA 06	:	Promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso de hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	75
TABLA 07	:	Porcentaje de inhibición del extracto acuoso de hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	77
TABLA 08	:	Comparación de porcentaje del extracto acuoso de corteza y hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a <i>Escherichia coli</i> según concentración máxima.	78
TABLA 09	:	Comparación de porcentaje del extracto acuoso de corteza y hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según concentración máxima.	79
TABLA 10	:	Resumen General del Porcentaje de Inhibición según la clasificación de la Actividad Antibacteriana.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 01 :	Tipos de bacterias.	32
FIGURA 02 :	Estructura química de gentamicina.	44
FIGURA 03 :	Dirección en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.	65
FIGURA 04 :	Promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso de corteza de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	71
FIGURA 05 :	Porcentaje de inhibición del extracto acuoso de la corteza de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	73
FIGURA 06 :	Promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso de hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	75
FIGURA 07 :	Porcentaje del halo de inhibición del extracto acuoso de hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a los microorganismos en ensayo.	77
FIGURA 08 :	Porcentaje de Inhibición de corteza y hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a <i>Escherichia coli</i> según concentración máxima.	78
FIGURA 09 :	Porcentaje de Inhibición de corteza y hojas de <i>Vismia angusta</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según concentración máxima.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido dexosiribonucleico
ARN	:	Ácido ribonucleico
ATCC	:	American Type Culture Collection
CMB	:	Concentración Mínima Bactericida
EDA	:	Enfermedades diarreicas agudas
ECEP	:	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	:	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ECEA	:	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECEI	:	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEH	:	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECAD	:	<i>Escherichia coli</i> adherencia difusa.
g	:	gramo
h	:	hora
Kg	:	Kilogramo
MH	:	Mueller Hinton
MINSA	:	Ministerio de Salud
mg	:	miligramo
mL	:	mililitro
mm	:	milímetro
mmHg	:	milímetro de mercurio
m.s.n.m	:	metros sobre el nivel del mar
NCCLS	:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
µm	:	micrómetros
µg	:	microgramos
°C	:	grados Celsius
S	:	unidad Sweders
TSA	:	Agar Soya Trypticase
TSB	:	Caldo Soya Trypticase
%	:	porcentaje

LISTA DE DEFINICIONES

Antibiótico	:	Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.
Bioseguridad	:	Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.
Cepa	:	Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.
Colonia	:	Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.
CMI	:	Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 -24 horas de incubación.
Disco de Sensibilidad	:	Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.
Escala	:	Esquema por medio del cual se puede medir alguna propiedad.
Escala de Mc. Farland	:	Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.
Esterilización	:	Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.
Estudio	:	Investigación detallada que se realiza con el fin de descubrir algo.
Ética	:	Parte de la Filosofía que trata de la moral y de las obligaciones del hombre.

- Inactivo (I) : Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.
Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.
- Incubación : Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.
- Inóculo : Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.
- In vitro* : Expresión que se designa a las reacciones fisiológicas que se estudian en el laboratorio, fuera del organismo.
- Látex : Jugo propio de muchos vegetales, que circula por los vasos laticíferos. Es de composición muy compleja y de él se obtienen sustancias diversas.
- M.A : Categoría clínica Moderadamente activo definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Esta categoría cepas bacterianas que pueden ser inhibidas por concentraciones del antibiótico superiores, siempre y cuando se puedan aumentar las dosis empleadas.
- Medio de Cultivo : Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.
- Medicina Tradicional : Conjunto heterogéneo de ideas sobre la enfermedad, de procedimientos, diagnósticos y, sobre todo, de medidas terapéuticas, que constituyen el contenido de las medicinas conocidas también conocidas como “Autóctonas”, “Populares”.

- Microvellosidades: Proyecciones delgadas similares a los pelos que se extienden desde la membrana plásmatica por la superficie de muchas células absorbentes o secretoras.
- Morbilidad : Tasa de enfermedad; relación entre personas sanas y enfermas de una comunidad.
- Mortalidad : Expresión del número de defunciones en una población de riesgo durante un año.
- Principio
- Activo : Cualquier constituyente de un fármaco que confiere una propiedad medicinal.
- Protocolo : Plan explícito y detallado de un experimento, procedimiento o prueba.
- Sensible : Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.

Capítulo I

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos. Cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades.

Se ha incrementado la búsqueda de compuestos bioactivos presentes en los extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional, para el tratamiento de diversas enfermedades.¹ Debido a la resistencia frente a los diferentes fármacos utilizados comúnmente y a la incidencia de las infecciones graves que se han adquirido en la práctica médica por microorganismos patógenos, las mismas que son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países tropicales, que representan aproximadamente un 50% de enfermedades infecciosas.

Las enfermedades infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* afecta a millones de personas en el mundo, registrándose en nuestro país 16,5 millones de consultas externas solicitadas a los organismos nacionales de prestación de servicios de salud, representando el 4.35% durante el año 2010. Durante el año 2011, en Loreto se presentaron 42,824 casos de enfermedades infecciosas, siendo las mujeres adultas y niños los más afectados.²

En el Perú, la resistencia a antimicrobianos es un problema de salud en diferentes regiones que afecta a todos los individuos y poblaciones, la resistencia a *Escherichia coli* es una de las causas relevantes debido al mal uso y abuso de los antibióticos, Así mismo, dan como resultado perfiles porcentuales de resistencia antimicrobiana a bacterias de origen hospitalario como *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina (100%), gentamicina (60%), eritromicina (57%).^{3,4}

El interés científico se ha intensificado en la búsqueda de nuevas drogas provenientes de fuentes naturales. Por ejemplo, el género *Vismia*, es conocido como excelente fuente de metabolitos secundarios; esto ha convertido a este género en fuentes de medicina alternativa para infecciones bacterianas y fúngicas. Particularmente la corteza y las hojas de esta especie se han usado para el tratamiento de heridas y ulceraciones infectadas, enfermedades fúngicas de la piel, herpes en los labios, como purgante y febrífugo, entre otras.⁵

El presente trabajo es una contribución al desarrollo de investigaciones en *Vismia angusta* (pichirina), así como para resaltar, validar y rescatar los valores ancestrales sobre su uso, siendo el punto de partida la identificación de sus principios activos; permitiendo en un futuro su cultivo sostenible para la elaboración y comercialización como medicamento, brindando una nueva alternativa económica en el control, prevención y tratamiento efectivo de diversas infecciones producidas por bacterias mencionadas en nuestro estudio. Así mismo los resultados obtenidos servirán como base para el inicio de muchas otras investigaciones referente a esta especie muy poco estudiada.

II. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La presencia permanente de enfermedades infecciosas causada por microorganismos patógenos resistente en humanos, animales y plantas es un problema de salud pública a nivel mundial variando ampliamente con la situación geográfica y probablemente son influenciadas por factores tanto ambientales como étnicos, siendo causa importante de morbilidad y pérdida económica.⁶ Debido a esto, están consideradas en el proyecto de control de enfermedades prioritarias del Banco Mundial/ Organización Mundial de la Salud/y el Centro Fogarty Internacional.⁷

Los microorganismos enteropatógenos como la *Escherichia coli* son causantes de una gran parte de muertes con enfermedades diarreicas agudas (EDA) representando el 29% a nivel nacional siendo nuestra región la mas afectada por esta bacteria.⁸ En nuestra región, múltiples estudios epidemiológicos han demostrado la presencia de las *Escherichia coli* diarreogénicas. Estudios de etiología, tratamiento y prevención de diarrea aguda y persistente en niños de Loreto, han reportado presencia de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y enterotoxigénica (ECET) en un rango de 5 al 40% y un promedio aproximado de 15% para ambos (18-21). En relación a enteroagregativa (ECEA), en un estudio de diarrea aguda y persistente en niños de Lima se buscó ECEA y se encontró una prevalencia de 8%.⁹

Por otro lado *Staphylococcus aureus* es una bacteria capaz de sobrevivir en condiciones adversas, siendo el responsable del 32 al 47% de las infecciones de piel y tejido celular subcutáneo, su importancia radica en la extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia a los antibacterianos y el potencial de causar infecciones que pueden llegar a ser letales por lo que son causantes del 15% de infecciones intrahospitalarias.¹⁰

Dichas bacterias son resistentes a los antibióticos, destacando en el año 2010 *Staphylococcus aureus* al 60.7% y *Escherichia coli* el 50% de resistencia, ocasionada muchas veces por el uso indiscriminado de antibióticos, requiriendo tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, presentándose numerosos efectos colaterales, registradas por el Instituto Nacional de Salud (INS).¹⁰

Las enfermedades infecciosas requieren de un tratamiento adecuado para evitar complicaciones serias y gastos importantes para el sector salud. En nuestro país se reportan hasta el 25,7% casos de resistencia a los antibacterianos en diversos hospitales de Lima.¹¹

Actualmente uno de los problemas que enfrentan los tratamientos médicos es el aumento de la disponibilidad de los antibióticos convencionales para el tratamiento de enfermedades infecciosas, en hospitales y en la comunidad han producido diversos problemas en pacientes y consumidores, tales como resistencia bacteriana, reacciones adversas y predisposición a enfermedades oncológicas,¹² lo que constituye una preocupación para la salud. Así mismo, la pérdida de eficacia de ciertos tratamientos por causa de la resistencia a los antimicrobianos aumenta el sufrimiento humano, contribuye a la pérdida de productividad y, a menudo, a la mortalidad.^{13, 14}

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud *in crescendo* y de gran complejidad, que afecta a todos los individuos y poblaciones alrededor del mundo. Este problema también afecta al Perú siendo unas de las causas relevantes el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales y comunidades.^{15, 16}

Un inconveniente que tiene la investigación científica debido a la resistencia de los agentes microbianos frente a los antibióticos, es la toxicidad de ellos y muchas veces su elevado costo, la intensa búsqueda de moléculas nuevas, obtenidas por síntesis o bien la obtención de nuevas fuentes naturales teniendo como punto clave

la investigación en plantas, con el fin de mejorar la calidad de vida de este tipo de pacientes.¹⁷

El uso de plantas con propiedades antimicrobianas es una actividad empírica, un tratamiento alternativo, muy eficaz, seguro y tolerado a dosis administradas. Esta práctica ancestral es muy utilizada en nuestra medicina tradicional entre ellas destaca la “pichirina” *Vismia angusta* que es utilizada empíricamente para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. A la fecha no existe conocimiento científico que explique la acción terapéutica de los componentes químicos presentes en ella.

Ante lo anterior, cabe formular la siguiente interrogante:

2.1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Tendrá actividad antibacteriana *in vitro* el extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta* (pichirina) sobre agentes patógenos. Iquitos - Perú, Año 2013?

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta* (pichirina) sobre agentes patógenos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Obtener el extracto acuoso de hojas de la especie vegetal *Vismia angusta* (pichirina).
- Obtener el extracto acuoso de corteza de la especie vegetal *Vismia angusta* (pichirina).
- Realizar el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* (pichirina).
- Realizar el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* (pichirina).
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta* (pichirina) mediante el método de disco difusión (Kirby-Bauer).

Capítulo II

I. MARCO TEÓRICO

1.1 MARCO REFERENCIAL

La Amazonía Peruana presenta una extensión territorial de 736,445 km², en la cual se han identificado aproximadamente 7,000 especies vegetales, de las cuales más de 1,000 de ellas son consideradas medicinales.¹⁸ Todavía no hay una certeza sobre la totalidad de especies de plantas de la Amazonía.

1.2 ANTECEDENTES

GUNASEKERA.S et al (1977), mencionan a los Yaneshas, que son una etnia de la selva amazónica peruana, tienen usos específicos para esta planta, antes de ir a dormir ellos usan el látex anaranjado de las corteza de *Vismia guiannensis* como una pomada supurativa encima de la parte afectada, una vez que esté bien pegado lo dejan hasta que este se desprenda por sí solo. Además de esto recomiendan seguir una dieta sin pescado además de usar sal ni comer cosas calientes.¹⁹

SIMMONDS. M et al (1985), reportó sobre las propiedades antimicrobianas del género *Vismia* su importancia en la Guayana Francesa: que son utilizadas para aliviar la comezón y tratar las heridas externas, mientras que la decocción de las hojas es tomada para bajar la fiebre.²⁰

LIMA. O (2003) Realizó un estudio *in vitro* de actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de las siguientes plantas medicinales: *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Citrus Limonium* (limón), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Eugenia caryophyllus* (clavo), *Vismia macrophylla* (pichirina), *Lippia alba* (bálsamo), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Pneumus boldus* (Boldo), *Ruta graveolens* (rue) y *Zingiber officinalis* (jengibre) en cepas de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*). Los aceites esenciales se obtuvieron mediante la técnica de

destilación por arrastre de vapor en el agua. Las pruebas de las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales se llevaron a cabo por la técnica de difusión en medio sólido. Los resultados obtenidos fueron cinco de los diez aceites esenciales probados mostró una inhibición del crecimiento de una o más cepas de bacterias Gram negativas. Sólo los aceites esenciales de *R. graveolens* y *Z. officinalis* no mostró acción inhibidora sobre cualquier cepa de prueba. Sin embargo, el aceite esencial de *M. chamomilla*, *V. macrophylla*, *C. zeylanicum* y *E. globulus* mostraron moderada actividad para *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, mientras que *C. citratus*, destacó por presentar buena actividad con un 76 % de las cepas analizadas *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*.²¹

SALAS et al (2006), mencionan que el extracto crudo de *Vismia baccifera* var. Dealbata, contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomona aeruginosa*, exhiben valores de CMI entre 2 a 5 mg/mL.²²

KUETE V et al (2007), demostraron en su estudio que la especie *Vismia laurentii*, se aislaron compuestos que presentan actividad antibacteriana y antifúngica; entre los cuales, se encuentran: o- dimetil-3' 4'-deoxisorospermin- 3' 4'-diol-1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metilanttraquinona, friedelina, vismiaquinona C, bivismiaquinona laurentiquinona, emodina, isoxantorina, kaempferol, vismiaquinona, xantona. Llegando a la conclusión de que estas sustancias son comunes en varias especies de *Vismia*, también mencionan que los extractos metanólicos de la especie *Vismia laurentii* contra bacterias Gram negativas y Gram positivos (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* *Bacillus subtilis*) y dos cepas de levaduras como *Candida albicans* y *Candida glabrata*; obtuvieron un rango de concentración mínima inhibitoria entre (4.88 y >78.2µm/L) concentraciones lejos de las proporcionados por los antibióticos de referencia, los cuales fueron gentamicina para bacterias y nistatina para levaduras.²³

PINO-BENITEZ Y CÓRDOVA (2007), en su estudio sobre la actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas que son utilizadas como colorantes demostraron en la evaluación *in vitro* por el método de Difusión en Agar que el extracto etanólico de corteza de *Vismia macrophylla* es activo contra tres tipos de bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.²⁴

CARPIO.A (2008), en su estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. En la facultad de odontología de la UPCH, encontró resultados positivos para 24 extractos de 27 de estas plantas. Los extractos con mayor efecto antimicrobiano corresponden a las especies *Momordica charantia* L., *Piper dumosum* Rudge, *Byrsonima poeppigiana* A. Juss, *Anacardium occidentale* L., *Psidium guajava* L., *Marcia paivae* O. Berg *Couropita guianensis* Aubl., *Vismia angusta* Miq, y cuatro aceites esenciales correspondientes a las especies *Cymbopogon citratos* (D. C.) Staf, *Mentha pulegium* L, y *Mintho stachysmollis* (Kunth).²⁵

CHIN.Y et al (2008) estudiaron que las bacterias, son los microorganismos más abundantes en el planeta y aunque muchas de ellas forman parte del organismo humano, algunas son organismos patógenos que provocan ciertos malestares. Entre estos microorganismos se pueden mencionar la *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Helicobacter pylori*, las cuales son causantes de enfermedades gastrointestinales. Actualmente, se han realizado importantes estudios *in vitro* de diferentes extractos de plantas que presentan actividad frente a estas bacterias, algunas de estas especies son la *Vismia laurentii de Wild*, *Garcinia mangostana*, *Mesua ferrea*, *Ochrocarpos siamensis* y *Garcinia atroviridis*, todas pertenecientes a la familia Clusiaceae, aunque también existen muchas especies pertenecientes a las familias Fabacea y Asteracea que presentan actividad antimicrobial.²⁶

ANDOQUE. H et al (2009), realizaron el estudio con los extractos etanolico y acuoso extraídos de corteza de *Vismia macrophylla* donde utilizaron cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*, donde encontraron actividad antibacteriana contra bacterias relacionadas a afecciones digestivas pero no hubo actividad alguna contra bacterias asociadas a las afecciones cutáneas (*Staphylococcus aureus*).²⁷

MARÍN.K (2009), reveló que el extracto hidroalcohólico de *Vismia Cayennensis* esta planta exhibió una actividad inhibitoria frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella sp*. Esta actividad antibacteriana, se ve reflejada en los halos de inhibición observados, para el extracto fue de 15,50 mm (61%) para *Escherichia coli* y 16,63 mm (71%) para *Shigella sp*. Usando como control positivos terramicina que presentó un halo de inhibición 25,63 mm y vibramicina presentó 23,50 mm²⁴ y que en el análisis fitoquímico de la corteza del extracto hidroalcohólico de *Vismia cayennensis* indica la presencia de flavonoides, saponinas, taninos, esteroides y triterpenos, demostrando que podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana del género *Vismia*.²⁸

MONTAÑO. T (2009) reportó que los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae, son usados en la medicina tradicional. Esta familia comprende alrededor de 25 géneros y 1 000 especies, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en las regiones tropicales, con excepción del género *Hypericum* que se halla en regiones de clima templado.²⁹

SANZ. B et al (2009), reportaron en un estudio realizado en el Valle de Chazuta, ubicado en el Amazonas del Perú, acerca de las plantas tradicionales medicinales utilizadas por los habitantes de la región, con algún tipo de interés farmacológico. Dentro de las plantas nombradas se encuentran *Vismia angusta*, comúnmente llamada *pichirina* en la región, donde el látex de la planta se usa como cataplasma aplicada en la piel para combatir la sarna, y la decocción del exudado de los frutos de la *Vismia sandwithii* es usado para combatir la hepatitis.³⁰

TAMOKOU. J et al (2009), demostraron por el método de microdilución que el extracto crudo de corteza *Vismia rubescens* fueron moderadamente activos frente a *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona aeruginosa* .³¹

GONZALEZ Y TORO (2010) realizaron el análisis fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Vismia ferruginea* encontraron carbohidratos reductores, polifenoles, taninos, flavonoides, fenilpropanoides, terpenos y/o esteroides, lactonas terpenicas, cardiotónicos; los cuales fueron confirmados por cromatografía de capa delgada.³²

PEREZ. A et al (2011) evaluaron dos métodos para medir la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de las hojas de *Melia azederach*, *Psidium guajava*, *Vismia macrophylla*, *Origanum vulgare*, *Eucaliptus* sp. Para la extracción etanólico utilizaron los métodos de percolación y de soxlet. Evaluaron los métodos de orificio sobre agar (método 1) y el método de disco sensitivo (método 2) donde midieron el efecto inhibitorio sobre *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Zygosaccharomyces microellipsoides*; usando como control positivo la gentamicina 80 mg/mL demostrando mayor efectividad el método 2. Donde obtuvieron que las hojas de *Melia azederach* y *Psidium guajava* son moderadamente activos frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Y las hojas de *Vismia macrophylla* son poco activos frente a *Escherichia coli*.³³

VIZCAYA et al (2012), efectuaron una revisión bibliográfica sobre la composición Química y actividades farmacológicas del género *Vismia*, que cubrió los estudios más recientes en la etnofarmacología, farmacología y fitoquímica de dicho género; como una excelente fuente de metabolitos secundarios y de uso medicinal alternativa tanto para infecciones bacterianas y fúngicas.³⁴

1.3 MARCO CONCEPTUAL

1.3.1 DEFINICIONES:

- a. Planta: Se denominan plantas a aquellos organismos (individuos o especies) que forman parte del reino Plantae.^{35,36}
- b. Plantas Medicinales: Es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser usadas terapéuticamente o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica.³⁷

Las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos. De hecho, han sido utilizadas desde tiempos remotos con fines curativos, ya que uno de los anhelos de los seres humanos ha sido siempre intentar combatir sus enfermedades. Para ello, han hecho uso de organismos y productos que la naturaleza ofrece. Los usos particulares se han transmitido en forma oral o escrita y de generación en generación a lo largo de la historia hasta nuestros días.³⁷

Cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar sus síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.

Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros.³⁷

El progreso de la industria farmacéutica, la producción de drogas sintéticas, han limitado en alguna medida la utilización de la fitoterapia; sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés por las plantas y la Amazonía se considera la zona más promisoría del planeta. En este sentido, para los países de la cuenca amazónica, la promoción y desarrollo de las plantas medicinales, la protección del saber de las comunidades indígenas, la defensa de los recursos genéticos y la creación de una sólida base científico-tecnológica para procesar los productos medicinales de origen herbario, deben ser aspectos fundamentales a contemplarse en sus políticas nacionales y regionales.

Las principales explicaciones de defensa de las plantas medicinales son las siguientes:

- Un banco de futuros fármacos por descubrir: Existen aproximadamente medio millón de plantas con flores, la mayoría de las cuales no ha sido investigadas y cuyos principios activos podrían ser decisivos en la curación de enfermedades actuales o venideras.
- Medicina sinérgica: Se ha comprobado cómo en muchos casos la aplicación de un componente aislado no ha tenido el efecto deseado, bien porque no tiene el mismo poder curativo que cuando se toma en conjunto con el resto de componentes, bien porque ha resultado ser tóxico. Los componentes de las plantas pueden tener un efecto sinérgico, es decir interactuar todos a la vez, de manera que sus usos pueden complementar o potenciar a otros o neutralizar sus posibles efectos negativos.
- Apoyo de la medicina oficial: El tratamiento de enfermedades muy complejas puede requerir en algunos casos el apoyo de las propiedades medicinales de las plantas o de los derivados que ellas nos proporcionan.
- Medicina preventiva: No debe olvidarse el carácter preventivo que las plantas tienen con respecto a la aparición de enfermedades. En este sentido las plantas superan a los remedios químicos que se aplican fundamentalmente cuando ya ha aparecido la enfermedad. Se ha comprobado cómo la ingestión de alimentos naturales puede prevenir muchas patologías.³⁸

1.4 ASPECTOS GENERALES DE *Vismia angusta*

1.4.1 Clasificación Taxonómica *Vismia angusta*³⁹

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Theales
Familia	: Clusiaceae
Género	: <i>Vismia</i>
Epíteto Especifico	: <i>Angusta</i>
Autor Epíteto Especifico	: Miq.
Nombre Científico	: <i>Vismia angusta</i> Miq.
Nombre Vulgar	: pichirina, pichirina amarilla, pichirina de altura.

A. Distribución Geográfica: Se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur y Central, aunque algunas pocas especies también se hallan en África y Asia. Distribución en América del Sur: Bolivia, Belice, Venezuela, Colombia, Brasil, Perú (Loreto).⁴⁰

B. Descripción Botánica: Árbol de 4m de altura, 20 cm de diámetro; ramas jóvenes con sección cuadrangular de unos 3-5 mm de sección, glabradas y rígidas, parte inferior de hojas oxidado marrón; hojas discoloras, reticulación ferruginea; pubescencia de la inflorescencia ferruginea; flor blanca amarillenta; cáliz café; corola amarillenta con líneas rojas; estambres blancos; pistilo amarillento; frutos verdes a amarillo oscuro.

Corteza externa: agrietada levemente, color marrón rojizo, las grietas separadas 1-3 cm entre sí.

Corteza interna: homogéneo, color rosado blanquecino, al ser cortada exuda látex de anaranjado intenso, escasa, de flujo lento.⁴⁰ (**Ver Anexo 05- Foto 01**)

C. Usos Tradicionales: Es empleado abundantemente alrededor del mundo en la medicina popular para el tratamiento de algunas enfermedades, particularmente el látex producido por esta especie se han usado para el tratamiento de enfermedades de la piel, como dermatitis, sífilis, herpes en los labios, sarna, eczemas y heridas también es usado como purgante, febrífugo, diurético; entre otras.⁴¹

Formas de Usos:

La resina es usada como yodo en heridas y carachas.

Contra la aparición de manchas blancas en la piel. Para utilizarlo se recoge el exudado que sale después de cortar una rama, o se corta una rama de 20 centímetros de diámetro, se pone en el fuego y se recoge el agua que exhuda. Esto se aplica dos veces al día durante dos o tres días directamente sobre la mancha. Durante el tratamiento no se debe bañar el área afectada ni comer pescado.²⁷

D. Composición Química: Las plantas de la familia Clusiaceae son conocidas como buenas fuentes de sustancias bioactivas. Aporta los siguientes datos sobre los componentes de *Vismia angusta*: se pueden citar las xantonas, compuestos fenólicos, cumarinas y flavonoides, en hojas se encuentran el oxalato de calcio Según la información aportada por la presencia de xantonas, es de gran importancia ya que estas poseen una actividad antidepresiva y antituberculosa. Además de poseer acción antimicrobiana, antiviral y cardiotónica.⁴²

1.5 BACTERIAS

Son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.⁴³

1.5.1 TIPOS FUNDAMENTALES DE BACTERIAS

A. Coco (del griego kókkos, grano): de forma esférica.

- Diplococos: cocos en grupos de dos.
- Tetracocos: cocos en grupos de cuatro.
- Estreptococos: cocos en cadenas.
- Estafilococos: cocos en agrupaciones irregulares o en racimo.

B. Bacilo (del latín baculus, varilla): en forma de bastoncillo.

C. Formas helicoidales:

- Vibrios: ligeramente curvados y en forma de coma.
- Espirilos: en forma helicoidal rígida.
- Espiroquetas: en forma de tirabuzón (helicoidal flexible).

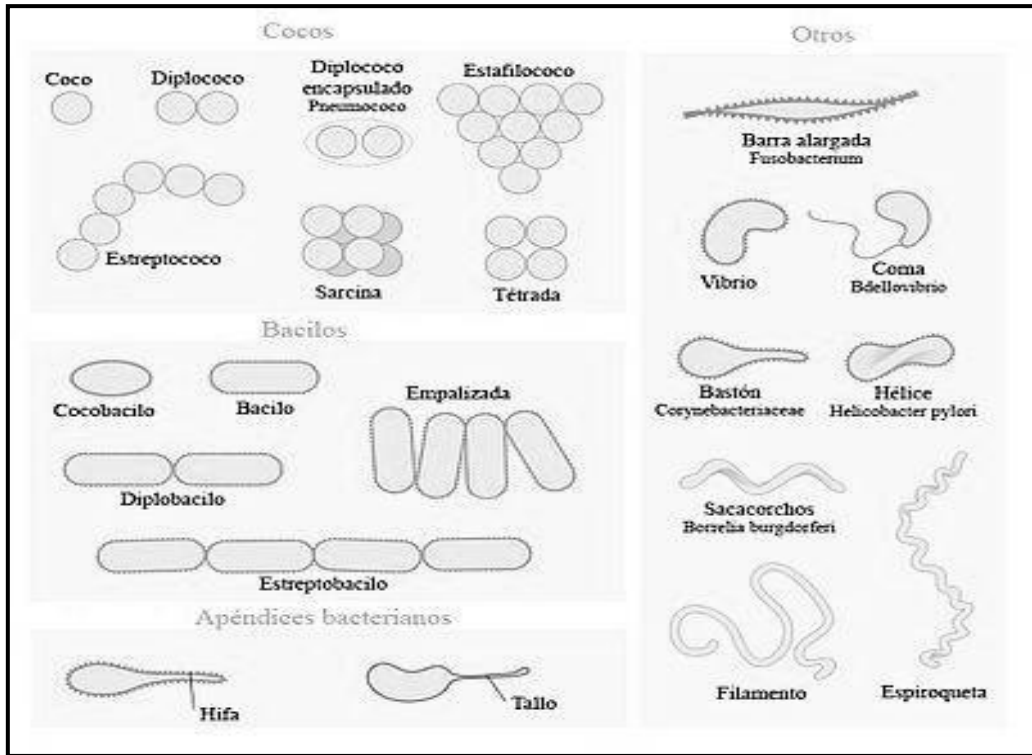


Figura 01: Tipos de bacterias

Algunas especies presentan incluso formas tetraédricas o cúbicas. Esta amplia variedad de formas es determinada en última instancia por la composición de la pared celular y el citoesqueleto, siendo de vital importancia, ya que puede influir en la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes, unirse a superficies o moverse en presencia de estímulos.⁴⁴

Especies con diversos patrones de asociación:

- *Neisseria gonorrhoeae*; en forma diploide (por pares).
- *Streptococcus*; en forma de cadenas.
- *Staphylococcus*; en forma de racimos.
- Actinobacteria; en forma de filamentos. Dichos filamentos suelen rodearse de una vaina que contiene multitud de células individuales, pudiendo llegar a ramificarse, como el género *Nocardia*, adquiriendo así el aspecto del micelio de un hongo.⁴⁵

1.6 DESCRIPCION DE LAS CEPAS UTILIZADAS(Ver Anexo 02)

1.6.1 Clasificación científica *Escherichia coli*⁴⁶ (Ver Anexo 02)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacterias
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: Escherichia
Epíteto Especifico	: <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia freundii</i>)
Autor	: Migula 1895

i) Descripción

Escherichia coli es un bacilo anaerobio facultativo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, mide de 1-3µm que se presenta solo, en pares, cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flagelados, no forma esporas y por lo general es no capsulado y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. En cultivos jóvenes la forma coco bacilar es bastante frecuente, en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se lo considera un microorganismo de flora normal.⁴⁷

ii) Patogenia

Es capaz de ocasionar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente severas, debido a que posee componentes de patogenicidad tales como las adhesinas, en especial en los pilis que aglutinan glóbulos rojos y hemolisinas, frecuente en la pielonefritis, por una endotoxina ligada al lípido A, de naturaleza pirógena, y también por citotoxinas que actúan sobre la adenilciclasa, similar al *Vibrio cholerae*.

Los componentes de patogenicidad son proteínas de membrana termoresistentes y no antigénicas, que le confieren a *Escherichia coli* la capacidad de invadir células epiteliales.⁴⁸

iii) Virulencia

Escherichia coli está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70°C.⁴⁹

iv) Clasificación

Se distinguen seis cepas según su capacidad patógena (virotipos): *Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD).

iv.1 Escherichia coli Enteropatogénica (ECEP)

La ECEP fue la primera cepa identificada serológicamente y es, frecuentemente, la cepa causante de cuadros diarreicos en conejos, perros, caballos y, por supuesto, en humanos, en general en ancianos y en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo.

El principal factor de patogenicidad es la adherencia entre la bacteria y membrana de las células del epitelio intestinal. La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman pilis en forma de bulto (Bfp).

iv.2 Escherichia coli Enterotoxigénica (ECET)

La ECET es el causante de la famosa “Diarrea del Viajero”, ya que se adquiere habitualmente por la ingesta de alimentos o agua contaminados.

Se presenta con cólicos abdominales o deposiciones acuosas en personas de todas las edades pero es una causante importante en diarreas en los lactantes de los países en vías de desarrollo.

La ECET posee pilis o fimbrias que poseen varias formas de antígenos del factor de colonización (CFA) que le permite colonizar la mucosa del intestino delgado sintetizando enterotoxinas llamadas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Las toxinas LT y ST aumentan los niveles intracelulares de AMPc y GMPc encontrados en la membrana de las células intestinales, lo que provoca la salida de iones y de agua.

iv.3 Escherichia coli Enteroinvasiva (ECEI)

Es inmóvil, es lactosa y descarboxilasa negativas. Es una de las que causa más daño debido a que invade el epitelio intestinal. La bacteria requiere de mucinas y adhesinas para adherirse a las microvellosidades de la mucosa para poder entrar a la célula por endocitosis, luego se multiplica dentro de la célula y se disemina a las células sanas adyacentes.

Causa diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis.

iv.4 Escherichia coli Enterohemorrágica o Verotoxigénica (ECEH)

La convención internacional de nomenclatura de patógenos ha recomendado el uso de Shiga Toxin *Escherichia coli* (STEC) para este grupo, debido a que estas bacterias producen una toxina citotóxica para células Vero de cultivo de similaridad estructural a la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. Las STEC producen verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocito pénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central). Esta cepa no fermenta el sorbitol y posee un fago, donde se encuentran codificadas las verotoxinas,

también llamadas "Toxinas Shiga", no posee una fimbria formadora de mechones, en vez de esto posee una fimbria polar larga que usa para adherencia.

iv.5 Escherichia coli Enteroagregativa (ECEA)

Sólo encontrada en humanos. Son llamadas enteroagregativas porque tienen fimbrias con las que aglutinan células en los cultivos de tejidos. Se unen a la mucosa intestinal causando diarrea acuosa sin fiebre. No son invasivas. Producen hemolisina y una enterotoxina ST similar a la de las enterotoxigénicas.

iv.6 Escherichia coli De Adherencia Difusa (ECAD)

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos.⁵⁰

v) Mecanismo de resistencia a los antibióticos

La *Escherichia coli* usa mecanismos como producción de enzimas inactivadoras de antibiótico, por ejemplo, las β -lactamasas. Estas se han caracterizado en detalle, sobre todo las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales pueden hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro como las de tercera y cuarta generación. Otro mecanismo es la alteración de los sitios de acción del antibiótico, por ejemplo, proteínas de unión a la penicilina (PBP) alteradas y disminución de la concentración antibiótica, ya sea, por impermeabilidad o mecanismos de bombeo hacia el exterior. Algunas veces, modifica con sus girasas de forma que la hacen resistente a la fluoroquinolonas.⁵¹

1.6.2 Clasificación científica *Staphylococcus aureus* (Ver Anexo 02)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Cocci
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: Staphylococcus
Epíteto Especifico	: <i>Staphylococcus aureus</i>
Autor	: Rosenbach 1884

i) Descripción

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positivo que miden cerca de 1µm de diámetro, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada. El nombre binominal de esta bacteria proviene de la raíz griega, que se compone de *staphylé*, que significa racimo y *coccus*, que significa grano, baya o uva; y del latín *aureus* que significa dorado. Este nombre significa racimo de uvas dorado y lo lleva en función de su morfología microscópica y su color dorado en el cultivo de agar sal manitol.⁵²

ii) Patogenia

Staphylococcus aureus tiene a su disposición un amplio arsenal contra las defensas del hospedero. Los mecanismos patógenos de este microorganismo dependen de sus factores adhesivos, las toxinas y enzimas estafilocócicas y sus defensas contra la inmunidad.

iii) Virulencia

Este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo

del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.⁵³

Factor de virulencia

Función

Componentes estructurales

Cápsula	Inhibe quimiotaxis y dificulta la fagocitosis.
Capa de polisacáridos extracelulares	Facilita la adherencia a los cuerpos extraños (como cables de marcapasos, catéteres, etc.).
Peptidoglicanos	Evita la lisis celular (estabilizador osmótico). Estimula la producción de pirógeno endógenos. Quimiotaxis leucocitaria provocando abscesos.
Ácido teicoico	Media la adherencia del estafilococo a fibronectina, un componente mayoritario del tejido conectivo.
Proteína A	Protección contra la inmunidad humoral. Fija anticuerpos.

Enzimas

Coagulasa	Cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina provocando el depósito de <i>Staphylococcus aureus</i> , al estar cubierto por fibrina se vuelve menos inmunógeno.
Hialuronidasa	Cataliza la destrucción del ácido hialurónico en el tejido conjuntivo para ayudar a la diseminación del estafilococo.
Fibrinolisisina	Disuelve coágulos de fibrina.
Lipasas	Promueven la hidrólisis de lípidos lo que hace que <i>Staphylococcus aureus</i> se disemine en el tejido cutáneo y subcutáneo

Endonucleasas /DNasas	Hidrólisis de ADN.
β -lactamasa	<i>Staphylococcus aureus</i> posee 3 tipos. Por lo general residen en plásmidos.

Toxinas

Toxinas exfoliativas (ETA, ETB)	Serina proteasas que atacan a la Desmogleína-1. Síndrome de piel escaldada por estafilococo.
Enterotoxinas	Produce diarrea por apertura de canales o muerte de enterocitos. Algunas son superantígenos.

iv) Mecanismo de resistencia a los antibióticos

La producción constitutiva de una gran cantidad de β -lactamasas, por parte de algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, le da la capacidad de hidrolizar lentamente a las penicilinas penicilinas-resistentes.

Naturalmente *Staphylococcus aureus* produce una penicilasa estafilocócica, pero ciertos plásmidos ocasionan que exista una hiperproducción de esta enzima que degrada penicilinas naturales y en forma limitada, pero notable, penicilinas semisintéticas (principalmente Oxacilina y Meticilina). La concentración mínima inhibitoria (CMI) para oxacilina y metilina en estos estafilococos es 1-2 μ g-ml y 2-4 μ g-ml, respectivamente. En estas cepas se denominan *borderline resistant Staphylococcus aureus* (BORSA) y la mayoría de estas pertenece al fagogrupo 94/96 y poseen un plásmido de 17,2 Kb común que produce a la β -lactamasa estafilocócica del tipo A.⁵⁴

1.7 EPIDEMIOLOGÍA

Las características epidemiológicas para cada tipo de bacteria son diferentes. En *Escherichia coli* no obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extra intestinales (infecciones urinarias, septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). *Escherichia coli* provoca 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo.⁵⁵

Staphylococcus aureus forma parte de la flora normal del ser humano. El sitio más frecuente de colonización es la zona anterior de las vías nasales, aunque también puede colonizar la piel (en particular si está lesionada), la vagina, las axilas, el perineo y la bucofaringe. Se sabe que 25 a 50% de los sujetos sanos pueden estar colonizados por *Staphylococcus aureus* de manera persistente o transitoria. La frecuencia de colonización es mayor entre los diabéticos insulino dependientes, los usuarios de drogas inyectables, los pacientes sometidos a hemodiálisis y los individuos con lesiones cutáneas. Los sitios de colonización actúan como reservorios de cepas para futuras infecciones por *Staphylococcus aureus* y las personas colonizadas están expuestas a un mayor riesgo de nuevas infecciones (por la especie colonizadora) que las no colonizadas. En general, *Staphylococcus aureus* es una causa importante de infecciones nosocomiales.⁵⁴

1.8 ANTIBIÓTICOS

Son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción.⁵⁶

1.8.1 MECANISMO DE ACCIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los antibióticos actúan a través de 2 mecanismos principales:

A. Como bactericidas: Producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas.

B. Como bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento bacteriano aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, una vez suspendido el antibiótico, puede recuperarse y volver a multiplicarse. La eliminación de las bacterias exige el concurso de las defensas del organismo infectado. Pertenecen a este grupo: tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosaminas, sulfamidas y trimetoprima.

- Mecanismos bioquímicos por los que los antibióticos alteran la biología de los microorganismos.

Se pueden resumir en los siguientes:

a) Inhibición de la síntesis de la pared celular, en fases diversas de la síntesis: β -lactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina, bacitracina.

b) Desorganización de la membrana citoplásmica, lo que conduce a la desintegración celular: polimixinas, anfotericina B y nistatina.

c) Inhibición de la síntesis de proteínas, por actuar sobre ribosomas; en la iniciación (subunidad 30 S): tetraciclinas; en la elongación (subunidad 50 S): cloranfenicol, eritromicina y lincosaminas; en ambas, con muerte bacteriana: aminoglucósidos.

- d) Interferencia en la síntesis y/o el metabolismo de los ácidos nucleicos, rifampicina (ARN-polimerasa ADN-dependiente), quinolonas (ADN-girasas), metronidazol y antivíricos.
- e) Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico, sulfamidas, sulfonas, pirimetamina y trimetoprima.⁵⁷

1.8.2 AMINOGLUCÓSIDOS

Son antibióticos naturales o semisintéticos, contienen aminoazúcares ligados a un anillo de aminociclitol por enlaces glucosídicos. Son relativamente tóxicos en comparación con otras clases de antibióticos pero siguen siendo útiles, más bien para tratar infecciones causadas por bacterias Gram negativas aerobias.

A. Mecanismo de acción

Los antibióticos aminoglucósidos son bactericidas rápidos. La destrucción de la bacteria depende de la concentración y si esta es más alta, mayor es la rapidez con la que destruye a los microorganismos. Los aminoglucósidos difunden por medio de canales acuosos formados por porinas, proteínas que se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativas y de este modo penetran en el espacio periplásmico. El sitio de acción de los aminoglucósidos en el interior de las células es a nivel de las subunidades 30s de los ribosomas (encargados de la lectura del código genético), después de penetrar por la membrana citoplásmica se ligan a polisomas e interfieren en la síntesis proteica al causar una “lectura errónea” y terminación prematura de la traducción de ARNm. Las proteínas aberrantes producidas pueden ser insertadas en la membrana bacteriana, con lo cual altera su permeabilidad y se estimula el paso de mas aminoglucósido ocasionando la muerte bacteriana.

Para ejercer su acción, es necesario que las bacterias se encuentren en fase de crecimiento.^{58, 59,60}

B. Actividad antibacteriana de los aminoglucósidos

Aunque el espectro de actividad es semejante para todo el grupo, existen diferencias importantes de sensibilidad debidas fundamentalmente al grado de susceptibilidad de cada antibiótico a los diferentes mecanismos de resistencia.

Los aminoglucósidos continúan siendo imprescindibles en el tratamiento de infecciones graves por esta bacteria, siendo necesaria con frecuencia la asociación con alguno de los β -lactámicos anteriormente citados, la gentamicina y tobramicina son activas *in vitro* contra más de 90% de las cepas de *Staphylococcus aureus* y 75% de las de *Staphylococcus epidermis*. En el caso del enterococo, cuya pared se comporta como una barrera imposible de ser atravesada por los aminoglucósidos, la asociación con antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana (β -lactámicos y vancomicina, fundamentalmente) produce un efecto sinérgico al aumentar la concentración intracelular de aminoglucósido de forma muy notable.

Un mecanismo similar podría explicar la acción sinérgica de la asociación β -lactámicos + aminoglucósidos sobre otras especies bacterianas, incluidos muchos bacilos Gram negativos, aunque hasta ese momento sólo se ha estudiado en *Escherichia coli*.

La actividad de kanamicina es inferior a la de gentamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina, por lo que normalmente no se utiliza en infecciones sistémicas.

La elección de aminoglucósido debe decidirse teniendo en cuenta el índice de resistencias a nivel local, valorando los datos bacteriológicos y farmacológicos de forma individual.⁶¹

C. Gentamicina

Es el aminoglucósido de primera elección por su bajo costo y su actividad fiable contra casi todos los aerobios Gram negativos, excepto los mas resistentes. Sin embargo, la aparición de microorganismos resistentes en algunos hospitales han constituido un problema grave y puede limitar el uso futuro de este medicamento.

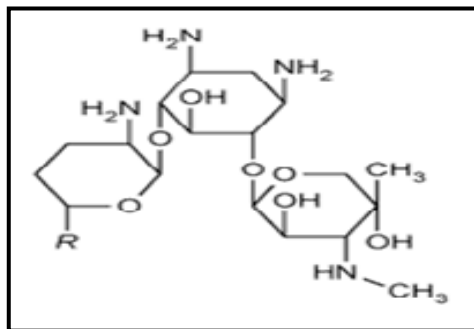


Figura 02: Estructura química de gentamicina

- Aplicaciones terapéuticas de la gentamicina

Infecciones de vías urinarias: Los aminoglucósidos casi nunca están indicados en el tratamiento de infecciones no complicadas de vías urinarias, aunque ha sido eficaz una sola dosis intramuscular de gentamicina o kanamicina para curar más de 90%. En individuos en muy grave estado con pielonefritis, el uso de este aminoglucósido solo o en combinación con un antibiótico β -lactámico permite un ataque o protección inicial amplio y eficaz.

Neumonía: va en aumento la frecuencia causada por bacilos gramnegativos, especialmente en personas hospitalizadas, individuos unidos a respiradores y en quienes tienen disminución de las defensas. Este fármaco al combinarse con un antibiótico β -lactámico están indicados como tratamiento empírico de esta enfermedad. También se recomienda la terapéutica por combinación para tratar neumonía causada por *Pseudomona aeruginosa*. Los aminoglucósidos son ineficaces para tratar la neumonía por anaerobios o por *Streptococcus pneumoniae*, que son causas de neumonía de origen comunitario; conviene no

considerar su empleo como fármacos únicos y eficaces contra cualesquiera de los cocos Gram positivos aerobios (que incluyen *Staphylococcus aureus* o estreptococos).

Meningitis: La meningitis generada por microorganismos gramnegativos constituye un grave problema terapéutico. Si se necesita usar un aminoglucósido, se sugiere la aplicación directa de gentamicina u otros fármacos de esta familia en los ventrículos cerebrales.

Peritonitis: Las personas que muestran peritonitis como consecuencia de diálisis peritoneal pueden beneficiarse con la administración de este tipo de aminoglucósido cuya aplicación es intravenosa o intramuscular en personas a quienes se realiza diálisis.

Infecciones por microorganismos Gram positivos: Existen pocas indicaciones para utilizar aminoglucósidos, pero a veces su uso es necesario, pues puede salvar la vida. En sujetos con endocarditis por enterococos, estas cepas no son destruidas por completo al combinarlos, sin embargo, dichas cepas casi siempre son sensibles a la penicilina administrada con gentamicina; estas son reveladas en varias pruebas de antibiograma o pruebas de sensibilidad.

Sepsis: Cuando hay infección y se sospecha de *Pseudomona aeruginosa*, se recomienda administrar una penicilina en combinación con gentamicina.

En Aplicaciones locales la absorción de la gentamicina es muy lenta si se aplica en pomada, pero puede acelerarse si se emplea una crema local. Cuando se administra un antibiótico en grandes zonas de superficie corporal (quemados), las concentraciones plasmáticas pueden llegar a incrementarse.

- **Efectos adversos**

Los efectos indeseables de la gentamicina son semejantes a los de otros aminoglucósidos. Las acciones colaterales mas graves e importantes generadas por este fármaco incluyen nefrotoxicidad y ototoxicidad irreversible. La administración intrarraquídea o intraventricular (cerebral) puede causar

inflamación local y culminar en radiculitis y otras complicaciones, razón por la cual rara vez se utiliza.⁶²

1.8.3 MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema que se ha ido complicando, sobre todo en las últimas décadas, porque a medida que se han ido sintetizando nuevos antimicrobianos, han ido surgiendo cepas resistentes a los mismos.^{63, 64}

Se entiende por resistencia, el mecanismo a través del cual, la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos.⁶⁵

Debe tenerse en cuenta que si bien la resistencia microbiana y resistencia clínica (fracaso terapéutico) están íntimamente relacionados, no son la misma cosa: la primera se refiere a la respuesta que desarrollan los patógenos susceptibles a las diferentes concentraciones de antibióticos mientras que la segunda, se refiere a la ineficiencia terapéutica, aun cuando las concentraciones del antimicrobiano sean correctas: las mismas dependen de factores extra bacterianos (selección inadecuada del antibiótico) o del huésped (neutropenia, cuerpos extraños, etc.)^{64,66}

La resistencia bacteriana puede ser:

- A.** Natural: cuando es una propiedad específica de algunas bacterias.
- B.** Adquirida: cuando se produce una mutación cromosómica o la bacteria adquiere un plásmido de resistencia, es decir, un fragmento extra cromosómico de ADN portador de genes que modifican la resistencia al antibiótico. La información genética presente en algunos plásmidos, es un factor importante en la patogenicidad o la invasividad de las bacterias, en la velocidad de aparición de cepas patógenas o invasivas resistentes a las drogas antimicrobianas y en la evolución del cuadro clínico.^{67, 68}

Mecanismo de Resistencia: Pueden clasificarse en 3 grupos.⁶⁹

1. Disminución de la Permeabilidad: En estos casos el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, es ésta la forma más frecuente de resistencia natural.^{70,63}

La permeabilidad de la pared celular está determinada por la naturaleza de ésta. En las bacterias Gram positivas, esta pared usualmente no es una barrera que impide la penetración de los antibióticos; sin embargo, en las Gram negativas, representa una barrera difícil de vencer y que varía según las diferentes especies; así por ejemplo, la pared celular es más permeable en algunas especies de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*, que *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus indolpositivo*.

En *Escherichia coli* y otras bacterias entéricas, una proteína específica (PORINS) impide la entrada de antibióticos hidrófilos con un peso molecular de hasta 650 daltons.⁶³

Ejemplos de resistencia por disminución de la permeabilidad son la resistencia de los bacilos Gram negativos a la penicilina G, la eritromicina, la clindamicina y la vancomicina, así como la resistencia de los estreptococos, *Pseudomona aeruginosa* y otras bacterias anaerobias a los aminoglucósidos.^{63, 67}

2. Modificación o Inactivación del Antibiótico: Es el mecanismo más común de resistencia adquirida y está determinado en gran medida por la producción de enzimas: las β -lactamasas.^{70,65}

Las β -lactamasas representan un grupo diferente de enzimas producidos por gérmenes Gram positivos, Gram negativos aerobios y anaerobios capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico e inactivar el antibiótico correspondiente.⁶⁵

La información genética para la síntesis de estas enzimas puede estar contenida en un cromosoma o en un plásmido y su producción puede ser una característica del germen (tasa de producción constante), aunque también la misma puede ser inducida en presencia de un sustrato apropiado.^{63, 64}

3. Alteraciones del Sitio donde los Antibióticos ejercen su acción: Estos mecanismos de resistencia se refieren a las modificaciones producidas en la estructura o paso metabólico sobre los que ejercen su acción, bien por incremento de la concentración de una sustancia competitiva, o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas alternas.⁷¹

La tolerancia, si bien no es considerada propiamente un mecanismo de resistencia, puede en la práctica comportarse como tal. La tolerancia se define como la existencia de una concentración mínima bactericida muy superior. Probablemente, las dosis altas destinadas a conseguir niveles muy superiores a la concentración mínima inhibitoria del microorganismo reduzcan la selección de estas subpoblaciones, por lo que, cuando se sospecha la existencia de ésta es necesario prolongar el tiempo de duración del tratamiento.⁷²

Soluciones al Problema de la Resistencia

La resistencia en gérmenes que producen infecciones graves constituye un problema sanitario muy serio. No es extraño aislar cepas que son resistentes a todos los antibióticos generalmente en uso. Durante las últimas décadas se desarrollaron nuevos antibióticos, con actividad antibacteriana ampliada. A ello las bacterias han respondido generando nuevas versiones de los genes de resistencia. Si se tiene en cuenta que el problema de la resistencia es el resultado de la capacidad innata de las bacterias de adaptarse al medio, esto no debería extrañarnos y además permite predecir que, por muy ingeniosos que seamos diseñando nuevos antibióticos, existen pocas posibilidades de evitar la aparición de gérmenes resistentes. Por lo tanto, es más razonable actuar sobre el otro lado del problema, es decir, reducir la presión selectiva tan brutal que nosotros introducimos con el uso masivo de los antibióticos. Se ha de evitar el uso inapropiado y masivo de los antibióticos, procurando tener el mejor conocimiento de los mecanismos de resistencia y de sus bases microbiológicas y genéticas; esto debe ser tenido muy en cuenta a la hora de determinar el uso de los antibióticos más apropiados en cada caso.⁵⁷

Uso de antimicrobianos de origen vegetal

Se han desarrollado con éxito líneas de investigación, muchas de ellas basadas en las propiedades antiinfecciosas y antiinflamatorias de plantas utilizadas en la medicina popular, pudiendo así contribuir innovadoramente en la terapia antimicrobiana.⁷³

La presencia de sustancias antimicrobianas en los vegetales superiores no es un dato reciente, solamente que a partir del descubrimiento de la penicilina, es que esta búsqueda tiene gran impulso. Las plantas producen gran número de metabolitos secundarios en diversas en diversas partes (hojas, raíces, flores, semillas) que son liberados al medio ambiente, muchos de ellos presentan acción antimicrobiana y antibacteriana. Estos metabolitos secundarios dan origen a diversos como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, que son específicos de determinadas familias, géneros o especies, y cuyas funciones, hace poco tiempo, eran desconocidas.

En 1970, la OMS reconoció los beneficios de la medicina china (a base de extractos de plantas), donde surgen investigaciones y desarrollo de medicamentos obtenidos de fuentes naturales. Estudios realizados en el periodo de 1981 a 2002 por la *Annual Reports of Medicinal Chemistry* demostraron que de entre 90 nuevas sustancias con potencial farmacológico analizadas, 61 de ellas eran derivados semisintéticos de plantas y eran oriundas de productos naturales.⁷⁴

La medicina popular es rica en plantas utilizadas para los más diversos fines, que sustituyen muchas veces, la prescripción médica. Esto se justifica, en parte, por el alto grado de accesibilidad de las plantas medicinales, debido a la gran disponibilidad de estos, muy diferente del que ocurre con los medicamentos industrializados que en la mayoría, dependen de la tecnología y materia prima externa.⁷⁵

La investigación de nuevos agentes farmacológicamente activos, obtenidos de plantas ha permitido descubrir muchos fármacos clínicamente útiles para tratar muchas enfermedades.

1.9 SENSIBILIDAD BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

Antibiograma

El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas.

Antibiograma realizado por el método de disco difusión (Kirby-Bauer): Una placa con crecimiento bacteriano y con seis discos de antibióticos. La zona de color claro que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento bacteriano en las zonas no inhibidas. Los círculos negros que rodean a cinco de los seis discos marcan las zonas en que los respectivos antibióticos han inhibido, con mayor o menor eficacia, el crecimiento del microorganismo a estudio. El que no tiene a su alrededor halo de inhibición lo que indica la resistencia del microorganismo a ese antibiótico.

Estos diferentes métodos de rutina permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Esta cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico.

Para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es, según la National Committee for Clinical Laboratory Standards:

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

-
Ciertas moléculas son representativas de un grupo de antibióticos. Los resultados (S, I, R) obtenidos con estas moléculas pueden ser ampliados a los antibióticos del grupo, que en ese caso no es necesario ensayar.⁷⁶

Los ensayos realizados por la técnicas microbiológicas de disco difusión en agar Mueller-Hinton y macrodilución en caldo Mueller-Hinton, siguiendo las normas del NCCLS,⁷⁷ establecen controles de antibióticos probados que fueron los siguientes: tetraciclina (Tet), ceftriaxona (Ctx), ciprofloxacina (Cip), cefoxitina (Fox), ampicilina (Amp), trimetoprim-sulfametoxazol (Stx), cloranfenicol (Cm), ácido nalidíxico (Na), gentamicina (Gm) y nitrofurantoína (Fu) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England, UK), dando como resultado valores de CMI en ug/ml referenciales de algunos antibióticos según los estándares de controles:⁷⁸

Tabla 01: Valores de referencia de sensibilidad a distintos antibióticos

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922						<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 259223					
	Diámetro de inhibición (mm)			CMI del estándar (ug/mL)			Diámetro de inhibición (mm)			CMI del estándar(ug/mL)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Gentamicina*	≥15	13-14	≤12	≥4	8	≤16	≥15	13-14	≤12	≥4	8	≤16
Ampicilina*	≥17	14-17	≤13	≥8	16	≤32	≥29	-	≤28	≥0,2	-	≤0.5
Ciprofloxacino*	≥21	16-20	≤15	≥1	2	≤4	≥21	16-20	≤15	≥1	8	≤4

* Fuente: valores tomados de CLSI 2010

S= sensible

I= intermedia

R= resistente

II. DEFINICIONES OPERACIONALES

2.1 VARIABLES:

2.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

- Extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta*.

2.1.2 VARIABLE DEPENDIENTE

- Actividad antibacteriana.

2.2 INDICADORES:

2.2.1 INDICADOR DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE

- Concentración de 200, 300 y 400 mg/mL de los extractos acuosos de hojas y corteza de *Vismia angusta*.

2.2.2 INDICADOR DE LA VARIABLE DEPENDIENTE

- Sensibilidad del *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a las hojas y corteza de *Vismia angusta*.

2.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA Y TIPO DE VARIABLE
Extracto acuoso de hojas y corteza de <i>Vismia angusta</i> (pichirina)	Producto obtenido mediante el método de extracción con agua por rotavapor.	Material vegetal que se somete a extracción acuosa por cocción de las hojas y corteza a 65-70 °C durante 1 h. Posterior filtrado, concentrado en rotavapor para obtener el extracto seco	Peso del extracto acuoso de la especie <i>Vismia angusta</i> (pichirina)	Sensibilidad bacteriana: 200, 300 y 400 mg/mL	Escala: Intervalar Tipo de variable: Cuantitativa.

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA Y TIPO DE VARIABLE
Actividad Antibacteriana <i>in vitro.</i>	Acción de observar cambios morfológicos de la bacteria causado por agentes químicos externos produciendo inhibición en el crecimiento del mismo.	Método de disco difusión (Kirby-Bauer): Diámetro del medio de cultivo alrededor del disco con antimicrobianos que presentan inhibición completa, inhibición parcial o crecimiento del microorganismo.	Tamaño de halo de inhibición expresado en porcentaje de inhibición.	1.Grado de Sensibilidad: Inactivo < 40% Poco activo 40-50% Moderadamente activo 51-75% Buena actividad >76%	Escala: Razón. Tipo de variable: Cualitativa

III. HIPÓTESIS

H₀: No existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de *Vismia angusta* (pichirina) sobre agentes patógenos. Iquitos - Perú, año 2013.

H₁: Existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de *Vismia angusta* (pichirina) sobre agentes patógenos. Iquitos - Perú, año 2013.

Capítulo III

I. METODOLOGÍA

1.1 Tipo de Investigación:

Descriptivo; porque se midió la actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta*, así como la caracterización del contenido de metabolitos secundarios.

1.1.1 Diseño de Estudio:

El estudio fue de diseño experimental, prospectivo y longitudinal.

- Experimental: Porque se midió el efecto de una variable independiente sobre otra dependiente; esto es debido a que la variable de nuestro estudio pasó por pruebas de laboratorio experimental.
- Prospectivo: Porque el estudio se desarrolló a partir de la aprobación del proyecto.
- Transversal: Porque se realizó una sola colecta de la especie vegetal en estudio para la investigación.

1.2 Diseño De Investigación:

El estudio se realizó con cepas de *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Los cuales se inoculó en las placas con Mueller-Hinton, luego se colocó los discos que contienen 10ug de gentamicina, solución salina y el extracto acuoso a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL. La lectura se realizó a 18 horas midiéndose los diámetros de las zonas de inhibición completa, para luego determinar la actividad antibacteriana del extracto en porcentaje.

1.3 Población y Muestra

1.3.1 Población Vegetal:

Para este estudio estuvo constituido por árboles de *Vismia angusta* distribuidos en los alrededores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica ubicado en el Fundo de Zungarococha - Puerto Almendras, de la Localidad de Nina Rumi, de la jurisdicción del distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto a 122 msnm. (Ver Anexo 01)

1.3.2 Muestra Vegetal:

Se recogió 500 g de hojas y 500 g de corteza de *Vismia angusta*. Para la recolección de la muestra vegetal se tuvo en cuenta los siguientes factores: hábitat de la planta, hora de recolección.

- **Criterios de Inclusión**

- Hojas jóvenes en buen estado.
- Corteza fresca en buen estado.

- **Criterios de Exclusión**

- Estado vegetativo deteriorado.
- Hojas infestadas por hongos o parásitos.
- Corteza infestadas por hongos o parásitos

1.3.3 Población Biológica:

Estuvo constituida por bacterias de: *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, procedentes del Centro Nacional de Producción de Biológicos del INS-MINSA, con sede en la ciudad de Lima. (Ver Anexo 11- Foto 10)

1.3.4 Muestra Biológica:

El número de colonias que se emplearon para la preparación del inóculo bacteriano fue de 3 a 5 colonias de tamaño aproximado.

- **Criterios de Inclusión**

- Cepas que reúnan las características microscópicas y bioquímicas del microorganismo.

- **Criterios de Exclusión**

- Cepas contaminadas
- Cepas que no coincidan con el fenotipo del microorganismo patrón.

1.4 MATERIALES E INSTRUMENTOS

1.4.1 Material Biológico:

- Cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATTC 25922.
- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.4.2 Material Vegetal:

- Hojas secas de *Vismia angusta*.
- Corteza secas de *Vismia angusta*.

1.4.3 Equipos:

- Microscopio compuesto (Axiostar plus ZEISS).
- Rotavapor (Büchi rotavapor R-124).
- Balanza digital SARTORIUS.
- Balanza analítica SARTORIUS MERCK (Sensibilidad 0,1mg).
- Congeladora FRIOLUX.
- Cámara fotográfica digital (Sony).
- Autoclave (Yamato).

- Calentador.
- Cabina de flujo laminar (Magmahelic “Forma Cientific/ Model: 13089-79).
- Estufa de cultivo a 35 °C (Merck/Model: 1125-1).
- Baño maría (Barnstead).
- Destilador de agua (Thermo Scientific).

1.4.4 Materiales de Laboratorio:

- Embudos.
- Frasco grande tapa-rosca 4 L.
- Placas de Petri de vidrio grande 10 mm.
- Tubos de ensayo de 5 y 7 mL.
- Láminas portaobjeto.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250 y 1000 mL.
- Vaso de precipitado de 50 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 250, 100, 50 ml y 20mL.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Tubos de ensayo con tapa-rosca (75 x 120 mm).
- Bagueta.
- Mechero de vidrio de alcohol.
- Asa de Kolle.
- Cuchillo mediano.
- Espátulas.
- Gradilla metálica.
- Pinza estéril.
- Escobillas lava-tubos.
- Vernier.
- Bisturí

1.4.5 Otros Materiales:

- Parafilm 2' x 250'.
- Disco de sensibilidad de Gentamicina 10 µg con 6 mm de diámetro.
- Discos estériles de 6 mm de diámetro.
- Micropipetas 200, 1000 µL.
- Tips de 200, 1000 µL.
- Hisopos estériles.
- Papel aluminio.
- Algodón.
- Papel filtro.
- Picetas.
- Papel toalla.
- Tubos Falcon.
- Papel de despacho.
- Plumón marcador.

1.4.6 Medios de Cultivo: (Ver Anexo 14)

- Agar Tripticasa Soya.
- Agar Mueller- Hinton.
- Caldo Tripticasa de Soya.
- Caldo Mueller- Hinton.
- Tubo de 0.5 de la escala de McFarland.

1.4.7 Drogas e insumos químicos

- Ácido clorhídrico (HCl).
- Agua destilada.
- Etanol 70°.
- Gentamicina (**Ver Anexo 11- Foto 11**)
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Fehling.
- Reactivo de Sudan III.

- Reactivo de Ninhidrina.
- Reactivo de Mayer.
- Cloruro de Bario (BaCl_2), para la preparación de Estándar 0.5 de Mc. Farland.
- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), para la preparación de Estándar 0.5 de Mc. Farland.
- Cinta de magnesio.

*** Materiales de bioseguridad:**

- Mandil.
- Mascarilla.
- Guantes quirúrgicos N° 6.½.
- Lentes de protección.

II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (Ver Anexo 04)

2.1 Preparación de la muestra vegetal

2.1.1 Acondicionamiento de la especie botánica

La muestra se recolectó en los alrededores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica ubicada en el Fundo de Zungarococha - Puerto Almendras- localidad de Nina Rumi, de la jurisdicción del distrito de San Juan (**Ver Anexo 01**) en horas de la mañana del mes de febrero, fue identificada en el *Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana* (Iquitos-Perú) (**Ver Anexo 03**). Luego se trasladó el material al laboratorio para el respectivo lavado con agua destilada. Una vez clasificadas las hojas y corteza se colocaron por separado sobre láminas de papel a temperatura ambiente, protegidas del sol hasta que presenten un aspecto seco y quebradizo. Una vez seco la muestra de corteza fue triturado y las hojas fueron pulverizados por un molino de acero inoxidable colocándolos en frascos para su utilización posterior (**Ver Anexo 05- Foto 01, 02, 03, 04**).

2.2 Obtención del Extracto Acuoso

Se obtuvo 1000 g de materia prima en 2500 mL de agua, durante 1h a temperaturas entre 65-70 °C; luego se filtró consecutivamente. La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 80 °C y a una presión de 690 mmHg por espacio de 3 h aproximadamente; posteriormente se dejó secar. (Ver Anexo 06 y 07 –Foto 05, 06, 07, 08)

2.3 Análisis Fitoquímico

Se realizó ensayos directos sobre el material vegetal (hojas y corteza) con el método descrito en *Métodos de Estudios de Productos Naturales. Perú* por Olga Lock³⁸ (Ver Anexo 09), con el protocolo de estudio respectivo.

- La identificación de la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios como son: alcaloides, quinonas, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, grasas, mucílagos, principios amargos y astringentes. (Ver Anexo 08)
- Obtención del extracto acuoso: se pesaron 30 g de la muestra seca previamente molida, se dejó macerando en 30 mL de agua destilada durante 24 horas y posteriormente se llevó a cocción a temperatura de 40 °C. Finalmente se filtró.

2.4 Preparación de las concentraciones

Se realizó el cálculo y ensayos respectivos de las concentraciones para cada extracto (hojas y corteza) a utilizar. Se pesó 2.5 g de cada extracto seco en 2.5 mL de agua destilada estéril para obtener la solución stock con una concentración de 1000 mg/mL. A partir de esta solución stock se procedió a preparar las siguientes concentraciones: 200 mg/mL, 300 mg/mL y 400 mg/mL.

2.5 Preparación de los discos de sensibilidad

- Los discos de sensibilidad se preparó utilizando papel Whatman N° 3 y empleando un perforador convencional. Estos discos luego fueron esterilizados en autoclave a 121 °C en 15 libras de presión por 15 minutos.
- Luego se procedió a agregar a cada uno de los discos 25 µL de las concentraciones de los extractos vegetales que son de 200 mg/mL, 300 mg/mL y 400 mg/mL. Las que se dejaron secar a 37 °C por 24 h.

2.6 Prueba de sensibilidad según LORES (1976), MITSCHER (1972), INS⁷⁸ (Ver Anexo 10)

Preparación del inóculo:

- Se procedió a preparar el medio agar Tripticasa de Soya (TSA) en placas petri para el cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Ver Anexo 11- Foto 12).
- Los cultivos de cada uno de los microorganismos de prueba son reactivados (Ver Anexo 11- Foto 13) en Caldo Tripticasa de Soya y en una estufa se incubó a los microorganismos a 37 °C por 18 a 24 horas, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- Ajustar la turbidez (Ver Anexo 11- Foto 14 y15) del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente usar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

Inoculación de las Placas:

- Transcurridos los 15 minutos de preparado el inoculado bacteriano, y ajustado la turbidez del mismo, se sumerge un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces presionando firmemente la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para remover el excesos del inóculo.
- Inocular en la superficie seca de la placa Mueller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Ver Anexo

11- Foto 16). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que se absorba el excesos de humedad.

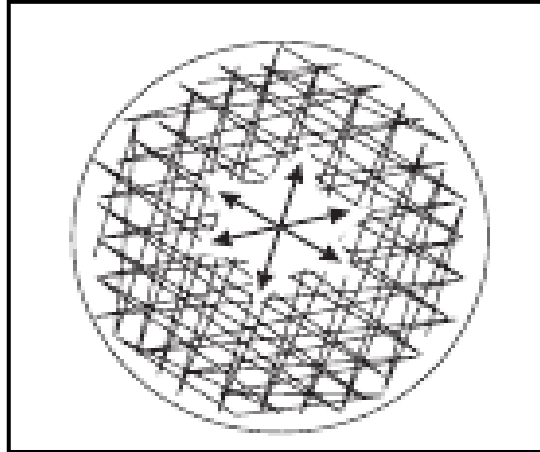


Figura 03: Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar

Aplicación de los Discos:

- Colocar los discos que contienen 10 µg de gentamicina (**Ver Anexo 11- Foto 17**) y la sustancia (extracto vegetal) a diferentes concentraciones, sobre la superficie del agar en forma manual con una pinza estéril. Presionando ligeramente para asegurar el contacto uniforme, sin introducir el disco en el agar.
- Lo discos deben ser colocados a una distancia de 2.5 cm uno del otro y a 1.5 cm del borde de la placa. Si las placas a utilizar son de 150 mm, no deben ir más de 11 discos y en una de 10 mm colocar 5 discos.

Incubación:

- Invertir las placas e incubar a 37° C para bacterias a 18 h (**Ver Anexo 11- Foto 18**).
- Después del tiempo recomendado de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco, usando vernier.
- En el grupo de control positivo se trabajó con gentamicina y en el grupo de control negativo se trabajó con Suero Fisiológico. Las pruebas se realizaron por triplicado.

2.7 Lectura e Interpretación de los Resultados

Luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura correspondiente con la observación de los halos de inhibición del crecimiento, mediante el registro de los diámetros de estas zonas según el método de disco difusión (Kirby- Bauer).

Porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diametro de la muestra}}{\text{Diametro del control}} \times 100$$

Los ensayos serán llevados por triplicado y se realizarán cultivos de control de todas las cepas para comprobar la viabilidad. El criterio que se utilizará para la clasificación de la actividad antibacteriana de los extractos evaluados se detalla en lo siguiente:

Tabla 02: Clasificación de la Actividad Antibacteriana según el porcentaje de inhibición

Actividad Antibacteriana	Porcentaje de Inhibición
Inactivo	< 40%
Poco activo	40 a 50%
Moderadamente activo	51 a 75%
Buena actividad	>76%

Fuente: IMET – EsSalud 2007.⁷⁹

2.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Protección de los Derechos Humanos y de los Animales

El área de microbiología donde se realizaron los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial que puede presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ello se contaron con estrictas medidas de bioseguridad.

III. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

3.1 Diseño y Método Estadístico

Para el análisis estadístico se empleó ANOVA (One Way) del programa SPSS versión 18.0. Se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

3.2 Análisis e Interpretación de Datos

- Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, fueron expresados en términos estadísticos, según grupo de estudio.
- Se calculó la media y desviación estándar como medidas de tendencia central, que serán presentados mediante tablas y gráficas.
- Los gráficos a utilizar en el trabajo son :
 - Gráficos de barras, para representar las variaciones de concentraciones frente a los microorganismos de estudio.
 - Gráficos de barras para representar los porcentajes de inhibición.
- Los datos se procesaran mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.
- Para el análisis de los resultados se empleó el programa estadístico SPSS 18.0.

Capítulo IV

I. RESULTADOS

Tabla 03: Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de la Muestra botánica de *Vismia angusta*. (Ver Anexo 15)

METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS	RESULTADO	
		Hoja	Corteza
Alcaloides	<i>Dragendorff</i>	0	0
	<i>Wagner</i>	0	0
Quinonas	<i>Bornträger</i>	++	+++
Aceites Esenciales-Grasas	<i>Sudán III</i>	+	+++
Saponinas	<i>Espuma</i>	++	+++
Fenoles y Taninos	<i>Cloruro Férrico</i>	+	+++
Aminoácidos	<i>Ninhidrina</i>	0	0
Flavonoides	<i>Shinoda</i>	++	+++
Mucílagos	<i>Tacto</i>	0	0
Principios Amargos y Astringentes	<i>Sabor</i>	+	++

(+++) Abundante; (++) Moderado; (+) Leve; (0) Ausente.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (Ver Anexo 12 y 13)

Análisis Descriptivo de la Capacidad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso de corteza de *Vismia angusta* a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL por el método de disco difusión a las 18 horas.

Los diámetros promedios de los halos de inhibición en el crecimiento bacteriano *in vitro* de los extractos acuosos de corteza de *Vismia angusta* por el método de disco difusión, se detallan en la Tabla 02 y Figura 02 en las que se aprecian las diferentes concentraciones.

A la concentración de 400 mg/mL se obtuvieron los siguientes resultados para:

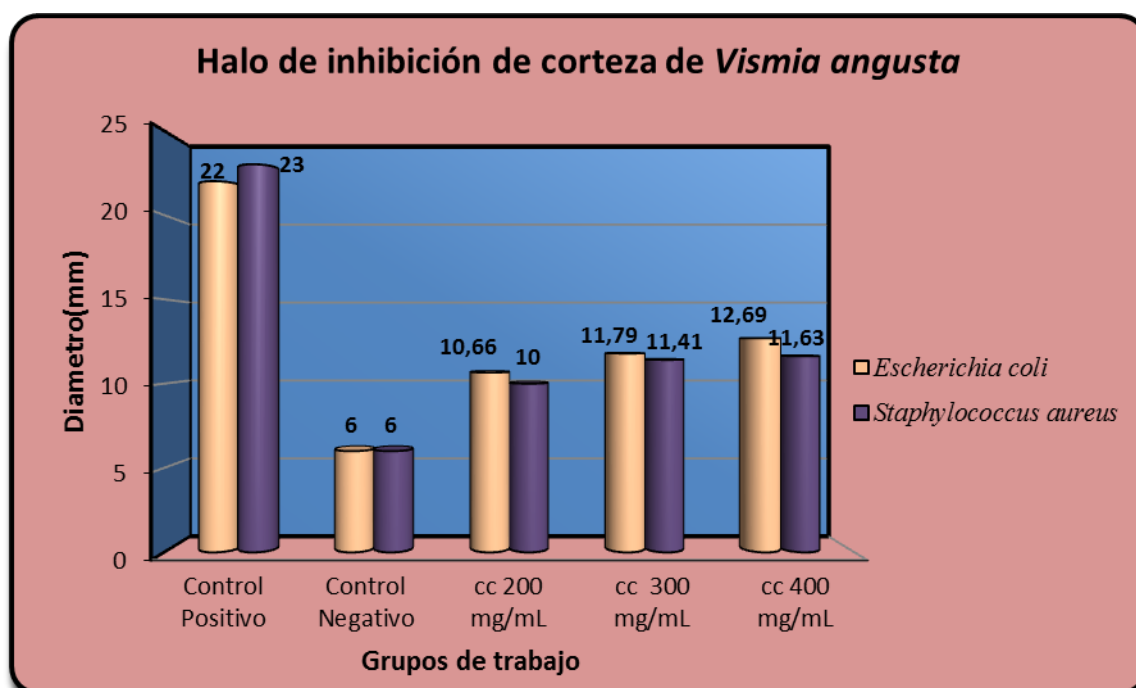
- *Escherichia coli*: 12.69 mm. El blanco fue constante e igual a 6.00 mm, mientras que con el antibiótico gentamicina a concentración de 10 µg fue de 22 mm de diámetro.
- *Staphylococcus aureus*: 11.63 mm. El blanco fue constante e igual a 6.00 mm, mientras que con el antibiótico gentamicina a concentración de 10 µg fue de 23 mm de diámetro.

Tabla 04: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

Grupos de Trabajo	MICROORGANISMO	
	<i>Escherichia coli</i> X \pm s.d	<i>Staphylococcus aureus</i> X \pm s.d
Gentamicina 10 μ g	22.00 \pm 0.00	23.00 \pm 0.00
Suero Fisiológico	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00
200 mg/mL	10.66 \pm 0.57	10.00 \pm 0.00
300 mg/mL	11.79 \pm 0.00	11.41 \pm 0.00
400 mg/mL	12.69 \pm 0.57	11.63 \pm 0.00

p < 0,05 con respecto al suero fisiológico y gentamicina

- Se indica los promedios, desviación estándar del diámetro del halo de inhibición frente a los microorganismos en ensayo.



FUENTE: Elaborado por las autoras

Figura 04: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

En la Figura 04. Se muestra el promedio de diámetro del halo de inhibición del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* frente a los microorganismos a las 18 horas.

En el grupo control positivo (gentamicina 10 µg): se aprecia el incremento del diámetro del halo de inhibición (23 mm) frente a *Staphylococcus aureus* y una disminución leve (22 mm) frente a *Escherichia coli*.

En el grupo control negativo (suero fisiológico 0.9%): el diámetro del halo de inhibición se mantienen constante (6 mm).

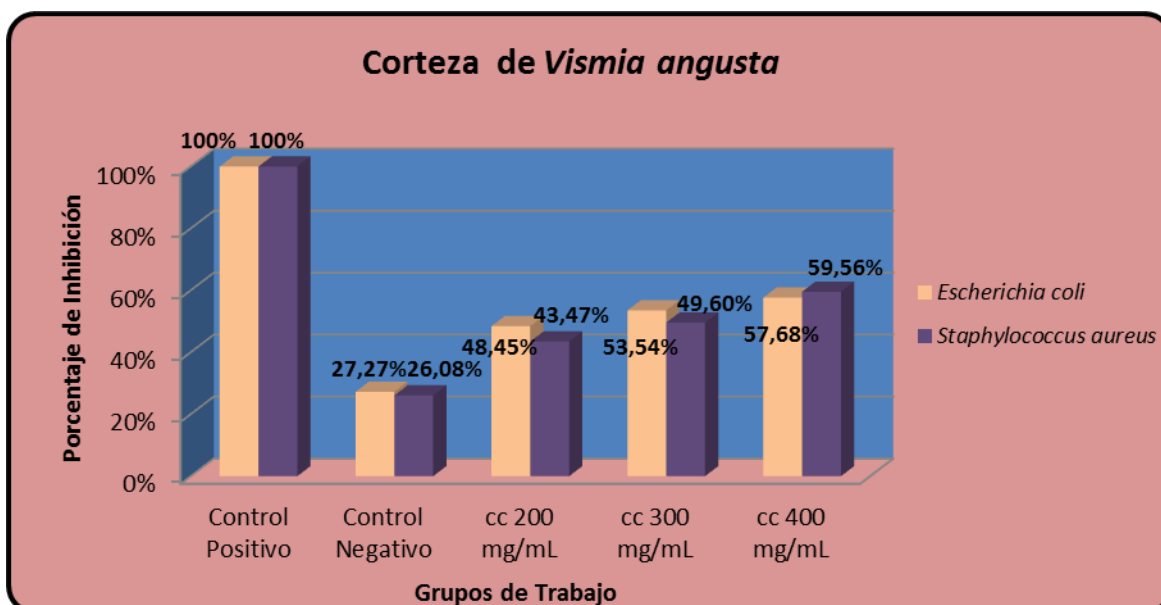
En el grupo corteza de *Vismia angusta*. Concentración 200 mg/mL: se observa un incremento del diámetro del halo de inhibición (10.66 mm) frente a *Escherichia coli* y una disminución posterior frente a *Staphylococcus aureus* (10 mm).

En el grupo corteza de *Vismia angusta*. Concentración 300 mg/mL: se observa un incremento del diámetro del halo de inhibición (11.79 mm) frente a *Escherichia coli* y una disminución posterior frente a *Staphylococcus aureus* (11.41mm).

En el grupo corteza de *Vismia angusta*. Concentración 400 mg/mL: se observa un incremento del diámetro del halo de inhibición (12.69 mm) frente a *Escherichia coli* y una disminución posterior frente a *Staphylococcus aureus* (11.63 mm).

Tabla 05: Porcentaje de inhibición (en porcentajes) del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

Grupos de Trabajo	MICROORGANISMO	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gentamicina 10µg	100%	100%
Suero Fisiológico	27.27%	26.08%
200 mg/mL	48.45%	43.47%
300 mg/mL	53.54%	49.60%
400 mg/mL	57.68%	59.56%



FUENTE: Elaborado por las autoras

Figura 05: Porcentaje de inhibición de los extracto acuoso de la corteza de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

El mayor porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli*: 57.68% a la concentración 400 mg/mL.

El mayor porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*: 59.56% a la concentración de 400 mg/mL.

Análisis Descriptivo de la Capacidad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso de hojas de *Vismia angusta* a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL por el método de disco difusión a las 18 horas

Los diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* por el método de disco de difusión se detallaron en la Tabla 06 y Figura 06 en donde se aprecian las diferentes concentraciones.

A la concentración de 400 mg/mL se obtuvieron resultados para:

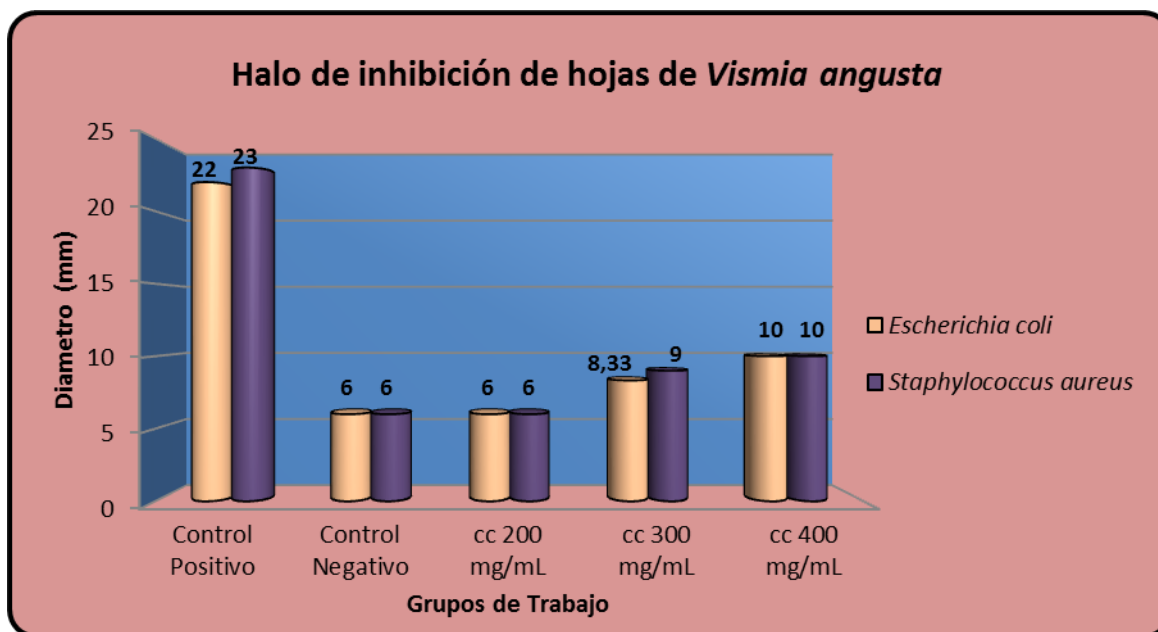
- *Escherichia coli*: 10.0 mm. El blanco fue constante e igual a 6.00 mm, mientras que con el antibiótico gentamicina fue de 22 mm.
- *Staphylococcus aureus*: 10.0 mm. El blanco fue constante e igual a 6.00 mm, mientras que con el antibiótico gentamicina fue de 23 mm.

Tabla 06: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

Grupos de Trabajo	MICROORGANISMO	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	X \pm s.d	X \pm s.d
Gentamicina 10 μ g	22.00 \pm 0.00	23.00 \pm 0.00
Suero Fisiológico	6.00 \pm 6.00	6.00 \pm 6.00
200 mg/mL	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00
300 mg/mL	8.33 \pm 0.57	9.00 \pm 0.00
400 mg/mL	10.00 \pm 0.00	10.00 \pm 0.00

p < 0,05 con respecto al suero fisiológico y gentamicina

- Se indica los promedios, desviación estándar del diámetro del halo de inhibición frente a los microorganismos en ensayo.



FUENTE: Elaborado por los autores

Figura 06: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo

En la Figura 06. Se muestra se muestra el promedio de diámetro del halo de inhibición extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* frente a los microorganismos a las 18 horas.

En el grupo control positivo (gentamicina 10 µg): se aprecia el incremento del diámetro del halo de inhibición (23 mm) frente a *Staphylococcus aureus* y una disminución leve (22 mm) frente a *Escherichia coli*.

En el grupo control negativo (suero fisiológico 0.9 %): el diámetro del halo de inhibición se mantienen constante (6 mm).

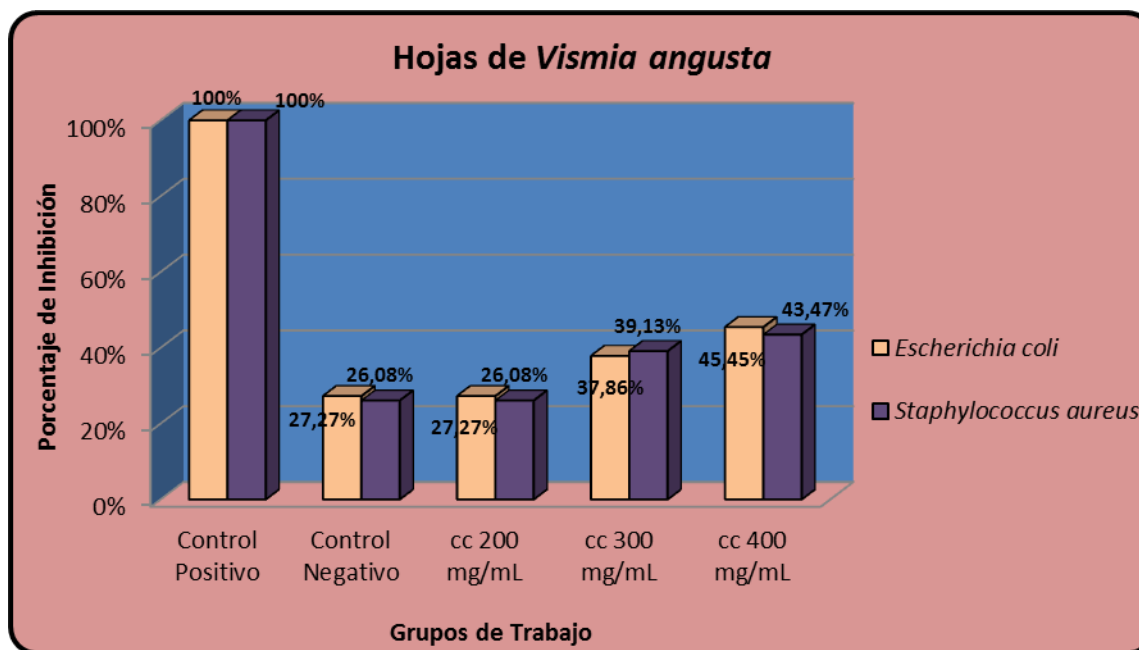
En el grupo hojas de *Vismia angusta*. Concentración 200 mg/mL: el diámetro del halo de inhibición se mantienen constante (6 mm) en ambos microorganismos.

En el grupo hojas de *Vismia angusta*. Concentración 300 mg/mL: se observa un incremento del diámetro del halo de inhibición (9 mm) frente a *Staphylococcus aureus* y una disminución posterior frente a *Escherichia coli* (8.33 mm).

En el grupo hojas de *Vismia angusta*. Concentración 400 mg/mL: se observa que el diámetro del halo de inhibición se mantienen constante (10 mm) para ambos microorganismos.

Tabla 07: Porcentaje de inhibición (en porcentajes) del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

Grupos de Trabajo	MICROORGANISMO	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gentamicina 10 μ g	100%	100%
Suero Fisiológico	27.27%	26.08%
200 mg/mL	27.27%	26.08%
300 mg/mL	37.86%	39.13%
400 mg/mL	45.45%	43.47%



FUENTE: Elaborado por los autores

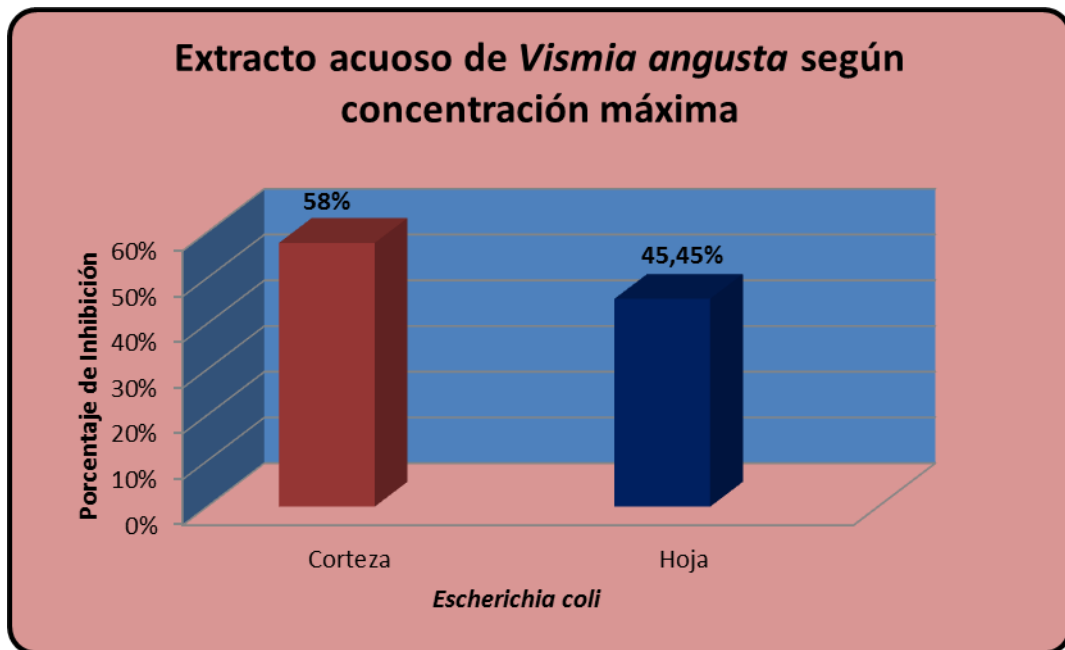
Figura 07: Porcentaje del halo de inhibición (en milímetros) del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* frente a los microorganismos en ensayo.

El mayor porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli*: 45.45% a la concentración 400mg/mL.

El mayor porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*: 43.47% a la concentración de 400mg/mL.

Tabla 08: Comparación de porcentaje del extracto acuoso de corteza y hojas de *Vismia angusta* frente a *Escherichia coli* según concentración máxima.

Concentración máxima de <i>Vismia angusta</i>	<i>Escherichia coli</i>	
	Corteza	Hojas
Dosis 400 mg/mL	57.68%	45.45%



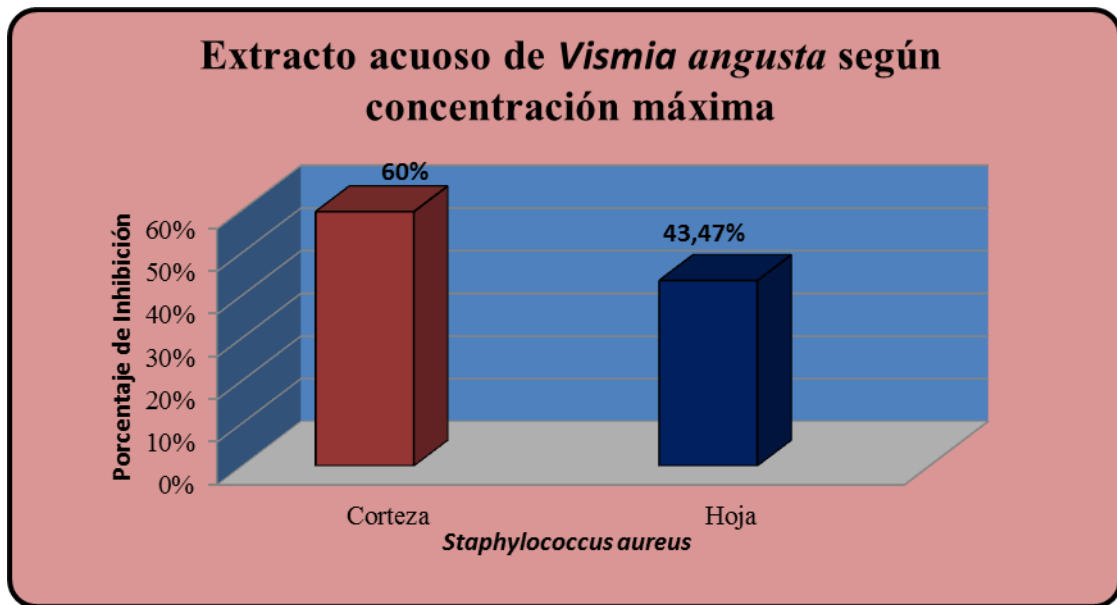
FUENTE: Elaborado por las autoras

Figura 08: Porcentaje de Inhibición de corteza y hojas de *Vismia angusta* frente a *Escherichia coli* según concentración máxima.

En la Figura 08. Se ilustra la variación del porcentaje de inhibición de corteza y hojas de la especie vegetal en estudio a la concentración máxima de 400 mg/mL frente a *Escherichia coli* observándose un incremento de porcentaje en corteza de dicha especie vegetal.

Tabla 09: Comparación de porcentaje del extracto acuoso de corteza y hojas de *Vismia angusta* frente a *Staphylococcus aureus* según concentración máxima.

Concentración máxima de <i>Vismia angusta</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Corteza	Hojas
Dosis 400 mg/mL	59.60%	43.47%



FUENTE: Elaborado por las autoras

Figura 09: Porcentaje de Inhibición de corteza y hojas de *Vismia angusta* frente a *Staphylococcus aureus* según concentración máxima.

En la Figura 09. Se ilustra la variación del porcentaje de inhibición de corteza y hojas de la especie vegetal en estudio a la concentración máxima de 400 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* observándose un incremento de porcentaje en corteza de dicha especie vegetal

Tabla 10: Resumen General del Porcentaje de Inhibición Según la Clasificación de la Actividad Antibacteriana

Concentración de <i>Vismia angusta</i>	<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
	corteza		hojas		corteza		Hojas	
200mg/mL	48.45%	P	27.27%	I	43.47%	P	26.08%	I
300mg/mL	53.54%	M	37.86%	I	49.60%	P	39.13%	I
400mg/mL	57.68%	M	45.45%	P	59.60%	M	43.47%	P

I= Inactivo

P= Poco Activo

M= Moderadamente Activo

B= Buena Actividad

II. DISCUSIÓN

Los pobladores amazónicos utilizan plantas medicinales del género *Vismia* bajo diferentes formas como cataplasma, infusión, decocción, exudado, etc., para aliviar padecimientos producidos por distintos tipos de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas, lo que constituye un serio problema de salud pública. (Vizcaya et al, 2012)

Actualmente en el Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (CIRNA-UNAP), el Instituto de Medicina Tradicional (IMET) de EsSalud, el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPNA), vienen realizando estudios de investigación para determinar las propiedades de las plantas con actividad antimicrobiana, antimicótica y antiparasitaria, utilizando diversas técnicas *in vitro* con un sinnúmero de agentes patógenos en los cuales no solo se analiza la actividad antimicrobiana sino también la Concentración Mínima Inhibitoria.

En el tamizaje fitoquímico realizado al extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta*, se encontró quinonas, aceites esenciales, saponinas, fenoles, flavonoides, sustancias astringentes y principios amargos. La mayor concentración de estos componentes está en la corteza más que en las hojas.

Para obtener una mayor concentración de estas moléculas, la mejor forma de extracción es la solución acuosa, ya que Marín.K (2009) en extracción hidroalcohólica de corteza del género *Vismia*, no reporta quinonas; esto debido a que estos compuestos químicos son moléculas que poseen una alta reactividad, formando compuestos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, en la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función biológica (Domingo y López-Brea, 2003)⁸⁰, por lo que no se encontró aminoácidos ni proteínas durante el tamizaje en esta investigación; en cambio Pino-Benitez y Córdova (2007) en el extracto etanólico del género *Vismia*, reporta fenoles, cianidinas, taninos y esteroides, haciendo además referencia que

carecen de alcaloides y que las antraquinonas se evidencian notoriamente en esta especie de planta.

En el extracto acuoso de hojas se encontró los mismos componentes reportados para el extracto acuoso de corteza pero en concentraciones mínimas. Gonzales y Toro (2010) en el extracto etanólico de hojas reportó los mismos componentes encontrados en el presente estudio de investigación, además de carbohidratos reductores, polifenoles, entre otros.

El análisis antibacteriano de los extractos acuosos de corteza y hojas de *Vismia angusta* se realizó mediante el método de disco difusión (Kirby-Bauer,1966), con cepas referenciales de *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La mejor actividad antibacteriana se presentó en concentraciones de 400 mg/mL del extracto acuoso de corteza siendo el halo de inhibición para *Escherichia coli* 12.69 mm y para *Staphylococcus aureus* 11.63 mm; en cambio con el extracto acuoso de hojas en esta misma concentración, los halos de inhibición para *Escherichia coli* fue de 10.00 mm y para *Staphylococcus aureus* 10.00 mm. Esto podría ser debido a que la corteza presento una mayor concentración de ácidos grasos esenciales, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides y quinonas, en comparación al extracto acuoso obtenido de las hojas. Domingo y López-Brea⁸⁰ (2003); Mbaveng et al (2008)⁸¹ y Cowan M. (1999)⁸², indican que la actividad antimicrobiano para el Género *Vismia* obtenida a partir de extractos hidroalcohólico, etanólico y acuoso, se encuentra en el grupo de las quinonas, flavonoides y aceites esenciales, compuestos químicos encontrados en esta investigación.

En el extracto acuoso de corteza se encontró una moderada actividad en cuanto al porcentaje del halo de inhibición de inhibición en concentración de 300 mg/mL (53,54%) y 400 mg/mL (57.68%) para a *Escherichia coli* ATTC 25922; mientras que en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 solo se encontró en 400 mg/L (59.60 %).

En el extracto acuoso de hojas se encontró poca actividad e inactividad en las concentraciones ensayadas, lo que podría ser atribuido a la presencia de más de un componente activo, la diferencia de los pesos moleculares de las sustancias, así como el tipo de microorganismo sobre el cual esté actuando la sustancia química. Debido a estos factores es que Marín. K (2009), en su trabajo de investigación con hojas del género *Vismia*, no encontró actividad antibacteriana; en cambio con extracto hidroalcohólico de la corteza, demostró que sí tiene actividad inhibitoria frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella sp.*

Asimismo, Pino-Benítez y Córdova (2007) demostraron que los extractos metanólicos de tres plantas utilizadas, una de ellas del Género *Vismia*, fueron activas contra tres tipos de bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, indicando que la corteza posee actividad antimicrobiana. A diferencia del estudio realizado por Andoque, H., et al (2009) quienes demostraron que el extracto acuoso no mostró actividad inhibitoria en la cepa de *Staphylococcus aureus* independientemente de la concentración. De otro lado Tamokou, J., et al (2009) demostraron por el método de microdilución que el extracto metanólico crudo de corteza del Género *Vismia* fue moderadamente activo frente a *Staphylococcus aureus* lo que puede deberse al método de extracción y al método antimicrobiano utilizados.

El método de disco difusión utilizado en esta investigación demostró ser sensible ante las cepas de los microorganismos empleados, lo que ha sido corroborado por Pérez, A., et al (2011), quien utilizó el mismo método en su estudio y demostró la sensibilidad de inhibición con los mismos microorganismo ensayados.

III. CONCLUSIONES

- En los extractos acuosos de hojas y corteza se determinó la presencia de aceites esenciales, taninos, flavonoides, saponinas y quinonas, encontrado mayor concentración en la corteza.
- La mejor actividad antimicrobiana fue en las concentraciones de 300 y 400 mg/mL del extracto acuoso de la corteza de *Vismia angusta* sobre las cepas de referencia: *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATTC 25923.
- El porcentaje de inhibición del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* a concentraciones de 400 mg/mL fue de 57,68 % para *Escherichia coli* y 59,60 % para *Staphylococcus aureus*.
- El porcentaje de inhibición del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* a concentraciones de 400 mg/mL fue 45.45% para *Escherichia coli* y 43.47 % para *Staphylococcus aureus*.
- La cepa referencial de *Escherichia coli* ATTC 25922 fue más sensible que la cepa referencial de *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, a las concentraciones de 300 y 400 mg/mL del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta*.

IV. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con la investigación de esta especie vegetal o el género *Vismia*, sobre otras partes de la planta con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre su actividad antimicrobiana.
- Realizar el aislamiento y elucidación de las estructuras químicas de los componentes químicos presentes en la especie vegetal *Vismia angusta*, como la espectrometría (U.V., I.R., R.M.N.H⁺), H.P.L.C. y electroforesis.
- Desarrollar estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo* de *Vismia angusta*.

Capítulo V

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Situación Reglamentaria de los Medicamentos. Reseña Mundial; 2000.
2. Oficina General de Estadística e Informática año [en línea]. Web master. Ministerio de Salud. Copyright © 2010[fecha de acceso 18 de mayo del 2012].URL Disponible en: <http://webmaster@minsa.gob.pe.htm>.
3. Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en Hospitales del Perú: Ministerio de Salud; 2008.
4. Vallejos C. Calderón J. Dongo V. Yarasca P. Vásquez L. Estrategias y metodologías de intervención para mejorar el uso de los antimicrobianos en el ámbito hospitalario. DIGEMID. 2006.
5. Cárdenas D, López R. Plantas Útiles de la Amazonia Colombiana Departamento del Amazonas: Perspectivas de los productos forestales no Maderables. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Ministerio del Medio Ambiente. Colombia; 2000.
6. Walker SL, Shah M, Hubbard VG, Pradhan HM, Ghimire M. Skin disease is common in rural Nepal: Results of a point prevalence study. Br J Dermatol; 2008; 158: 334-8.
7. Organización Mundial de la Salud. Una estrategia mundial para combatir las enfermedades infecciosas. Ginebra; 1994.
8. Sumari L, Zumba W. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Extractos Liofilizados de Ocho Ecotipos de *Bixa orellana l.*[Tesis]. Perú: IMET-EsSalud; 2008.

9. Instituto Nacional de Salud. Reporte de las Principales Enfermedades Infecciosas em el Perú. Lima. Boletín Informativo INS, 2007; 15 pp.
10. Salazar E, Adachi JA, Wang Y, Jian ZD, Mathewson JJ, DuPont HL. Acute versus persistente diarrheaamong children in Lima, Perú: difference in etiologic agents. IDSA Abstract. Denver, Colorado: 1998, marzo 19. Sección B.p.5
11. Maldonado F, Llanos F, Zavalaga J. Uso y Prescripción de Medicamentos Antimicrobianos enel Hospital Apoyo de laMerced. Revista Peruana Medica. Lima-Perú. 2010; Vol. 19 181-185.
12. Maguiña-Vargas C, Ugarte-Gil C, Montiel M. Uso adecuado y racional de los antibióticos. Acta Med. Per. 2006; 23 (1): 15-20.
13. Villar L; Villavicencio O. Manual de Fitoterapia. Organización panamericana de la salud. EsSalud-Lima. 2001; 7-8.
14. Duke J. Amaranthaceae. In Flora of Panama. Ann. Missouri Bot. Gard. 48:6-50. Part. 4. fasc. 4; 2000.
15. Obregón L. Fitoterapia: Importancia de su desarrollo al servicio de salud. FITO Lima, Perú; 2003.
16. Machado L. Materia primas vegetales para la industria de fitofármacos FITO Lima-Perú; 2003.
17. Cracraft J, Grifo F. The living planet in crisis. Biodiversity science; 1999.
18. Etnobotánica, etnofarmacia, fitonomía, pistas para el conocimiento sistemático de las plantas. Folle-0113- IIAP 2011; 4: 285-346.

19. Gunasekera .P., Sivapalan K., Sultanbawa M., Ollis, W. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I, 11.1977.
20. Simmonds M, Blaney W, Delle Monache M, Macquae M, Bettolo M. Insect antifeedant propiertis of anthanoids from the genus *Vismia*. J Chem Ecol 1985; 11: 15-93.
21. Lima O. Estudio *in vitro* de actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales en cepas de bacterias Gram negativas. Rev. Bras. Cien. Saude; 2003. 7(3):251-258, set-dic. Brasil.
22. Salas F, Velasco J, Rojas, J, Morales A. Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *Dealbata* (Clusiaceae) Collected in Venezuela. Nat Prod Comm 2: 185 – 188; 2006.
23. Kuete V, Nguemeving J, Beng V, Azebaze A, Etoa F, Meyer M, Bodo B. y Nkengfack E. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia Laurentii* De Wild (Clusiaceae). Journal of Ethno-Pharmacology 109: 372-379; 2007.
24. Pino B., Córdova C., Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de Quibdó – Chocó. En: Scientia et Technica Año XIII, No 33, Mayo de 2007. UTP, 387-390.
25. Carpio A. Estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral. UPCH-Lima; 2008.
26. Chín, Y.; Jung, H.; Chaí, H.; Keller, W. y Kinghorn, A. Xanthones with quinone reductase- Inducing activity from the fruits of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). Phytochemistry.2008; 69: 754-758.

27. Andoque, H; Andoque, D; Andoque, H; Andoque, R; Andoque, M. Plantas medicinales de la gente de Hacha. Instituto Amazónico de Investigación. IMANI. 2009, pp.106.
28. Marín J.K. Estudio Fitoquímico de *Vismia Cayennensis* y su posible actividad biológica. [Tesis doctoral]. Cumaná: Servicio de Publicaciones, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre; 2009.
29. Montaña, T. IVIC investiga el uso medicinal de los recursos botánicos venezolanos. Bitácora, boletín informativo IVIC, 27 de mayo de 2009. Pág. 1.
30. Sanz-Biset J, Campo de la Cruz J, Epiquien M, Cañigüeral S. A First Survey on the medicinal Plants of the Chazuta valley (Peruvian –Amazonan). J. Ethno-Pharmacology 122: 333 – 362; 2009.
31. Tamokou J, Tala M, Wabo H, Kuate J, Tane P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. Laboratory of Microbiology and Antimicrobial Substances, Faculty of Science, University of Dschang, En: Journal of Ethnopharmacology Volume 124, Issue 3, 2009, Pages 571–575.
32. Gonzales. K y Toro. T. Análisis y Evaluación fitoquímica de los metabolitos secundarios de *Vismia ferruginea* (Clusiaceae). Colombia. Rev. Biológica, 2010.
33. Perez. A, Rojas. S, Rodríguez. J. Doncel. A, Arrieta. I, Arrieta. J, Martínez. J, Mielles. J, Rodríguez. A, Chamorro. L. Evaluación de métodos para medir la actividad inhibitoria de extractos vegetales nativos del departamento de Sucre sobre bacterias y levaduras patógenas. Rev. Colombiana cienc.2011, 3 (1).

34. Vizcaya M, Morales A, Rojas J, Nuñez R. Revisión bibliográfica sobre la composición Química y actividades farmacológicas del genero *Vismia*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2012; 11 (1): 12– 34.
35. Raven P, Evert R, Eichhorn S. *Biology of Plants. "Plant Systematics: Science of Biological Diversity"*. 6ª ed; 1999.
36. Peter H. Raven, Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn. *Biology of Plants. "Plant Systematics: Science of Biological Diversity"*. 6ª ed; 1999.
37. Morales Segura M, Morales Montesinos J. “Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos”: Hacia una fitomedicina (fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica. *Plantas medicinales y Medicina natural* 2da ed; 2009.
38. Lock O. *Métodos de Estudios de Productos Naturales*. Perú: Fondo Editorial; 1994.
39. El mundo de las plantas medicinales. Importancia de las plantas medicinales. Copyright©1999-2010 Botanical-online SL. URL Disponible en: <http://www.botanical-online.com/plantasmedicinalesimportancia.htm>.
40. Brako L, Zarucchi J L. Catalogue of the flowering plants, *Angiosperms* and *Gymnosperms* of Peru. *Monographs in systematic botany from the Missouri botanical garden* 1993; 358 pp.
41. Cárdenas D, López R. *Plantas Útiles de la Amazonia Colombiana* Departamento del Amazonas: Perspectivas de los productos forestales no Maderables. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Ministerio del Medio Ambiente. Colombia; 2000.

42. Nkengfack A E; Mkounga P; Meyer M; Fomun Z T; Bodo B. Three prenylatedxanthonones with antimicrobial properties from the roots of *Symphoniaglobulifera*. *Phytochemistry*; 2002; 61: 181-187.
43. Fredrickson J, Zachara J, Balkwill D. *Apple Environ Microbiology* [en línea]. Washington. O' Reilly; 2004. [fecha de acceso 03 de febrero 2013] URL disponible en: <http://www.grnadapuebla.net.org/cgi/content/full/biblioteca>.
44. Alvarado J. *Apuntes Médicos del Perú. Farmacología 3^{era} parte*. Lima – Perú; 1999.
45. Estudio de la microbiología [en línea]. *Abc España*; 1996 [fecha de acceso 03 de febrero 2013] URL disponible en: <http://micro.abc.org/cgi/content/micro/servi.htm>.
46. Martínez- Ordiozola P, Muñoz- Sanchez P, Gutierrez- Macías A, Arriola- Martínez P, Montero- Aparicio E, Ezpeleta- Baquedano C. Análisis de 182 episodios de bactericemia por enterococo: Estudio de la epidemiología, microbiología y evolución clínica. *Enferm. Infecc.Microbiol.Clin.*25:503-7; 2007.
47. Farmer J. *Enterobacteriaceae: Introduction and Identification of Clinical microbiology*.Washington.D.C.ASM. 6^oed; 1995.
48. Le, J. et al. Infecciones del Aparato Urinario durante el Embarazo, *Annal of pharmacotherapy*. Oct; 38 (10): 1692-1701; 2004.
49. Pontificia Universidad Católica de Chile. Infección Urinaria, Diagnóstico y Tratamiento. *Boletín Escuela de Medicina*. 1997; 26: 150-155.
50. Boop CA, Brener FW, Wells JG, Strockbine N. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. En: *Manual of clinical microbiology*. Muray PR. Jo Baron, MA Ptaller, FC Yolken. The Washington, D.C.E. d. ASM. Press. 1999: 459-474.

51. Crespo, M. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. Colombia Médica Vol. 33 N°4. Pág. 179 – 193; 2002.
52. Hurtado, MP; de la Parte, MA; Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. (HTML). Rev Soc Ven Microbiol (Venezuela: Scielo): Julio 2002; 22 (2): pp. 112-118. ISSN1315-2556. Archivado del original el Desconocido. Consultado el 22 de febrero de 2013.
53. Lowy, Franklin D. *Staphylococcus aureus* infections (en inglés, PDF). *NEJM* (Estados Unidos: Massachusetts Medical Society): 20 de agosto 1998; 339 (8): pp. 520-532. Consultado el 7 de febrero de 2013.
54. Musser J, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: Association of the gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination (en inglés). *J Clin Microbiol* 2002; (30): pp. 2058-63.
55. Nataro JP, Kaper JB. Diarrhea genic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*11:142-20; 2011.
56. Cáceres G; Moroni A., Bramuglia G., Mato G. Monitoreo Terapéutico de Drogas. *Medicina Infantil* 15 (2): 156-8; junio 2008.
57. Mediavilla. A, Flórez. J, García-Lobo. J. *Farmacología Humana*.3a. ed. Barcelona: Masson, S.A; 2000.
58. Calderon JE: Consideraciones Generales sobre el Uso de Antimicrobianos. en: *Aplicación Clínica de Antibióticos y Quimioterápicos*. edit. Méndez Cervantes. 7a. edición 53:85; 1997.

59. Campbell BA, Cox SM: Penicilinas. Med Clin North Am. Uso de antibióticos en obstetricia y Ginecología edit. Interamericana 3: 427-439; 2002.
60. Erickson J. Penicilinas de espectro extendido en Cuidados intensivos temas actuales. Antibióticos en cuidados intensivos. 1:79-98; 2002.
61. Chambers. H., Sande. M. Fármacos antimicrobianos: Aminoglucósidos. Quimioterapia de las enfermedades microbianas.9 (46), 1-19, 2010.
62. Farran EW. Bacterial resistance. En: Lambert H, O'grady P. Antibiotic and chemotherapy. 6 ed. Londres Churchill Livingstone, 1992:303-12.
63. Mayer KH, Opalg M, Medeiros HA. Mechanisms of antibiotic resistance. En: Mandell GL, Douglas JR, Bennetteje, eds. 3 ed. Londres,Churchill Livingstone, 2003:206-18.
64. Medeiros A. recent increases in resistance: mechanisms and organism. Clin Infect Dis 2007;24(1):519-45.
65. Norby SR. Treatment failures with broad-séctrum antibiotics. Scand J Infect Dis 2001; 78: 64-70.
66. Cordiés Jackson L, Vázquez Vigoa A. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Revisión bibliográfica. Rev Acta Médica 1990; 4(2):165-92.
67. Cisneros Benavides E, Gómez Enchelmaun M. Trasferencia y resistencia al suero en cepas gramnegativas multiresistentes a las drogas antimicrobianas. Rev Latinoa Microbiol 2007; 29:27.
68. Silva J Jr. Community-acquired pneumonia - it is time for the penicillin bullet to be replaced?. West J Med 2006; 164:79-80.

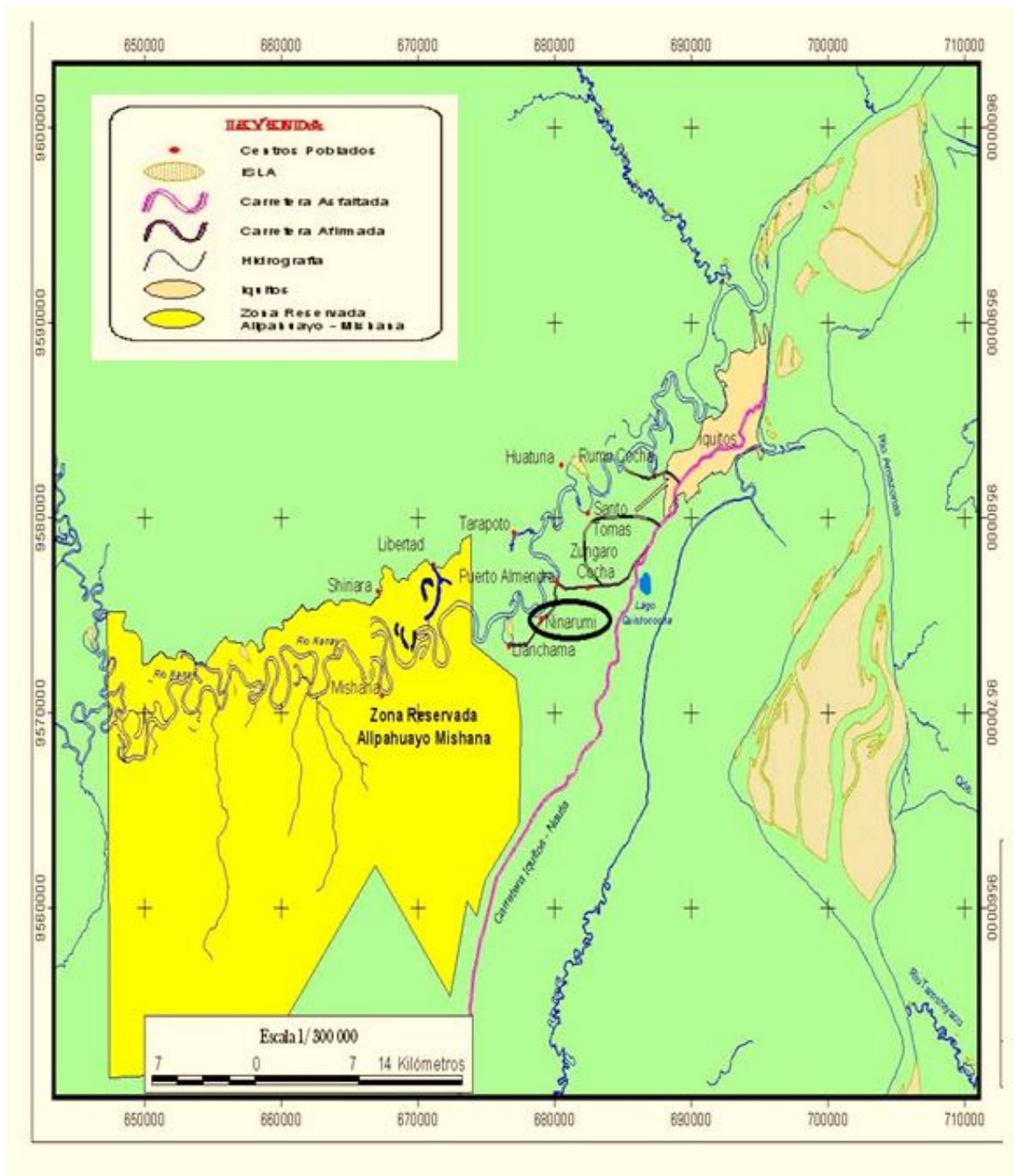
69. Calderwood S, Moellering D Jr. Principios de tratamiento antiinfeccioso. En: Stein LH. Medicina interna. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 2008: 1469-86.
70. Coloraciones bacterianas. En: Bowman WC, Raud M. Farmacología: bases químicas y patológicas. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1987; 13:6-16.
71. Young L.S. Tratamiento antimicrobiano. En: Wyn gaarden J, Lloyd HS, Bennett J, eds. Cecil: tratado de Medicina Interna. 19 ed. México, DF: Nueva Editorial Interamericana, 1994;1859-72.
72. Phillipson D. Fitoquímica y plantas medicinales. Phytochemistry. Vol. 56, 237-243; 2001.
73. Newman J. Gragg M. Snader M. Natural products as sources of news drugs over the period 1981– 2002. J. Nat. Prod; 2003.Vol.
74. Amorim C. Lima A. Higinio S. Silva S. Fitoterapia: Instrumento para una mejor calidad de vida. Infarma. Albuquerque, U.P; 2003. Vol. 15, (1-3) 66-69.
75. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Sensibilidad antibacteriana a antibióticos [en línea]; 2008. [fecha de acceso 03 de febrero 2013].URL disponible en:http://www.danival.org/microclin/antibiot/_madreantibiot.html.
76. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard. NCCLS Document M2-A7. 7th ed. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.

77. Valera A. Souza V. Cerritos R. Cruz A. Susceptibilidad microbiana a antibióticos y extractos naturales. Manual de prácticas laboratorio de biología de procariontes. Valores referenciales estándares de Concentración Mínima Inhibitoria de Gentamicina; 2010.
78. Sacsquispe, R. Velásquez, J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud, Serie de Normas Técnicas N° 30; Lima – 2002.
79. Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – EsSalud 2007.
80. Domingo, D y López-Brea. Plantas con acción antimicrobiana. Servicio de microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. Rev. Esp Quimioterap, 2003; Vol. 16 (4): 385-393.
81. Mbaveng, A. Kuete, V. Nguemeving, J. Beng, V. Nkengfack, A. Meyer, J. Lall, N. Krohn, K. Antimicrobial activity of the extract and compounds obtained from *Vismia guineensis* (Guttiferae). Asian Journal of Traditional Medicines, 2008, 3(6).
82. Cowan, MM. Plantas products as antimicrobial agents. Clinical Microbiol. Rev.1999, 12(4): 564-82.

ANEXOS

ANEXO 01:

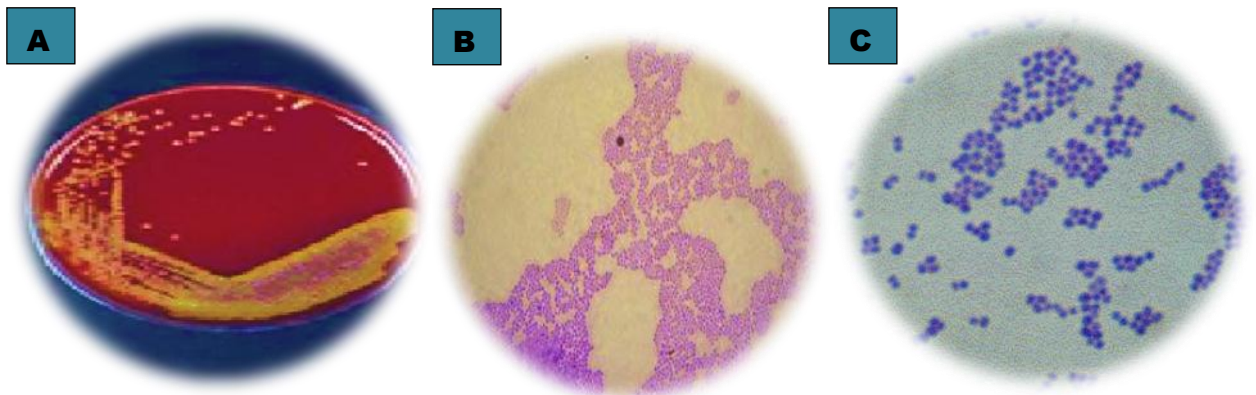
IMAGEN SATELITAL DE LA UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA COMUNIDAD DE NINA-RUMI



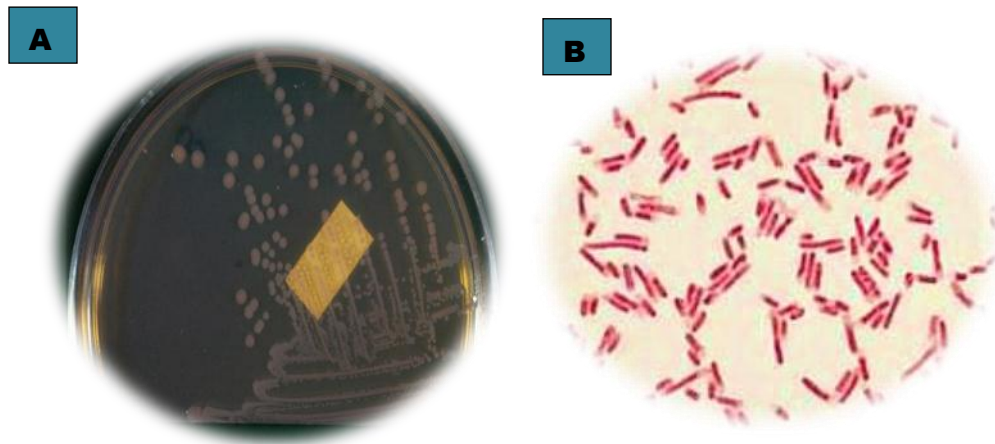
ANEXO 02:

MUESTRAS BACTERIOLÓGICAS DEL ESTUDIO.

Especie bacteriológica de *Staphylococcus aureus*: **A.** Medio de cultivo sólido Agar sangre utilizado para el crecimiento bacteriológico **B.** Representación de la visión por medio del microscopio de las colonias *Staphylococcus aureus* **C.** Características fenotípicas de los cocos grampositivo presentando la forma de racimos de uvas.



Especie bacteriológica *Escherichia coli*: **A.** Representación del cultivo específico utilizado para el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli* que presenta brillo metálico **B.** Representación de las características microscópicas de la especie Gram-negativa *Escherichia coli*, siendo una bacteria virulenta, inmóvil, presentando forma de cilíndrica de bacilo alargado.



ANEXO 03:

CONSTANCIA DE LA MUESTRA BOTÁNICA



UNAP

Herbarium Amazonense - AMAZ
Centro de Investigación de Recursos Naturales

CONSTANCIA Nº 18

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, la muestras botánica presentada por los Bachilleres: **CHAMPION CHOTA MONICA** y **VÁSQUEZ RODRÍGUEZ GÉNESIS DEL ROSARIO**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; son parte de la tesis titulada: “**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS Y CORTEZA DE *Vismia angusta* “pichirina” SOBRE AGENTES PATÓGENOS. IQUITOS-PERÚ, AÑO 2013**”. La cual fue verificado e identificado en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Nombre común	Nombre Científico	Familia
“Pichirina”	<i>Vismia angusta</i> Miq.	CLUSIACEAE

Se expide el presente certificado al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 11 de Junio del 2013

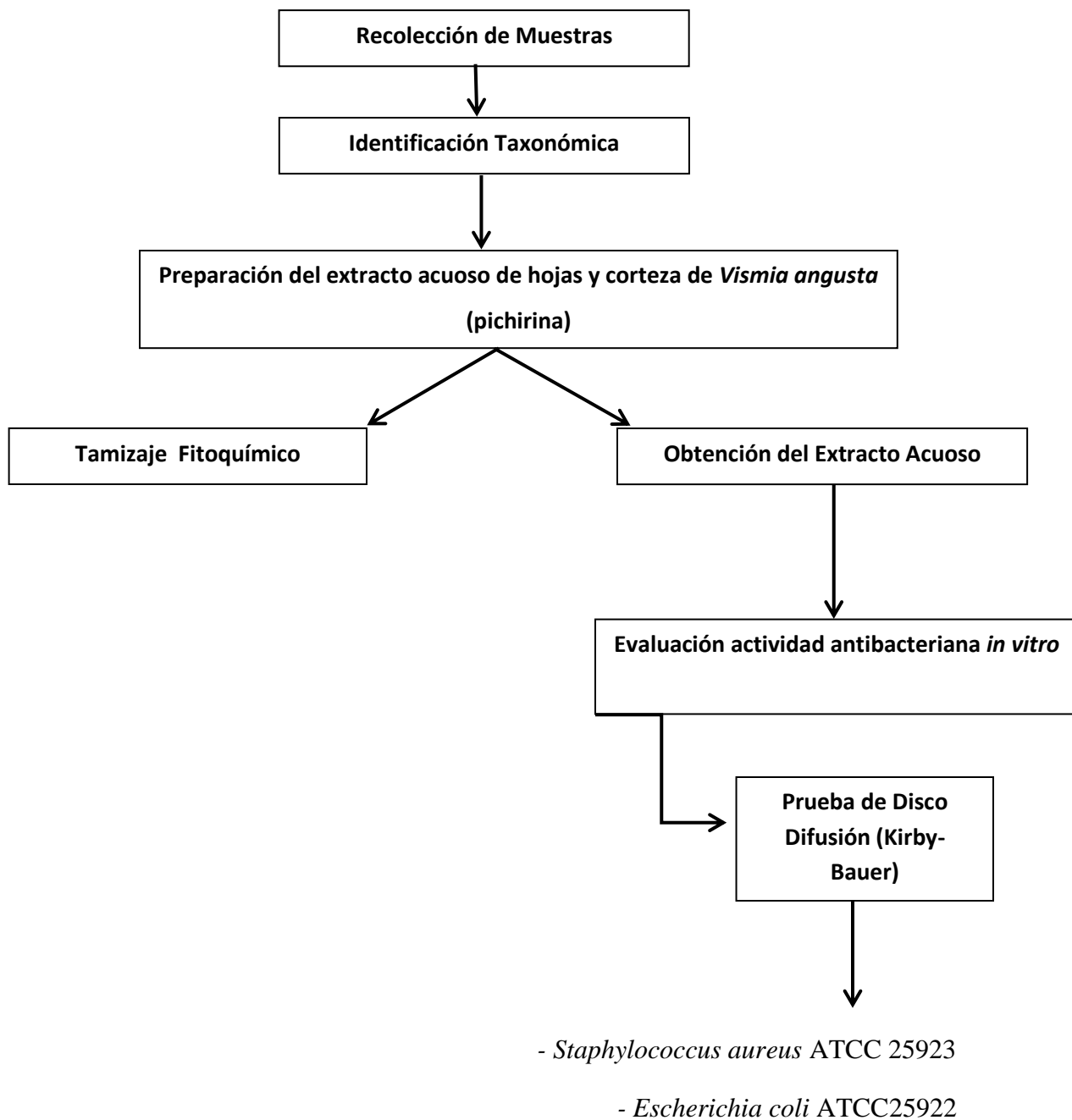
Atentamente,


Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA M.sc.
Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP



ANEXO 04:

FLUJOGRAMA DE INVESTIGACIÓN



ANEXO 05:

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL HOJAS Y CORTEZA DE

Vismia angusta

Foto 01: *Vismia angusta*



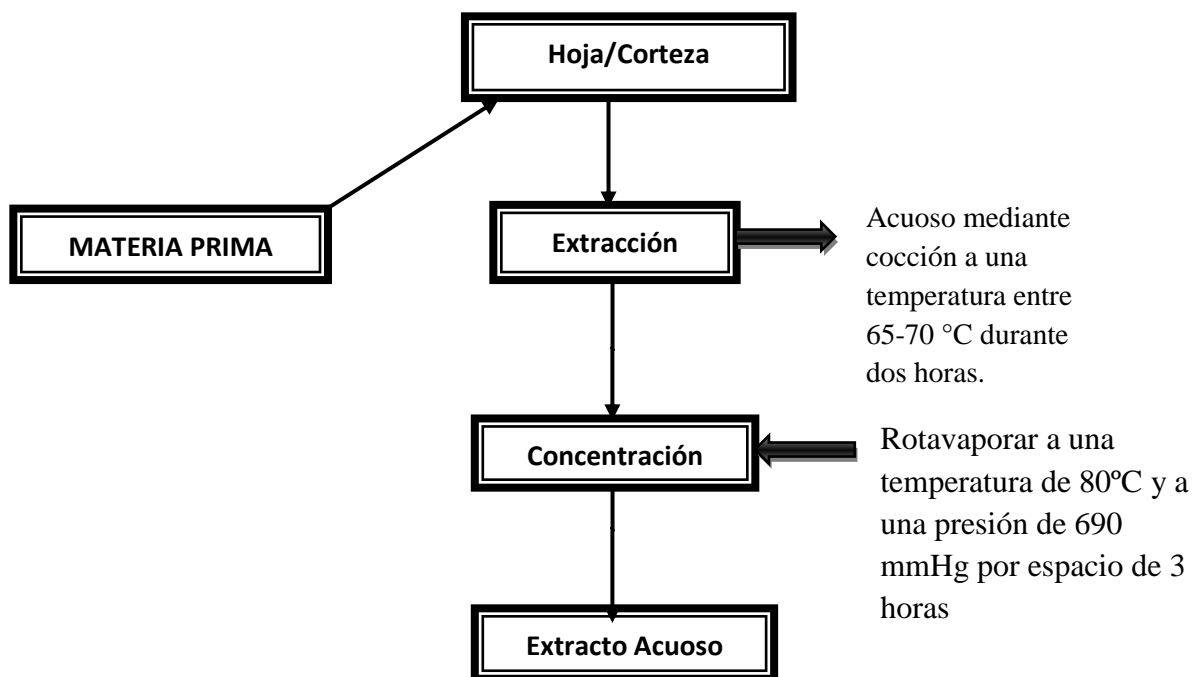
Foto 02 y 03: Se distribuyeron las hojas y la corteza de *Vismia angusta* para ser secados.



Foto 04: Se pulverizado de la Muestra Vegetal.

ANEXO 06:

ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJA Y CORTEZA DE *Vismia angusta*



ANEXO 07:

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO
ACUOSO DE HOJA Y CORTEZA DE *Vismia angusta*



Foto 05: Polvo y Desmenuzados de Hojas y Corteza de *Vismia angusta*



Foto 06: Cocción de la Especie vegetal.



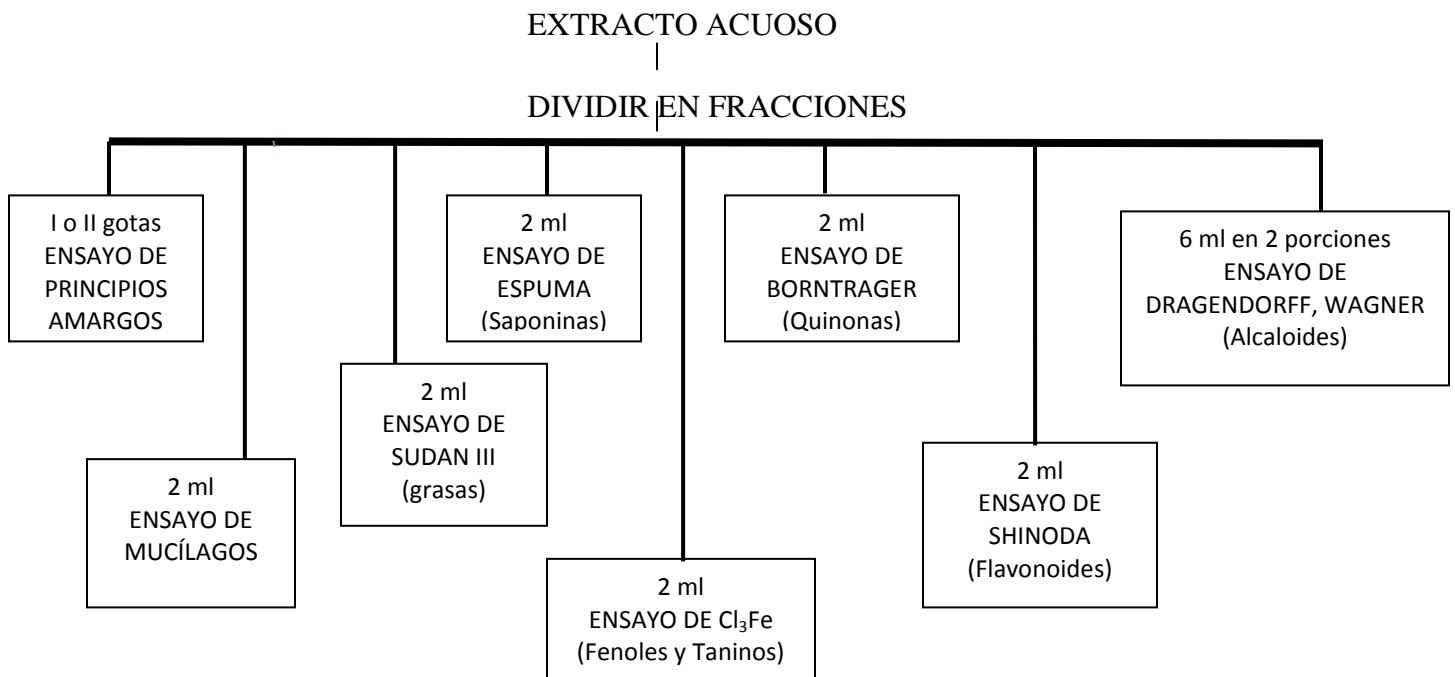
Foto 07: Filtrado de la Especie Vegetal.



Foto 08: Concentrado de la muestra.

ANEXO 08:

ESQUEMA DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO CUALITATIVO



ANEXO N°09:

PROTOCOLO DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO SEGÚN OLGA LOCK

Técnica Operatoria

Se determinó la presencia de metabolitos secundarios en el extracto acuoso de *Vismia angusta* mediante ensayos de identificación cualitativa.

-Identificación de Alcaloides:

Ensayo de Dragendorff: A 2g de la muestra disolver en 1 mL. De solución de ácido clorhídrico al 1%. A la disolución resultante se le adicionan III gotas del reactivo de Dragendorff para detectar la presencia de alcaloides. Si se trata de un extracto acuoso, a la alícuota se le añade I gota de ácido clorhídrico concentrado. Un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de alcaloides.

Ensayo de Wagner: A la solución se le adiciona 2 o 3gotasde la solución reactiva de Wagner respectivamente, si se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito.

En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescenciapuede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

-Identificación de Quinonas:

Ensayo de Borntrager: La fracción disuelta en 1 ml de cloroformo se agita con 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o de amonio al 5% y se deja en reposo hasta su separación. El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, que se reporta (++) , o rojo, que se reporta (+++).

-Identificación de Saponinas:

Ensayo de espuma: Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye 5 veces su volumen con agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 a 10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

-Identificación de Fenoles y/o Taninos:

Ensayo del cloruro férrico: A la fracción acuosa (1 mL) se le añaden 0,5 mL de una disolución de cloruro férrico al 5% en solución salina, posteriormente se añade acetato de sodio previo al ensayo. La aparición de un color o precipitado verde, rojo, azul o negro indica la presencia de fenoles y/o taninos.

-Identificación de Flavonoides:

Ensayo de Shinoda: Se realizará con el extracto acuoso. Se toma 1 mL del extracto, se le adicionan 2 mL de agua. Posteriormente se adiciona 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de magnesio metálico. La aparición de coloración indicará la presencia o ausencia de Flavonoides:

Amarillo- Rojo: Flavonas,

Rojo Magenta: Flavanonoles,

Rojo Magenta, Violeta Azul: Flavanonas.

-Identificación de grasas:

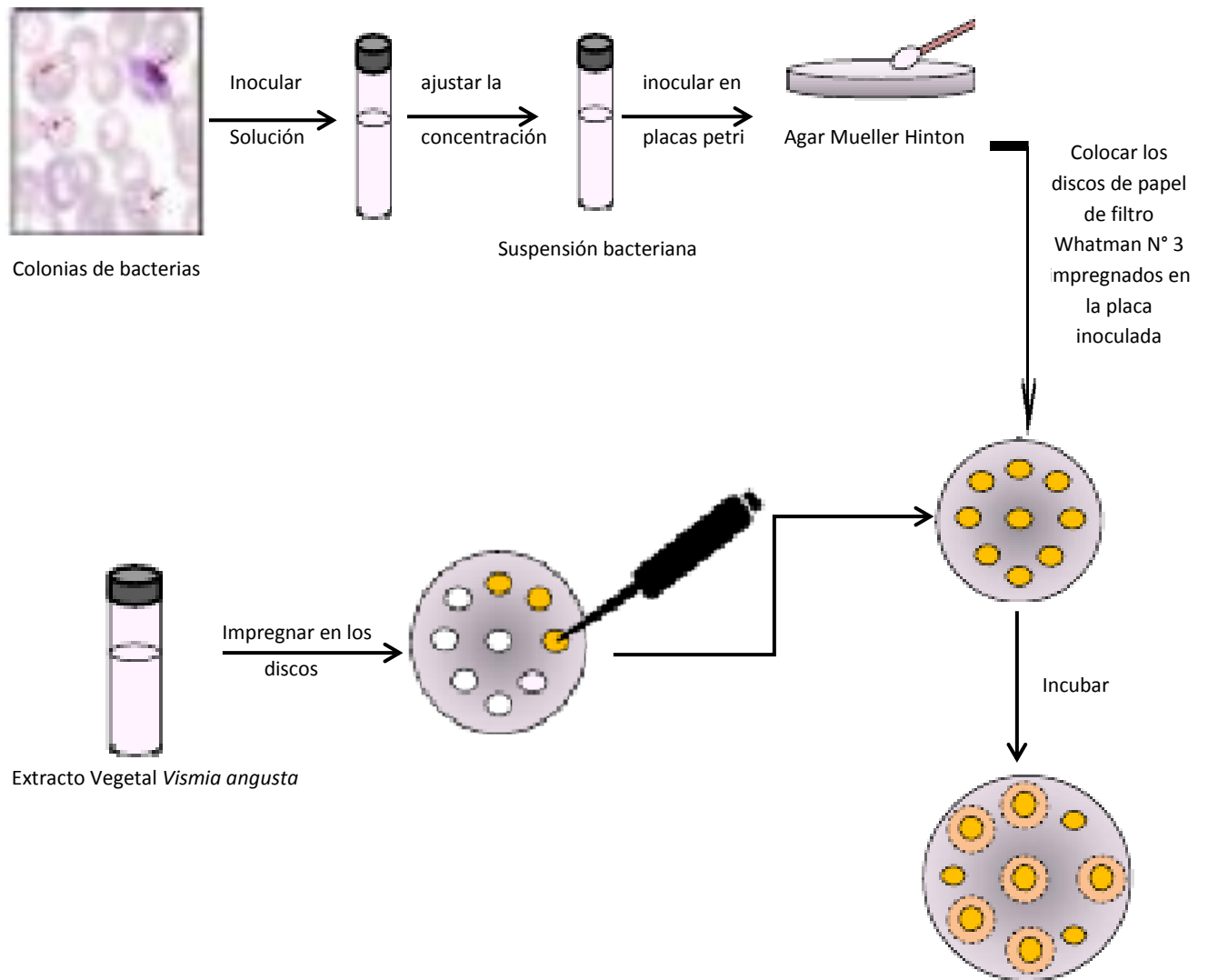
Ensayo sudan III: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente.

-Otros ensayos:

Ensayo de mucílagos: Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello, a una alícuota del extracto en agua se enfría entre 0°C a 5°C. Si la solución toma una consistencia gelatinosa, el ensayo es positivo.

Ensayo de principios amargos y astringentes: El ensayo se realizará saboreando I gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios bien diferenciados al paladar.

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



ANEXO 11:

EVALUACIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro*



Foto 10: Cepas Bacterianas del Instituto Nacional de Salud.



Foto 11: Gentamicina

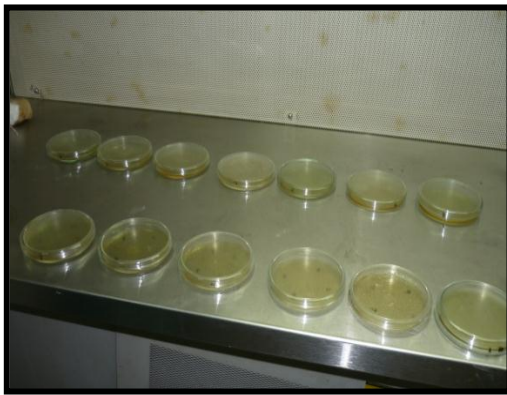


Foto 12: Medio agar Tripticasa de Soya (TSA) para el cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Foto 13: Bacterias reactivados en Caldo Tripticasa de Soya





Foto 14: Inoculación de la cepa bacteriana

Foto 15: Ajuste de la turbidez según la escala de Mc. Farland.

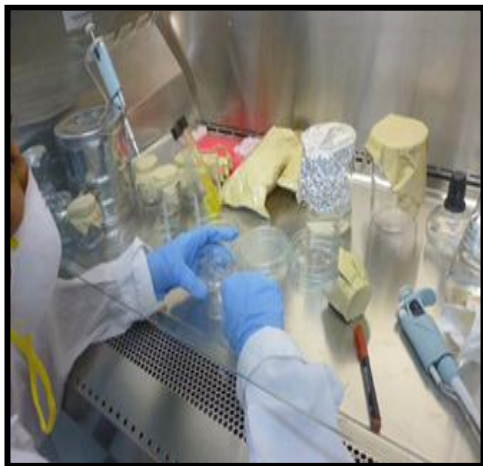
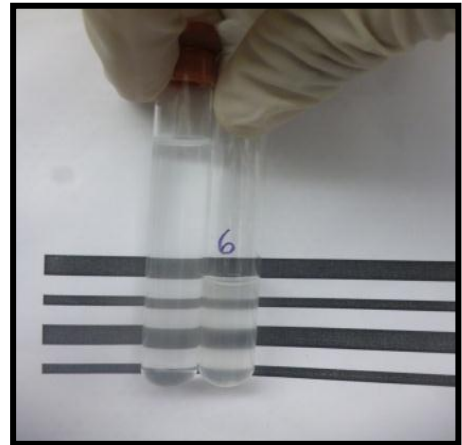


Foto 16: Sembrando de las cepas bacterianas en forma de estrías con el hisopo en tres direcciones.

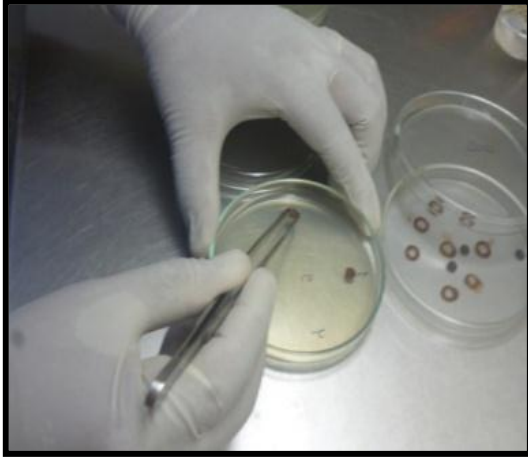


Foto 17: Aplicación de los discos de sensibilidad.

Foto 18: Incubación de las cepas bacterianas.



ANEXO 12:

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Foto 19: Actividad antibacteriana de la corteza de *Vismia angusta* frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL

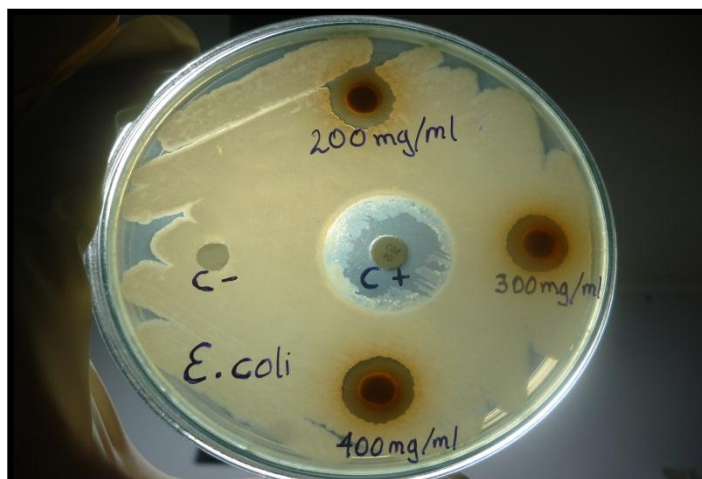
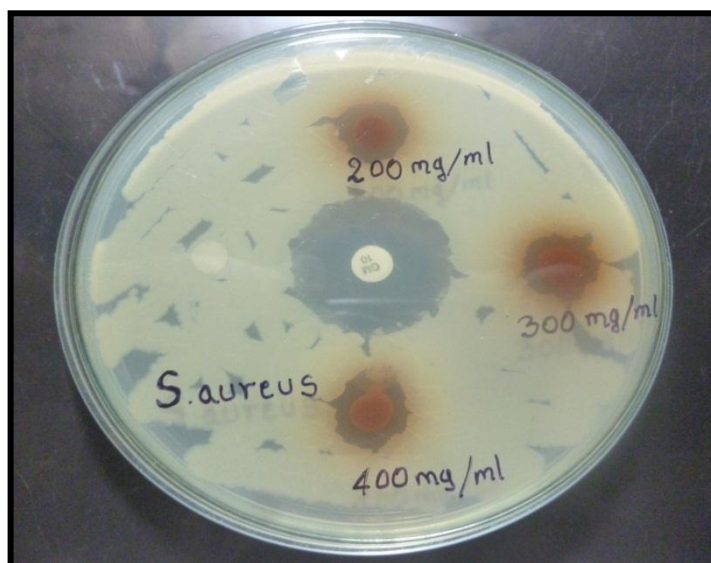


Foto 20: Actividad antibacteriana de la corteza de *Vismia angusta* frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL



ANEXO 13:

Foto 21: Actividad antibacteriana de hojas de *Vismia angusta* frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL

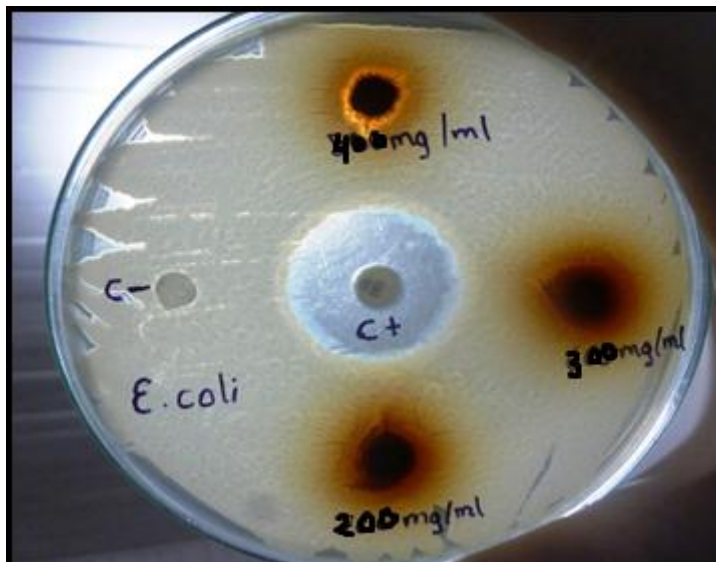
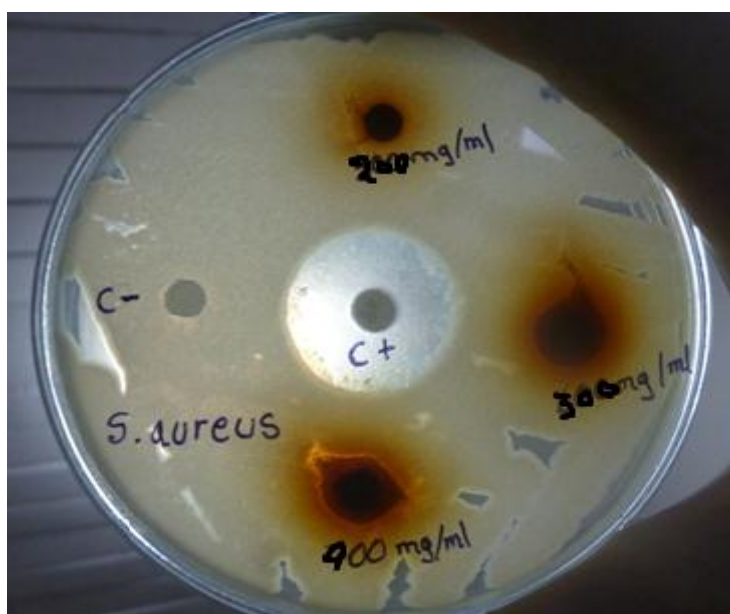


Foto 22: Actividad antibacteriana de hojas de *Vismia angusta* frente a *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/mL



ANEXO 14:

MEDIOS DE CULTIVO

1.- Agar Trypticase de Soya:

COMPOSICIÓN:

- Polisorbato 80.....5 g/L
- Hisditina.....1 g/L
- Peptona de Soja.....5 g/L
- Sodio Tiosulfato.....0,5 g/L
- Lecitina.....0,7 g/L
- Peptona de Caseína.....15 g/L
- Sodio Cloruro.....5 g/L
- Agar.....15 g/L
- pH final (7.3 +/- 0.2).

USOS:

El Agar Trypticase de Soya es utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies, para el mantenimiento de cepas ATCC y para el análisis de aguas y alimentos. Además garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto grampositivos como gramnegativos aerobias.

FUNDAMENTO:

Es un medio de cultivo Recomendado para la recuperación y aislamiento de toda clase de bacterias, hongos y levaduras. La presencia de Lectina y Tween permite neutralizar la actividad antibacteriana, facilitando la investigación de los gérmenes en productos o superficies que contengan: Aldehídos, derivados fenólicos, o amonio cuaternario.

La aportación de caseína y peptonas de soja al Agar de Trypticase-soja hace al medio muy nutritivo por el suministro de nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y péptidos de cadena más larga. La presencia de estas peptonas en el medio permite el cultivo de una gran variedad de gérmenes aerobios y anaerobios.

PROCEDIMIENTO:

El agar Trypticase de Soya debe permitir el crecimiento abundante de todos los microorganismos en estudio después de 18 horas de incubación en atmósfera de aerobiosis.

Cualquier muestra puede ser procesada en este medio y puede sembrarse por diferentes métodos así:

1. El medio agar tripticasa de soya debe conservarse a temperatura de 4-8°C colocando las placas en posición invertida para evitar que el agua de condensación pueda caer sobre la superficie del medio.
2. Con asa bacteriológica estéril trabajando siempre a la llama del mechero, tomar una mínima muestra.
3. Sembrar suavemente sobre la superficie tersa del medio por el procedimiento de agotamiento.
4. Incubar las placas en posición invertida a 37°C en aerobiosis.
5. Al término de 18-24 horas de incubación examinar el cultivo y determinar los estudios a seguir si se requieren.

Nota: Para la evaluación microbiológica de áreas y superficies utilice como método de siembra el método de sedimentación o el método del hisopo impregnado e incube.

2.- Caldo Trypticase de Soya:

COMPOSICIÓN:

- Peptona de caseína.....17.0 g
- Peptona de harina de soya.....3.0 g
- D(+)-Glucosa.....2.5 g
- Cloruro de Sodio.....5.0 g
- Hidrógenofosfato di-potásico.....2.5 g

Disolver 30 g en 1 litro de agua destilada llevar a calentar por unos minutos hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.- Agar Mueller Hinton:

COMPOSICIÓN:

- Infusión de carne.....300g/L
- Ácido Casamino.....17,5 g/L
- Almidón.....1,5 g/L
- Agar.....17 g/L
- pH final (7.4 +/- 0.2).

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
2. Autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C - 50°C.
3. Una vez esterilizado y solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse:
 - a. Utilizando un electrodo de superficie
 - b. Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión

- c. Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro
4. Repartir el medio en placas petri (60 ml – 70 ml o 25 ml – 30 ml, para placas de 150 mm o 100 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.
 5. Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30°C – 35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser, luego, descartadas.

4.- Tubo de 0.5 de la Escala de McFarland

COMPOSICIÓN:

- Cloruro de Bario 0.048M.....0.5 ml
- Ácido Sulfúrico 1%.....99.5 ml

Agregar 0.5 ml de una solución de BaCl₂ 0.048M (BaCl₂ 2H₂O al 1.157% P/V) a 99.5 ml de una solución de H₂SO₄ 0,18M (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.

ANEXO 15:

RESULTADO DEL TAMIZAJE



Foto 23: Coloraciones respectivas según los ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta*

Foto24: Coloraciones respectivas según los ensayos realizados en el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta*

