

**“AÑO DE LA CONSOLIDACIÓN DEL MAR DE GRAU”**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**



**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A  
*Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; POR EL  
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR”**

**Presentado Por los Bachilleres:**

**RIOS MACEDO, MARCOS ANDRES  
FLORES HERNANDEZ, JHON KLAUSSEN**

**Asesores:**

**M.C. CHARLES OCAMPO FALCON.  
Blga. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE.**

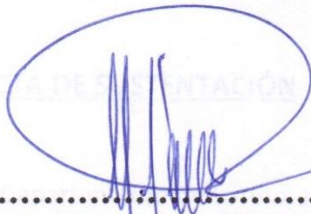
**CO-ASESOR.**

**Q.F. JHESUS JEAN PIERRE LOPEZ MESIA**

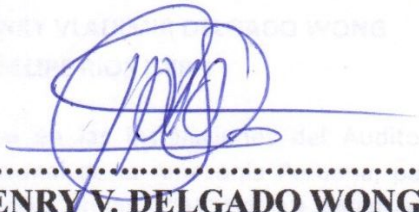
**IQUITOS – PERÚ**

**2016**

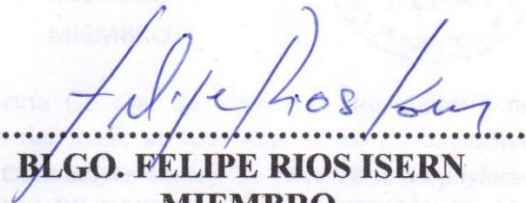
**JURADO CALIFICADOR**



.....  
**Ing. GLADYS CARDENAS DE REATEGUI**  
**PRESIDENTE**



.....  
**Q.F. HENRY V. DELGADO WONG**  
**MIEMBRO**



.....  
**BLGO. FELIPE RIOS ISERN**  
**MIEMBRO**

**ASESORES:**

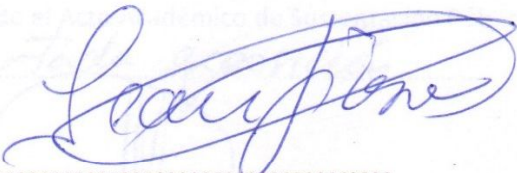


.....  
**M.C. CHARLES OCAMPO FALCÓN**  
**ASESOR**



.....  
**BLGA. JESSY P. VASQUEZ CHUMBE**  
**ASESOR**

**CO-ASESOR**



.....  
**Q.F. JHESUS JEAN PIERRE LOPEZ MESIA**





"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 14 días del mes de Julio del dos mil dieciséis, siendo las 13:00 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 103-FFB-UNAP-2016, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- > ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS PRESIDENTA
- > Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG MIEMBRO
- > BLGO. FELIPE RÍOS ISERN MIEMBRO



Se constituyeron en las instalaciones del Auditorio de la Oficina General de Bienestar Universitario de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*; POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR", presentado por los Bachilleres MARCOS ANDRES RIOS MACEDO y JHON KLAUSSEN FLORES HERNÁNDEZ, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

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

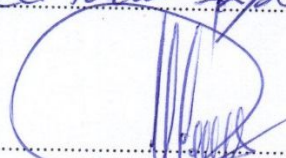
Satisfactoriamente


Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

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



Siendo las 14:30 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su acertada exposición

  
ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS  
PRESIDENTA

  
Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG  
MIEMBRO

  
BLGO. FELIPE RÍOS ISERN  
MIEMBRO

*TESIS*

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A  
*Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; POR EL  
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR”**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* Y *Escherichia coli*; POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR”**

**Ríos Macedo, M.A<sup>1</sup>.; Flores Hernández, J.K<sup>1</sup>**

**1: Bachilleres en Farmacia y Bioquímica; FFBQ-UNAP-IQUITOS**

---

**RESUMEN**

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de microbiología de los alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias; las muestras de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma) fueron recolectadas en Nina Rumi – Carretera Zungarococha – San Juan – Iquitos. El principal objetivo del estudio fue determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “Pie de Paloma” mediante los métodos de Macrodilución y Difusión en agar. Las cepas utilizadas fueron: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27833, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como control positivo se usó el antibiótico Gentamicina y como control negativo una solución de etanol/agua a concentración 1:1 (50% / 50%).

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “Pie de Paloma” evidenció la presencia de triterpenos y esteroides, fenoles y taninos, alcaloides, lactonas, curmarinas y flavonoides.

Con respecto a la actividad antibacteriana del extracto etanólico, frente a *Escherichia coli*, a concentración de 12mg presentó un halo de inhibición de 19.7 mm, mientras que en la concentración de 6mg presentó un halo de 15.7mm. Frente a *Staphylococcus aureus*, a concentración de 12mg presentó un halo de inhibición de 28.3 mm, mientras que en la concentración de 6mg presentó un halo de 22.7mm. Frente a *Pseudomonas aureginosa*, a concentración de 12mg presentó un halo de inhibición de 19.3 mm, mientras que en la concentración de 6mg presentó un halo de 14.7mm.

Mediante el método de macrodilución, el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “Pie de Paloma” demostró ser **muy activo** frente a *Escherichia coli* (CMI: 2mg/ml); para *Staphylococcus aureus*, demostró ser **muy activo** (CMI: 4mg/ml), de igual manera frente a *Pseudomonas aureginosa* (CMI: 4mg/ml).

**Palabras claves:** Actividad antibacteriana, Extracto etanólico, *Chamaesyce thymifolia*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

**“ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Chamaesyce thymifolia* (Pie de Paloma)  
AGAINST *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*;  
BY MACRODILUTION AND AGAR DIFFUSION”**

**Ríos Macedo, M.A<sup>1</sup>.; Flores Hernández, J.K<sup>1</sup>**  
**1: Degree in Pharmacy and Biochemistry; FFBQ-UNAP-IQUITOS**

---

**ABSTRACT**

This work was carried out in the food microbiology laboratories at the Faculty of Food Industries; *Chamaesyce thymifolia* samples (pie de paloma) were collected at Nina Rumi - Road Zungarococha - San Juan – Iquitos. The main objective of the study was to assess the in vitro antibacterial activity of ethanol extract of *Chamaesyce thymifolia* "Pie de Paloma" by Macrodilution and agar diffusion. The strains used were *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27833, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As positive control was used the antibiotic Gentamicin and as negative control a solution of ethanol / water concentration 1: 1 (50% / 50%).

The phytochemical screening of the ethanol extracts of *Chamaesyce thymifolia* "Pie de Paloma" showed the presence of triterpenoids and steroids, phenols and tannins, alkaloids, lactones, curmarinas and flavonoids.

Concerning the the ethanolic extract antibacterial activity, against *Escherichia coli*, a concentration of 12mg presented an inhibition of 19.7 mm, while the concentration of 6mg presented a halo of 15.7mm. Against *Staphylococcus aureus*, a concentration of 12mg showed an inhibition of 28.3 mm, while the concentration of 6mg presented a halo of 22.7mm. Against *Pseudomonas aeruginosa*, concentration of 12 mg presented an inhibition of 19.3 mm, while the concentration of 6mg presented a halo 14.7mm.

By method of Macrodilution, the ethanol extract of *Chamaesyce thymifolia* "Pie de Paloma" proved to be **very active** against *Escherichia coli* (MIC: 2mg / ml); for *Staphylococcus aureus* it proved to be **very active** (MIC: 4 mg / ml), likewise against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC: 4 mg / ml).

**Keywords:** Antibacterial activity, ethanolic extract, *Chamaesyce thymifolia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, **William Ríos Puerta** y **Elizabeth Macedo Vela**, porque a ellos les debo todo lo que soy, por su apoyo constante e incondicional y sobre todo porque siempre creyeron en mí.*

*A mis hermanos **Eva María**, **Carlos William** y **Rony Reynaldo** que siempre están ahí dándome fuerzas para seguir adelante con mis metas y siempre seguir mirando con positivismo todos los obstáculos que se me presentan en la vida.*

*A todos ellos que son una pieza importante en mi vida, porque de ellos aprendí y crecí no solo físicamente sino espiritualmente porque sé que aunque todos se marchen serán ellos y solo ellos quienes se mantendrían siempre a mi lado en las buenas y en las malas aun cuando no estemos físicamente juntos nuestros corazones lo estarán eternamente **LOS QUIERO.***

**MARCOS ANDRÉS RÍOS MACEDO**

**GRACIAS!...**

*Dedico este trabajo a las personas más importantes para mí que son mis padres **Juan Nicolas Flores Grandez y Graciela Hernández Flores** ellos son el motor de que realice este trabajo y que siempre estuvieron al pendiente de mí para darme ese impulso para seguir adelante y mejorar cada día.*

*También quiero agradecer infinitamente a mi hermana **Claudine Salazar Hernández** por su apoyo incondicional y ser un ejemplo para mí, también a los buenos consejos de mis abuelos **Juanito Flores Pérez y Wilma Grandez García** que siempre me daban ánimos para no decaer y seguir por el buen camino.*

*No obstante también tengo un aprecio muy especial a mis amigos de la universidad, profesores y compañeros del laboratorio de la FIA que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme y brindarme sus conocimientos, no sin antes tener a Dios como mejor guía para mí a lo largo de mi vida para hacer las cosas bien, GRACIAS POR TODO.*

***JHON KLAUSSEN FLORES HERNANDEZ***

**GRACIAS!...**



## *AGRADECIMIENTOS*

*En el presente trabajo quisiéramos agradecer en primer lugar a Dios por su bendición, dándonos la oportunidad de concluir este trabajo.*

*A nuestros Asesores:*

*- Al Dr. Charles Ocampo Falcón; por apoyarnos y darnos los conocimientos referentes al trabajo y siempre estar ahí con dedicación y esmero.*

*- Al Ing. Allenguer Gerónimo Alva Arévalo; por brindarnos el laboratorio el cual está a cargo, para realizar la obtención de los extractos para nuestro trabajo.*

*- A la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, por hacer posible la realización de los ensayos del estudio, brindándonos el laboratorio de microbiología.*

*-Al Q.f. Jean Pierre López Mesia, porque fue participe en la ejecución de nuestra parte experimental.*

*-Al Bach. Alexander Javier Iman Torres por habernos apoyado de manera desinteresada en la parte microbiológica durante el desarrollo de la ejecución de la parte experimental de la tesis.*

*- A mis amigos Flavio Aldo, Mijail Anthony, Salvador Rivera y Cesar que estuvieron apoyándonos directa y a veces indirectamente en este gran proyecto de tesis.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.....</b>	<b>04</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>05</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>06</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>08</b>

### CAPITULO I

<b>1.1 INTRODUCCION.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Objetivo General.....	20
1.2.2 Objetivos Específicos.....	20

### CAPITULO II

<b>2.1 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Antecedentes.....	22
2.1.2 <i>Chamaesyce thymifolia</i> (pie de paloma).....	25
2.1.2.1 La clasificación taxonómica.....	25
2.1.2.2 Sinonimia.....	25
2.1.3 Descripción Botánica.....	25
2.1.4 Origen y Distribucion.....	26
2.1.5 Composición Química.....	26
2.1.6 Farmacología.....	27
<b>2.2 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Método de Macrodilución.....	28
2.2.2 Método de Difusión en Agar.....	29

<b>2.3 CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS EN ESTUDIO.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 <i>Pseudomonas Aureginosa</i> .....	31
2.3.1.1 Taxonomía.....	31
2.3.1.2 Características.....	31
2.3.2 <i>Escherichia Coli</i> .....	32
2.3.2.1 Taxonomía.....	32
2.3.2.2 Características.....	33
2.3.3 <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	34
2.3.3.1 Taxonomía.....	34
2.3.3.2 Características.....	34
<b>2.4 VARIABLES OPERACIONALES.....</b>	<b>36</b>
2.4.1 Variable Independiente.....	36
2.4.2 Variable Dependiente.....	36
<b>2.5 INDICADORES.....</b>	<b>37</b>
2.5.1 Método de Macrodilución.....	37
2.5.1.1 Independiente (X).....	37
2.5.1.2 Dependientes (Y).....	37
2.5.2 Método de Difusión en Disco.....	37
2.5.2.1 Independiente (X): Concentración del extracto.....	37
2.5.2.2 Dependiente (Y): Grado de sensibilidad.....	37
<b>2.6 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....</b>	<b>38</b>
2.6.1 Método de Macrodilución.....	38
2.6.2 Método de Difusión en Disco.....	39
<b>2.7 HIPOTESIS.....</b>	<b>40</b>

## CAPITULO III

<b>3.1 METODO DE LA INVESTIGACION.....</b>	<b>42</b>
3.1.1 Método de investigación.....	42
3.1.2 Flujograma de investigación.....	43
<b>3.2 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Procedimiento Experimental.....	44
3.2.1.1 Recolección de la Muestra Vegetal.....	44
3.2.1.2 Identificación de la Muestra Vegetal.....	44
3.2.1.3 Procesamiento de la muestra vegetal.....	44
3.2.1.4 Molienda de la Muestra Vegetal.....	45
3.2.1.5 Obtención del Extracto Etanólico.....	45
<b>3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Vegetal.....	46
3.3.1.1 Población Vegetal.....	46
3.3.1.2 Muestra Vegetal.....	46
3.3.2 Microbiológica.....	46
3.3.2.1 Población Microbiológica.....	46
3.3.2.2 Muestra Microbiológica.....	46
<b>3.4 PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....</b>	<b>47</b>
3.4.1 Método de Macrodilución.....	47
3.4.1.1 Recuperación de cultivos conservados.....	47
3.4.1.1.1 Congelados.....	47
3.4.1.1.2 Reactivación de Bacterias.....	47
3.4.1.1.3 Cultivo en Agar.....	47
3.4.1.2 Preparación Del Inóculo.....	48

3.4.1.3 Incubación.....	48
3.4.1.4 Preparación y control de extractos.....	48
3.4.1.5 Preparación del control positivo.....	49
3.4.1.6 Interpretación de datos.....	50
3.4.2 Método de Difusión en Disco.....	50
3.4.2.1 Preparación del Inoculo.....	50
3.4.2.2 Dilución de Extractos.....	51
3.4.2.3 Inoculación de las placas.....	51
3.4.2.4 Aplicación de los Discos.....	52
3.4.2.5 Incubación.....	52
3.4.2.6 Lectura de las placas e Interpretación de los resultados.....	52
3.4.2.7 Interpretación de datos para el método de difusión en Disco.....	53
3.4.2.7.1 Valores críticos para la medida de sensibilidad en disco.....	53
3.4.2.7.2 Procedimiento de Categorización.....	53
<b>3.5 INSTRUMENTOS Y MATERIALES.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6 ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS.....</b>	<b>56</b>
<b>3.7 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....</b>	<b>56</b>
<b>3.8 PROTECCION DE LOS DERECHOS HUMANOS.....</b>	<b>57</b>

#### CAPITULO IV

<b>4.1 RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1.1 Obtención de Extractos Vegetales.....	59
4.1.1.1 Determinación del Rendimiento de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “Pie de Paloma”..	59
4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.....	60
4.1.3 <i>Actividad antibacteriana de Chamaesyce thymifolia “pie de paloma”</i> .....	61



4.1.3.1 Método de difusión de disco (Kirby - Bauer).....	61
4.1.4 Método de Macrodilución: Determinación de la concentración Mínima inhibitoria (CIM).....	67
4.1.4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	67
4.1.5 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	68
<b>DISCUSION.....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## INDICE DE TABLAS

TABLA N° 01: Clasificación de la Muestra vegetal en estudio.....	25
TABLA N° 02: Taxonomía ( <i>Pseudomonas aureginosa</i> ).....	31
TABLA N° 03: Taxonomía ( <i>Escherichia coli</i> ).....	32
TABLA N° 04: Taxonomía ( <i>Staphylococcus aureus</i> ).....	34
TABLA N° 05: Método de Macrodilución.....	38
TABLA N° 06: Método de Difusión en Disco.....	39
TABLA N° 07: Categorización .....	53
TABLA N° 08: Rendimiento del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .....	59
TABLA N° 09: Tamizaje Fitoquímico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “Pie de Paloma” .....	60
TABLA N° 10: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomas aeruginosa</i> según diámetro de la zona de inhibicion.....	61
TABLA N° 11: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aureginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	67
TABLA N° 12: Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” frente a las bacterias en estudio.....	68

## INDICE DE FOTOS

FOTO N° 01. Filtración de los Extractos.....	83
FOTO N° 02. Concentración de los extractos mediante el rotavapor.....	83
FOTO N° 03. Extracto Etanólico.....	84
FOTO N° 04. Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio.....	84
FOTO N° 05. Microtubos, tips para micropipetas, matraz con Agar M.H, tubos de CINa Antes de ser llevados al autoclave.....	85
FOTO N° 06. Placas para los ensayos después de sacarlos de la estufa.....	85
FOTO N° 07. Preparación de las placas con Agar M.H para los ensayos.....	86
FOTO N° 08. Siembra de las bacterias en las placas para los estudios.....	86
FOTO N° 09. Crecimiento de las bacterias de Estudio después de 24 horas de Incubación.....	86
FOTO N° 10. Cultivo bacteriano en tubo de CINa 0.9% para su respectivo crecimiento (Izquierda). Patrón de Mac farland (Derecha).....	87
FOTO N° 11. Procedimientos realizados del ensayo de Macrodilución.....	87
FOTO N° 12. Secuencia de microtubos realizados aplicando el ensayo de macrodilución con el Extracto de fruto y hoja de <i>Capsicum frutescens</i> para <i>Pseudomonas Aureginosa</i> , <i>staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	88
FOTO N° 13. Resultados de E.C, Difusión en Disco. <i>staphylococcus aureus</i> .....	88
FOTO N° 14. Resultados de E.C, Difusión en Disco. <i>Pseudomona aureginosa</i> .....	89
FOTO N° 15. Resultados de E.C, Difusión en Disco. <i>Escherichia coli</i> .....	89

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 01. <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” .....	84
--	----

## INDICE DE IMAGENES

IMAGEN N° 01. Constancia de Certificación de la muestra vegetal.....	90
--	----

## INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA N° 01. Obtención del extracto Etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> (pie de paloma).....	43
--	----

## INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N° 01. Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .....	59
---	----

GRAFICO N° 02. Categorización del Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según Diámetro de la zona de inhibición.....	63
---	----

GRAFICO N° 03. Categorización del Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” frente a <i>Escherichia coli</i> según Diámetro de la zona de inhibición.....	64
--	----

GRAFICO N° 04: Categorización del Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” frente a <i>Pseudomonas aureginosa</i> según Diámetro de la zona de inhibición.....	65
--	----

GRAFICO N° 05: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de la planta entera de <i>Chamaesyce thymifolia</i> “pie de paloma” según Porcentaje de inhibición.....	66
---	----

# CAPÍTULO I



## 1.1 INTRODUCCION

En los últimos años se ha vuelto a las plantas en busca de nuevos principios activos, con el fin de determinar su eficacia y evaluar su potencial como fuentes de nuevas drogas, ya que es de suma importancia descubrir nuevos compuestos que sean más eficaces y de menor toxicidad. Los diferentes tipos de infecciones producidas por agentes bacterianos son cada vez más frecuentes para el ser humano y con mayor intensidad en cada ocasión.

Existen alternativas en estas plantas maravillosas, tal es el caso del *Chamaesyce thymifolia* “Pie de Paloma” teniendo en cuenta las evidencias de la familia de esta especie vegetal expuestas en la literatura, de su posible rol antimicrobiano frente a patógenos importantes que producen enfermedades infecciosas.

Se observó que menos del 45% de las Infecciones Intrahospitalarias (IIH) diagnosticadas tenían corroboración microbiológica. A pesar de ello se observó que los gérmenes más frecuentemente encontrados son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*.<sup>1</sup>

Las diversas enfermedades ocasionadas por agentes patógenos e inadecuados comportamientos en los distintos estilos de vida del hombre moderno, está creando una necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento, con una tendencia de volver a las costumbres ancestrales del uso de plantas para la cura de sus enfermedades.

La enfermedad estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* que contaminó y desarrolló en el alimento.

Generalmente ocurre en brotes, predominantemente en verano, y el organismo responsable es generalmente aislado de personas involucradas en la preparación del alimento.

La incidencia es desconocida pero es probablemente una de las causas de enfermedad transmitida por alimentos más frecuentes. Entre los alimentos implicados frecuentemente se encuentran: ensaladas de papas y huevos, pastelería, jamón, pollo, cremas heladas, etc.

El *Escherichia coli*, *Stafilococo aureus* y *Pseudomona aeruginosa* son importantes agentes patógenos involucrados en una serie de infecciones que abarca desde el plano respiratorio hasta el tracto urinario, cuyo impacto se incrementa por sus múltiples factores de virulencia y su resistencia a los antimicrobianos.<sup>2,3</sup>

En la Región Amazónica, el elevado porcentaje de humedad y las altas temperaturas, condicionan en los lugareños a una alta prevalencia, sobre todo en poblaciones de alto riesgo debido al grado de hacinamiento, contaminación ambiental, contacto con los animales domésticos (zoonosis); constituyendo una de las causas importantes de consultas en Hospitales y postas.<sup>4</sup>

Loreto cuenta con una diversidad de recursos naturales, destacando grandes variedades de especies de plantas medicinales; es por ello, la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas como la utilización de extractos de plantas que sean efectivos e inocuos para tratar diferentes infecciones ocasionadas por agentes patógenos.

Con todo ya lo mencionado anteriormente, y el abuso excesivo de antibióticos, está causando una resistencia bacteriana total con un mayor porcentaje de enfermos a nivel de nuestra región, buscamos con nuestro trabajo poder brindar una nueva opción de medicamento contra las enfermedades.

### 1.3 OBJETIVOS:

#### 1.3.1 GENERAL:

Determinar la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma) frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*. Por el método de Macrodilucion y Difusion en Agar.

#### 1.3.2 ESPECÍFICO:

- ✓ Realizar el Tamizaje Fitoquímico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma).
- ✓ Realizar el cultivo de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* y realizar la identificación microbiológica respectiva.
- ✓ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* del Extracto Etanólico obtenido de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma), mediante el método de Macrodilución y difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.
- ✓ Comparar el efecto Antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma), con el control positivo (Gentamicina).

# CAPÍTULO II

## **2.1 MARCO TEÓRICO:**

### **2.1.1 ANTECEDENTES:**

En la actualidad las plantas continúan siendo utilizadas en el tratamiento de muchas enfermedades, tanto en los países en vías de desarrollo como en los no desarrollados. El hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado identificar y utilizar una buena cantidad de especies vegetales. Pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales de estas plantas han sido realizados. De las 1516 especies (distribuidas en 145 familias y 594 géneros).<sup>5</sup>

Cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales de forma que la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica, están tomando un auge insospechado tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico.

Esta práctica está asociada al empirismo en muchos casos faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma fehaciente los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables. No hay que olvidar que el 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizados a partir de sustancias halladas en la investigación fitoquímica.<sup>5</sup>

Se observó que no existe una patente hasta ahora en esta planta. Por lo tanto, otros estudios de la normalización de extractos, aislamiento e identificación de componentes activos, los estudios farmacológicos sobre compuestos aislados, modo de acción, desarrollo de la formulación, la eficacia clínica y toxicológica aún no se han explorado hasta la fecha.

Este estudio será útil para el desarrollo moderno de drogas y servir al propósito de desarrollar una curación y tratamiento de enfermedades y para probar clínica de seguridad, fiabilidad y eficacia. Esta planta puede utilizarse como una fuente barata de productos terapéuticos activos.



## ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE *Chamaesyce thymifolia*.

Respecto a *Chamaesyce thymifolia*, aún no se reportan estudios en diversas actividades biológicas y/o farmacológicas, solo se evidencian estudios realizados en *Euphorbia thymifolia* Linn, especie vegetal perteneciente a la familia Euphorbiaceae.

Kane S. et al. 2009. Realizaron un screening fitoquímico preliminar de *E. thymifolia* Linn, donde mostraron la presencia de diterpenoides, flavonoides, esteroides, taninos y resinas principalmente.

Bezerra G. 2015. Realizo un estudio fitoquímico y biológico in vitro en especies del género Euphorbia (Euphorbiaceae), donde revelan la presencia de terpenos, esteroides y flavonoides entre otros.

Rodríguez M, Zevallos F. 2013. Realizo la actividad antibacteriana in vitro del fruto de *Morinda citrifolia* L. y planta entera de *Notholaena nivea* (Poir) Desv, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, Imet- Essalud 2013, utilizaron como control positivo al antibiótico Gentamicina 10mg y obtuvieron un diámetro de inhibición de 20.4 mm y 19.9 mm.

Ríos N, Dávila R. 2013 (Realizaron la “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE *Geranium ayavacense* SOBRE *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, y Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., Muñoz, J. 2006 (Realizaron la Detección de la actividad antimicrobiana de 10 plantas medicinales utilizados en la medicina folclórica de Colombia: Una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. En una evaluación de actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria de distintos extractos de plantas medicinales; donde utilizaron como controles positivos a Sulfato de Gentamicina 1.0 ug/ml, clindamicina 0.3 ug/ml y nistatina 1.0 ug/ml.)

Amaral A. et al. 1999. Realizaron un estudio para determinar la actividad antiviral de los extractos flavonoidicos de las partes aéreas de *Chamaesyce thymifolia*, donde encontró una elevada citotoxicidad sobre células HEp-2 y moderada actividad

inhibitoria sobre los virus HSV-1 y BVDV. Este resultado puede relacionarse con nuestra elevada actividad antibacteriana en nuestro ensayo debido a que también presentan flavonoides y compuestos fenólicos y taninos.

Parekh J. et al. 2005. Estudiaron la actividad antibacteriana con extractos acuosos y etanólicos de *Euphorbia hirta* L. y *Euphorbia tirucalli* L., donde demostraron ser efectivos frente a *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus* sp. Considerándose al extracto etanólico con mayor capacidad inhibitoria.

Adefuye AO et al. 2013. Estudio la corteza del tallo de *B. micrantha* (Euphorbiaceae), en un extracto en acetato de etilo, obteniendo buenos resultados como antibacteriano, aduciendo que esta especie puede proporcionar moléculas importantes, que podrían ser sustrato útil para la síntesis de nuevos antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de infecciones causadas por estos organismos.

## 2.1.2 *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma)

### 2.1.2.1 La clasificación taxonómica:

**TABLA 01. Clasificación de la Muestra Vegetal en estudio.**

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophita</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbiaceae</i>
Género	<i>CHamaesyce</i>
Especie	<i>CHamaesyce thymifolia</i>
N. científico:	<i>CHamaesyce thymifolia</i>

### 2.1.2.2 Sinonimia:

La sinonimia de *Chamaesyce thymifolia*, lo que más se emplean son: pie de paloma, Tártago Tomillo hojas, sandmat Golfo, cámara de amargo, Mujer pequeña, euphorbe y feuilles de tomillo.<sup>6</sup>

### 2.1.3 Descripción Botánica:

Suavemente hispida hierbas postradas. Tallo pubérulas, delgado, cilíndrico, de color verde claro, pero a menudo de color rosado cuando está fresco convertirse púrpura o verde oscuro, grisáceo al secarse. Los tallos son con látex blanco, la difusión en el suelo, 10-20 cm de longitud con un diámetro de entre 1 a 3 mm; ramas que irradian, delgado, de color rojizo y pubescente. Las hojas son simples, opuestas, elípticas, oblongas u ovadas, 4-8 mm de largo y 2.5 mm de ancho, con ápice redondeado, la base oblicua, pequeña, lados desiguales en la base. El pecioladas, 3-6 mm de largo, 2-4 mm de ancho, todo verde, pero a menudo de color rojo cobrizo cuando está fresco, convirtiéndose en gris violáceo oscuro verde o en el secado. La lámina es oval-oblonga u oblicuamente oblonga. Apex es obtuso o redondeado. El margen es dentado hacia el ápice y suave hacia la base y la venación es reticulada. Pecíolo es pequeño, delgado, esbelto, de color verde pálido y, a menudo de color rosado. Ciatios en racimos

axilares. Campanulate involucro, 8 mm de largo; glándulas 4. Las flores masculinas 1-4, ebracteolate. Femenino lateralmente pendular; tomentoso ovario; estilo 3-bifurcada de la base. Los frutos son ovoides-globoso, agudamente 3 lóbulos, casi sésiles cápsula de 1 mm x 1 mm truncado de base, de corta peluda. Son cocos cuando madura. Las semillas son cónica, registro, ovoides y obtuso cuadrangular, de hasta 1 mm de largo, de forma aguda en ángulo 4-, de color marrón rojizo y sin carúncula.<sup>6</sup> Ver figura N° 01

#### 2.1.4 Origen y Distribución

Comprende cerca de 2000 especies y tiene una distribución mundial, con al menos 750 especies que se dan en el África continental y cerca de 150 especies en Madagascar y las islas del Océano Índico. *Chamaesyce thymifolia*, un grupo de hierbas anuales o, a veces perennes con estípulas obvias, caracterizado además por un tallo principal abortar en el estado de plántula, la planta que consta tanto de una forma dicotómica de ramificación de la inflorescencia umbela-como ampliado, con las brácteas florales que aparecen como hojas normales, ciatios solitarios o hasta 5 juntos en cimas de hoja congestionadas , 4 glándulas involucrales con apéndices como pétalos o semillas enteras y cónicos sin carúncula. Varias otras especies *Euphorbia*. Pertenecientes a esta sección se utilizan con fines medicinales.<sup>7</sup>

#### 2.1.5 Composición Química

Contiene: en el extracto hexanico se comprobó la presencia de Alcaloides (+), carotenos (+), aceites esenciales – grasas (+) y quinonas (++) y con mayor proporción triterpenos y esteroides (+++), lactonas y curmarinas (+++).

Respecto al extracto etanólico destacan triterpenos y esteroides (+++), Fenoles y taninos (+++), alcaloides (++) , lactonas y curmarinas (++) y flavonoides (+).

En el extracto acuoso se encontró en mayor proporción azúcares reductores (+++), Fenoles y taninos (+++), Saponinas (+), flavonoides (+) y alcaloides (+).

### **2.1.6 Farmacología**

Se utiliza tradicionalmente como un purificador de la sangre, sedante, hemostático; aromática, estimulante, astringente para la diarrea y la disentería, antihelmíntico, emoliente, laxante; y también en casos de flatulencia, estreñimiento; en la tos crónica; como un antiviral en el asma bronquial y paroniquia.<sup>7</sup>

Las hojas secas y semillas se administran junto con mantequilla de leche a los niños en quejas del intestino. Raíz se da en la amenorrea y la gonorrea. El aceite se utiliza en jabones medicinales para el tratamiento de la erisipela. El petróleo también se utiliza como un spray para mantener a las moscas y mosquitos. También se utiliza como vermífugo para perros y zorros de granja. Jugo del polvo de la planta se da con el vino como un remedio para las mordeduras de reptiles venenosos. Se aplica con cloruro de amonio a la curación de la caspa. La planta fresca se considera vulnerario y galactagogue, utilizado en ophthalmia y otro ojo problemas, ardor, llagas, la atrofia, la disentería y dolor de pecho. La planta también se utiliza como un antipirético, en, trastornos crónicos fríos menstruales, infecciones del tracto urinario, enfermedades de la piel tales como la lepra, el sarampión y otras erupciones de la piel. La planta de triturado se frota en la cabeza como un rubefaciente irritante para promover el crecimiento del cabello en los casos de alopecia. El látex se dice que es útil en el acné vulgar y como tónico en la menorragia.<sup>8</sup>

## **2.2. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS**

Esta actividad consiste en la determinación de la capacidad antibacteriana de las muestras a estudiar, y su determinación ha sido una de las más representativas a nivel científico y tecnológico, muchos extractos de plantas de las más diversas familias muestran este tipo de actividad, las cuales se

han atribuido a gran cantidad de sustancias, entre ellas, alcaloides, aceites, taninos, saponinas y flavonoides.<sup>9</sup>

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica.

A su vez, la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud; los países tercermundistas poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados accesibles a toda la población. Países como Cuba, han establecido un plan para mejorar la salud en la población. Esto abarca la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades mediante el uso de medicamentos alternativos obtenidos de plantas, los cuales son de bajo costo con alta disponibilidad.

### **2.2.1 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN:**

Los procedimientos iniciales son realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo.<sup>10</sup>

**Fundamentos:** Consiste en exponer a las cepas en estudio a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se

prepara el juego de tubos con 1ml de caldo MH (Mueller Hinton) suplementado con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> estéril sin antimicrobiano.

Se colocan 2 ml de solución del antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml al tercer tubo.

El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/ml, ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar.<sup>11</sup>

### 2.2.2 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a agentes antimicrobianos expresada como CMI, se puede ensayar mediante varios métodos. Uno de ellos es la **Técnica de Dilución en Agar**, técnica que se basa en la preparación de una serie de placas de agar a las cuales se agrega el antimicrobiano a probar, en distintas concentraciones incluidas en el medio. Luego cada una de dichas placas se inocula con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (Mc Farland 0.5). Las placas se examinan después de incubar por 18 a 24 horas a 35°C: se observa si hubo crecimiento bacteriano o ausencia de él y se determina la CMI del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. Para obtener valores reproducibles, cada detalle debe ser controlado cuidadosamente en base a las normas internacionales. Este método ha sido descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) año 2003.<sup>12</sup>

Conocido como test de Kirby – Bauer, ese método fue estandarizado por Bauer *et al.* En 1996. Este es el ensayo más usado en la separación de plantas con actividad antimicrobiana en la práctica clínica y está recomendado por la Clinical and Laboratory Institute (CLSI). Básicamente, consiste en colocar un reservorio impregnado con la muestra en contacto con un medio de cultivo inoculado y, al final del periodo de incubación, medir el diámetro de la zona

clara (zona de inhibición de crecimiento) alrededor del reservorio. La medida del diámetro es un buen indicador de la actividad antimicrobiana.

Algunos autores utilizan placas Petri conteniendo dos capas de medio. La primera capa es colocada en la placa y luego, después de su solidificación, otro tipo de agar mezclado con microorganismos es colocado por encima del primero.

Existen diferentes reservorios, como discos de papel, cilindros de acero inoxidable y cavidades perforadas del agar. Algunos autores consideran las cavidades el único reservorio apropiado para extractos acuosos, pues la interferencia de las partículas es mucho menor. Muchas veces, antes de impregnar la muestra en los reservorios, estos son esterilizadas por medio de filtración con filtros Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ . Tal procedimiento es hecho principalmente cuando se trata de extractos acuosos.<sup>13</sup>

Antes de incubar el sistema inoculado, puede ser mantenido a temperaturas más bajas por algunas horas con el objetivo de facilitar la difusión de la muestra y, consecuentemente, aumentar el diámetro de inhibición, mejorando el límite de detección. Algunos estudios consideran suficiente mantener las placas a 4°C durante 1 a 2 horas.

No existe ningún valor patrón que determina que la muestra es activa o no. Es frecuente expresar los resultados como un criterio para determinar el grado de susceptibilidad o sensibilidad y la resistencia. En estos casos, son creadas escalas basadas en el tamaño de las zonas de inhibición. Cuanto mayor sea el halo, más sensible es el microorganismo. Algunos autores solo consideran una muestra activa si la razón del halo de la muestra por el halo del control fuera mayor que cero; o sea, el halo de la muestra es igual o mayor que el del control.

Existe una variación del método de difusión en agar utilizado tanto para aceites esenciales como para extractos brutos. En esta técnica, los microorganismos son inoculados en la superficie del agar y después de 10 minutos, 1 gota de 10  $\mu\text{L}$  de la muestra es colocada en el centro de la placa.<sup>14</sup>



## 2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS EN ESTUDIO:

### 2.3.1 *Pseudomonas Aeruginosa*

#### 2.3.1.1 Taxonomía (TABLA N° 02)

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Pseudomonadales</i>
FAMILIA	<i>Pseudomonadaceae</i>
GENERO	<i>Pseudomonas</i>
ESPECIE	<i>P. aureginosa</i> MIGULA, 1894

#### 2.3.1.2 Características:

*Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina.

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C.<sup>15</sup>

Estas características le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias. Lo anterior favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmucomprometidos.<sup>15</sup>

*Pseudomonas aeruginosa* puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *P. aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Muchas cepas

son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.<sup>16</sup>

*P. aeruginosa* produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como b-lactamasas de amplio espectro, metalo-β-lactamasas (MBL), alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación de ADN-girasas y bombas de expulsión activa.<sup>4,5</sup> Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia específica a carbapenémicos es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina (OprD), a un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activa (MexAB-OprD) y a la producción de metaloenzimas.

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua.<sup>17</sup>



FIGURA N° 02 Características Macroscópicas De *P. aeruginosa*

### 2.3.2. *Escherichia coli*

#### 2.3.2.1 Taxonomía: (TABLA N°03)

<b>REINO</b>	<i>Bacteria</i>
<b>FILO</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>CLASE</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<b>ORDEN</b>	<i>Enterobacteriales</i>
<b>FAMILIA</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>GENERO</b>	<i>Escherichia</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>E. coli</i> (( <i>E. freundii</i> )) MIGULA, 1895

### 2.3.2.1 Características:

*Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar Mac Conkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA.<sup>18</sup>

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados.<sup>18</sup>

*Escherichia coli* es la especie tipo del género *Escherichia*. Incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son H<sub>2</sub>S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y descarboxila la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su LPS, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación.<sup>19</sup>

*Escherichia coli* coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio. Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".<sup>19</sup>



Figura n°03 Características Macroscópicas de *E.coli*

### 2.3.3 *Staphylococcus aureus*

#### 2.3.3.1 Taxonomía. (TABLA N° 04)

<b>REINO</b>	<i>Bacteria</i>
<b>FILO</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>CLASE</b>	<i>Bacilli</i>
<b>ORDEN</b>	<i>Bacillales</i>
<b>FAMILIA</b>	<i>Staphylococcaceae</i>
<b>GENERO</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>S.aureus</i> Rosenbach 1884

#### 2.3.3.2 Características:

El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega staphyle (racimo de uvas) para describir las características de crecimiento en grupos semejantes a uvas. Los estafilococos son cocos Gram positivos que miden cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa.<sup>20</sup>

El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no

tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones.

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, hallándose en los portadores sanos, especialmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda.<sup>20</sup>

*S. aureus* posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas,  $\beta$ -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de shock tóxico), acaba produciendo infección.

*S. aureus* interacciona con múltiples receptores del huésped a través de diversos componentes de superficie. Presenta asimismo una elevada capacidad de adherencia a diversos sustratos in vitro, por mecanismos que se activan también sobre diversos materiales inanimados como el polimetacrilato, el teflón o la mayoría de materiales protésicos. Al igual que *S. aureus* sensible a la meticilina, las cepas SARM se introducen en el medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores sanitarios.

El reservorio fundamental lo constituyen los pacientes ingresados que están infectados o colonizados, extendiéndose a otros pacientes principalmente por medio de las manos del personal sanitario (infección cruzada).<sup>21</sup>



*Figura n°04 Características Macroscópicas de S. aureus*

## **2.4 VARIABLES OPERACIONALES**

### **2.4.1 INDEPENDIENTE**

- El extracto etanólico obtenido de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma).

### **2.4.2 DEPENDIENTE**

- Actividad Antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma)

## **2.5 INDICADORES**

### **2.5.1 PARA EL METODO DE MACRODILUCION**

#### **2.5.1.1 Independiente (X):**

##### **Concentración de los extractos:**

- Concentración baja: 0.25 mg/ml
- Concentración media: 4 mg/ml
- Concentración alta: 32 mg/ml

#### **2.5.1.2 Dependientes (Y):**

##### **Grado de turbidez:**

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (100% de inhibición)

### **2.5.2 PARA EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY BAUER)**

#### **2.5.2.1 Independiente (X): Concentración del extracto**

- Concentración alta : 12 mg
- Concentración baja : 6 mg

#### **2.5.2.2 Dependiente (Y): Grado de sensibilidad**

- Sensible (S) : Inhibición al 100%
- Intermedio (I) : Inhibición al 50%
- Resistente (R) : Resistente

## 2.6 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

### 2.6.1 Tabla N°05 Método de Macrodilución

Variable		Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
INDEPENDIENTE	Extracto etanólico de <i>CHamaesyce thymifolia</i>	Producto que se obtendrá mediante el método de extracción por rotavapor	El solvente en contacto con la especie vegetal arrastrará los metabolitos secundarios solubles por extracción en rotavapor a una temperatura de 70° C durante 3 horas.	Concentración del Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> (pie de paloma).	Concentración baja: 0.25 mg/ml Concentración media: 4.0 mg/ml Concentración alta: 64 mg/ml	Nominal	Cualitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo	El grado de turbidez que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , expuesta al extracto en estudio	Grado de Turbidez	Ausencia de turbidez en los cultivos de las cepas ensayadas, inhibición del 100% ligera turbidez del medio, inhibición del 75% Inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50% Ligera inhibición, inhibición del 25% No inhibición	Nominal	Cualitativa



2.6.2 Tabla N°06. Método de Difusión en Disco.

Variable		Definición Conceptual	Indicador	Definición Operacional	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
INDEPENDIENTE	Extracto etanólico de <i>CHamaesyce thymifolia</i>	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor	Concentración del Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> (pie de paloma).	La especie vegetal en contacto con etanol como solvente para arrastrar los metabolitos secundarios solubles en ellas y cuya extracción se realizó en rotavapor a una temperatura de 60° C durante 3 horas	Concentración alta: 12 mg Concentración baja: 6 mg	Nominal	Cualitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo	Grado de sensibilidad que presentan los medios de cultivos inoculados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , expuesta al extracto	Indican los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos	S Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada con la dosis de extracto recomendada para el tipo de infección y la especie infectante. I Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de extracto más elevado. R Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales.	Nominal	Cualitativa

## 2.7 HIPOTESIS

El Extracto Etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma); presenta Actividad Antibacteriana *In vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.

# CAPÍTULO III

### 3.1 METODO DE LA INVESTIGACION

#### 3.1.1. Método de investigación

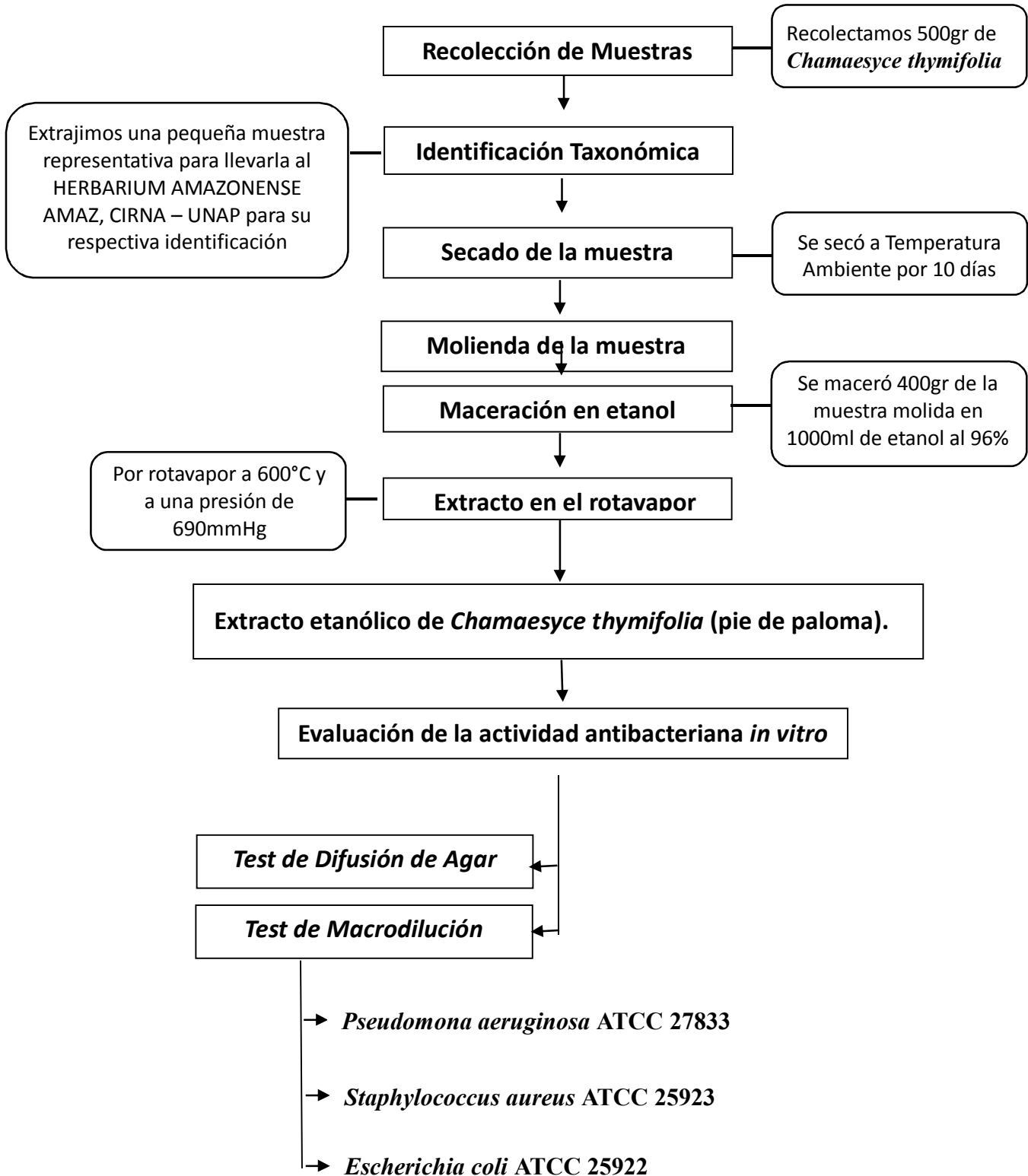
Se empleó el Diseño experimental, prospectivo y Longitudinal.

- **Experimental:** Porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.
- **Prospectivo:** Porque se desarrolló a través del tiempo.
- **Longitudinal:** Porque permite realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

### 3.1.2 Flujograma de la Investigación

#### ESQUEMA N° 1

Obtención del extracto Etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma).



## **3.2 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS**

### **3.2.1 Procedimiento Experimental**

#### **3.2.1.1 Recolección de la Muestra Vegetal**

Las muestras de *Chamaesyce thymifolia*, fueron recolectadas a las 10:00 a.m. a 95cm al sur oeste, con rumbo a 75°, a 9671452 de longitud y a una latitud de 9575572. Esta zona se encuentra a 222MSNM y a 0654512UTM, Comunidad de Nina Rumi, Distrito de San Juan, Provincia de Maynas – Departamento de Loreto; Iquitos, Perú.

#### **3.2.1.2 Identificación de la Muestra Vegetal**

La identificación taxonómica de la especie recolectada fue realizada teniendo en cuenta el nombre científico, familia, nombre vulgar. En el HERBARIUM AMAZONENSE AMAZ, CIRNA-UNAP, con la asesoría del botánico responsable, el cual determinó la categoría taxonómica empleando descriptores morfológicos, claves de identificación y bibliografía especializada. Obteniéndose el documento de certificación de la muestra por dicho lugar (HERBARIUM AMAZONENSE). Ver imagen N° 01 En Anexos

#### **3.2.1.3 Procesamiento de la muestra vegetal**

La muestra vegetal de *Chamaesyce thymifolia*, se procesó siguiendo los procedimientos de lavado, secado, selección y maceración de cada muestra, en el laboratorio de Fitoquímica (FIA), posteriormente los extractos fueron llevados al laboratorio de Microbiología de Alimentos en donde realizamos los ensayos de nuestra investigación, estos laboratorios se encuentran dentro de la Planta Piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias, de la Universidad Nacional De la Amazonia Peruana ubicado en la Av. Freyre N° 610 – Iquitos.

#### **3.2.1.4 Molienda de la Muestra Vegetal**

La materia prima fue molida lo suficientemente pequeña, luego fue envasada en recipientes adecuados y conservadas en lugares secos y frescos para su uso.

#### **3.2.1.5 Obtención del Extracto Etanólico**

El extracto etanólico se obtuvo por maceración de las muestras de *Chamaesyce thymifolia*, con etanol al 96% durante 7 días repitiendo el proceso 3 veces consecutivos hasta agotamiento de la muestra.

Para cada extracción se maceró 400 gr respectivamente de cada materia vegetal. Véase Tabla 01. De *Chamaesyce thymifolia*, en 1000 ml de etanol al 96% para cada muestra vegetal, durante 7 días por agotamiento. La concentración del extracto se realizó eliminando el disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 60°C y a una presión de 690 mmHg. Por espacio de 2 horas aproximadamente cada muestra, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por un lapso de 4 a 6 días, donde se obtuvo la suficiente cantidad de extractos con el cual se realizó los ensayos, tanto para macrodilución y difusión en discos. (Ver fotos N° 01, 02, 03 .En Anexos).

### **3.3 POBLACION Y MUESTRA**

#### **3.3.1 VEGETAL**

##### **3.3.1.1 Población Vegetal**

La población vegetal en estudio estuvo constituida por la especie vegetal de *Chamaesyce thymifolia*

##### **3.3.1.2 Muestra Vegetal**

*Chamaesyce thymifolia* (toda la planta.)

##### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

La muestra vegetal en buen estado, estructuralmente enteras sin presencia de deterioro, exento de plagas y otros contaminantes visibles.

##### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

La muestra vegetal en mal estado, estructuralmente no enteras, partidas o incompletas, con presencia de deterioro y otros contaminantes visibles.

#### **3.3.2 MICROBIOLÓGICA**

##### **3.3.2.1 Población Microbiológica**

La población microbiológica lo constituyen las bacterias.

##### **3.3.2.2 Muestra Microbiológica**

Las muestras microbiológicas están constituidas por las cepas. (Ver foto 04, Anexos):

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



## **3.4 PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

### **3.4.1 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN**

#### **3.4.1.1 Recuperación de cultivos conservados**

##### **3.4.1.1.1 Congelados**

Descongelamos los tubos que contienen bacterias petrificadas a temperatura ambiente por un tiempo de una hora y media, para transferir una pequeña muestra (bacterias en estudio) con el asa bacteriológica, en los tubos que contienen caldo nutritivo como medio apropiado para ejercer la reactivación de las bacterias.

##### **3.4.1.1.2 Reactivación de bacterias**

Los tubos que contienen a las bacterias con caldo nutritivo se incubaron a la temperatura de 36 °C a 37 °C por 24 horas, para ejercer una buena condición y reactivación bacteriológica.

##### **3.4.1.1.3 Cultivo en agar**

Se procedió a enfriar las placas que antes fueron retiradas de la estufa a 180 °C x 1 hora, retirando el papel de despacho en la cual estaban envueltas, para plaquear con Agar Mueller Hinton, vertiendo 20 ml en cada placas (3 placas en total) luego llevamos a la estufa a 37 °C por 24 horas, para usarlo como control de calidad (No se encontró crecimiento de microorganismos en el Agar Mueller Hinton luego de las 24 horas). Ver fotos N°05, 06,07.

De los tubos (contienen Caldo nutritivo y bacterias incubadas por 24 horas), se extrae la muestra y se siembra por estrías con el asa bacteriológica esterilizada en las 3 placas (para las 3 bacterias) con contenido de agar Mueller Hinton. (Ver foto N° 08) que se incubaron de 35 - 37 °C durante 24 horas. (Ver foto N°09)

### **3.4.1.2 Preparación del inóculo**

De las placas sembradas con cada bacteria de estudio se extrajo con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton, para transferirlos a los tubos que contienen 3 ml de Cloruro de sodio 0.9 % (NaCl), utilizando el vortex para un mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mac. Farland por comparación visual con dicho patrón, (Ver foto N°10). Cabe recalcar que se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

La suspensión del inóculo con turbidez comparable al tubo de la escala de Mac. Farland contiene aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL; para el ensayo la suspensión bacteriana se preparó agregando 0,1 mL del tubo de NaCl 0.9 %, (que contiene las bacterias de estudio) en 9.9 ml de Caldo Mueller Hinton obteniéndose un total de 10 ml con una concentración bacteriana de  $1,5 \times 10^6$  ufc/mL.

### **3.4.1.3 Incubación:**

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución.<sup>22</sup>

### **3.4.1.4 Preparación y control de extractos:**

- a) Se pesó 320 mg del extracto etanólico respectivamente en viales tipo Sendorff estériles y se añadió 0.5 ml de agua destilada obteniendo una concentración de 640 mg/mL (Solución madre o Stock).
- b) De la solución madre o Stock se extrajo 0.1 ml y se añadió al tubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.

- c) Posteriormente del tubo N° 01 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo N° 02 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al tubo N°08.
- d) Del tubo N° 08 se extrajo 0.5 ml que fue desechado.
- e) Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana preparada anteriormente para los ensayos.
- f) El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.
- g) Para la preparación del control de turbidez se repitieron los pasos a),b),c),d), añadiendo finalmente 0.5 mL de caldo M-H estéril.
- h) Las concentraciones para el ensayo fueron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml, siendo el tubo N° 09 control de crecimiento (0 mg/mL). (Ver fotos N°11, 12)

#### **3.4.1.5 Preparación del control positivo:**

- El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enrasó hasta 5 ml en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10'240 ug/ml.
- De la solución madre se extrajo 0.1 ml y se añadió al tubo N° 01 que contendrá 0.9 mL de caldo Mueller Hinton.
- Del tubo N° 01 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo N° 02 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al tubo así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09
- Del tubo N° 09 se extrajo 0.5 ml que fue desechado

- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana.
- El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.
- Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 512 ug/ml a 2 ug/ml, siendo el tubo N° 10 control de crecimiento (0 µg/mL) (ver Figura N°04)

#### **3.4.1.6 Interpretación de datos:**

La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en µg/ml para el control positivo y en mg/ml para los extractos.

### **3.4.2 MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO**

#### **3.4.2.1 Preparación del inóculo**

De placas con agar Mueller Hinton sembradas con cada bacteria de estudio, se extrajo nuevamente con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton, para transferirlos a los tubos (4 tubos en total) que contienen 3 ml de Cloruro de sodio 0.9 % (NaCl), utilizando el vórtex para un mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mc. Farland por comparación visual con dicho patrón. Ver foto N° 10 cabe recalcar nuevamente que se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. Este proceso se repitió tanto para los ensayos de Macrodilución y difusión en Disco respectivamente.

La suspensión del inóculo con turbidez comparable al tubo de la escala de Mc. Farland contiene aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL.

#### **3.4.2.2 Dilución de extractos:**

Se pesaron 360 mg de cada extracto en microtubos de tipo Sppendorf estériles, luego fueron diluidos en 0.6 ml de una mezcla Etanol/Agua (1:1) respectivamente para cada extracto, para alcanzar una concentración de 600mg/ml (Concentración 1). Para facilitar su homogenización fueron llevados al vórtex.

Para obtener la Concentración 2, se procedió a extraer 0.2 ml de la Concentración 1 para posteriormente ser agregado en 0.2 ml de una mezcla de Etanol/Agua (1:1) alcanzando una concentración de 300 mg/ml (Concentración 2) que fueron colocados nuevamente en el vórtex para su homogenización.

Finalmente se procedió a impregnar a cada disco de papel whattman N°5 con 20uL de cada concentración (1 y 2 respectivamente), para ser llevados a la estufa durante 18 horas con la finalidad de eliminar la presencia del Etanol/agua que fueron utilizadas para la disolución de los extractos. Obteniendo así discos impregnados de 12 mg (Concentración 1) y 6 mg (Concentración 2).

Cabe precisar que se realizó el mismo procedimiento tanto para el extracto etanólico independientemente.

#### **3.4.2.3 Inoculación de las placas:**

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (4 tubos), se procedió a extraer con una micropipeta 100 uL del inóculo (4 tubos correspondiente a las 4 bacterias de estudio), para luego verter en placas con Agar Mueller Hinton, que ya fueron preparadas para el ensayo (3 placas por bacteria) diseminando con la espátula de Drigalsky en todas las direcciones de la superficie de cada placa, asegurando una distribución uniforme del inóculo.
  
- Antes de colocar los discos dejamos secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

#### **3.4.2.4 Aplicación de los discos:**

- Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril y la punta de una aguja que se nos ayudó a presionar suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- Se colocaron los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. Los discos no fueron removidos una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que difunden rápidamente en la superficie.
- Los discos usados para el estudio fueron: Discos de los Extractos de 12mg y 6 mg, Discos de control negativo: Etanol/agua (1:1) los cuales fueron llevados a la estufa durante 18 horas eliminando la presencia de estos, Discos de Control positivo: Gentamicina 10 ug.

#### **3.4.2.5 Incubación:**

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, durante 24 horas.

Después del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa, para proseguir con la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

#### **3.4.2.6 Lectura de las placas e interpretación de los resultados:**

- o Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando la regla vernier.(Ver foto N° 13, 14,15).
- o Se debe mantener iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.

- Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.
- El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento bacteriano, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

### 3.4.2.7 Interpretación de datos para el método de difusión en disco

#### 3.4.2.7.1 Valores críticos para la medida de sensibilidad en disco:

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de las CMI para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados in vitro y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados.<sup>23</sup>

#### 3.4.2.7.2 Procedimiento de categorización:

Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios. (Tabla)

**TABLA 07. CATEGORIZACIÓN**

<b>Categorías</b>	<b>Concentración mínima inhibitoria (mg/L)</b>	<b>Diámetro del halo de inhibición (mm)</b>
<b>S</b>	<b>CIM ≤ c</b>	<b>DHI ≥ D</b>
<b>R</b>	<b>CIM &gt; C</b>	<b>DHI &lt; d</b>
<b>I</b>	<b>C &lt; CIM ≤ C</b>	<b>DHI &lt; D</b>

FUENTE: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión de la INS.

Por otra parte la lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiogramas de sensibilidad y resistencia permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo de fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma.<sup>24</sup>

### **3.5 INSTRUMENTOS Y MATERIALES:**

#### **Material de Vidrio**

- Embudos.
- Erlenmeyers de 250 y 500 ml.
- Placas petri
- Matraz 1000 ml.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Probetas de 10, 100, 250 y 1000 ml.
- Tubos con tapa rosca (75 x 120 mm.)
- Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- Vasos de precipitado de 5, 10, 20, 50 y 100 ml.
- Espátulas Drigalsky.

#### **Material de Metal**

- Asa de Kolle para siembra bacteriológica.
- Cuchillo mediano.
- Escobillas lava tubos.
- Regla vernier
- Gradilla metálica.
- Pinza estéril

#### **Otros Materiales**

- Algodón COPPON
- Detergente Ariel
- Guantes quirúrgicos 7 ½ family Doctor
- Mascarillas Family Doctor



- Papel aluminio B&T
- Papel de despacho B&T
- Papel secante B&T
- Plumón marcador ARTESCO

### **Equipos**

- ❖ Autoclave AUTESTER
- ❖ Balanza analítica (Mettler Toledo AG 204)
- ❖ Cocina eléctrica (PRACTICA/modelo: cocineta eléctrica HP1)
- ❖ Estufa de cultivo a 35 °C. (Merck / Model: 1235-2).
- ❖ Mechero de Bunsen
- ❖ Incubadora JSB. MOD-ST 22 QV
- ❖ Potenciómetro - pH meter CORNING PR 15
- ❖ Refrigerador de 2-8 C°(MABE /Modelo. RML10WHPN 50)
- ❖ Rotavapor. BÜCHI. R-3000 (Equipo completo) 120V 60HZ.
- ❖ Vórtex MIXER MODEL VM-1000.
- ❖ Cámara de flujo laminar. (Magnehelic “Forma Cientific Model: 13089-799.
- ❖ Micropipetas de 20, 100, 500 uL

### **Reactivos**

- ❖ Ácido clorhídrico 0.5 M J.T. BAKER
- ❖ Ácido Sulfúrico 0.2M
- ❖ Agua destilada Estéril
- ❖ Cloruro de bario y Carbonato de sodio.
- ❖ Etanol 96°

### **Medios de Cultivo**

- ❖ Agar Mueller Hinton. MH - OXOID
- ❖ Caldo Nutritivo.
- ❖ Caldo Mueller Hinton. MH - OXOID

### **Material de Bioseguridad**

- ❖ Mandiles de laboratorio. MEDIC
- ❖ Gorro, Mascarilla N 78.

- ❖ Guantes quirúrgicos descartables N°7,7 ½.
- ❖ Lentes de protección. B&T

### **3.6 ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS**

El procesamiento de datos con respecto a las variables de estudio se realizó mediante el software estadístico SPSS 22 para Windows y Minitab versión en español, los cuales nos permitieron elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular los datos estadísticos necesarios para el estudio.

Se presenta el análisis estadístico descriptivo de acuerdo a los datos obtenidos del estudio como son: Desviación típica, dispersión (varianza). Gráficos (histogramas, barras, tortas, etc.).

### **3.7 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO**

Un exitoso programa de seguridad en el laboratorio abarca un proceso continuo de reconocimiento, evaluación y mitigación de riesgos, asociado a acciones que aseguran que el proceso sea sostenible en el tiempo. El riesgo de las exposiciones, las infecciones adquiridas en el laboratorio y la liberación no intencionada de agentes o materiales para el medio ambiente, se debe reducir al garantizar la competencia de los técnicos, profesionales y auxiliares de laboratorio en todos los niveles. La competencia es un factor medible y documentable que involucra no sólo las habilidades que pueden ser enseñados y desarrollados, sino también el juicio y la capacidad de reconocer las limitaciones del entorno de trabajo y las habilidades propias y de las otras personas en el laboratorio. La gestión del riesgo biológico consiste en un sistema o conjunto de procesos orientado a controlar los riesgos asociados a la manipulación, almacenamiento, eliminación de agentes biológicos y toxinas en el laboratorio. Estos procesos fueron realizados a cabalidad en el presente trabajo cumpliendo con las normas establecidas.<sup>25</sup>

### **3.8 PROTECCION DE LOS DERECHOS HUMANOS**

En los laboratorios del área de microbiología donde se realizaron los ensayos experimentales del estudio, constituyen un medio de trabajo especial ya que el personal de trabajo, y los que se encuentran alrededor de las áreas de trabajo, lo constituye el ser humano, por ende se presenta riesgos de enfermedades infecciosas, y de lesiones, es por ello que se tomaron estrictas medidas de bioseguridad, con la finalidad de salvaguardar la integridad del personal humano, respetando, guiándonos y cumpliendo con las medidas y estipulaciones que enmarcan la protección de los derechos humanos.

# CAPÍTULO IV

## 4.1 RESULTADOS:

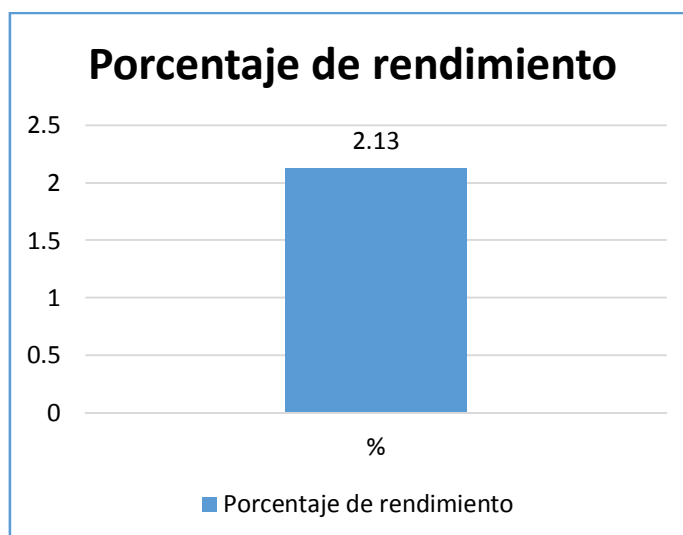
### 4.1.1 Obtención de Extractos vegetales.

#### 4.1.1.1 Determinación del Rendimiento de *Chamaesyce thymifolia* “Pie de Paloma”

**Tabla N°08. Rendimiento del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*.**

Parte de planta	Cantidad de Muestra vegetal (g.)	Cantidad Muestra seca para maceración (g.)	Cantidad de Extracto etanólico (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Planta	600	400	8.5	2.13 %

Grafico N°01: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.



La Tabla N°08 y el Grafico N°01, representan el rendimiento en porcentaje, de la planta utilizada *Chamaesyce thymifolia*, obtenidas por el equipo Rotavapor. En la Tabla N°08, se determinó el rendimiento de la planta entera y se obtuvo un 2.13% de 400 g. de muestra seca.

#### 4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.

**Tabla N°09: Tamizaje Fitoquímico de *Chamaesyce thymifolia* “Pie de Paloma”**

<b>METABOLITOS</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>EXTRACTO HEXANICO</b>
ALCALOIDES	Drangendorff	+
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann – Burchard	+++
QUINONAS	Borntrager	++
LACTONAS Y CUMARINAS	Baljet	+++
CAROTENOS	Carr - Price	+
ACEITES ESENCIALES – GRASAS	Sudán III	+

<b>METABOLITOS</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>EXTRACTO ETANÓLICO</b>
ALCALOIDES	Drangendorff	++
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann – Burchard	+++
QUINONAS	Borntrager	0
LACTONAS Y CUMARINAS	Baljet	++
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	0
SAPONINAS	Espuma	0
FENOLES Y TANINOS	Cloruro Férrico	+++
AMINOÁCIDOS Y AMINAS	Ninhidrina	0
FLAVONOIDES	Shinoda	+
GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Kedde	--

<b>METABOLITOS</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>EXTRACTO ACUOSO</b>
ALCALOIDES	Drangendorff	+
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	+++
SAPONINAS	Espuma	+
FENOLES Y TANINOS	Cloruro Férrico	+++
FLAVONOIDES	Shinoda	+
MUCÍLAGOS	Prueba del tacto	0
PRINC. AMARGOS – ASTRINGENTES	Prueba del gusto	+

**(+++)** Abundante; **(++)** Moderado; **(+)** Leve; **(0)** Ausente; **(--)** No se realizó

4.1.3 Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma”.

4.1.3.1 Método de difusión de disco (Kirby - Bauer)

**Tabla N°10:** Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de la zona de inhibición.

BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANOLICO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	PLANTA ENTERA			% INHIBICIÓN	RESULTADO
	(mg/mL)	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	28.3 ± 1.5	SENSIBLE	119.5	BUENA ACTIVIDAD
	6	22.7 ± 4.5	SENSIBLE	95.64	BUENA ACTIVIDAD
	Gentamicina 10ug	23.7 ± 0.6	SENSIBLE	---	---
<i>Escherichia coli</i>	12	19.7 ± 5.0	SENSIBLE	98.33	BUENA ACTIVIDAD
	6	15.7 ± 5.1	SENSIBLE	78.33	BUENA ACTIVIDAD
	Gentamicina 10ug	20.0 ± 2.0	SENSIBLE		---
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	12	19.3 ± 4.5	SENSIBLE	79.56	BUENA ACTIVIDAD
	6	14.7 ± 4.7	INTERMEDIO	60.36	MODERADAMENTE ACTIVO
	Gentamicina 10ug	24.3 ± 1.2	SENSIBLE		---

\* Esquema DZI frente a Control positivo & Actividad antimicrobiana      Porcentaje de inhibición

Resistente: <12 mm      Inactivo: < 40%  
 Intermedio: 13 - 14 mm Poco activo: 40 – 50%  
 Sensible: > 15 mm      Moderadamente activo: 51 – 75%  
 Buena actividad :> 76 %

Fuente: Instituto Nacional De Salud, Ministerio De Salud Del Perú. 2002. “Manual De Procedimientos Para La Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana Por el método de disco difusión”

**LA TABLA N° 10:** se muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de disco difusión, a diferentes niveles de concentraciones del extracto etanólico de la Planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El control Positivo (Gentamicina 10 mcg), obtuvo promedio de 23.7 mm., 20.0mm y 24.3 mm. En el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado en todas las evaluaciones como SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (Sensible = >15 mm.).

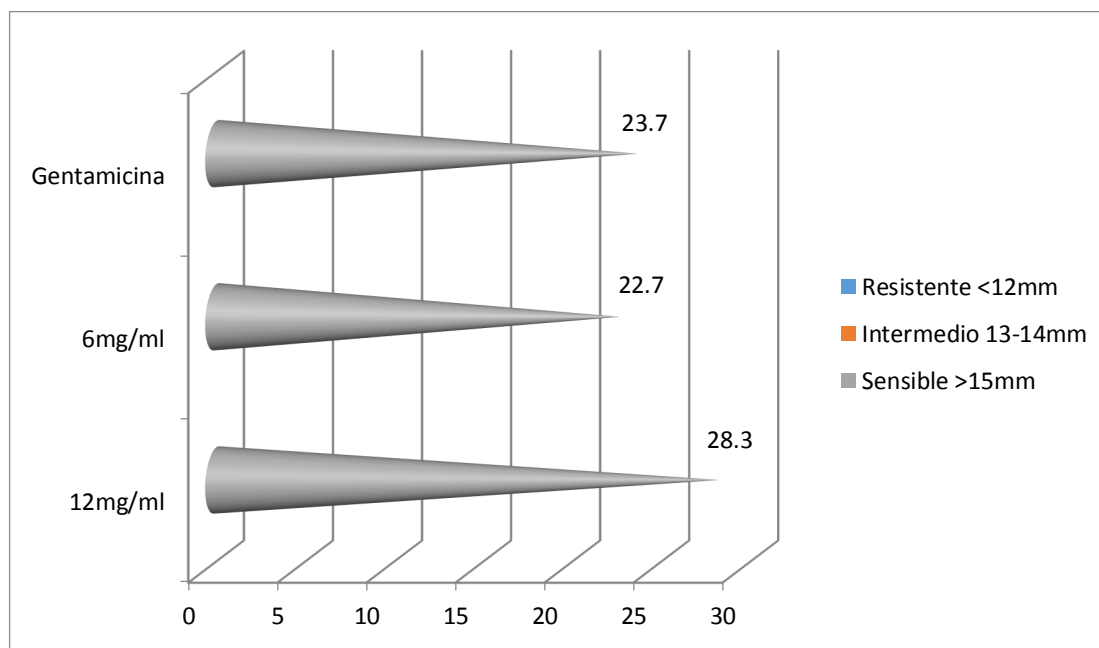
En el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, se evaluaron a concentraciones de 12 y 6 mg/ml. frente a *Staphylococcus aureus*, encontrándose diámetros en la zona de inhibición de 28.3mm. y 22.7mm. Respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de SENSIBLE, por encontrarse por encima del parámetro de comparación según control positivo (Sensible = >15 mm).

La evaluaron frente a *Escherichia coli*, a concentraciones de 12 y 6 mg/ml. se encontraron diámetros en la zona de inhibición de 19.7mm. y 15.7mm. Respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de SENSIBLE, por encontrarse por encima del parámetro de comparación según control positivo (Sensible = >15 mm).

La evaluaron frente a *Pseudomonas aureginosa*, a concentraciones de 12 y 6 mg/ml. se encontraron diámetros en la zona de inhibición de 19.3 mm. y 14.7 mm. Respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de SENSIBLE e INTERMEDIO respectivamente, por encontrarse por encima del parámetro de comparación según control positivo (Sensible = >15 mm, Intermedio = 13 – 14mm).



**Grafico N° 02:** Categorización del Extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.

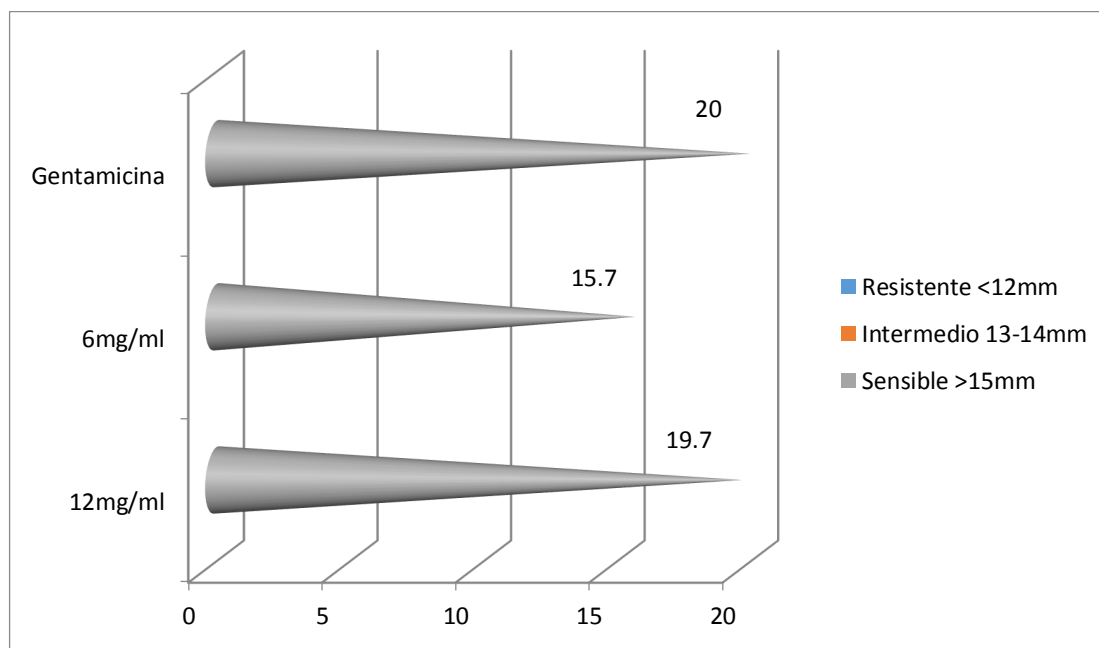


El grafico N° 02, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* y del control positivo (Gentamicina 10 mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 23.7mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, obtuvieron valores de DZI mayores a 15mm, por lo cual se categoriza como SENSIBLE.

**Grafico N° 03:** Categorización del Extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a *Escherichia coli* según Diámetro de la zona de inhibición.

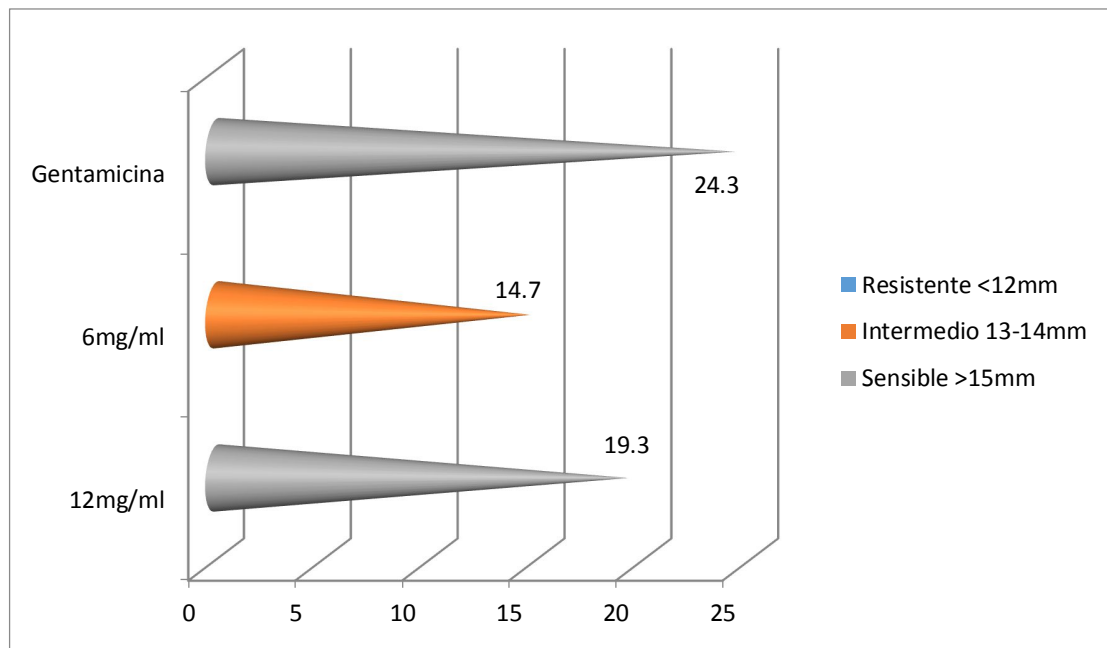


En el Grafico N° 03 se muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* y del control positivo (Gentamicina 10 mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20.0 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, obtuvieron valores de DZI mayores a 15mm, por lo cual se categoriza como SENSIBLE.

**Grafico N° 04:** Categorización del Extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” frente a *Pseudomonas aureginosa* según Diámetro de la zona de inhibición.



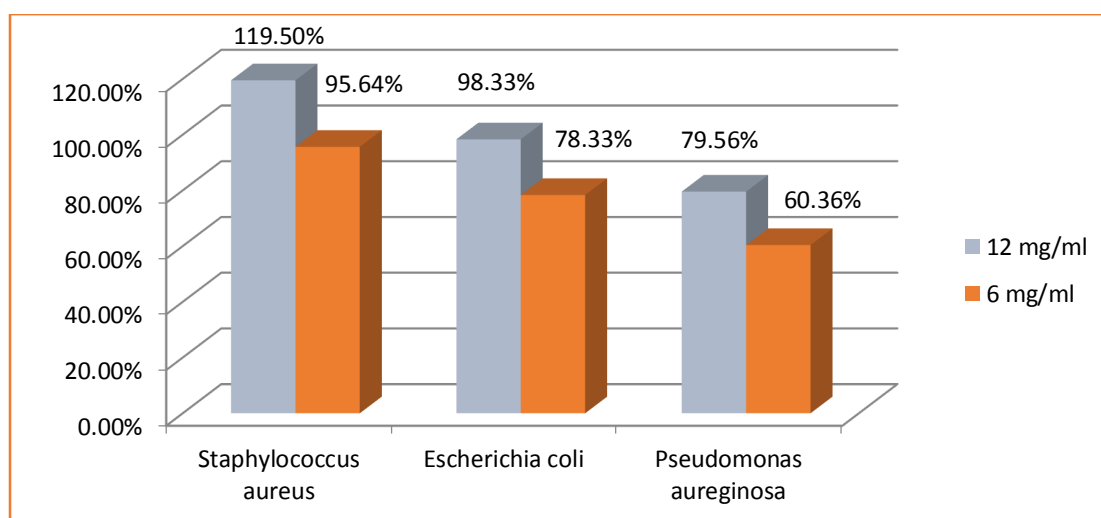
En el Grafico N° 04 se muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* y del control positivo (Gentamicina 10 mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Pseudomonas aureginosa*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 24.3mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

El grupo con la concentración de 12mg/ml del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, obtuvo valores de DZI mayores a 15mm (19.3 mm), por lo cual se categoriza como SENSIBLE.

El grupo con la concentración de 6mg/ml del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, obtuvo valores de 14.7 mm de DZI, por lo cual se categoriza como INTERMEDIO.

**GRAFICO N° 05:** Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de la planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” según Porcentaje de inhibición.



El grafico N°05, muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanólico de hojas *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” en las diferentes concentraciones (12mg/ml y 6mg/ml) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*.

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos etanolicos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose para *Staphylococcus aureus*, un porcentaje de inhibición de 119.5% a concentración de 12mg/ml y 95.64% a concentraciones de 6mg/ml; en el cual se obtiene como resultado BUENA ACTIVIDAD por encontrarse porcentajes mayores de 76%.

*Escherichia coli*, evidenció un porcentaje de inhibición de 98.33% a concentración de 12mg/ml y 78.33% a concentraciones de 6mg/ml en el cual se obtiene como resultado BUENA ACTIVIDAD por encontrarse porcentajes mayores de 76%.

En *Pseudomonas aureginosa* evidenció un porcentaje de inhibición de 79.56% a concentración de 12mg/ml dando como resultado BUENA ACTIVIDAD y para la concentración de 6mg/ml obtuvo un 60.36% en el cual se obtiene como resultado MODERADAMENTE ACTIVO

#### 4.1.4 Método de Macrodilución: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).

##### 4.1.4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

**TABLA N°11:** Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa* y *Escherichia coli*.

BACTERIA EN ESTUDIO	N° DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C4	4 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	C5	2 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	C4	4 mg/ml	MODERADO ACTIVO

\* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderado activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

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

En la Tabla N° 11, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 2mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma” demostró ser Moderado activo frente a *Escherichia coli*.

Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 4mg/ml, por lo tanto, el efecto del

extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” demostró ser Moderado activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudonomas aureginosa*.

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

**TABLA N° 12:** Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a las bacterias en estudio.

<b>Especies bacterianas</b>	<b>Clasificación</b>	<b>CBM</b>
<i>Pseudonomas aureginosa</i>	Bacilos gram-negativos	32 mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos gram-negativos	16 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos gram-positivos	16 mg/ml

A partir de los tubos donde no se observó crecimiento bacteriano (CMI) por efecto del extracto etanólico de la planta entera de *Chamaesyce thymifolia*, se procedió a determinar la CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA (CBM.), que se entiende como la menor concentración del extracto que no solo inhibe el desarrollo de las bacterias sino que también las destruye.

Para esto se efectuó el subcultivo del contenido de los tubos que presentaron CMI en el ensayo realizado y sembradas en placas de agar, en donde se observó después de la incubación durante 24 h.

Según rango de lectura de la concentración bactericida mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 32mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” demostró ser activo frente a *Pseudonomas aureginosa*.

Asimismo, en el rango de lectura de la concentración bactericida mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” demostró ser activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## DISCUSION

En el presente estudio se evaluó, la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a 3 cepas bacterianas (*Pseudomona aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), mediante el método de Difusión en disco “Kirby – Bauer” y difusión en caldo (macrodilución).

Para la preparación de los extractos vegetales, se utilizaron la planta entera, los cuales fueron cortados, molidos y secados a temperatura ambiente; el método escogido para la extracción del extracto etanólico, fue mediante la técnica de maceración en frío a una presión atmosférica y temperatura ambiental (37°C) Después de la maceración en frío por una semana, se filtró utilizando papel filtro para concentrarlo en rotavapor a una temperatura de 40° C y una presión de 690 mm Hg, por espacio de 3 horas obteniendo extracto alcohólico de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*”.

Los resultados obtenidos en el estudio respecto al rendimiento del extracto de planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” fue de 2.13%, con el cual se puede deducir que por cada 100g de planta entera seca, se puede obtener aproximadamente 2.13 g. de extracto etanólico.

La presunción exitosa de los metabolitos secundarios de la especie vegetal depende de gran medida del tipo solvente utilizado en el procedimiento de extracción, los nativos y curanderos utilizan principalmente agua como disolvente, pero en nuestro estudio se utilizó un solvente orgánico (etanol). El argumento principal para utilizar etanol como solvente es por los términos de la polaridad de los compuestos o metabolitos secundarios extraídos por este disolvente y, además de su bioactividad intrínseca, por su capacidad para disolver y extraer los probables metabolitos secundarios con actividad antibacteriana. Parekh J., Jadeja D., Chanda S.<sup>29</sup>

El estudio de las características farmacognósticas del extracto etanólico de la planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*”, se realizaron mediante protocolo descritas por Corral A et al.<sup>30</sup>

Del tamizaje fitoquímico se obtuvieron respuesta positiva para una gran diversidad de grupos funcionales, en el extracto hexanico se comprobó la presencia de Alcaloides (+), carotenos (+), aceites esenciales – grasas (+) y quinonas (++) y con mayor proporción triterpenos y esteroides (+++), lactonas y curmarinas (+++). Respecto al extracto etanólico destacan triterpenos y esteroides (+++), Fenoles y taninos (+++), alcaloides (++) , lactonas y curmarinas (++) y flavonoides (+). En el extracto acuoso se encontró en mayor proporción azúcares reductores (+++), Fenoles y taninos (+++), Saponinas (+), flavonoides (+) y alcaloides (+).

Respecto a *Chamaesyce thymifolia*, aún no se reportan estudios en diversas actividades biológicas y/o farmacológicas, solo se evidencian estudios realizados en *Euphorbia thymifolia* Linn, especie vegetal perteneciente a la familia Euphorbiaceae; donde Kane S. et al.<sup>31</sup> Realizaron un screening fitoquímico preliminar de *E. thymifolia* Linn, donde mostraron la presencia de diterpenoides, flavonoides, esteroides, taninos y resinas principalmente.

También Bezerra G.<sup>32</sup>; realizo un estudio fitoquímico y biológico in vitro en especies del género *Euphorbia* (Euphorbiaceae), donde revelan la presencia de terpenos, esteroides y flavonoides entre otros.

Los métodos más usados en la actualidad para evaluar actividad antimicrobiana de sustancias extraídas de plantas medicinales son: el método de Kirby –Bauer o disco difusión y el método de pocillos o excavación que también sirven para hallar no sólo la potencia de los antibacterianos, sino también, la resistencia de



algunos microorganismos a ciertos antibióticos o sustancias usadas como posibles antibióticos Toribio MS, Oriani DS y Skliar MI.<sup>33</sup>

En nuestro estudio utilizamos el método de difusión en disco “Kirby-Bauer”, y se utilizó como Control positivo (Antibiótico) a Gentamicina 10mg, además del extracto etanólico de la planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” en 2 niveles de concentraciones.

Los diámetros de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina 10mcg) fueron de 23.7 mm, 20.0 mm y 24.3 mm, lo cual, según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del Instituto Nacional de Salud, lo califica como 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).

En estudios similares realizados por Rodríguez M, Zevallos F.<sup>34</sup>; desarrollados en el Instituto de Medicina Tradicional – Essalud; utilizaron como control positivo al antibiótico Gentamicina 10mg y obtuvieron un diámetro de inhibición de 20.4 mm y 19.9 mm.; asimismo Ríos N, Dávila R.<sup>35</sup> y Rojas, Ochoa, Ocampo y Muñoz.<sup>36</sup>; En una evaluación de actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria de distintos extractos de plantas medicinales; donde utilizaron como controles positivos a Sulfato de Gentamicina 1.0 ug/ml, clindamicina 0.3 ug/ml y nistatina 1.0 ug/ml.

Según los resultados obtenidos, respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de 12mg/ml y 6mg/ml, se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano, evidenciando un diámetro de zona de inhibición (DZI) de  $28.3 \pm 1.5$  mm para la concentración de 12mg/ml y  $22.7 \pm 4.5$  mm para la concentración de 6mg/ml; el

cual nos indicaron como resultado SENSIBLE en comparación con los criterios de categorización del Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, frente a su control positivo; donde indica que cuando se utiliza como antibiótico de control positivo a sulfato de Gentamicina; se categoriza como SENSIBLE cuando el halo de inhibición se encuentra >15mm. Frente a *Escherichia coli*, a concentración de 12mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de  $19.7 \pm 5.0$  mm, y a 6mg/ml obtuvo  $15.7 \pm 5.1$  mm; con el cual ambos categorizan como inhibición SENSIBLE, por tener un halo de inhibición >15mm.

Frente a *Pseudomonas aureginosa*, a concentración de 12mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de  $19.3 \pm 4.5$  mm, con el cual es categorizado como SENSIBLE y a 6mg/ml obtuvo  $14.7 \pm 4.7$  mm; con el cual ambos categorizan como inhibición INTERMEDIO, por tener un halo de inhibición de 13.0 a 14.9 mm.

Con estos resultados encontrados se calculó el porcentaje de inhibición para determinar la actividad antibacteriana, tomando como referencia el protocolo de estudio del Instituto de Medicina Tradicional (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75% Buena actividad :> 76 %) obteniéndose para *Staphylococcus aureus* en ambas concentraciones un valor de 119.5% y 95.64% de inhibición, por lo tanto es considerado en la clasificación de BUENA ACTIVIDAD. *Escherichia coli* a la concentración de 12mg obtuvo un 98.33%, y a la concentración de 6mg obtuvo un 78.33%, los cuales son considerados como BUENA ACTIVIDAD. *Pseudomonas aureginosa* a la concentración de 12mg obtuvo un 79.56%, considerándose BUENA ACTIVIDAD y a la concentración de 6mg obtuvo un 60.36%, lo cual es considerado como MODERADAMENTE ACTIVO.

Con esta especie vegetal *Chamaesyce thymifolia*, no se encuentran investigaciones respecto a la actividad antibacteriana, sin embargo hay un

estudio sobre los flavonoides como efecto antiviral. Mayor cantidad de estudios se realizaron con especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae.

Amaral A. et al.<sup>37</sup> realizaron un estudio para determinar la actividad antiviral de los extractos flavonoidicos de las partes aéreas de *Chamaesyce thymifolia*, donde encontró una elevada citotoxicidad sobre células HEp-2 y moderada actividad inhibitoria sobre los virus HSV-1 y BVDV. Este resultado puede relacionarse con nuestra elevada actividad antibacteriana en nuestro ensayo debido a que también presentan Flavonoides y compuestos fenólicos y taninos.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica, Como una forma de protección ante el daño ocasionado por heridas y al ataque por insectos y microorganismos patógenos, las plantas han logrado desarrollar una gran variedad de formas de defensa ante condiciones adversas de estrés biótico y abiótico. Las plantas sintetizan enzimas que logran degradar la pared celular de algunos microorganismos. La estructura y composición de la pared celular también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos y/o microorganismos. Como parte de su protección química, las plantas sintetizan metabolitos secundarios, algunos con actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante, y otros como precursores de otros metabolitos secundarios que se forman hasta el momento de ser atacadas por algún microorganismo. (Rowell, R. M.; Pettersen, R.; Han, J. S.; Rowell, J. S. y Tshabalala, M. A.<sup>38</sup> La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología.

De los resultados obtenidos, se aprecia la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, frente a *Staphylococcus aureus*, por el método de Macrodilución, donde se determinó la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) en el Tubo C4 cuya concentración del extracto fue de 4mg/ml, lo cual indica que a partir de esta concentración se evidencia aclaramiento de la turbidez de los tubos de ensayo; comprobándose

que se disminuye o inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a partir de esta concentración. Frente a *Escherichia coli*, se determinó la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) en el Tubo C5 cuya concentración del extracto fue de 2mg/ml, y frente a *Pseudomonas aureginosa*, se determinó en el tubo C4 (4mg/ml).

La determinación de la actividad antimicrobiana según el valor del CIM, estos resultados están calificados como MODERADAMENTE ACTIVOS.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Parekh J. et al.<sup>39</sup>; que estudiaron la actividad antibacteriana con extractos acuosos y etanólicos de *Euphorbia hirta* L. y *Euphorbia tirucalli* L., donde demostraron ser efectivos frente a *S. aureus*, *E. coli*, Bacillos sp. Considerándose al extracto etanólico con mayor capacidad inhibitoria.

Bezerra G.<sup>32</sup>, estudio varias especies de la familia Euphorbiaceae sobre la composición fitoquímica y actividades biológicas, dentro de ellas la actividad antibacteriana; donde menciona la eficacia del extracto etanólico en la inhibición del crecimiento de Gram Negativas y asevera que este efecto puede deberse por la presencia de una gama de metabolitos secundarios, principalmente a la presencia de flavonoides.

Asimismo, Adefuye AO et al.<sup>40</sup>; estudio la corteza del tallo de *B. micrantha* (Euphorbiaceae), en un extracto en acetato de etilo, obteniendo buenos resultados como antibacteriano, aduciendo que esta especie puede proporcionar moléculas importantes, que podrían ser sustrato útil para la síntesis de nuevos antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de infecciones causadas estos organismos.

La purificación adicional, identificación y caracterización de los compuestos activos podrían ser nuestra prioridad en futuros estudios con esta especie *Chamaesyce thymifolia* “Pie de paloma”.

## CONCLUSIONES

- Del tamizaje fitoquímico se obtuvieron respuesta positiva para una gran diversidad de grupos funcionales, en el extracto hexánico se comprobó la presencia de Alcaloides (+), carotenos (+), aceites esenciales – grasas (+) y quinonas (++) y con mayor proporción triterpenos y esteroides (+++), lactonas y curmarinas (+++). Respecto al extracto etanólico destacan triterpenos y esteroides (+++), Fenoles y taninos (+++), alcaloides (++) , lactonas y curmarinas (++) y flavonoides (+). En el extracto acuoso se encontró en mayor proporción azúcares reductores (+++), Fenoles y taninos (+++), Saponinas (+), flavonoides (+) y alcaloides (+).
- Según los resultados obtenidos, respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la planta entera de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*” frente a *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de 12mg/ml y 6mg/ml, se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano, evidenciando un diámetro de zona de inhibición (DZI) de  $28.3 \pm 1.5$  mm para la concentración de 12mg/ml y  $22.7 \pm 4.5$  mm para la concentración de 6mg/ml; el cual nos indicaron como resultado SENSIBLE.
- Frente a *Escherichia coli*, a concentración de 12mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de  $19.7 \pm 5.0$  mm, y a 6mg/ml obtuvo  $15.7 \pm 5.1$  mm; con el cual ambos categorizan como inhibición SENSIBLE, por tener un halo de inhibición >15mm.
- Frente a *Pseudomonas aureginosa*, a concentración de 12mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de  $19.3 \pm 4.5$  mm, con el cual es categorizado

como SENSIBLE y a 6mg/ml obtuvo  $14.7 \pm 4.7$  mm; con el cual ambos categorizan como inhibición INTERMEDIO, por tener un halo de inhibición de 13.0 a 14.9 mm.

- Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución, se aprecia la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, frente a *Staphylococcus aureus*, por el método de Macrodilución, donde se determinó la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) en el Tubo C4 cuya concentración del extracto fue de 4mg/ml, lo cual indica que a partir de esta concentración se evidencia acalamamiento de la turbidez de los tubos de ensayo; comprobándose que se disminuye o inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a partir de esta concentración.
- Frente a *Escherichia coli*, se determinó la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) en el Tubo C5 cuya concentración del extracto fue de 2mg/ml, y frente a *Pseudomonas aureginosa*, se determinó en el tubo C4 (4mg/ml).
- La determinación de la actividad antimicrobiana según el valor del CIM, estos resultados están calificados como MODERADAMENTE ACTIVOS.

## RECOMENDACIONES

- Realizar fraccionamiento, aislamiento y purificación de los componentes más abundantes que se encuentre en *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*”, para probar cuál de las fracciones tiene un mejor efecto antibacteriano o determinar un sinergismo entre sus componentes.
- Realizar diseños de ensayos antibacterianos con diferentes controles positivos como oxaciliana, penicilina, eritromicina, etc, con el objetivo de profundizar los estudios.
- Desarrollar otros ensayos para corroborar la sensibilidad antimicrobiana de *Chamaesyce thymifolia* “*pie de paloma*”, y así validar los resultados obtenidos.
- Desarrollar un estudio toxicológico de la planta por que se demostró que tiene una excelente actividad frente a estas tres bacterias estudiadas.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Espinoza V. Muñoz F.:** Gérmenes bacterianos más frecuentes y su patrón de sensibilidades y resistencias en un Hospital Pediátrico de tercer nivel. [Tesis para obtener el título de Pediatría Médica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
2. **Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E.:** Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Pública Mex.* 2009; 51(suppl 3):S439-S446.
3. **Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M.:** Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:346-352.
4. **Typhoid Fever.** WHO Fact Sheet N149. March 1997; <http://www.who.int/inffs/en/fact149.html> [consulta: 9 abril 2002]
5. **Barquero A.:** Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Rev. Quím Viva* 6: 19 – 35, 2007.
6. Dugdhika. *Ayurveda Herbs/Medicinal-Plant-thymifolia.aspx.* (2012)
7. **Loizeau, P.; Spichiger, R.:** Moraceae. Contribución a la Flora de la Amazonía Peruana. Génova, IT, p. 17-85. IIAP-PUB.033. (1990).
8. **Reynel, C; Pennington, T; Pennington, R; Flores, C; Daza, A.:** Árboles útiles de la Amazonia Peruana y sus usos, un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Ilustraciones. (2003).



9. **Escobar A.:** Extractos de plantas como inhibidores de la formación de Biopelícula de *Escherichia coli* 0157: H7, facultad de ciencias biológicas, Universidad Autónoma de nuevo León, Mexico.julio, (2014).
10. **Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G.** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. Braz J Microbiology. 2000; 31:247-56.
11. **Desta, B.:** Ethiopian tradicional herbal drugs. Part II: antimicrobial activity of 63 medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 39, 129-139.(1993).
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova. (1997).
13. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ,** et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406:959-964
14. **Engel J, Balachandran P.** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. Curr Opin Microbiol 2009; 12:61-66.
15. **Tan TT.** “Future” threat of gram-negative resistance in Singapore. Ann Acad Med Singapore 2008; 37:884-890.
16. **Drasar B.; Hill M.:** Human intestinal flora. Academic Press, London, , 1974
17. **Donnenberg MS.** Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature 406: 768-774, 2000.

18. **Kloss W.** Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. En: Crossley KB, Archer GL, Eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:113-215.
  
19. **Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Alcalá L, Bouza E.** Grupo de Trabajo para el estudio de estafilococos. Situación actual de la resistencia de Staphylococcus en España. Cuarto estudio nacional (1996). Rev Clin Esp 1997; 197:12-18.
  
20. **WRAY C. & WRAY A.,** EDS (2000). Salmonella in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
  
21. **Kaye K, Engemann J, Fraimow H, Abrutyn E.:** Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. Infect Dis Clin North Am. 2004; 18(3):467-511.
  
22. **Organización Mundial de la Salud.** Manual de bioseguridad en el laboratorio. 2005. Tercera Edición. Ginebra.
  
23. **Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M.** (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. Food Chem. 85:415-421.
  
24. **Dartois V, Sanchez-Quezada J, Cabezas E, Chi E, Dubbelde C, Dunn C, Granja J, et al.** (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. Antimicrob Agents Chemother. 49:3302-3310.
  
25. **Rodríguez M, Zevallos F.** Actividad antibacteriana in vitro del fruto de Morinda citrifolia l. y planta entera de Notholaena nivea (poiret) desv, frente a Escherichia

coli, Staphylococcus aureus y Enterococcus faecalis, Imet- Essalud 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.

26. **Ríos N, Dávila R.** “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE Geranium ayavacense SOBRE Escherichia coli, Enterococcus faecalis y Staphylococcus aureus, IMET-ESSALUD-2013”. Essalud 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.)
27. **Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., Muñoz, J.** Detección de la actividad antimicrobiana de 10 plantas medicinales utilizados en la medicina folclórica de Colombia: Una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. BMC Complementary and Alternative Medicine 2006; 6: 2-2
28. **Guerra G. y Guerra H.:** Bioseguridad en el Laboratorio. Bioseguridad. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud-INS.. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud. (2000).
29. (Parekh J., Jadeja D., Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. Turk J Biol 2005; 29: 203-210.)
30. (Corral A, De la Paz J, Concepción E, Hernández R, López D. Tamizaje, Tecnología, control de calidad y farmacología del extracto fluido de Bouganvillea spectabilis Willd. Rev Cubana Plant Med. 1997; 2 (2): 19-25.).
31. (Kane S, Mohite S, Shete J. Antihelmintic activity of aqueous and Methanolic extracts of Euphorbia thymifolia Linn. Int.J. PharmTech Res. 2009; 1(3): 666 – 669.)
32. (Bezerra G. Estudo Fitoquímico e Biológico In Vitro de Espécies do Gênero Euphorbia: E. hirta, E. hyssopifolia e E. thymifolia L. (Tesis de Maestría). Petrolina: Universidade Federal do Vale do Sao Francisco, 2015.)

33. (Toribio MS, Oriani DS y Skliar MI. Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. *Ars. Pharm.* 2004; 45(4): 335-341.).
34. (Rodríguez M, Zevallos F. Actividad antibacteriana in vitro del fruto de *Morinda citrifolia* L. y planta entera de *Notholaena nivea* (Poir.) Desv, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, Imet- Essalud 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.).
35. ( Ríos N, Dávila R. “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE *Geranium ayavacense* SOBRE *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013”. *Essalud* 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.).
36. (Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., Muñoz, J. Detección de la actividad antimicrobiana de 10 plantas medicinales utilizados en la medicina folclórica de Colombia: Una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6: 2-2).
37. (Amaral A, Kuster R, Gonçalves J, Wigg M. Antiviral Investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia* 1999; 70(3):293-295.)
38. (Rowell, R. M.; Pettersen, R.; Han, J. S.; Rowell, J. S. y Tshabalala, M. A. 2005. Cell Wall Chemistry. En Roger M. Rowell (ed). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press. Sepulveda J., G.; Porta D., H. y Rocha S., M. 2003.).
39. (Parekh J., Jadeja D., Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk J Biol* 2005; 29: 203-210.).
40. (Adefuye AO, Ndip RN. Phytochemical analysis and antibacterial evaluation of the ethyl acetate extract of the stem bark of *Bridelia micrantha*. *Phcog Mag* 2013).

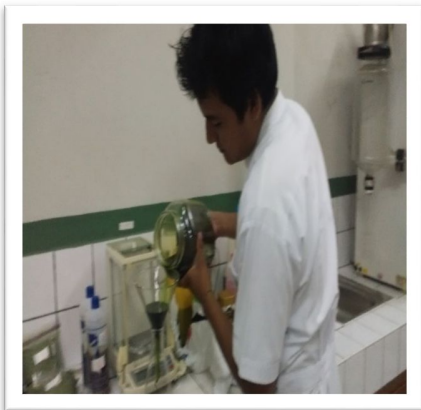
## ANEXOS

**FIGURA N°01.** *Chamaesyce thymifolia* “pie de paloma”.



### OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

**Foto N° 01** Filtración de los extractos



**Foto N°02** Concentración de los extractos  
Mediante el rotavapor.

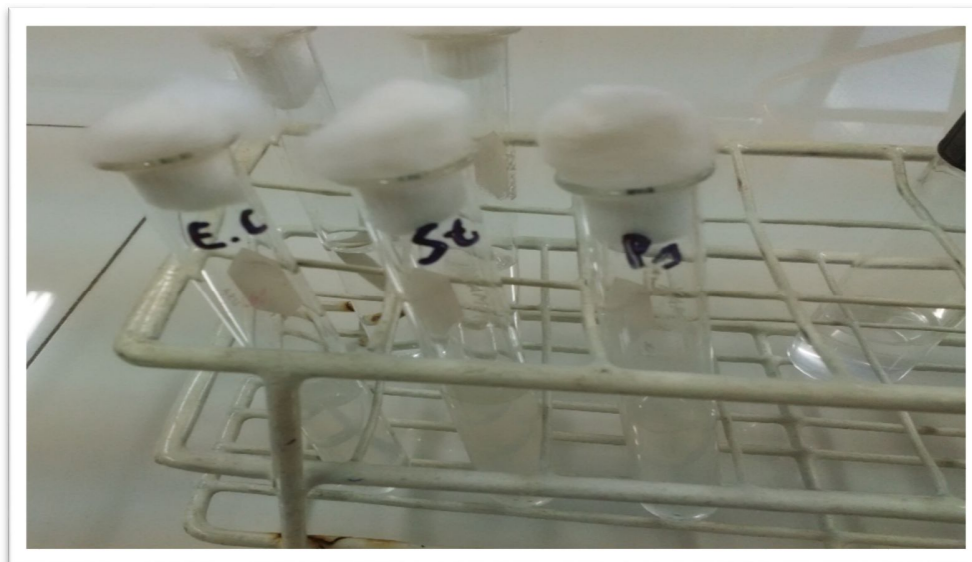


**Foto N° 03 Extracto Etanólico**



**Población microbiológica**

**Foto N° 04 Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio**



**Procedimientos de los ensayos de actividad antibacteriana**

**FOTO N° 05 MICROTUBOS, TIPS PARA MICROPIPETETAS, MATRAZ CON AGAR MUELLER HINTON, TUBOS DE CINa ANTES DE SER LLEVADOS AL AUTOCLAVE.**

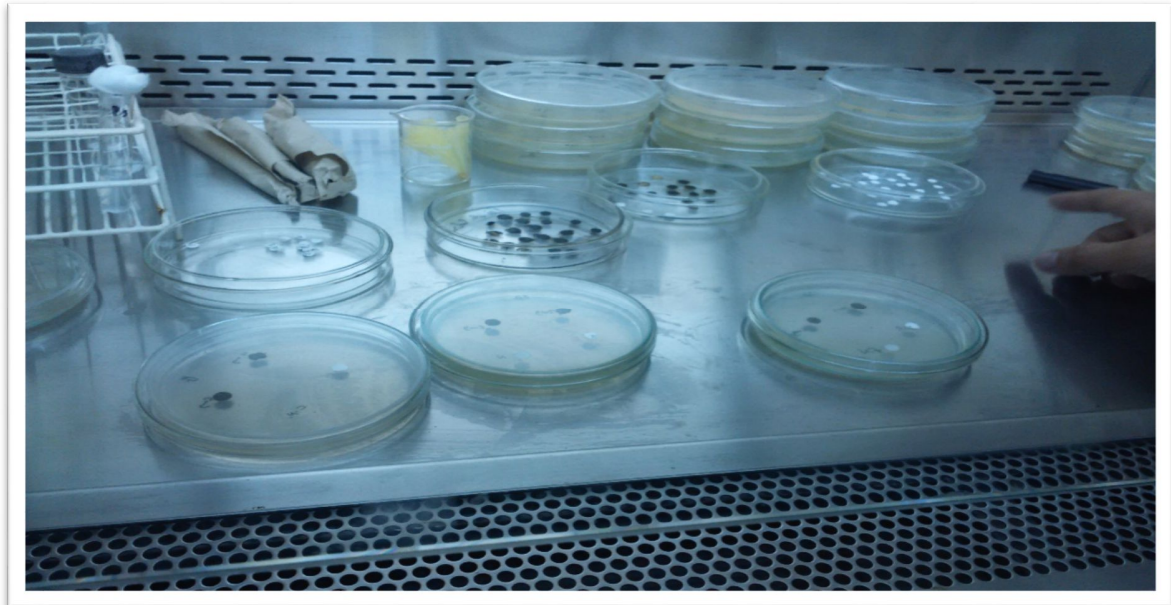


**FOTO N° 06 PLACAS PARA LOS ENSAYOS DESPUES DE SACARLOS DE LA ESTUFA**





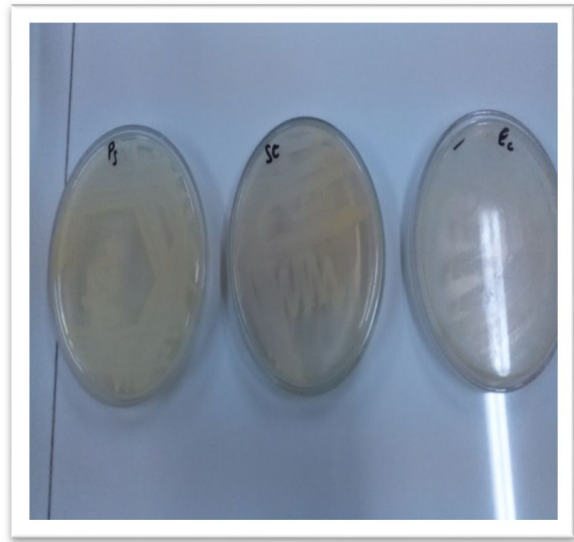
**FOTO N° 07 Preparación de las placas con Agar Mueller Hinton para los ensayos.**



**Foto N°08 Siembra de las bacterias en las Placas para los estudios.**

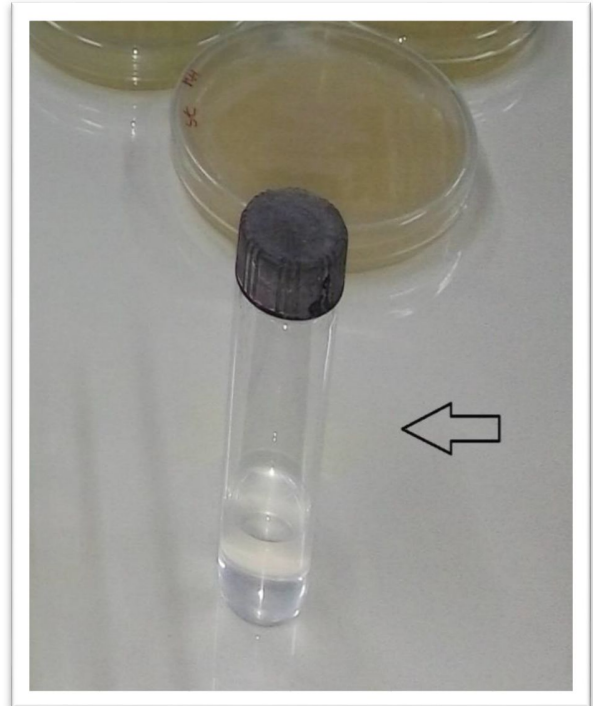


**FotoN°09 Crecimiento de las bacterias de Estudio después de 24 horas de incubación**





**Foto N° 10 Cultivo bacteriano en tubo de CINa 0.9% para su respectivo crecimiento (izquierda). Patrón de Mac farland (derecha)**



**Foto N° 11 Procedimientos realizados del ensayo de Macrodilución**

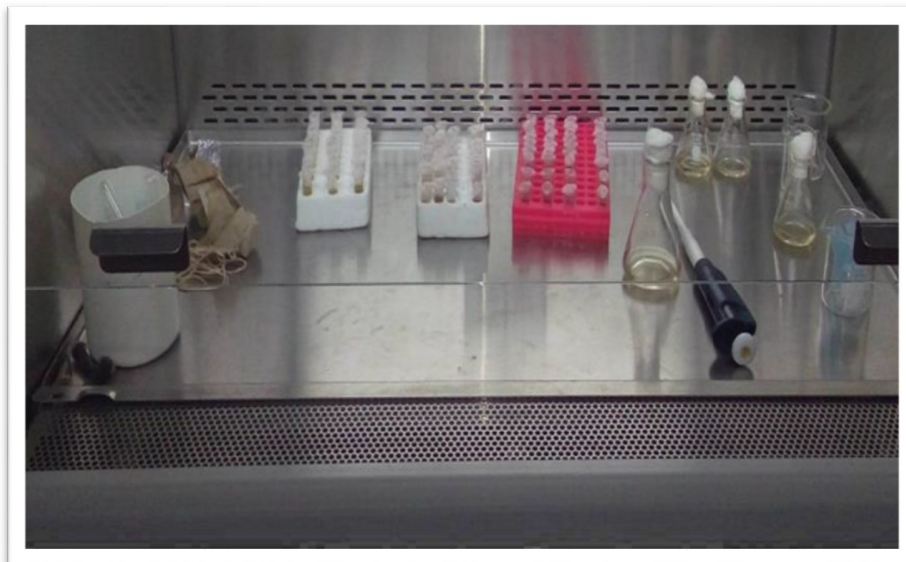


Foto N° 12 Secuencia de microtubos realizados aplicando el ensayo de macrodilución con el Extracto de *Chamaesyce thymifolia* "pie de paloma" para *Pseudomonas aureginosa*, *staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

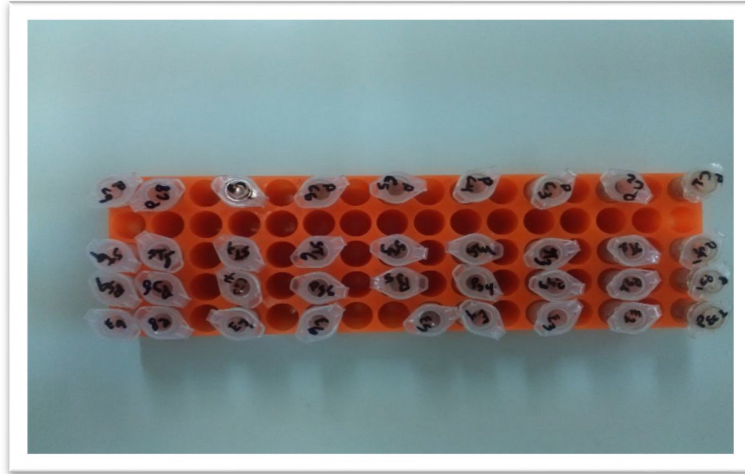


Foto N° 13. Resultados de E.C, Difusión en Disco. *staphylococcus aureus*

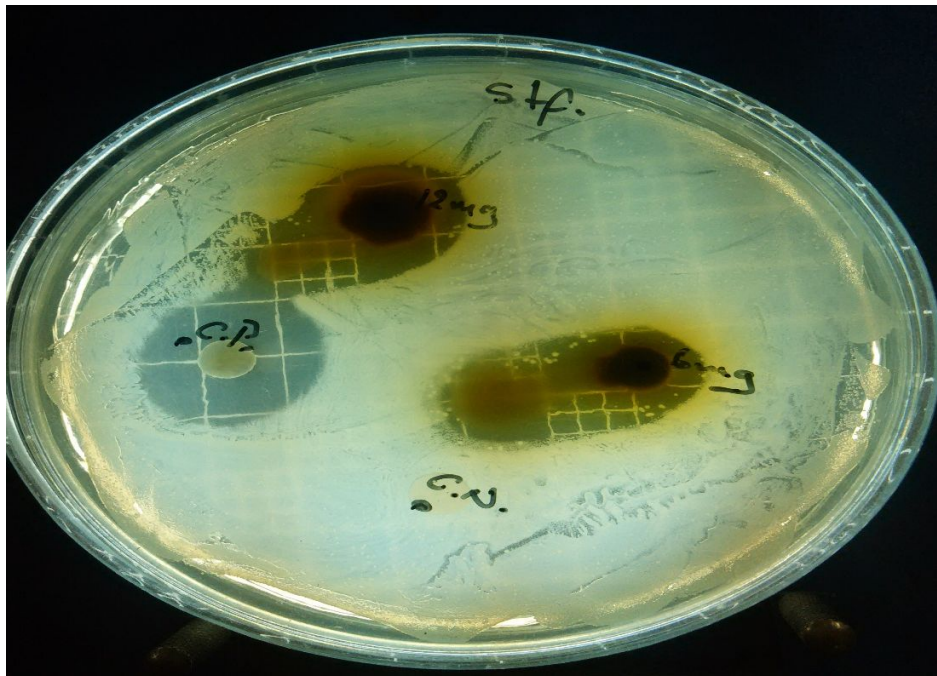


Foto N° 14. Resultados de E.C, Difusión en Disco.  
*Pseudomonas aureginosa*

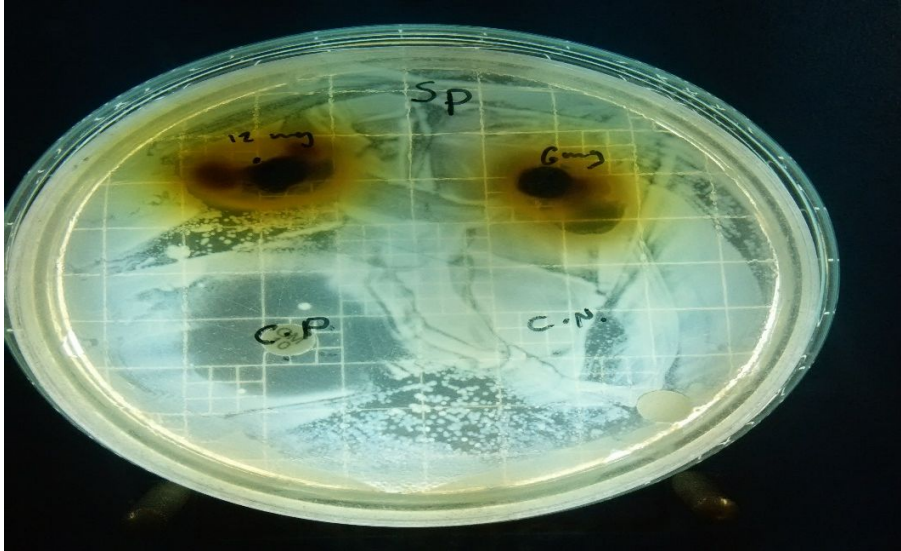


Foto N° 15. Resultados de E.C, Difusión en Disco.  
*Escherichia coli*

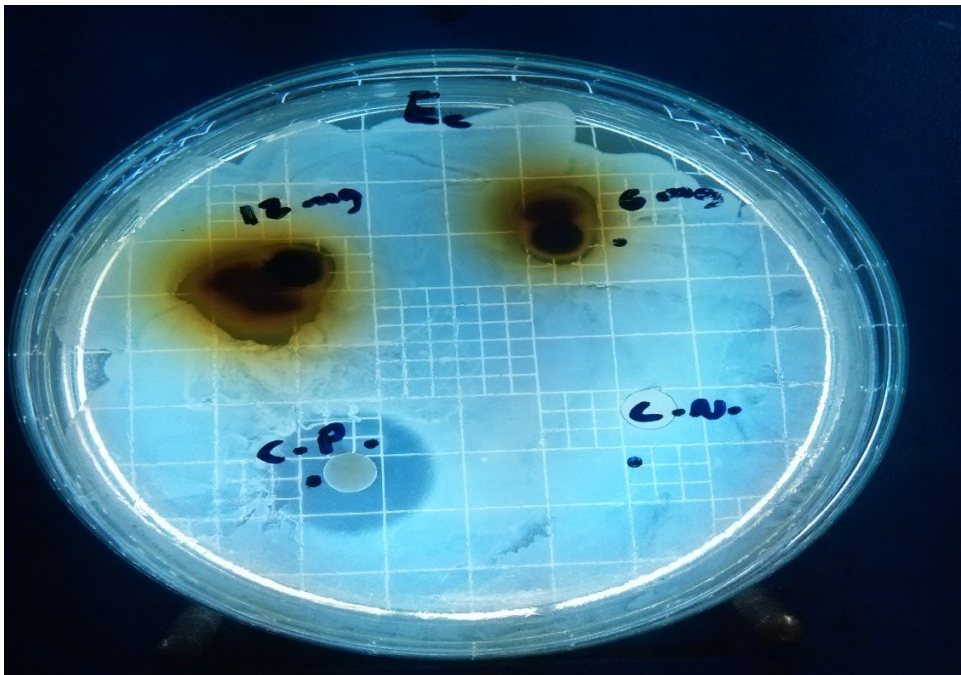




IMAGEN N° 01



Herbarium Amazonense – AMAZ  
Centro de Investigación  
de Recursos Naturales

## CONSTANCIA N° 023-2016-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de La Universidad Nacional De La Amazonia Peruana

### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por las bachilleres: **MARCOS ANDRES RIOS MACEDO y JHON KLAUSSEN FLORES HERNANDEZ**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: **“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN Y DIFUSIÓN EN AGAR”**. La cual fue verificado y determinado en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP. Que a continuación se indica:

Código de Herbarium	Familia	Nombre Científico
000494	EUPHORBIACEAE	<i>Chamaesyce thymifolia</i> (L.) Millsp.

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos 06 de Mayo del 2016

Atentamente,

  
  
Bigo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA  
Coordinador del Herbarium AMAZ  
CIRNA-UNAP