UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO:

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE *Clidemia hirta L Don* "MULLACA MORADA" POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN, FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

AUTORES:

Bach. LUIS DANIEL SALDAÑA SUNCIÓN

Bach. DANITZA GABRIELA GARCÍA MEDINA

ASESORES:

REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS

MARITZA GRANDEZ RUIZ

IQUITOS – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

EVALUACIÓN FITOQUIMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE *Clidemia hirta L Don* "MULLACA MORADA" POR EL METODO DE DISCO DIFUSIÓN, FRENTE A MICROORGANISMOS PATOGENOS.

PAGINA DE APROBACIÓN

Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
Presidente de Jurado

Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ
Miembro de Jurado

CLETO JARA HERRERA
Miembro de Jurado

REYNA GLADYS CARDENAS CARDENAS
Asesora

MARITZA GRANDEZ RUIZ
Asesora

UNAP

Facultad de
Farmacia y Bioquímica

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 17 días del mes de Junio del dos mil dieciséis, siendo las 19:00 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación Nº 063-FFB-UNAP-2016, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- **Q.F.HENRY VLADIMIR DELGADO WONG** — **PRESIDENTE**
- **Q.F. LUIS ALBERTO VÍLCHEZ ALCALÁ, Mgr.** — **MIEMBRO**
- **ING. CLETO JARA HERRERA** — **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 "**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE *Clidemia hirta* L Don "MULLACA MORADA" POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN, FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS",** presentado por los Bachilleres **LUIS DANIEL SALDAÑA SUNCIÓN y DANITZA GABRIELA GARCÍA MEDINA,** para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley Nº 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de las 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 Unanimidad

2.- Observaciones Ninguna

Siendo las 20:30 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a las sustentantes por su Adecuada exposición

Q.F.HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
PRESIDENTE

Q.F. LUIS ALBERTO VÍLCHEZ ALCALÁ
MIEMBRO

ING. CLETO JARA HERRERA
MIEMBRO

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE *Clidemia hirta L Don* "MULLACA MORADA" POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN, FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

Saldaña Sunción L.D[1].; García Medina D.G.[1]

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

RESUMEN

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, ubicada en Nina Rumi, Distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto; el objetivo fue realizar el tamizaje fitoquímico y determinar la actividad antibacteriana *In vitro* de *Clidemia hirta* L. Don "Mullaca morada" por el método de disco difusión, frente a microorganismos patógenos, las muestras de hojas y frutos fueron colectados en alrededores de la facultad de Farmacia y Bioquímica. El tamizaje fitoquímico se realizó, por el método modificado de Schabra y Cols y la actividad antibacterial se determinó del extracto etanólico de las hojas por el método de Disco Difusión (Kirby-Bauer), frente *Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa*. En la hojas se evidenció la presencia de triterpenos-esteroides, aceites esenciales, Fenoles, compuestos reductores, agrupamientos lactónicos, flavonoides en forma abundante, carotenos, saponinas en menor cantidad. En frutos se encontraron en forma abundante alcaloides, triterpenos-esteroides, carotenos, aceites esenciales, saponinas, fenoles, compuestos reductores y flavonoides; poca cantidad de agrupamientos lactónicos. No encontrándose aminoácidos y aminas. La actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *C. hirta* frente a *Staphylococcus aureus* fue de 66.67% a las concentraciones de 19mg/ml, 58.33% a la concentración de 12 mg/ml, obteniéndose como resultado Moderadamente Activo; Para *Escherichia coli*, se obtuvo 85.19% a 19mg/ml, clasificándose como Buena Actividad y 74.07% y 62.96% a las concentraciones de 12 y 6 mg/ml con Moderada Actividad. Para *Pseudomonas aeruginosa*, no se evidenció inhibición alguna, siendo considerado INACTIVO. Se concluye que el extracto etanólico de hojas de *C. hirta* a las concentraciones de 12 y 19mg/ml presentaron ligera actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, *Clidemia hirta*, tamizaje fitoquímico.

PHYTOCHEMICAL EVALUATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY *In vitro* OF *Clidemia hirta L Don* "MULLACA MORADA" BY THE DIFFUSION DISK METHOD, AGAINST PATHOGENIC MICROORGANISMS

Saldaña Sunción L.D[1].; García Medina D.G.[1]

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

ABSTRACT

This research was conducted in the laboratories of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, located in Nina Rumi, District of San Juan, Province of Maynas, State of Loreto, the objective was make the phytochemical screening and determine the antibacterial activity In vitro of *Clidemia hirta* L. Don "Mullaca morada" by the diffusion disk method against pathogenic microorganisms, samples of leaves and fruits were collected surroundings of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry. The phytochemical screening was performed, by the method modified of Schabra y Cols and the antibacterial activity was determined of ethanolic extract of leaves by the diffusion disk method against *Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa*. In the leaves showed higher: triterpens – steroids, essential oils, phenolics, lactones, flavonoids, and less carotene, saponins. In the fruits showed higher: alkaloids, triterpens – steroids, carotenes, essential oils, saponins, phenolic and flavonoids. It was not found amino acids and amines. The antibacterial activity of ethanolic extract of leaves of *C. hirta* against *Staphylococcus aureus* was 66.67% to concentration of 19mg/ml, 58.33% to 12 mg/ml, obtained as a result Moderately Active; *Escherichia coli*, was 85.19% to 19mg/ml, obtained as a result Good Activity, 74.07% and 62.96% to concentration of 12 y 6 mg/ml with Moderately Active. For *Pseudomonas aeruginosa*, no inhibition was evidenced, it is considered Inactive. It is concluded that the ethanol extract of leaves of *C. hirta* to concentrations of 12 y 19mg/ml presented light antibacterial activity against to *S. aureus* and *E. coli*.

Key words: Antibacterial activity, *Clidemia hirta*, phytochemical screening.

DEDICATORIA

La presente Tesis está dedicada a Dios,
ya que gracias a él he logrado concluir
mi carrera;

a mis padres Luis y Martha porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona,

A mis hermanos Martha y Nino, por sus palabras y su compañía; a mi querida prima Andrea por ser mi amiga fiel y a mis tías Marleni y Adela por su apoyo en mis años universitarios.

MUCHAS GRACIAS

LUIS DANIEL

DEDICATORIA

Mis logros están dedicados al forjador de mi camino, a nuestro padre celestial, que siempre me acompaña y me levanta cuando desfallezco.

A mis padres Luis y María quienes me enseñaron y apoyaron en este largo recorrido brindándome su amor y ejemplo en forma incondicional, enseñándome que con esfuerzo y dedicación los sueños se hacen realidad y serán mi ejemplo a seguir.

A mis hermanitos Brian, Katherine, Shirley por sus consejos paciencia y amor. A Sari quien es y será un gran apoyo y parte de nuestra familia. A todos mis familiares y amigos quienes siempre tuvieron palabras de aliento, superación y creyeron en mí.

MUCHAS GRACIAS

DANITZA GABRIELA

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, nuestro infinito agradecimiento por habernos albergado durante estos seis años de formación profesional, a la plana docente por haber compartido sus conocimiento con mucha dedicación y esfuerzo.

A nuestras asesoras Ing. GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS, Dra., e Ing. MARITZA GRANDEZ RUÍZ, Dra., por su apoyo en la realización de este trabajo de tesis.

A los miembros del Jurado presidido por el Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG, por la voluntad de apoyarnos incondicionalmente para llegar hasta donde hemos llegado.

A nuestros amigos y compañeros con quienes hemos compartido momentos de alegría y tristeza, fortaleciendo nuestra amistad y compañerismo durante estos años que compartimos juntos.

Gracias

INDICE TEMÁTICO

CONTENIDOS	**Pág.**
CARÁTULA	1
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
ACTA DE SUSTENTACIÓN	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
DEDICATORIA	6-7
AGRADECIMIENTOS	8
CAPÍTULO I	
I.-INTRODUCCIÓN	17-19
1.1.- OBJETIVOS	20
CAPÍTULO II	
II.- MARCO TEÓRICO	22
2.1.- ANTECEDENTES	22-26
2.2.- MARCO CONCEPTUAL	27
2.2.1.- Especie Vegetal: *Clidemia hirta* L. Don "Mullaca morada"	27
2.2.1.1.- Clasificación taxonómica	28
2.2.1.2.- Características de la especie	28
2.2.1.3.- Descripción Botánica	28-29
2.2.1.4.- Distribución	29
2.2.1.5.- Control Biológico	30
2.2.1.6. Usos Tradicionales	30
2.2.2. Generalidades: METABOLITOS SECUNDARIOS	31
2.2.2.1. Antecedentes de los metabolitos secundarios de origen vegetal	31-32
2.2.2.2. Importancia de los metabolitos secundarios	32
2.2.2.3. Metabolito secundario	32
2.2.2.4. Metabolismo secundario	33
2.2.3. EXTRACTOS VEGETALES	33-34
2.2.3.1.-Consistencia de los extractos	34

2.2.3.2.-Extractos blandos 34
2.2.3.3.-Extractos firmes o de consistencia pilular 34
2.2.3.4.- Extractos secos 34-35
2.2.3.5.-Extractos fluidos 35
2.2.3.6.-Caracteristicas de los extractos 35-36
2.2.3.7.-Conservación de los extractos 36-37
2.2.4.-METODOS DE EXTRACCIÓN 37
2.2.5.-MOLECULAS ACTIVAS EN EL AMBITO MEDICINAL E INDUSTRIAL 38
2.2.5.1.-Los Alcoholes 38
2.2.5.2.-Los fenoles 38-39
2.2.5.3.-Cumarinas 39
2.2.5.4.-Alcaloides 39-40
2.2.5.5.-Los Aldehidos 40
2.2.5.6.-Los Terpenos 40
2.2.5.7.-Flavonas 40-41
2.2.5.8.-Los Isoflavonoides 41
2.2.5.9.-Quinonas 41
2.2.5.10.-Tanoides o Taninos 41-42
2.2.5.11.-Los aceites esenciales 42
2.2.5.12.-Saponinas 42
2.2.5.13.-Esteroides y Triterpenos 42
2.2.5.14.-Cromenos y Benzofuranos 43
2.2.5.15.-Sesquiterpenlactonas 43
2.2.6.-MICROORGANISMOS SELECCIONADOS 44
2.2.6.1.-Bacteria *Staphylococcus aureus* 44
2.2.6.1.1.-Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus* 44-45
2.2.6.2.-Bacteria *Escherichia coli* 46
2.2.6.3.1.-Clasificación taxonómica de *Escherichia coli* 47-48
2.2.6.4.-Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* 48
2.2.6.4.1.-Clasificación Taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa* 48-53
2.2.7.- ANTIMICROBIANOS 53-54
2.3.- HIPÓTESIS 55
2.4.- DEFINICIONES OPERACIONALES 56

2.4.1- VARIABLES 56
2.4.1.1.-Variable independiente 56
2.4.1.2.-Variable dependiente 56
2.5.- INDICADORES 56
2.5.1.- Indicador Independiente 56
2.5.2.- Indicador Dependiente 56
2.5.3.- Operacionalización de variables 57-59

CAPITULO III
III.- METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 61
3.1.- TIPO DE ESTUDIO 61
3.1.1.- Diseño de la Investigación 61-62
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA 62
3.2.1.- Población vegetal 62
3.2.2.- Muestra Vegetal 62
3.2.3.- Criterios de inclusión 62
3.2.4.- Criterios de Exclusión 62
3.2.5.- Población Bacteriana 62
3.2.6.- Muestra bacteriana 63
3.2.7.- Criterios de inclusión 63
3.2.8.- Criterios de exclusión 63
3.3.- PROCEDIMIENTOS, TÉCNICA E INSTRUMENTOS
DE RECOLECCIÓN DE DATOS 63
3.3.1.- Procedimiento de recolección de datos 63
3.3.1.1.- Identificación y taxonomía de las muestras botánicas 63
3.3.1.2.- Preparación de la especie vegetal 64
3.3.1.3.- Procesamiento de la muestra botánica 64
3.3.1.4.- Obtención del Extracto Etanólico 65
3.3.1.5.- Determinación de rendimiento 66
3.3.1.6.- Preparación de los extractos a diferentes concentraciones 66
3.3.1.7.- Actividad antimicrobiana disco difusión (Kirby-Bauer) 66
3.3.1.8.- Preparación de los discos de sensibilidad 67
3.3.1.9.- Estandarización de la cepa bacteriana a utilizar 67
3.3.1.10.- Prueba de Sensibilidad 67

3.3.1.11.- Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición 67
3.3.1.12.-Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición 68
3.3.2.- Materiales e Instrumentos 68
3.3.2.1. Material vegetal 68
3.3.2.2. Material biológico 68
3.3.2.3.-Equipos 68-69
3.3.2.4.-Medios de cultivo y reactivos químicos 69
3.3.2.5.- Materiales de laboratorio 69-70
3.4.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 70
3.4.1.- Secado y Almacenamiento 70
3.4.2.- Molienda 70
3.4.3.- Tamizaje fitoquímico 71
3.4.3.1.- El ensayo de Sudán III 71
3.4.3.2.- El ensayo de Dragendorff, Mayer, y Wagner 71
3.4.3.3.- El ensayo de Baljet 72
3.4.3.4.-Ensayo de Borntrager 72
3.4.3.5.- Ensayo de Liebermann – Burchard 72
3.4.3.6.- Ensayo de Ninhidrina 72
3.4.3.7.- El ensayo de Shinoda 72
3.4.3.8.- Ensayo de mucílagos 73
3.4.3.9.- El ensayo de espuma 73
3.4.3.10.-Ensayo de Fehling 73
3.4.3.11.-Ensayo de resina 73
3.4.4.- ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO 73
3.4.4.1.- Preparación del inóculo 73-74
3.4.4.2.- Dilución de extractos 74
3.4.4.3. - Inoculación de las placas 74-75
3.4.4.4. - Aplicación de los discos 75
3.4.4.5.- Incubación 75
3.4.4.6.- Lectura de las placas e interpretación de los resultados 75-76
3.4.4.7.- Interpretación de datos para el método de difusión en disco 76

3.4.4.7.1.- Valores críticos para la medida de sensibilidad en disco 76
3.4.4.7.2.- Procedimiento de categorización 76-77

CAPITULO IV
IV.- RESULTADOS 79
4.1. Obtención de Extractos vegetales 79
4.1.1.- Determinación del Rendimiento de *Clidemia hirta* "Mullaca morada" 79
4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico 80-81
4.1.3 Actividad antibacteriana de *Clidemia hirta "*Mullaca Morada*"* 82
4.1.3.1.- Método de difusión de disco (Kirby - Bauer) 82-86

CAPITULO V
V.-DISCUSION 88-93

CAPITULO VI
VI.-CONCLUSIONES 95-96

CAPITULO VII
VII.- RECOMENDACIONES 98

CAPITULO VIII
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 100-113

ANEXOS 112-118

INDICE DE ANEXOS

Anexo N° 01: Constancia del Herbarium Amazonense 113
Anexo N° 02: Flujograma de recolección de datos para la evaluación Antibacterial 114
Anexo N° 03: Flujograma de Tamizaje Fitoquímico 115
Anexo N° 04: Preparación del Extracto Etanólico 116
Anexo N° 05: Tamizaje Fitoquímico 117
Anexo N° 06: Actividad Antibacterial 118

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Características Macro y Microscópicas de *Staphylococcus aureus* 44
Figura N° 02: Características Macro y Microscópicas de *Escherichia coli* 46
Figura N° 03: Características Macro y Microscópicas de *Pseudomonas aeruginosa* 49

INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01: Variable Independiente 57
Cuadro N° 02: Variable Dependiente 58-59
Cuadro Nº 03: Porcentaje de inhibición 67
Cuadro Nº 04: Clasificación actividad antimicrobiana 68
Cuadro N° 05: Categorización 76

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema N° 01: Esquema del diseño de investigación 62
Esquema N° 02: Obtención del extracto etanólico de *Clidemia hirta* 65

INDICE DE TABLAS

Tabla N°01: Rendimiento del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta* "Mullaca morada" 79

Tabla N° 02: Resultado del extracto n-hexánico 80

Tabla N° 03: Resultados del extracto etanólico 80

Tabla N° 04: Resultados del extracto acuoso 81

Tabla N°05: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Clidemia hirta "Mullaca morada"* frente a S*taphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa,* según diámetro de la zona de inhibición 82

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°01: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de *Clidemia hirta* "Mullaca morada" 79

Gráfico N° 02: Categorización del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"*, frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición 83

Gráfico N° 03: Categorización del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"*, frente a *Escherichia coli* según Diámetro de la zona de inhibición 84

Gráfico N° 04: Categorización del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"*, frente a *Pseudomonas aeruginosa* según Diámetro de la zona de inhibición 85

Gráfico N° 05: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"* según Porcentaje de inhibición 86

CAPITULO I

I.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son, actualmente, la principal causa de mortalidad y morbilidad en el mundo.[1] La aparición de patógenos resistentes a los antimicrobianos, ha originado el aumento de la disponibilidad de agentes antimicrobianos para el tratamiento sintomático de enfermedades en hospitales y en la comunidad, ya que ha disminuido la susceptibilidad a los antimicrobianos de los agentes patógenos bacterianos que contribuyen significativamente a la carga ocasionada por enfermedades respiratorias, febriles, diarreicas y del tracto reproductivo.[2]

En la actualidad en muchos sistemas de salud de América, Asia y Europa; es frecuente el uso de drogas vegetales y de fitomedicinas, como parte integral de la medicina convencional.[3] El uso de las plantas medicinales ha sido de vital importancia en el pueblo egipcio, los griegos y los romanos heredaron la tradición de Egipto y existen muchos textos escritos, sobre todo por médicos y científicos griegos que hablan sobre las propiedades de las plantas. En China y en la India, el uso de las plantas medicinales está muy extendido y forma parte de la cultura popular y las clases más desfavorecidas económicamente. Los monjes en sus monasterios han empleado mucho tiempo para estudiar las plantas medicinales.

Los primeros habitantes de la región amazónica vivieron en un aprendizaje permanente de los beneficios que le ofrecía el entorno para la salud y la cura de enfermedades.[4] Nuestro país tiene una gran diversidad biológica por el número de especies, recursos genéticos y variedad de ecosistemas. El uso de fitofármacos es una alternativa válida para implementar una política de atención primaria de salud por su bajo costo y su uso tradicional.[5] Considerando que la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo.

La OMS informa sobre la resistencia a los antimicrobianos y en particular a los antibióticos, siendo una grave amenaza para todas las regiones del mundo. Ya que hace, que los antibióticos dejen de funcionar, en el tratamiento para las infecciones. Como por ejemplo la resistencia a la meticilina que sirve para controlar las infecciones por *S. aureus,* encontrándose en la región del África, hasta un 80%, en la región de

Europa, hasta un 60% en la región de Asia Sudoriental, más de un 25%, en la región del Pacífico Occidental, hasta un 80%.[8] En el 2013 hubo 480.000 nuevos casos de tuberculosis multirresistente registrados en el mundo. Se estima que un 3,5% de los nuevos casos y un 20,5% de los casos tratados previamente eran de tuberculosis multirresistente.[7] En la región de las Américas, la OPS, ha recopilado datos sobre la resistencia a los antibióticos en los hospitales y laboratorios de 21 países de la región, encontrando que en las Américas hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas, dos clases importantes de fármacos antibacterianos. La resistencia de *K. pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación es elevada y generalizada. Hasta un 90% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina.

La ONU ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades primarias de salud; estos países poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población.[6] Las plantas son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. Se sabe que existen en el mundo más de 250 mil especies vegetales, de ellas hay unas 12 mil especies que pueden ser medicinales, aunque se conoce sobre sus propiedades tan sólo a un 10%. Las plantas medicinales contienen principios activos muy valiosos para la elaboración de medicamentos.[7]

Los productos elaborados a base de plantas medicinales y aromáticas son cada vez más frecuentes en las recetas médicas. En este sentido, se prevé que el mercado mundial de medicamentos botánicos y otras drogas derivadas de plantas, aumente de los 19.500 millones de dólares EE.UU. alcanzados el 2008 hasta 32.900 millones de dólares EE.UU. el 2013, lo que equivale a una tasa de crecimiento anual del 11,0%, según un estudio realizado el 2009 por BCC Research & Development. En el mundo, el comercio de plantas medicinales (extractos y fitomedicinas) alcanza los 20 000 millones de dólares/año, con un ritmo de crecimiento del 10% por año. El Perú es uno de los 12 países megadiversos del planeta; posee alrededor del 10% de especies de la flora mundial (25 000 especies), de las cuales 30% son endémicas; ocupa el primer lugar en número de especies de plantas con propiedades medicinales utilizadas por la población

(4400 especies). Como es el caso de la actividad antibacteriana de los extractos de plantas y productos naturales, que han revelado el potencial de las plantas superiores, como los flavonoides que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.[8]

En el presente estudio se determinó la presencia de metabolitos secundarios como son: compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos y esteroides, saponinas, compuestos reductores, aceites esenciales, carotenos, agrupamientos lactónicos y alcaloides los cuales desde el punto de vista farmacológico son muy promisorios; siendo necesario incrementar el conocimiento de las propiedades aun no demostradas científicamente de la especie en estudio y así dejar de utilizarla en forma empírica, con miras a mejorar su eficacia y seguridad, o en caso contrario limitar su utilización.

Para la determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Clidemia hirta* L. Don. "Mullaca morada", por el método de Disco Difusión, frente a microorganismos patógenos, 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 %) se obtuvo para *Staphylococcus aureus* en sus concentraciones de 6mg/ml, 12mg/ml y 19mg/ml, valores de 46.67%, 58.33% y 66.67% de inhibición respectivamente, por lo tanto es considerado en la clasificación de MODERADAMENTE ACTIVO a las concentraciones de 12mg/ml y 19mg/ml. y POCO ACTIVO a la concentración de 6mg/ml. *Escherichia coli* a la concentración de 19mg/ml obtuvo un 85.19%, considerándose poseer BUENA ACTIVIDAD y a la concentración de 12mg/ml obtuvo un 74.07% y a 6mg/ml obtuvo un 62.96%, lo cual son considerados como MODERADAMENTE ACTIVO. *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones evaluadas no mostró porcentaje de inhibición, por lo tanto es considerado INACTIVO.

1.1.- **OBJETIVOS**

1.1.1.- Objetivo General

Realizar la evaluación Fitoquímica y determinar la actividad antibacteriana *In vitro* de *Clidemia hirta* L. Don "Mullaca morada" por el método de disco difusión frente a microorganismos patógenos.

1.1.2.- Objetivos Específicos

- Obtener el extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta L. Don* "Mullaca morada".
- Realizar la evaluación Fitoquímica de *Clidemia hirta L. Don* "Mullaca Morada" en hojas y frutos.
- Determinar la actividad antibacteriana In vitro por el método de disco difusión, frente a *Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa*.

CAPITULO II

II.- MARCO TEORICO

2.1.- ANTECEDENTES

Las plantas son uno de los grupos biológicos que ha sido parte importante del proceso de evolución biológica del planeta tierra. Desde su aparición hace alrededor de 3.000 millones de años, constituyen un grupo de organismos que en los distintos períodos geológicos ha ido evolucionando y sobreviviendo ante los diferentes ambientes que se han ido presentando. Como resultado de este proceso evolutivo, en la actualidad se encuentran habitando en el planeta alrededor de 260.000 especies.[9, 10]

Ramírez L., Marín D., Jiménez F. 2013. Evaluaron la actividad ictiotóxica y citotóxica de diez plantas pertenecientes a familias Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Rutaceae. Se obtuvieron los extractos acuoso y butanólico, los cuales fueron evaluados frente a peces guppy (*Poecilia reticulata*) y frente a células Vero. El más alto porcentaje de actividad ictiotóxica (%AI) fue presentada por los extractos butanólico y acuoso de *Miconia caudata* (Bonpl.) DC., *Miconia aeruginosa* Naud., *Miconia* sp., *Clidemia hirta* (L.) D. Don., *Palicourea lyristipula* Wern L. e *Hirtella racemosa Lam*. En la prueba de citotoxicidad los extractos de *Clidemia hirta* y *Miconia* sp. Se presentaron como parcialmente activos; el resto no se mostraron activos frente a células Vero.[11]

Duque N. 2008. Determinó la actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Miconia sp* 5%, *Miconia caudata* 5%, *Clidemia hirta* (3 y 5) % y los extractos butanolicos de *Miconia sp* (3 y 5) %, *Miconia caudata* (3 y 5) %, *Clidemia hirta* 5% y *Hamelia patens* (1, 3 y 5) % los cuales fueron evaluados por macrodilucón en tubos a concentraciones del 5%, 3% y 1% m/v contra *Cándida albicans* a una absorbancia de 0,1 (λ = 495 nm) y *Aspergillus niger* al 0.05% m/v. Concluyendo que presentaron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Mientras *Aspergillus niger* no presentó susceptibilidad a los componentes antifúngicos de los extractos evaluados.[12]

Oblitas G., Hernández-Córdova G., Chiclla A., Antich-Barrientos M., Ccorihuamán-Cusitito l., Romaní F. 2013. Determinaron la frecuencia de empleo de plantas medicinales y las características de su uso en pacientes de dos hospitales referenciales de la ciudad de Cusco. El 83,2% y 75,3% informaron haber empleado plantas medicinales alguna vez en su vida y en el último mes, respectivamente; además, el 85,7% señaló que desearía que su médico le recete plantas medicinales. Sus usos más frecuentes son para problemas digestivos (62,4%); urinarios (42,4%), y respiratorios (40,4%). Se concluye que el empleo de plantas medicinales se encuentra bastante difundido entre los usuarios de dos hospitales referenciales de la ciudad de Cusco. Los patrones de empleo revelan que los pacientes desean que los médicos del sistema de salud prescriban plantas medicinales en su acto médico.[13]

Jiménez F. 2013. Determinó la actividad antibacteriana mediante la técnica mejorada de perforación en placa de agar, utilizando la mezcla DMSO-agua (1:1) como blanco y los antibióticos ampicilina y amoxicilina (5 mg/mL) como controles. Extractos y fracciones se evaluaron a concentraciones de 100, 50 y 25 mg/ml. La actividad antibacteriana no mostró efecto inhibidor alguno por parte de extractos y fracciones de prueba. Las fracciones de *H. trachyphylla* provenientes de separaciones cromatográficas mostraron tener una actividad alelopática promisoria como inhibidores o promotores de crecimiento en plántulas de lechuga. Las fracciones F-1B, F-B2, F-1B3, F-1E, F-2A1, F-2B2, F-2A2A, F-2A2A1 y F-2A2B presentaron importante actividad alelopática inhibitoria del hipocótilo, mientras que las fracciones F-1H, F-2A2D y F-2A2A1 presentaron efecto promotor de crecimiento promisorio en epicótilo. La realización de esta investigación proporciona nuevos conocimientos de metabolitos secundarios bioactivos de *Henriettella trachyphylla*, los cuales serán de gran utilidad para la industria farmacéutica en el desarrollo de futuros medicamentos basados en productos naturales.[14]

Mosquera O., Echeverry L., Niño J. 2009. Evaluaron 84 extractos vegetales (1000 mg/L) obtenidos de 42 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (Risaralda, Colombia), para determinar su actividad fungicida

a través de los métodos de elongación del tubo germinativo de las ascosporas y de la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*. El extracto metanólico de la especie *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) presentó la mayor actividad antifúngica, al reducir en 100% el crecimiento de *M. fijiensis* en sus dos ciclos reproductivos, lo cual hace a este extracto una fuente potencial para el control de la Sigatoka Negra.[15]

Salas M. 2014. Al Aislar, identificar y elucidar los metabolitos secundarios presentes en algunas fracciones del extracto acetato de etilo de las partes aéreas de Aciotis polystachya (Bonpland) Triana (Melastomataceae), identificaron Quercetina y Kaempferol, quienes constituyen un nuevo reporte de metabolitos secundarios tanto para el género como para esta especie, además son los responsables de muchas actividades biológicas o farmacológicas, lo cual podría justificar algunos usos etnobotánicos de esta planta.[16]

Ocampo D., Colmenares A., Isaza J. 2014. Realizaron la investigación de los metabolitos secundarios de la especie *Meriania speciosa*, colectada en la vereda "El Peón", municipio de Pance (Cali.- Valle del Cauca), e identificada en el herbario CUVC, Universidad del Valle (CUVC 51734). Del extracto hexanoico se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), utilizando una columna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) los componentes fitano, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, 3,7,11,15-tetrametilhexadecanol, fitol, ácido tetradecanoico, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido, ésteres metílicos de ácido hexadecanoico, (Z)-9-octadecenoico y ácido octadecanoico; y complejo de vitamina E.[17]

Bomfim-Patrício M., Salatino A, Martins A., Wurdack J., Salatino M. **2001**. Las hojas de los árboles de las especies de Melastomataceas, Lavoisiera, Microlicia y Trembleya fueron analizadas para determinar la composición de flavonoides. Un total de 116 componentes fueron obtenidos, que comprende 69 flavonoides y 47 flavonas glicosiladas. La ocurrencia común de flavonoides, incluyen 6 derivados de oxigenados, característico de Lavoisiera (con alguna variación de flavonoides metoxilados y flavonas). Los flavonoides predominan

en las especies de Microlicia. Los flavonoides patrones de Trembleya son algo confusos, algunas especies son afines a Lavoisiera, otros a Microlicia. UPGMA análisis usando los flavonoides agliconas como caracteres y de muestras analizadas como OTUs dieron una resolución no completa para los 3 géneros, pero proporciona la combinación de los clusters exclusivamente o preferencialmente especies de cualquier Lavoisiera y Microlicia. Las especies de Trembleya emergen del fenograma intercalado entre especies de otro género. La data, sugiere el reconocimiento de Lavoisiera y Microlicia e incluye especies de Trembleya con otros de ese género. Si la gran variedad de flavonoides es vista como indicativo de promover los avances evolutivos, de hábitos arbustivos in Microliacea (Lavoisiera y Trembleya) deberían ser considerados como provenientes de los tipos herbáceos (Microlicia).[18]

Jaime C. **2008**. Evaluó el extracto en DCM, el cual presentó actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* con porcentajes de inhibición de 66.4, 57.4 y 46.1% para concentraciones de 100, 50 y 25 mg/mL respecto al control, amoxicilina a 5 mg/mL. Las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso arrojaron resultados positivos respecto a la actividad antioxidante, los mayores resultados se obtuvieron para las fracciones E4L y E4F 2.0258 y 2.0657 µeq de DPPH/g de fracción seca, resultado muy próximo a la actividad del control (ácido ascórbico, 2.51 µeq de DPPH/g de ácido ascórbico).[19]

Mimura, M., Salatino, A., Salatino, M. 2004. Determinaron que los principales componentes químicos encontrados en la familia Melastomataceae son de tipo flavonoide.[20]

Isaza J., Ito H., Yoshida T. 2004. Encontraron compuestos de tipo polifenólico, especialmente taninos hidrolizables monoméricos o pentaméricos.[21]

Jang, D., *et al*. 2006. Encontraron escasamente sustancias cianogénicas y alcaloide. Diversas especies del género Miconia presentan especialmente compuestos de tipo triterpeno, cumarinas y benzoquinonas.[22]

Mimura M., Salatino, A., Salatino, M. 2004. Aislaron antocianinas de flores y frutos de diferentes especies, tales como, Lavoisiera Trembleya y Microlicia. Se han realizado acercamientos quimiotaxonomicos aprovechando la distribución foliar de alcanos en la especie Huberia, glucósidos acilados han sido aislados de *Monochaetum multiflorum*.[20]

2.2.- MARCO CONCEPTUAL

Actualmente más del 70% de la población mundial recurre a las plantas para la solución de problemas básicos de salud. La industria farmacéutica ha obtenido del reino vegetal la materia prima necesaria para la elaboración de casi el 30% de los productos farmacéuticos que hoy emplea la medicina moderna. Esta tendencia va en aumento con la búsqueda de nuevas plantas útiles en las selvas tropicales del planeta, ya que la industria farmacéutica empieza a agotar las posibilidades de nuevas drogas a partir de la ingeniería química y genética o de la síntesis de sustancias químicas a partir del petróleo y del alquitrán de hulla. Las plantas contienen elementos activos que las protegen de los insectos, mohos y otros parásitos, así como de los rayos ultravioletas del sol. Muchos de estos componentes -ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones- poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre.[23]

2.2.1. Especie vegetal: *Clidemia hirta* L. Don "Mullaca morada":

El epíteto hirta significa "maleza" en latín. "Koster´s curse" es un nombre de uso común en los lugares donde la planta crece como mala hierba, tales como Hawái. Koster fue el hombre que entre 1880 y 1886 ingreso accidentalmente semillas de *C. hirta* en Fiji en viveros de café, en donde su naturaleza problemática se notó por primera vez alrededor de 1920 (Paine, 1934; Simmonds, 1937). Originalmente sólo se conocía como "la maldición" por el daño que causo a las plantaciones de coco, su nombre vernáculo se convirtió en un modelo después que las otras plantas invasoras se establecieran como patrones, Ellington´s curse en Fiji, McConnel´s curse en Australia, La maldición de India en el este de África o *Burbank´s Folly* en el noroeste del Pacífico.

2.2.1.1.- Clasificación taxonómica:

Clidemia hirta fue descrita por (L.) D. Don y publicado en *Memoirs of the Wernerian Natural History Society* 4: 309. 1823.[24]

Reino	: Plantae.
Sub-reino	: Viridiplantae
Infrareino	: Streptophyta land plants
Super-División	: Embryophyta
División	: Tracheophyta-vascular plants, trachephytes
Sub-División	: Spermatophytina- spermatophytes, seed plants, phanérogames
Clase	: Magnoliopsida
Super Orden	: Rosanae
Orden	: Myrtales
Familia	: Melastomataceae-melastomas
Género	: Clidemia D. Don.
Especie	: *Clidemia hirta* (L) D. Don-Kaurasiga, Koster´s curse, roinisinga, soapbush.

2.2.1.2. Características de la especie:

Clidemia hirta es un arbusto perenne. Es una especie de planta invasora en muchas regiones tropicales del mundo, y ocasiona graves daños.[35] Está incluido en la lista 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.[14] Se lo encuentra de 0 a 2 300 msnm.[25]

2.2.1.3. Descripción Botánica:

La planta crece entre 0,5 y 2 metros de altura, dependiendo de su hábitat. Hojas ovadas a oblongo-ovadas, de 5 a 16 cm de largo y 3,2 a 8 cm de ancho. Inflorescencia ramificada de 2 a 3 cm de largo, flores con pétalos blancos oblongos a obovado-oblongos de 8 a 10 mm de largo y 3 a 5 mm de ancho. Las bayas o zarzamoras son de 6 a 8 milímetros de largo y un

sabor un poco parecido al sabor de un arándano. Cada fruta contiene más de 100 pequeñas (0,5mm) semillas. Florece y da fruto todo el año, si las condiciones son lo suficientemente húmedas. Una planta grande puede producir más de 500 frutos en un solo año.[26]

Las semillas son dispersadas por las aves, cerdos salvajes, otros animales y humanos. Las ovejas no se comen la planta, y el tanino en el interior del fruto es venenoso para las cabras. Las semillas pueden permanecer viables en el suelo hasta por 4 años.

El factor humano de consumo no ha sido totalmente explorado. El tanino en el interior de la fruta no es nocivo para los seres humanos y un jarabe delicioso puede hacerse de esta fruta. El jarabe tiene un hermoso color azul índigo y puede ser utilizada para mejorar y eliminar la amargura de infusiones como la yerba mate.

2.2.1.4. Distribución:

Originario de América Neotropical (México a Paraguay, así como el Caribe),[26] ha sido introducido a Australia, Asia meridional y el este de África.[27] Fue introducido en Hawái en la década de 1940, en 1978 se había extendido a más de 90.000 hectáreas (360 km^2) de tierra en Oahu. En 1972 Koster´s curse fue detectado por primera vez en la Isla de Hawái. Se lo encuentra en los departamentos de Amazonas, Antioquia, Bolívar, Boyacá, Caquetá, Casanare, Cauca, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, Guainía, Guaviare, Huila, La Guajira, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Risaralda, Santander, Tolima, Valle, Vaupés. A nivel global están distribuidos en Centroamérica, Sudamérica, Antillas Mayores, introducida en los trópicos del Viejo Mundo.[25]

2.2.1.5. Control Biológico

Koster´s curse puede formar densos matorrales que sofocan las plantaciones, pastizales y la vegetación local. Sacar las plantas manualmente de la tierra complementada por la aplicación de herbicidas es un eficaz método de control, pero temporal.[27] El *Thysanoptera urichi* de Trinidad se utiliza para controlar biológicamente *C. hirta*, el cual fue empleado por primera vez en Fiji en 1930 (Simmonds, 1933). La persona que ingresa en Australia esta planta, puede ser multado hasta con 60.000$ (Australia).

2.2.1.6. Usos Tradicionales

En nuestro país existe un gran recurso natural de la familia melastomatácea, el cual ha sido poco estudiado; sin embargo, se ha comprobado que sus principales constituyentes son del tipo polifenólico. Es importante notar que algunas especies de la familia han sido usadas en Colombia como medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, infecciones, heridas de la piel, enfermedades respiratorias, cálculos de la vejiga y otras dolencias genitourinarias, como diuréticos y como remedios tópicos para irritaciones de las encías. Los hechos antes descritos señalan a las plantas melastomatáceas como buenos candidatos para la búsqueda de nuevos metabolitos biológicamente activos, que podrían ser desarrollados como medicamentos alternativos para el tratamiento y control de las infecciones intestinales y respiratorias en animales y seres humanos.[24]

La Organización Mundial de la Salud ha reconocido el valor que las plantas medicinales pueden aportar a la hora de cubrir las necesidades sanitarias a nivel mundial, e insta a que se lleven a cabo más evaluaciones clínicas sistémicas y se establezcan normas más exigentes en lo que respecta a su cultivo y preparación.[28]

2.2.2. GENERALIDADES METABOLITOS SECUNDARIOS

2.2.2.1. Antecedentes de los metabolitos secundarios de origen vegetal

Alrededor del año 1800, no se había progresado en el campo de la fitoquímica. Solo se conocían unas cuantas sustancias como el azúcar de caña, almidón alcanfor y ácido benzoico, debido a que su preparación es sumamente sencilla. Mezclas complejas como grasas, aceites, esencias, etc., se habían elaborado, aunque su composición era desconocida. Los primeros investigadores en el campo de la fitoquímica no lograron valorar la extrema complejidad de las materias con que realizaban sus investigaciones por no contar con las técnicas necesarias para conseguir un proceso verdadero. Las primitivas investigaciones fueron descartadas por no encontrar diferencias considerables entre una planta venenosa y otra inocua. La expresión, la extracción acuosa y la evaporación se habían utilizado con anterioridad para obtener azúcar a partir de la caña de azúcar. El farmacéutico francés Nicolas Lemery (1645-1715) desarrolló el empleo de los procesos de extracción y utilizó el alcohol como disolvente.[29]

Robert Boyle (1627-1691) desechó la antigua teoría de Aristóteles de que la materia está compuesta de cuatro elementos y aunque jamás llegó a aislar ningún alcaloide es indudable que iba bien orientado cuando trató el opio con carbonato potásico y alcohol.[29]

En 1747 se aisló la sacarosa de diversas plantas, entre ellas de la remolacha, por el farmacéutico alemán A.S. Marggraf (1707-1780). K.W. Scheele (1742-1786), logró un gran éxito en el campo de la Fitoquímica, al aislar los ácidos cítrico, gálico, málico, oxálico, tartárico y prúsico.[29]

En 1803 se aisló el primer alcaloide, la narcotina, luego morfina, estricnina, emetina. Chevreul (1813-1823) precisó la naturaleza química de las grasas y los aceites fijos.[29]

La principal preocupación de los investigadores era el aislamiento y determinación de las estructuras de los compuestos, habiéndose establecido los principales tipos estructurales encontrados comúnmente en las plantas. Luego la atención de los químicos fue dirigido a las rutas biosintéticas halladas en las plantas.[29]

2.2.2.2. Importancia de los metabolitos secundarios

Según la historia, los metablitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que han sido explotados por el hombre.

Cabe destacar que a pesar de los esfuerzos de instituciones gubernamentales e investigadores en aumentar el nivel y el caudal de conocimientos adquiridos sobre las metodologías de transformación secundaria (de frutos, flores, semillas, hojas y tallos) y de la identificación y caracterización de los metabolitos secundarios de especies vegetales priorizadas, en la actualidad sólo unos pocos metabolitos se utilizan a nivel industrial, por lo que se ha establecido la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocados al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en nuestro entorno, investigando las sustancias producidas por diferentes especies promisorias que pueden tener aplicación en la industria (cosmética, farmaceutica, textilera y agroalimentaria).[29]

2.2.2.3. Metabolito secundario

Son todas aquellas moleculas activas generadas por diversas eespecies vegetales. Los metabolitos son moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen roles muy importantes en el reino vegetal, pueden suponer una ventaja competitiva considerable.[29]

2.2.2.4. Metabolismo secundario

El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una determinada especie y no son universales. Este metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural. Algunas porciones de esta química son comunes para un número diferente de especies o de familias de plantas, pero actualmente la química de los metabolitos secundarios es usualmente diferente de una planta a otra, pues precursores químicos comunes pueden conducir a resultados totalmente diferentes.[29]

2.2.3. EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados (agua, etanol, hexano, etc,) de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.[30]

Los extractos vegetales se han usado desde la antigüedad para el tratamiento de distintas enfermedades. Luego de la llegada de los europeos a América y de la exploración de Asia y África, muchas plantas medicinales fueron descubiertas y sus propiedades estudiadas. Con el descubrimiento de la penicilina, la fitoterapia pasó a un segundo plano y el desarrollo y uso de los antibióticos se volvió generalizado.[31]

En los últimos años, el renovado interés por lo natural y lo orgánico ha propiciado el resurgimiento de los extractos naturales y generados nuevas líneas de investigación. Los extractos vegetales se obtienen directamente de las plantas y no sufren transformaciones posteriores, por ello su rendimiento es bajo y continúan siendo costosos. Se extraen de las partes no leñosas de las plantas, en especial de las hojas, mediante diferentes métodos: extracción, destilación por arrastre con vapor de agua (más usada a nivel comercial), extracción con solventes volátiles. Se encuentran en estructuras histológicas especializadas, localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta. Su función en la planta sigue en

estudio pero se asocia a la inhibición de la germinación, como protección contra insectos y hongos y para favorecer la polinización.[31]

Se conocen aproximadamente 3000 plantas con potencial antimicrobiano, de las cuales 300 tienen importancia comercial.[32] La clasificación de extractos se basa en la consistencia y se denominan con el mismo nombre de la planta de la cual provienen (planta donante), se distinguen entre ellos los aceites esenciales y las oleorresinas.

2.2.3.1.- Consistencia de los extractos

Alzate en 1990, descubrio la consistencia ideal que debian tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos.[33]

2.2.3.2.-Extractos blandos:

Tiene la consistencia de miel espesa; algunas veces debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa.[33]

2.2.3.3.- Extractos firmes o de consistencia pilular:

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las pildoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos.[33]

2.2.3.4.- Extractos secos:

Anteriormente se les conocia con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas (Belga, Norteamérica, Noruega y Mexicana), pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos. Golaz (1973) les dio

el nombre de extractos unitarios y los recomienda para la preparación de tinturas y jarabe.[33]

2.2.3.5.- Extractos fluidos:

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente el peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada.[33]

2.2.3.6.- Caracteristicas de los extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros, cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- Algunos con de color café amarillento, otros rojizos, los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo.
- La solubilidad de los extractos es variable y esta en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcolimétrico del alcohol con el cual han sido preparados
- Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordell (1995) propuso ensayos generales para someter a los

extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final. Estos trabajos fueron remontados por Corpas, quien propuso realizar ensayos de identidad a los extractos obtenidos.[33]

2.2.3.7.- Conservación de los extractos

Labfarve (1995) determinó las alteraciones y los diferentes métodos de conservación de los extractos. Los extractos son medicamentos en donde la alteración modifica y varia notoriamente la naturaleza del producto. En principio un extracto seco o de tipo pilular se conserva mejor que un extracto acuoso. Esto no es totalmente exacto, pues la naturaleza del producto interviene igualmente. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorven humedad atmosférica. Algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos. Por otra parte, las alteraciones más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color. Los extractos a base de alcaloides, bajan de título, según lo demuestran las investigaciones de Fricotel y Métin (1970). Esta disminución del título alcaloídico, es especialmente sensible a los extractos blandos y de aspecto pilular y bastante menos notorio en los extractos secos.[33]

Según Corpas y Barriga (1993), la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- Se deben conservar protegiendolos de la luz
- Los envases deben estar bien tapados.
- Se deben conservar en un ambiente seco.[33]

Desde luego, son numerosos los métodos que se han indicado para la conservación de los extractos. Para mayor comodidad ellos se pueden clasificar, en dos categorías.[33]

Tenemos en el primer grupo aquellos a los cuales no se les ha adicionado ninguna materia extraña. Al segundo grupo, por el contrario, pertenecen

aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza físico-química definida.[33]

2.2.4.- METODOS DE EXTRACCIÓN

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación. En el caso de búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en agua o con solución isotónica (0.9% NaCl). Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petroleo (extracto etereo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua.[34]

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona. Las extracciones pueden hacerse por “extracción continua en soxhlet”, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal. Por “reflujo”, el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal. Y por “maceración en frio”, el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío.[34]

2.2.5. MOLECULAS ACTIVAS EN EL AMBITO MEDICINAL E INDUSTRIAL

No todos los componentes químicos elaborados por la planta, poseen igual interes para la fitoquímica. Los denominados principios activos son frecuentemente alcaloides o heterósidos; ambos merecen por ello especial atención. Otros grupos, como los glúcidos, grasas y proteínas, tienen importancia dietética y muchos, como los almidones y las gomas, se emplean en técnica farmacéutica, aunque carecen de señalada acción farmacológica. Otras sustancias como el oxalato cálcico, sílice, lignina y materiales colorantes, pueden ser materias primas coadyuvantes en diferentes procesos en la industria.[29]

2.2.5.1.-Los Alcoholes:

Los alcoholes libres no estan generalmente presentes más que en forma de trazas en las plantas vivas. Son esterificados y combinados bajo la forma de heterósidos. Se encuentran sobre todo en los aceites esenciales. El olor de ciertos alcoholes les da gran aplicación en la perfumería o como aromatizante.[35]

Los alcoholes alifáticos son tensoactivos e hipotensores (actúa a nivel de vasos sanguineos). Todos los alcoholes son tóxicos en grado diverso. Los alcoholes de las plantas umbelíferas, tienen una toxicidad muy elevada.[35]

2.2.5.2.- Los fenoles:

Entre los fenoles encontrados en estado libre, se encuentran constituyentes importantes de las esencias como el timol, el carbacrol (esencias de tomillo), el eugenol y el chavicol. Muchos de los fenoles están en estado de éter oxidado en las esencias, entre ellos citaremos el estrangol, la miristicina, el apiol y el atenol.[35]

Los fenoles tienen una actividad fisiológica marcada prque poseen propiedades antisépticas. Hidroquinol, timol (este último tambien antihelmintico), eugenol (anestésico local), el apiol es emenagogo, el

anetol es carminativo (evita la formación de gases en el tracto digestivo) y antidiarreico a pequeñas dosis y veneno del SNC a altas dosis. El tetrahidrocannabinol es alucinógeno. Los polifenoles del helecho son antihelminticos.[35]

Son los compuestos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámicos y cafeico. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo, la manzanilla y la gayuba cuyo principio activo, la arbutina, ha sido utilizado a lo largo de los años en el tratamiento de la infección urinaria.[36]

El mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfihidrilo o por interacciones no específicas con proteínas.[36]

2.2.5.3.- Cumarinas:

Son compuestos derivados de la benzo-α-pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Estan presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitromboticas y vasodilatadoras. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral.[36]

2.2.5.4.- Alcaloides:

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo.[36] Estos compuestos constituyen con los heterósidos y los antibioticos la mayor parte de los prncipios activos de las plantas medicinales. Son sustancias de origen bilógico sobre todo de origen vegetal, ya que en el reino animal se encuentran raramente representadas.

Los alcaloides contienen siempre carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxigeno. Excepcionalmente algunos alcaloides contienen azúfre.[29]

2.2.5.5.- Los Aldehidos:

Son derivados de los alcoholes primarios por deshidrogenación. Muchos aldehidos son aromatizantes como la vainilla y el citral. Asimismo, este grupo fitoquímico tiene propiedades antisépticas. La vainilla por ejemplo tienen efectos coleréticos.[35]

2.2.5.6.- Los Terpenos:

Son compuestos a menudo no saturados formados por carbono, hidrógeno y oxígeno de estructura no aromática y que se encuentran sobre todo en los aceites esenciales y en las resinas.[35] Muchas plantas deben a sus compuestos terpénicos de las esencias, sus propiedades aromáticas. Pero estas sustancias, poseen tambien propiedades farmacodinámicas muy variadas en relación con las diferentes funciones ligadas a su esqueleto terpénico. Algunas son irritantes de la piel y de las mucosas, utilizándose como rubefacientes (pineno en la esencia de trementina). Los azulenos tienen propiedades antiinflamatorias. El geraniol, cineol y linalol tienen propiedades antisépticas. El ascaridol tiene propiedades vermífugas, La tuyona tiene propiedades abortivas y estupefacientes. Las cucurbitaceas, poseen propiedades tóxicas y necrosantes. El ácido glicirricético tiene propiedades antiinflamatorias.[29]

2.2.5.7.- Flavonas:

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microrganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde, las cuales ejercen activdad frente a *Vibrio cholerae* , *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otros

microorganismos. Otros flavonoides tienen en general actividad antiviral.[36]

2.2.5.8.- Los Isoflavonoides:

Actúan como efectivas fitoalexinas, las cuales pueden ser definidas como compuestos antimicrobianos de pequeño peso molecular o metabolitos de estrés biológico. Ellos pueden ser constitutivos o también ser inducidos por ataque biológico o heridas. Los constituyentes varian entre especies y tambien varian dependiendo la edad y el ambiente en el que se encuentra la planta. Estos flavonoides inhiben la germinación de esporas de hongos y causan daño a los sistemas de membrana. El recubrimiento de algunas semillas y algunas resinas de árboles son particularmente ricas en flavonoides antimicrobianos.[36]

2.2.5.9.- Quinonas:

Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoria de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio.[36]

2.2.5.10.- Tanoides o Taninos:

Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenados de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Estas sustancias son de sabor astringente y tienen la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable al fijarse sobre sus proteínas. El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser

hidrolizables. Se han descrito más de 30 taninos que puedan inhibir hongos y bacterias.[36]

2.2.5.11.- Los aceites esenciales:

Estos productos llamados comúnmente esencias son sustancias olorosas volátiles contenidas en los vegetales. Su volatilidad les diferencia de los aceites fijos que se producen de los lípidos. Son particularmente abundantes en las Coníferas, Rutáceas, Umbelíferas, Mirtáceas y Labiadas.[29]

Son compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunas con poder antimicrobiano, como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la capsaicina de la planta conocida como el pimiento rojo o chile (*Capsicumm anmon*).[36]

2.2.5.12.- Saponinas:

Son los componentes principales de varios extractos de plantas que tienen actividad antiprotozoaria. Las saponinas se unen al colesterol y otros esteroles de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular.[37]

2.2.5.13.- Esteroides y Triterpenos:

Los compuestos esteroidales pueden interferir determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química; los de naturaleza hidrocarbúrica, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcoholica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte.[38]

2.2.5.14.- Cromenos y Benzofuranos:

Los cromenos y benzofuranos son productos naturales que se han encontrado en algunas especies de Rutaceae, Liliaceae, Ciperaceae y principalmente en ciertas tribus de las Asteraceae, entre las cuales parece ser exclusivo de las Asteraceae, Eupatorieae, Heliantheae y Senecioneae. Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en hojas y tallos y menos comunmente en raíces habiéndose encontrado en los primeros hasta un 5% sobre el peso seco.[39]

Muchos cromenos y benzofuranos han mostrado ser biológicamente activos como el toxol y la dehidroxitremetona son tóxicos a los peces; el toxol y el angelato de toxilo exhiben una débil actividad antitumoral contra leucemia linfocitica P-388; el encecalin, el 7-hidroxiencalin y la 6-metaoxieuparina son fotóxicos a varios hongos y bacterias; el encecalin también ha mostrado acción insecticida; asimismo, los precocenos I y II actúan como hormonas antijuveniles en los insectos.[39]

2.2.5.15.-Sesquiterpenlactonas:

Derivadas biogenéticamente de los sesquiterpenos, son una clase de productos naturales distribuidos menos ampliamente que estos últimos y de ocurrencia predominante en la familia Asteraceae (notablemente en géneros Artemisia y Ambrosia), de allí que su distribución permite ser aplicada a problemas taxonómicos especialmente en los géneros nombrados y en otras taxas. Son sustancias amargas que se encuentran en todos los órganos de la planta, en concentraciones que varian entre 0.01 y 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas; son bastante solubles en cloroformo y en eter etílico. Presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado acción citotóxica, antimurol, analgésico inhibidoras del crecimiento de bacterias, entre otras. Estos compuestos lactónicos son primariamente clasificados en base a su esqueleto carboxilico como germacranólidos, guaianólidos, eudesmanólidos y pseudoguaianólidos, entre otros (el sufijo olido se refiere a la función lactona).[39]

2.2.6.- MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

2.2.6.1.-Bacteria *Staphylococcus aureus*

Pertenece a la familia Staphylococcaceae. Es Gram positivo, aunque las cepas viejas o los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativo. Tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección.

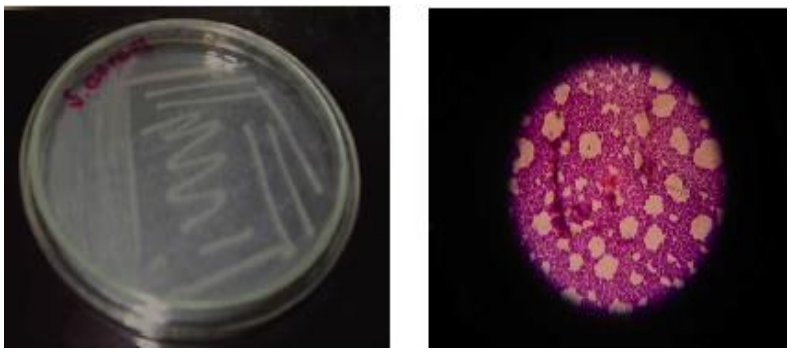


Figura N° 01: Características Macro y Microscópicas de *Staphylococcus aureus*

2.2.6.1.1.- Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus*

Reino : Baceria
Filo : Firmicutes
Clase : Bacilli
Orden : Bacillales
Familia : Staphylococcaceae
Género : *Staphylococcus*
Especie : *S. aureus* ROSENBACH 1884

Son cocos Gram positivos de 0.5 – 1 µm de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo. Crecen a una temperatura óptima de 37°C y se desarrollan mejor en un pH ligeramente alcalino de 7.6 la adición de glucosa favorece el crecimiento.[40] Forma parte de la flora normal de mucosas y piel e intervienen en procesos patológicos diversos como

infecciones supurativas e intoxicaciones alimenticias.[34] Más del 95% de los *Staphylococcus aureus* producen proteína A, la cual puede estar asociada a la célula o al medio extracelular,con una importante afinidad por la fracción Fc de la Ig G. La presencia de proteina A o coagulasa es de gran utilidad clínica para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies de *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* es una bacteria que puede causar infección en todos los grupos de edad tanto en forma esporádica como epidérmica y se ha identificado como una de las principales causas de infección de heridas quirurgicas. Su principal forma de transmisión es por contacto.[41]

La capacidad de *S. aureus* para fermentar los azucares como maltosa, manitol, trehalosa es positiva. La producción de una nucleasa termoestable es un buen indicador de la presencia de *S. aureus*, al igual que la conversión de nitratos a nitritos. Elaboran diversas enzimas: proteasas, lipasas, fosfatasas, gelatinasas, catalasas y coagulasas. En cultivo puro resisten una concentración de fenol al 1% durante 15 minutos, pero solo los mata una concentración al 2%. Soportan el calor húmedo a 60°C durante 30 minutos. Muchas cepas de *S. aureus* toleran concentraciones altas de cloruro de sodio (7.5 a 10%), y son fácilmente inhibidos por colorantes como el violeta de genciana.[40]

La transmisión se produce principalmente por ingesta de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas. En el ámbito laboral, la transmisión se produce por contacto con personas, animales (zoonosis) o elementos contaminados, ocurriendo principalmente por la contaminación de heridas y mucosas, por la inoculación accidental a través de pinchazos o cortes con objetos contaminados y por mordeduras de animales. Produce infecciones locales de la piel y las mucosas (impétigo, foliculitis, forunculosis, conjuntivitis, etc.), e infecciones internas que se complican en individuos inmunodeprimidos, pudiendo producir endocarditis, meningitis, artritis séptica, neumonía y osteomielitis, que pueden llegar a ser mortales.[40]

2.2.6.2.-Bacteria *Escherichia coli*

Las bacterias del género *E. coli* son Gram-negativas, tienen forma de barra y pertenecen a la familia Enterobacteria. Esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el de los humanos. *Escherichia coli (E. coli)* es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Los serotipos se asocian con virulencia. Una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F). Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular. Cuándo se usan métodos de cultivos aeróbicos, esta bacteria es la especie dominante encontrada en las heces. Normalmente cumple una función importante en el cuerpo, suprimiendo el crecimiento de especies dañinas de bacterias así como también sintetizando cantidades apreciables de vitaminas. Son pocas las cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedades a los humanos a través de diferentes mecanismos. Entre ellas están las cepas enteroinvasivas (EIEC) responsables de una forma de la disentería bacilar. No obstante, es desconocido aún el tipo de alimentos que pueden hospedar a estas bacterias patogénicas.[42]

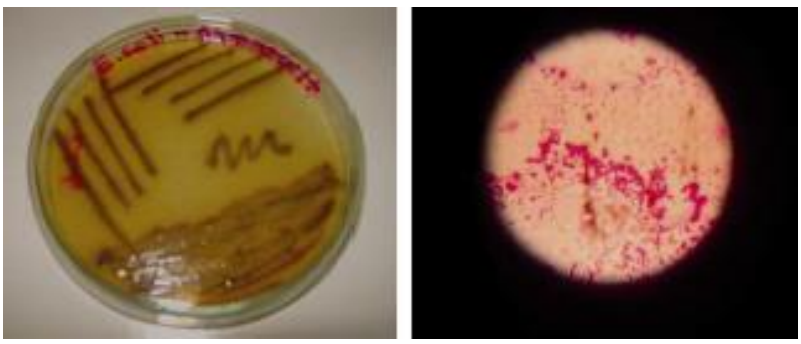


Figura N° 02: Características Macro y Microscópicas de *Escherichia coli*.

2.2.6.3.1.-Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

Reino : Bacteria
Filo : Proteobacteria
Clase : Gammaproteobacteria
Orden : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Género : *Escherichia*
Especie : *E. coli* (E. freundi)

Es un bacilo de 1-3 µm por 0.5 µm por flagelos, que se presenta sólo, en pares, en cadenas cortas o formando grupos. En general es móvil (por flagelos perítricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forma esporas y por lo general es no capsulado y Gram negativo. En cultivos jóvenes la forma coco-bacilar es bastante frecuente; en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor. En agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas, de borde continuo o un tanto ondulado, brillantes y de coloración blanca un poco amarillenta. Con producción de ácidos y gas, fermenta la lactosa y un gran número de carbohidratos; algunas cepas son lactosas negativas. Produce H_2S en determinados medios. Acidifica y coagula la leche. Pueden necesitarse pruebas adicionales en casos de *E. coli* aislada de colitis hemorrágicas, las cuales son típicamente negativas a sorbitol. Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH favorable es de 7 algunas cepas producen hemolisina.[40]

Se ha considerado inicialmente sólo como un habitante del intestino, desde hace cerca de tres décadas se empezó a estudiar su poder enteropatógeno. Se ha visto que las cepas toxigénicas de *E. coli* pueden producir una enterotoxina termolábil (TL), una termoestable (TS) o ambas. La TL es una proteína de alto peso molecular, que bioquímicamente es muy similar a la toxina de Vibrio cholerae,

activando la adenilciclasa. Es inactivada a 60°C. La TS es una pequeña molécula relativamente estable al ser hervida.[42]

2.2.6.4.-Bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gramnegativo 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*, al igual que otras *pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono.

2.2.6.4.1.-Clasificación Taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*

Reino : Bacteria
Filo : Proteobacteria
Clase : Gammaproteobacteria
Orden : Pseudomonadales
Familia : Pseudomonadaceae
Género : *Pseudomonas*
Especie : *P. aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula, 1894

La *Pseudomonas aeruginosa* (PA) es el principal patógeno de la familia Pseudomonadaceae y se identifica por ser un bacilo gramnegativo ligeramente curvado que crece mejor en aerobiosis, es muy versátil nutritivamente y no fermenta hidratos de carbono pero produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa y lactosa o sacarosa. Etimológicamente, *"pseudomonas"* significa *"falsa unidad"*, del griego "*pseudo"*, que significa "falso" y "monas" que significa "unidad simple". El nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes; aeruginosa que significa "el color del cobre oxidado", reflejando el característico color azul verdoso que presentan las colonias en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa.*[43] Este típico color verdoso observado en muchas cepas proviene de la producción de

pigmentos fluorescentes como la pioverdina (pigmento amarillo verdoso), o la piocianina (pigmento azul hidrosoluble) y con menor frecuencia producen piorrubina (pigmento rojo) o piomelanina (marrón negruzco).[44] La mayoría de las cepas presentan también un olor característico similar a la uva o a una fruta madura.

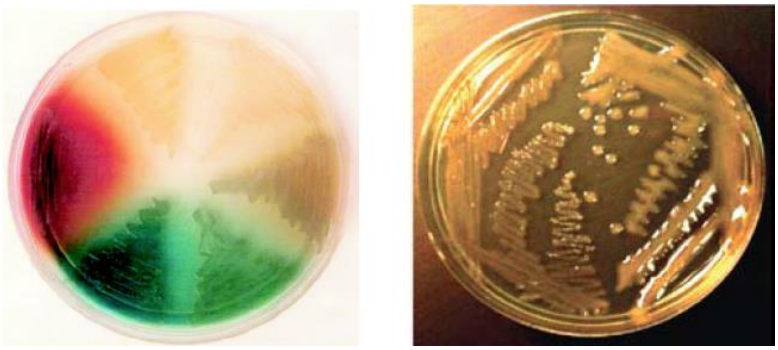


Figura N° 03: Características Macro y Microscópicas de *Pseudomonas aeruginosa*

En relación a la morfología de las colonias puede ser variada y generalmente pigmentadas, se encuentran las típicas colonias que se extienden en la placa con un brillo metálico y con un aspecto gelatinoso, viscoso especialmente en zonas de mayor crecimiento y las variantes de colonias con morfotipo enano, coliforme y mucoide frecuentes de observar en vias respiratprias y en pacientes con fibrosis quística (FQ) Desde el punto de vista de la ultraestructura, la *Pseudomonas aeruginosa* produce un flagelo polar único aunque en algunas ocasiones se han aislado con dos o tres flagelos y muchas fimbrias o pili en la superficie celular y practicamente todas las cepas presentan genes para la producción de un polisacarido extracelular (cápsula exfopolisacarida) y que en exceso es la base del fenotipo de las colonias mucosas en los pacientes con FQ., Enfermedad pulmonar Obstructiva crónica (EPOC) o de las colonias aisladas los catéteres urinarios. Posee además una compleja membrana externa típica de las bacterias gramnegativas que contiene el crecimiento y metabolismo celular. Esta estructura limita

enormemente el paso de nutrientes y de otros componentes como los antimicrobianos y le confiere una gran capacidad para defenderse.

Esta capacidad para defenderse generada por el gran número de factores de virulencia estructurales (cápsula expopolisacarida, adhesinas, pili, pigmentos difusibles, endotoxinas) y toxigénicos (exotoxinas, A, S y T) como enzimáticos (elastasa, proteasa, alcalina, ramnolípido, fosfolipasa C) explica en gran parte que las *Pseudomonas aeruginosa* pueda causar una amplia variedad de infecciones. Estos factores de virulencia bacteriana que contribuyen en e proceso patológico asociado a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* son variados tanto en forma como en función. El huesped afecta al papel y la importancia de los diferentes factores de virulencia de modo significativo, la función inmunitaria innata y adquirid, el lugar de infección y situaciones de comorbilidad, por nombrar unos pocos, determinan si un factor de virulencia bacteriana desempeña un papel mayor o menor en la patogenia.[43]

La *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por estar ampliamente distribuida en la naturaleza formando parte de la microbiota normal del hombre. La tierra, plantas, agua corriente pueden actuar como reservorio con clara predilección por los ambientes húmedos tolerando un amplio rango de temperatura de crecimiento (hasta 50°C). La facilidad que muestra *Pseudomonas aeruginosa* para crecer tanto en la naturaleza como a nivel nosocomial le permite ser una de las principales causas de infecciones hospitalarias grave.[45] En el ambiente hospitalario la *Pseudomonas aeruginosa* puede colonizar superficies húmedas de los pacientes como son oido, axilas, periné y también se aisla en entornos húmedos inanimados que incluyen agua de lavabos, sumideros, duchas, etc.[43]

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. Estas características les permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias. Lo anterior favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos.[46, 47] *P. aeruginosa* puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria. Las infecciones por *P. aeruginosa* son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos.[48] *P. aeruginosa* produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como β-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.[49,50] Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *P. 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.[50,51]

P. aeruginosa resistente a los carbapenémicos está asociada con la producción de metaloenzimas y tiene la capacidad para hidrolizar todos los antibióticos β-lactámicos, excepto el aztreonam; además, es responsable de los brotes intrahospitalarias en centros terciarios.[51,53-55] Tres grupos de MBL han sido identificados: clase A (dependientes de serina e inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico, son inducibles y no transferibles), clase B (dependientes de zinc, inhibidas por el EDTA, inducibles o asociadas a plásmidos conjugativos) y clase C (oxacilinasas).[51,52]

La resistencia a diversos antibióticos y sustancias con actividad antimicrobiana ha sido asociada con la formación de biopelículas

bacterianas, así como la fagocitosis por componentes del sistema inmune adaptativo.[56] Asimismo, diversas infecciones nosocomiales producidas por *P. aeruginosa* han sido relacionadas con su capacidad para desarrollar biopelículas; las cuales, están embebidas en una matriz extracelular formada por proteínas de membrana externa, pili, exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos.[57] Los componentes de los EPS involucrados en la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* están codificados principalmente por diversos genes que se encuentran localizados en tres operones independientes: algU, psl y pel.[57,58]

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. Las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos como las piscinas y bañeras de hidromasaje. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.[59]

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. *P. aeruginosa* es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. Se han aislado en gran variedad de ambientes húmedos, como fregaderos, baños de agua, sistemas de distribución de agua caliente, duchas y bañeras de hidromasaje.[59]

La vía de infección principal es la exposición de tejidos vulnerables, en particular herida y mucosa, a agua contaminada, así como la contaminación de instrumentos quirúrgicos. La limpieza de lentes de contacto con agua contaminada puede causar un tipo de queratitis. La ingestión de agua de consumo no es una fuente de infección importante.[60]

Aunque la presencia de *P. aeruginosa* puede ser significativa en algunos entornos como en centros sanitarios, no hay evidencia de que los usos normales del agua de consumo sean una fuente de infección para la población general. No obstante, puede asociarse la presencia de concentraciones altas de *P. aeruginosa* en el agua potable, especialmente en el agua envasada, con quejas sobre su sabor, olor y turbidez. *Pseudomonas aeruginosa* es sensible a la desinfección, por lo que una desinfección adecuada puede minimizar su entrada en los sistemas de distribución. Las medidas de control diseñadas para limitar la formación de biopelículas, como el tratamiento para optimizar la eliminación del carbono orgánico, la restricción del tiempo de residencia del agua en los sistemas de distribución y el mantenimiento de concentraciones residuales de desinfectantes, deberían reducir la proliferación de estos microorganismos. El RHP detecta la presencia *Pseudomonas aeruginosa* y puede utilizarse, junto con parámetros como las concentraciones residuales de desinfectantes, como indicador de condiciones que podrían sustentar la proliferación de estos microorganismos. Sin embargo, como *P. aeruginosa* es un microorganismo común en el medio ambiente, el análisis de *E. coli* (o bien de coliformes termotolerantes) no puede utilizarse con este propósito.[61]

2.2.7.- ANTIMICROBIANOS

Desde el siglo XVIII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Paul Ehrlich, quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconoció las reacciones químicas específicas entre microorganismos y medicamento, la aparición de la resistencia a estos y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos. Posteriormente se descubrieron las sulfonamidas y se

acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano, llamadas antibióticos, de ahí surgió la penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, etc. Las cuales también han sido obtenidos sintéticamente, a través de modificación química, total o parcial, de las moléculas por biosíntesis.[62]

El ataque a los microorganismos por parte de los antimicrobianos, se pueden dar de diferentes maneras: por inhibición de la síntesis de la pared celular, de las funciones de la membrana celular, de la traducción de material genético y de la síntesis de ácidos nucleicos.[62]

El término antibiótico, se refiere a un producto metabólico de un organismo que es perjudicial, o inhibitorio para otros microorganismos en muy pequeñas cantidades, estas sustancias pueden actuar de dos maneras:

- Como microbiocidas, es decir, que matan las formas vegetativas de los gérmenes, específicamente se denominan bactericidas, refiriendose a bacterias y fungicidas refiriendose a hongos.
- Como microbiostático, es decir que inhibe el crecimiento de microorganismos y se denominará bacteriostático o fungistático, según se refiera a bacterias o a hongos, respectivamente.[33]

2.3.- HIPÓTESIS

El extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta* L. Don. "Mullaca morada" presenta actividad antibacteriana, por el método de Disco Difusión, frente a microorganismos patógenos

Los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Clidemia hirta* L. Don. "Mullaca morada" tienen relación con la actividad antibacteriana.

2.4.- DEFINICIONES OPERACIONALES

2.4.1.- VARIABLES

2.4.1.1.- Variable independiente:

Extracto etanólico de hojas y frutos de *Clidemia hirta L. Don* "Mullaca Morada".

2.4.1.2.- Variable dependiente:

- Tamizaje Fitoquímico de los extractos n-hexánico, etanólico y acuoso de hojas y frutos de *Clidemia hirta L. Don* "Mullaca Morada"

- Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta L. Don* "Mullaca Morada".

2.5.- INDICADORES:

2.5.1.- Indicador Independiente

Extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta L. Don* "Mullaca Morada"

- Concentración 1 (C1) : 19 mg/ml
- Concentración 2 (C2) : 12 mg/ml
- Concentración 3 (C3) : 6 mg/ml

2.5.2.- Indicador Dependiente

- Ausencia o presencia de metabolitos secundarios del extracto etanólico de diferentes órganos de la especie en estudio.
- Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la especie en estudio.
- Halos de inhibición del extracto alcohólico obtenido en comparación con el control positivo según CLSI para los métodos de Kirby – Bauer.
- Porcentaje de inhibición según el tamaño de diámetro del halo en los discos.

2.5.3.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Cuadro N° 1: Variable Independiente

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta* L. Don "Mullaca Morada", recolectadas en la zona de Nina Rumi.	Producto de la extracción de las hojas obtenidas por maceración con etanol a temperatura ambiente.	Extracción etanólica obtenida por maceración de las hojas durante 15 días. Con posterior filtrado, concentrado en rotavapor y secado.	Concentración del extracto etanólico de hojas.	(C1): 19 mg/ml (C2): 12 mg/ml (C3): 6 mg/ml	Intercalar Tipo :Cuantitativo

Cuadro N° 2: Variable Dependiente

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de la especie en estudio.	Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento y/o producir la muerte de una o más bacterias.	**Sensibilidad bacteriana:** Grado de susceptibilidad de los microorganismos frente al extracto de la especie vegetal en estudio, con la formación de un halo de inhibición.	Diámetro en milímetros (mm) del halo de inhibición. Porcentaje de inhibición.	**Resistente (R): <12mm** **Intermedio (I): 13-14 mm** **Sensible (S): > 15 mm** **Grado de sensibilidad**. -Inactivo <40% -Poco activo 40-50% -Moderado activo 51-75% -Buena actividad >76%	Intercalar. Tipo: Cuantitativo

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Evaluación fitoquímica de los extractos n-hexano, etanólico y acuosos de hojas y frutos de la especie en estudio	Extracción del material vegetal con solventes de diferente polaridad que permite la identificación de metabolitos secundarios presentes en las hojas y frutos de la especie en estudio	Se Macerará al medio ambiente 10 gramos de muestra seca y molida en 50 ml de n-hexano durante 24 a 48 horas (extracto hexanico), el residuo se macerará con 50ml de etanol (extracto etanólico) y macerar el residuo remanente con 50ml de agua (extracto acuoso):	Identificación de metabolitos secundarios: - Extracto hexanico: - Extracto etanólico: - Extracto acuoso.	- Alcaloides - Triterpenos y esteroides - Quinonas - Cumarinas - Carotenos - Ac. Esenciales y grasas - Azucares reductores. - Saponinas - Fenoles y taninos - Aminas - Glicosidos card -Flavonoides. - Mucilagos - Principios amargos y astringentes.	Intercalar. Tipo: Cuantitativo

CAPITULO III

III.- METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de estudio

Se empleó un ***Diseño experimental, prospectivo y longitudinal.***

- **Experimental:** Se realizó un fenómeno dado introduciendo elementos que modificaron el comportamiento de las variables en estudio (extracto etanólico de las hojas y microorganismos) los mismos que serán medidos en determinados momentos.

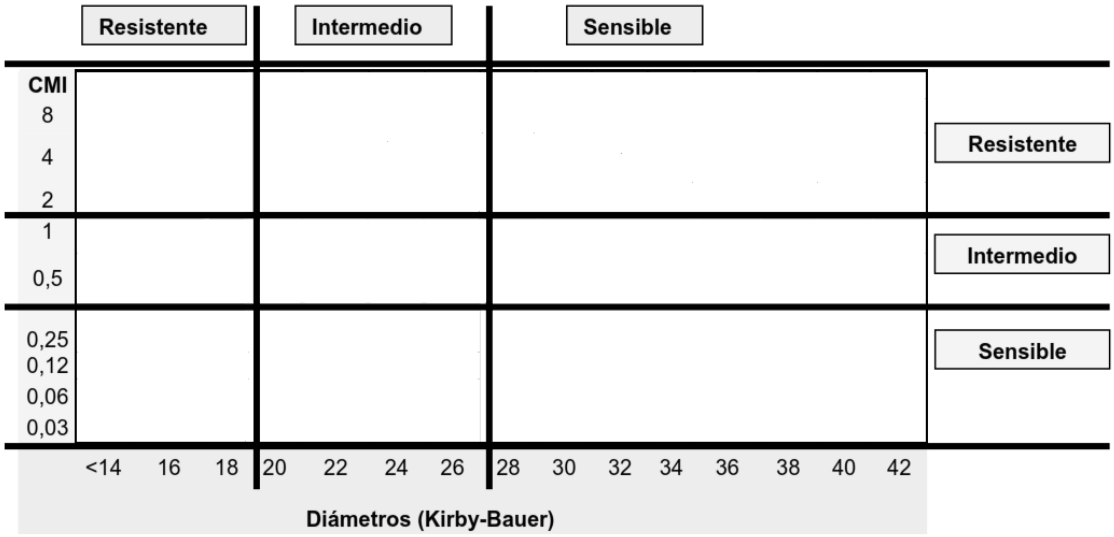
- **Prospectivo:** En el registro de la información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.

- **Longitudinal:** Permitió realizar la recolección en forma sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

3.1.1.- Diseño de investigación

La presente investigación se realizó con el objetivo de encontrar la actividad antibacteriana *In vitro* frente a microorganismos patógenos, utilizando el método de Difusión en disco (Kirby-Bauer), representada por halos de inhibición que tuvo el extracto etanólico, a las diferentes concentraciones de la especie en estudio, teniendo en cuenta los siguientes parámetros fisicoquímicos:

- Esterilización de Laboratorios con luz UV durante 2 horas.
- Medios de cultivo con pH de 7.2 – 7.4.
- Autoclavado a 121°C por 15 min. (±1°C).
- Siembra de los cultivos en cabinas de bioseguridad (flujo de aire entre 45-55 pes/min.)
- Incubación de las placas en posición invertida en incubadoras a 35°C (±1°C) por 24 horas



Esquema N° 01: Esquema del diseño de investigación

3.2.- <u>POBLACIÓN Y MUESTRA</u>

3.2.1.- Población vegetal

Estuvo constituida por el conjunto de especies vegetales de *Clidemia hirta (L).* D. Don "Mullaca morada" de la zona de Nina Rumi.

3.2.2.- Muestra Vegetal

Hojas, y frutos secos y molidos de *Clidemia hirta.*

3.2.3.- Criterios de inclusión.

Plantas sanas, en buen estado de conservación y libre de excremento animal.

3.2.4.- Criterios de Exclusión.

Plantas infestadas por microorganismos, secas o en mal estado de conservación, con restos de excremento.

3.2.5.- Población Bacteriana.

Cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa ATCC 27853* provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

3.2.6.- Muestra bacteriana.

Se emplearon entre 3 y 5 colonias de cada bacteria, que se utilizaron para la preparación del inóculo bacteriano.

3.2.7.- Criterios de inclusión.

- Colonias que reunieron las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- Colonias con resultado positivo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.

3.2.8.- Criterios de exclusión.

- Colonias que no reunieron las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- Colonias con resultados negativos a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.
- Colonias con presencia de contaminantes.

3.3.- PROCEDIMIENTOS, TÉCNICA E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

3.3.1.- Procedimiento de recolección de datos

3.3.1.1. Identificación y taxonomía de las muestras botánicas

La identificación taxonómica de las especies colectadas, se realizó en el HERBARIUM AMAZONENSE de la UNAP, con la asesoría de un botánico y por comparación de las muestras existentes. El botánico determinó la categoría taxonómica, empleando descriptores morfológicos, claves de identificación, bibliográfica especializada y estereoscopio. En la descripción botánica se caracterizaron las partes estructurales, sobre todo las hojas de la especie en el campo y el laboratorio. Con la muestra botánica recolectada se anotó los datos referente a la especie y fecha de colecta (Anexo N° 01).

3.3.1.2. Preparación de la especie vegetal

Se usó diferentes órganos de la planta (hojas y frutos). La recolección de la muestra vegetal se realizó, considerando la edad, estado vegetativo y la temporada de recolección. Se seleccionaron las hojas y frutos en buen estado de conservación.

3.3.1.3. Procesamiento de la muestra botánica

Después de ser recolectada la muestra botánica fue envuelta en papel periódico y puesta en costales desinfectados para transportarlos al Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicada en Nina Rumi (Carretera Iquitos- Nauta) en el Distrito de San Juan Bautista.

En el laboratorio se lavaron las muestras vegetales a chorro de agua corriente para eliminar remanente de suciedad. Se secaron a temperatura ambiente bajo sombra durante cinco días, luego se pasaron a una estufa a 42°C, durante 48 horas.

Luego las muestras fueron pesadas y molidas en un mortero, reduciendo su tamaño para luego pasarla por un tamiz de malla N° 20, para mejorar el proceso de extracción.

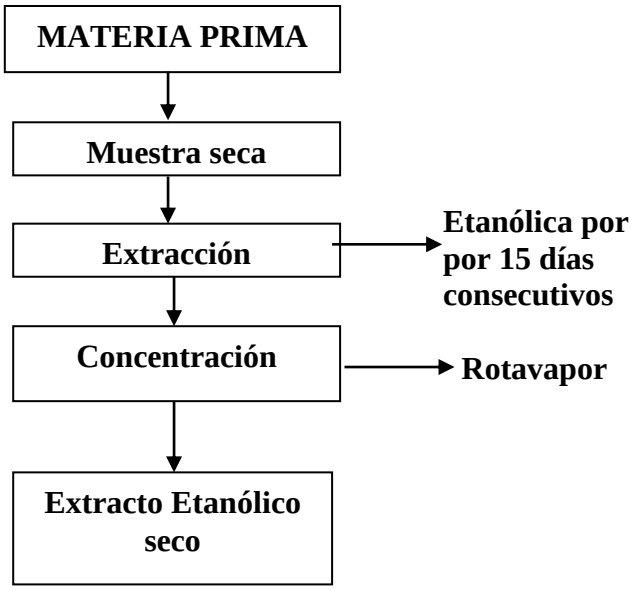
Las muestras molidas se guardaron en frascos herméticos para su posterior utilización. Almacenados a temperaturas menores a 20°C y lejos de la luz.

Para realizar el Tamizaje fitoquímico, se pesaron exactamente 10 g de cada una de las muestras y se procedió según esquema (ver anexo N° 03).

3.3.1.4. Obtención del Extracto Etanólico.

- Las hojas de la especie (*Clidemia hirta*) previamente secada, molida y pesada (610g), se procede a macerar en etanol de 96° (1500ml) durante 15 días.
- Pasados los 7 días se filtró con algodón y papel filtro; la muestra vegetal sobrante se volvió a macerar con 1500 ml de etanol de 96°, por un periodo de 7 días, para luego ser filtrada (2da filtración).
- La muestra filtrada se llevó al rotavapor; para obtener la concentración del extracto etanólico de la muestra vegetal, a presión reducida, a una temperatura de 60ºC y a una presión de 690 mm Hg, por espacio de 3 horas aproximadamente,
- Posteriormente el remanente obtenido se dejó secar a temperatura ambiente por 7 días
- Una vez seco el extracto etanólico se pesó y envasó en un frasco rotulado de vidrio estéril para su posterior utilización en la determinación de la Actividad Antibacteriana (Esquema N°2), (Anexo N°02).

Esquema N°2. Obtención del extracto etanólico de *Clidemia hirta*



3.3.1.5.- Determinación de rendimiento

Para el cálculo de los porcentajes de rendimientos se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{Peso\ del\ extracto}{Peso\ de\ la\ muestra\ total} x\ 100$$

3.3.1.6. Preparación de los extractos a diferentes concentraciones.

- Se procedió a realizar el cálculo para preparar las siguientes concentraciones: 19 mg/ml, 12 mg/ml y 6 mg/ml.

3.3.1.7. Actividad antimicrobiana disco difusión (Kirby-Bauer)

La determinación de la Actividad Antimicrobiana (mediante el Método de KIRBY-BAUER) se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) ubicada en Nina Rumi (Carretera Iquitos- Nauta), Distrito de San Juan Bautista.

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos.

3.3.1.8. Preparación de los discos de sensibilidad.

- Los discos de sensibilidad se prepararon utilizando papel Wattman Nº 3 y un perforador convencional. Estos discos se esterilizaron en autoclave a 121C° en 15 libras de presión por 15 minutos.
- Luego se procedió a impregnar a cada uno de los discos con 20µl de las concentraciones de los extractos vegetales, los que se dejaron secar a 45°C por espacio de 24 horas.

3.3.1.9. Estandarización de la cepa bacteriana a utilizar.

Se preparó la suspensión bacteriana en suero fisiológico, usando un inóculo de colonia bacteriana según las características mencionadas, hasta obtener la misma turbidez del estándar 0.5 en la escala de Mc Farland.

3.3.1.10. Prueba de Sensibilidad.

- Bajo condiciones estériles se procedió a sembrar con un hisopo el inóculo bacteriano en placas con agar Mueller Hinton.
- Se colocaron los discos de sensibilidad con los extractos, el disco con el control negativo y el disco con el antibiótico control positivo, sobre la superficie del agar en forma manual con la ayuda de una pinza estéril.
- Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas, en condiciones de aerobiosis.
- Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro completo), usando una regla o calibrador.

3.3.1.11. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.

CUADRO Nº 03: Porcentaje de inhibición

$$\%\text{INHIBICIÓN: } \frac{\text{Diámetro de la muestra X 100}}{\text{Diámetro del control}}$$

3.3.1.12.-.Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

CUADRO Nº 04: Clasificación actividad antimicrobiana

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	<40%
Poco activo	40 – 50%
Moderado activo	51 – 75%
Buena actividad	>76%

3.3.2. Materiales e Instrumentos

3.3.2.1. Material vegetal:

- Hojas de la especie vegetal *Clidemia hirta* (L.) D. Don

3.3.2.2. Material biológico:

- Microorganismos patógenos: Cepas de Escheria coli ATCC 35218, Cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Pseudomonas aerugiosa* ATCC 27853

3.3.2.3. Equipos:

- Autoclave (Intermedical trade S.A./Model Mod. Vertical –V)
- Balanza Analítica. METTLER TOLEDO AG 204
- Balanza digital - Ohaus® Compact Portable Balance
- Cámara de flujo laminar Magmehelic "Forma cientific/Model: 13089-79)
- Campana de seguridad (Terra Universal)
- Microscopio binocular. OLYMPUS
- Refrigerador. FRÍO LUX
- Cámara fotográfica (Digital). Samsung
- Cocina eléctrica (PRACTICA/Modelo: cocineta eléctrica HP1)

- Refrigerador de 2-8°C (MABE Colombia/Modelo: RML10WHPN50)
- Agitador magnético (JENWAY LTD. Felsted Dunmonw Essex England CM6 3LB/Model:1200)
- Estufa esterilizadora
- Estufa incubadora a 35°C

3.3.2.4.- Medios de cultivo y reactivos químicos

- Agar Nutritivo
- Agar tripticasa de soya
- Agar Miuller Hilton
- Caldo MIuller Hilton
- Cloruro de Bario
- Ácido sulfúrico concentrado
- Cristal violeta
- Lugol
- Acetona
- Safranina
- Fucsina básina
- Etanol q.p.
- Etanol 96%
- Agua destilada

3.3.2.5.- Materiales de laboratorio.

- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc.
- Pipetas 1 y 10 cc
- Placas Petri de 10 cm
- Placas Petri de 4 cm.
- Tubos de ensayo
- Asa de inoculación.
- Disco de sensibilidad
- Discos estériles de 6 mm de diámetro.

- Embudos de vidrio
- Espátula mediana
- Guantes quirúrgicos N° 7 ½
- Gradillas para tubos de ensayo
- Hisopos estériles
- Mascarillas descartables
- Papel filtro Whatman N° 3
- Algodón hidrófilo
- Tips descartables de 10µL, 250, 500 y 1000 uL.
- Micropipetas automáticas de 10µL, 250, 500 y 1000 uL.
- Lápiz marcador de vidrio
- Marcador indeleble
- Papel de despacho
- Papel lente
- Papel toalla
- Tijeras
- Cronómetro
- Vernier o regla graduada en mm.

3.4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1.- Secado y Almacenamiento:

Se colocó la planta en bandejas con papel, en un lugar ventilado en donde los rayos del sol no estaban directos, se volteaba cada cierto tiempo. Las hojas se almacenaron enteras y se guardaron en bolsa plástica. Los frutos también se guardaron en bolsas plásticas. Las bolsas se identificaron adecuadamente.[63]

3.4.2.-Molienda:

La molienda se realizó en mortero, luego se pasó por un tamiz N° 20, la muestra vegetal se molió poco a poco, el polvo semi-fino obtenido se colectó en una bolsa plástica la cual se selló y fue debidamente identificada.[63]

3.4.3.-Tamizaje fitoquímico:

El tamizaje fitoquímico se realizó con el objetivo de determinar la presencia de determinados metabolitos secundarios, en dependencia de sus características estructurales y solubilidad de cada uno de ellos, que permitieron su identificación en uno u otro solvente (agua, alcohol y hexano). Con la finalidad de agotar todos los metabolitos presentes en la muestra se trabajó con solventes de polaridad crecente hasta agotar el material vegetal. Se desarrollaron los siguientes ensayos:

3.4.3.1.- El ensayo de Sudán III:

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente.[64]

3.4.3.2.- El ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner:

Permiten identificar alcaloides, se procede de la forma descrita para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución ácida. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de alcaloide. En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.[64]

3.4.3.3.- El ensayo de Baljet:

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos láctonicos pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado.

3.4.3.4.- Ensayo de Borntrager:

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo.[64]

3.4.3.5.-Ensayo de Liebermann – Burchard:

Permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides, debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

3.4.3.6.- Ensayo de Ninhidrina:

Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.

3.4.3.7.- El ensayo de Shinoda:

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos. El ensayo de antocianidinas permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo.[65]

3.4.3.8.- Ensayo de mucílagos:

La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua.[64]

3.4.3.9.- Ensayo de espuma:

Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénicas.[64]

3.4.3.10.- E**nsayo de Fehling:**

Para reconocer la presencia de azúcares reductores se emplea este método, se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.[64]

3.4.3.11.- El **ensayo de resina:**

Permite identificar este tipo de compuestos y se considera positivo cuando aparece un precipitado.[64]

3.4.4.- ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

3.4.4.1.- Preparación del inóculo

De las placas con agar Mueller Hinton 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 al tubo conteniendo 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 el estándar.

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

Se hizo la misma preparación para las tres bacterias motivo del presente estudio.

3.4.4.2.- Dilución de extractos:

- Se pesaron 560 mg del extracto (Hoja) en microtubos de tipo Sppendorf estériles, luego fueron diluidos en 0.6 ml de una mezcla Etanol/Agua estéril (1:1), para alcanzar una concentración de 933,333 mg/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 0.1 ml de una mezcla de Etanol/Agua (1:1) alcanzando una concentración de 622,222 mg/ml (Concentración 2) que fueron colocados nuevamente en el vórtex para su homogenización.
- Para obtener la Concentración **3**, se procedió a extraer 0.2 ml de la Concentración **2** para posteriormente ser agregado en 0.2 ml de una mezcla de Etanol/Agua (1:1) alcanzando una concentración de 311,111 mg/ml (Concentración 3) que fueron colocados nuevamente en el vórtex para su homogenización.
- Finalmente se procedió a impregnar a cada disco de papel whattman con 20µL de cada concentración, 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 aproximadamente 19, 12 y 6 mg.

3.4.4.3. - Inoculación de las placas:

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a extraer con una micropipeta 100 µL del inóculo, 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. Repitiendo este proceso para las 3 bacterias trabajadas.

- 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.

3.4.4.4. - 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 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: Disco del Extracto (hoja) de 19mg, 12mg y 6 mg, Discos de control negativo: Etanol/agua (1:1) los cuales fueron llevados a la estufa durante 18 horas. Discos de Control positivo: Gentamicina 10 µg.

3.4.4.5. - 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.

3.4.4.6.- Lectura de las placas e interpretación de los resultados:

- Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando la regla vernier.
- 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 obvio, visible, 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.

3.4.4.7.- Interpretación de datos para el método de difusión en disco.

3.4.4.7.1.- 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.

3.4.4.7.2.- Procedimiento de categorizacion:

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.

Cuadro N° 05: Categorización

Categorías	Concentración mínima inhibitoria (mg/L)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
S	**CIM £ c**	**DHI ³ D**
R	**CIM > C**	**DHI < d**
I	**C < CIM £ C**	**DHI < D**

FUENTE: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN DE LA INS.[84]

Por otra parte la lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiofenotipos 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.

CAPITULO IV

IV.- RESULTADOS:

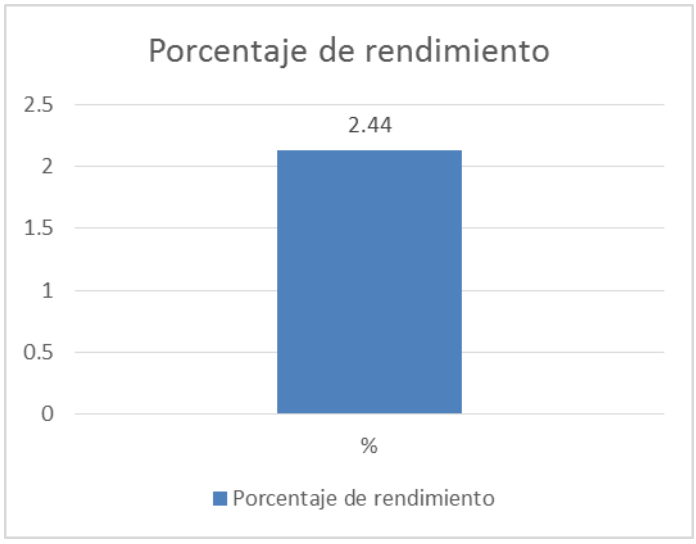
4.1. Obtención de Extractos vegetales.

4.1.1.- Determinación del Rendimiento de *Clidemia hirta* "Mullaca morada"

Tabla N°01. Rendimiento del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta* "Mullaca morada".

Parte de planta	Cantidad de Muestra vegetal (g.)	Cantidad Muestra seca para maceración (g.)	Cantidad de Extracto etanólico (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Hoja	610	450	11	2.44%

Grafico N°01: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de *Clidemia hirta* "Mullaca morada".



La Tabla N°01 y el Grafico N°01, representan el rendimiento en porcentaje, de las hojas utilizadas de *Clidemia hirta*, obtenidas por el equipo Rotavapor. En la Tabla N°01, se determinó el rendimiento de las hojas y se obtuvo un 2.44% de 450 g. de muestra seca.

4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.

La presencia de metabolitos secundarios en los diferentes extractos, obtenidos en el tamizaje fitoquímico de las hojas y frutos de ***Clidemia hirta*** (Mullaca morada), siguiendo el método modificado de Schabra y Col.[66], se señalan en la siguiente tabla:

TABLA N° 02: Resultado del extracto n-hexánico

Metabolitos	Ensayos	Resultados	
		Hojas	Fruto
Alcaloides	Dragendorf, Mayer y Wagner	+	+++
Triterpenos y Esteroides	Ensayo de Liebermann – Burchard	+++	+++
Quinonas	Ensayo de Borntrager	-	-
Carotenos	Ensayo de Carprice	++	+++
Aceites esenciales y grasas	Ensayo de Sudan III	+++	+++

TABLA N° 03: Resultados del extracto etanólico

Metabolitos	Ensayo	Resultados	
		Hojas	Fruto
Alcaloides	Dragendorf, Mayer y Wagner	+	
Saponinas	Prueba de la espuma	++	+++
Fenoles	Ensayo de Cloruro Férrico	+++	+++
Ensayo de aminoácidos y aminas	Ensayo de ninhidrina	-	-
Compuestos reductores	Ensayo de Fehling	+++	+++
Agrupamientos lactónicos	Ensayo de Baljet	+++	+
Triterpenos y Esteroides	Ensayo de Liebermann – Burchard	+++	+++**(esteroides)**
Quinonas	Ensayo de Borntrager	+	-
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	+++**(carmelita)**	+++**(carmelita)**

Tabla N° 04: Resultados del extracto acuoso

Metabolitos	Ensayo	Reacciones	
		Hojas	Fruto
Saponinas	Ensayo de espuma	-	+++
Alcaloides	Ensayo de Dragendorf, Mayer y Wagner	+++	+++
Fenoles	Ensayo de Cloruro Férrico	+++	+
Compuestos reductores	Ensayo de Fehling	-	-
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	+++	+++
Mucílago		-	-

Leyenda: **Abundante cantidad +++**
Mediana cantidad ++
Poca cantidad +
Ausencia -

4.1.3 Actividad antibacteriana de *Clidemia hirta* "Mullaca morada".

4.1.3.1 Método de difusión de disco (Kirby - Bauer)

Tabla N°05: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Clidemia hirta "Mullaca morada"* frente a S*taphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomas aeruginosa,* según diámetro de la zona de inhibición.

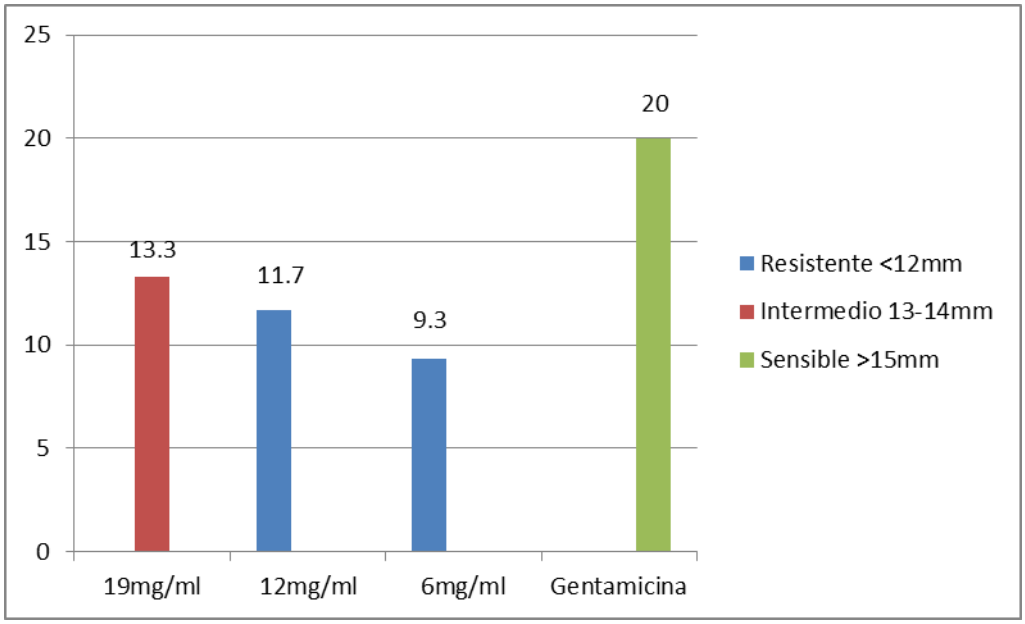
BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANÓLICO PLANTA ENTERA (mg/mL)	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) * (mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&) % INHIBICIÓN	RESULTADO
Staphylococcus aureus	19	13.3 ± 1.2	INTERMEDIO	66.67	MODERADAMENTE ACTIVO
	12	11.7 ± 0.6	RESISTENTE	58.33	MODERADAMENTE ACTIVO
	6	9.3 ± 1.5	RESISTENTE	46.67	POCO ACTIVO
	Gentamicina 10µg	20.0 ± 1.7	SENSIBLE	---	---
Escherichia coli	19	15.3 ± 1.5	SENSIBLE	85.19	BUENA ACTIVIDAD
	12	13.3 ± 2.1	INTERMEDIO	74.07	MODERADAMENTE ACTIVO
	6	11.3 ± 2.1	RESISTENTE	62.96	MODERADAMENTE ACTIVO
	Gentamicina 10µg	18.0 ± 1.0	SENSIBLE	---	---
Pseudomonas aeruginosa	19	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	Gentamicina 10µg	18.7 ± 1.2	SENSIBLE	---	---

* Esquema DZI frente a Control positivo
Resistente : <12 mm
Intermedio : 13 - 14 mm
Sensible : > 15 mm

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición
Inactivo : < 40%
Poco activo : 40 – 50%
Moderadamente activo: 51 – 75%
Buena actividad :> 76 %

La Tabla Nº 05**:** 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 hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"* frente a *Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa.*

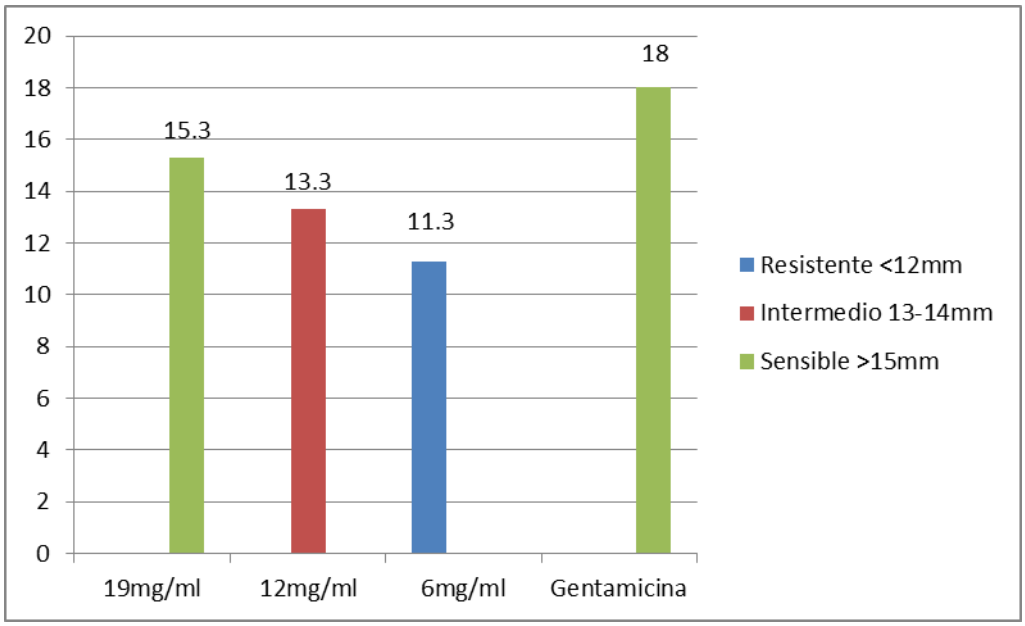
Gráfico N° 02: Categorización del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"*, frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 02, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de las hojas de *Clidemia hirta* y del control positivo (Gentamicina 10µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*.

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 difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta*, obtuvieron valores de DZI de 9.3 y 11.7mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categoriza como RESISTENTE; en la concentración de 19mg/ml se obtuvo un DZI de 13.3mm, por lo cual se categoriza de INTERMEDIO.

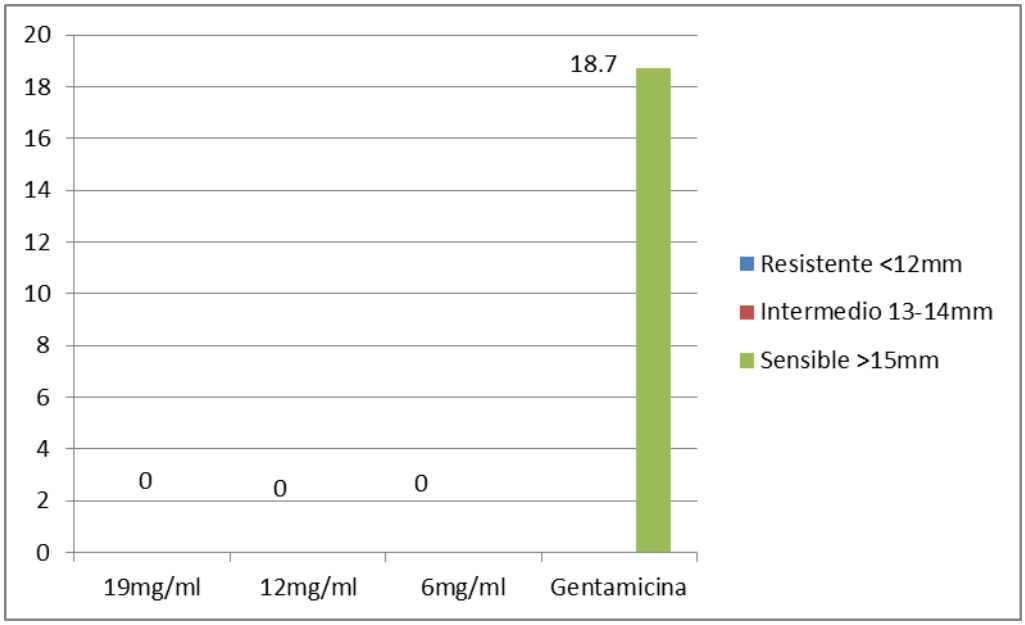
Gráfico N° 03: Categorización del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"*, frente a *Escherichia coli* según Diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 03, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta* y del control positivo (Gentamicina 10µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 18.0 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta*, obtuvieron valores de DZI de 11.3mm, a la concentración de 6mg/ml, por lo cual se categoriza como RESISTENTE; en la concentración de 12mg/ml se obtuvo un DZI de 13.3mm, por lo cual se categoriza de INTERMEDIO, en la concentración de 19mg/ml se obtuvo un DZI de 15.3mm, por lo cual se categoriza de SENSIBLE.

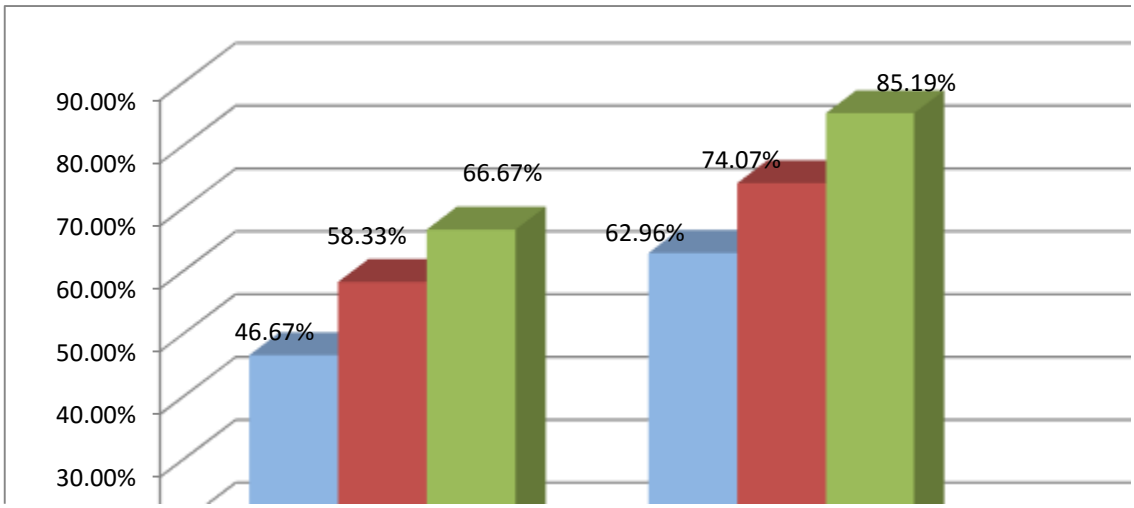
Gráfico N° 04: Categorización del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"*, frente a *Pseudomonas aeruginosa* según Diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 02, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de las hojas de *Clidemia hirta* y del control positivo (Gentamicina 10µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 18.7 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clidemia hirta*, obtuvieron valores de DZI de 0.0, 0.0 y 0.0mm, a las concentraciones de 6, 12 y 19mg/ml, respectivamente, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

Gráfico N° 05: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"* según Porcentaje de inhibición.



El grafico N°05, muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanólico de hojas *Clidemia hirta "*Mullaca morada*"* en las diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa.*

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos etanólicos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose tanto para *Staphylococcus aureus,* un porcentaje de inhibición de 66.67% a la concentración de 19mg/ml, un 58.33% en la concentración de 12mg/ml, con el cual se obtiene como resultado MODERADAMENTE ACTIVO, un 46.67% en la concentración de 6mg/ml, obteniéndose como resultado POCO ACTIVO.

Para *Escherichia coli,* un porcentaje de inhibición de 85.19% a la concentración de 19mg/ml; lo cual se obtiene como resultado BUENA ACTIVIDAD, un 74.07% y 62.96% a las concentraciones de 12 y 6mg/ml, lo cual se obtiene como resultados MODERADAMENTE ACTIVO; (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75%, Buena actividad :> 76 %).

Para *Pseudomonas aeruginosa,* no se evidenció porcentajes de inhibición alguna, por lo tanto es considerado INACTIVO.

CAPITULO V

V. DISCUSIÓN:

En el presente estudio se evaluó, la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "Mullaca morada"* frente a 3 cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa),* mediante el método de Difusión en disco "Kirby – Bauer.

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. [83]

Los resultados obtenidos en el presente estudio referente al Rendimiento del extracto de hojas de *Clidemia hirta,* fue de 2.44%, lo cual nos indica que por cada 100 gramos de hojas secas se puede obtener aproximadamente 2.44 g. de extracto etanólico en polvo.

En la tabla 1, 2 y 3 se observan los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas, y frutos de las especies *Clidemia hirta*, notándose una gran variedad de metabolitos, entre ellos alcaloides, los cuales se encontraron más abundantes en los frutos y poca cantidad en las hojas. Para la identificación de estos, se realizaron ensayos con los reactivos de Dragendorff, Mayer & Wagner, los que produjeron con las sales de estos compuestos, precipitados de color rojo anaranjado, blanco lechoso y marrón respectivamente, corroborando lo encontrado por Mimura, M., Salatino, A., Salatino, M. 2004.[20], determinaron que los principales componentes químicos encontrados en la familia Melastomataceae son de tipo flavonoide. Jang, D. S., *et al*. 2006.[70], quienes hallaron pocos alcaloides en melastomatáceas. Estos metabolitos secundarios se encuentran distribuidos en mayor cantidad en especies del género *Clidemia* y en poca cantidad en el género *Miconia*. Estos cumplen diversas funciones en las plantas, tales como defensa natural contra herbívoros y hongos. Asimismo, presentan una amplia gama de actividades terapéuticas como antimicrobianos, analgésicos, antiinflamatorios, diuréticos, antioxidantes, antivirales, y antitumorales.[71]

Otros metabolitos encontrados en los órganos de la especie en estudio son los compuestos fenólicos en forma abundante en hojas y frutos, los cuales se evidenciaron con la aparición de color verde al reaccionar con tricloruro férrico.[68] Estos metabolitos secundarios engloban a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, y cumplen diversas funciones en las plantas, como defensa contra herbívoros o patógenos, además, en particular como soporte mecánico, en la atracción de polinizadores, y dispersantes de frutos, así como, reducen el crecimiento de las plantas competidoras próximas. Dentro de este grupo se evidenció en forma abundante a los flavonoides, los cuales dieron reacción positiva con el reactivo de Shinoda dando coloraciones de anaranjado a rojo en la fase amílica.[68] Los flavonoides son los metabolitos que dan coloraciones a las plantas por eso son considerados pigmentos naturales, encontrándose generalmente en las flores, frutos y hojas fundamentalmente en forma de glicósidos, lo que les infiere una alta solubilidad en agua y disolventes polares, la cual se incrementa por la alta polaridad de sus estructuras.[67,68] Los flavonoides protegen a las células de exceso de radiación ultravioleta, que se acumulan en las capas epidérmicas de las hojas y tallos, además de ser moduladores del trasporte polar de auxinas. Los flavonoides, han sido empleados para la reducción de la fragilidad capilar, protección frente a estados tóxicos agudos, en terapéutica estrogénica e inflamatoria por su acción similar a la cortisona. Además, son usados como antioxidantes, antivirales, antidiarreicos, antihelmínticos y citostáticos.[72] Asimismo, se evidenció la presencia de antocianidinas, dando una coloración rojo a marrón en la fase amílica, estos son un tipo de flavonoides responsables de la mayoría de los colores rosa, rojo, morado y azul en las plantas y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula. Debido a que colorean flores y frutos, las antocianinas son muy importantes en la atracción de animales para la polinización y la dispersión de las semillas. Estos metabolitos, han sido reportados como anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, según reporte de Garzón, 2008; Martínez, 2005.[73,74]

Por otro lado, las lactonas y cumarinas, se evidenciaron en forma abundante en las hojas y en poca cantidad en los frutos de la especie, las cuales reaccionaron con Baljet dando coloración roja. Asimismo, presentan en forma abundante agrupamientos lactónicos que le confieren actividades insecticidas [75,76]

Respecto a los triterpenos y esteroides, estos se han identificado en todos los órganos de las especies en estudio, los cuales dieron reacción positiva con el reactivo de Liebermann-Burchard dando coloraciones de rojo (triterpenos) y color azul verdoso (esteroides). Los esteroides biogenéticamente están relacionados a los triterpenos. Los esteroides son compuestos fundamentales en la estructura vegetal.

Las saponinas son glicósidos, de ambos triterpenos y esteroles, este metabolito secundario también se ha encontrado medianamente en las hojas y abundante en los frutos de la especie en estudio. Son un grupo amplio distribuido en sustancia vegetales, así llamadas por su capacidad para formar espuma con el agua. Estas son poderosas surfactantes, causan hemólisis y son potentes toxinas plasmáticas, venenosas para los peces, pero sin efectos tóxicos para los hombres al ser ingeridos. Tienen actividades antiinflamatorias, antialérgicas antivirales y moluscosidas.[77] Las saponinas esteroidales, son materia inicial para la preparación de varios productos muy potentes y ampliamente usados como productos farmacéuticos, entre ellos: cortisona, anticonceptivos, estrógenos, testosterona.[78,79]

Por otro lado, también se evidencia la presencia de aceites y grasas en las hojas y frutos de la especie en estudio. Estos, se identificaron mediante el ensayo de Sudan III dando coloración roja, estos metabolitos, se encuentran en las partes aéreas de las plantas superiores, que incluyen hojas y frutos, que están cubiertas completamente, con excepción de la apertura estomática, de una membrana continua lipídica extracelular denominada cutícula.[80,81,82]

El ensayo para azúcares reductores resultó positivo dando precipitados de color rojo ladrillo abundante al reaccionar con Fehling. Estas, se encontraron en todos los órganos estudiados (hojas y frutos) de las especie en estudio, en forma abundante. Por otro lado, para la identificación de los aminoácidos, se realizó la reacción con la ninhidrina. Este metabolito no se encontró en los órganos en estudio.

Grupos de metabolitos secundarios como cardenólidos, quinonas, resinas y mucílagos no fueron detectados en el presente estudio.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta*, se utilizó el método de Kirby –Bauer o disco difusión, según el Manual

de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión aprobado por el Instituto Nacional de Salud.[84]

En nuestro estudio se utilizó como Control positivo (Antibiótico) a Gentamicina 10µg, además del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "*mullaca morada" en 3 niveles de concentraciones.

Los diámetros de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina 10µg) fueron de 20.0 mm, 18.0 mm y 18.7 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 Ríos N, Dávila R.[85] utilizaron como control positivo a Gentamicina 10µg, donde obtuvieron un diámetro de inhibición de 20.4 mm y 19.9 mm frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Rojas, Ochoa, Ocampo y Muñoz.[86] 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 µg/ml, clindamicina 0.3 µg/ml y nistatina 1.0 µg/ml.

Según los resultados obtenidos, respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Clidemia hirta "*mullaca morada" frente a *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de 6mg/ml y 12mg/ml, se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano, evidenciando un diámetro de zona de inhibición (DZI) de 9.3 ± 1.5 mm y 11.7 ± 0.6 mm respectivamente; el cual nos indicaron como resultado RESISTENTE 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; en cambio la concentración de 19mg/ml demostró un 13.3 mm y se categoriza como INTERMEDIO cuando el halo de inhibición se encuentra entre 13 - 14mm.

Frente a *Escherichia coli*, a concentración de 19mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de 15.3 ± 1.5 mm, con el cual se categoriza como SENSIBLE y a 12mg/ml obtuvo 13.3 ± 2.1 mm; con el cual se categorizan como inhibición INTERMEDIA, y a 6mg/ml obtuvo un 11.3 ± 2.1 mm, categorizándose como RESISTENTE, por tener un halo de inhibición <12mm.

Frente a *Pseudomonas aeruginosa*, no se evidenció inhibición del crecimiento bacteriano a ninguna de las concentraciones ensayadas, con el cual fueron categorizados como RESISTENTES.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Jiménez J. 2013.[14], quien determinó la actividad antibacteriana de una especie de la familia Melastomataceae, mediante una técnica mejorada de perforación en placa de agar, y los antibióticos ampicilina y amoxicilina (5 mg/mL) como controles. Extractos y fracciones fueron evaluados a concentraciones de 100, 50 y 25 mg/ml. La actividad antibacteriana no mostró efecto inhibidor alguno por parte de extractos y fracciones de prueba.

Con nuestros 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 sus concentraciones de 6mg/ml, 12mg/ml y 19mg/ml, valores de 46.67%, 58.33% y 66.67% de inhibición respectivamente, por lo tanto es considerado en la clasificación de MODERADAMENTE ACTIVO a las concentraciones de 12mg/ml y 19mg/ml. y POCO ACTIVO a la menor concentración ensayada.

Escherichia coli a la concentración de 19mg/ml obtuvo un 85.19%, considerándose poseer BUENA ACTIVIDAD y a la concentración de 12mg/ml obtuvo un 74.07% y a 6mg/ml obtuvo un 62.96%, lo cual son considerados como MODERADAMENTE ACTIVO. *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones evaluadas no mostró porcentaje de inhibición, por lo tanto es considerado INACTIVO.

Diversos estudios fueron realizados con especies del género *Clidemia*, algunos evaluaron actividades frente a hongos y bacterias.

Duque Betancur Natalia. [12], Determinó la actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Miconia sp* 5%, *Miconia caudata* 5%, *Clidemia hirta* (3 y 5) % y los extractos butanolicos de *Miconia sp* (3 y 5) %, *Miconia caudata* (3 y 5) %, *Clidemia hirta* 5% y *Hamelia patens* (1, 3 y 5) % los cuales fueron evaluados por macrodilucón en tubos a concentraciones del 5%, 3% y 1% m/v contra *Cándida albicans* a una absorbancia de 0,1 (λ = 495 nm) y *Aspergillus niger* al 0.05% m/v. Concluyendo que presentaron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Mientras *Aspergillus niger* no presentó susceptibilidad a los componentes antifúngicos de los extractos evaluados.

Arias C.[19] Evaluó un extracto similar al empleado en nuestro estudio, el extracto en DCM, el cual presentó actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* con porcentajes de inhibición de 66.4, 57.4 y 46.1% para concentraciones de 100, 50 y 25 mg/mL respecto al control, amoxicilina a 5 mg/mL. Las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso arrojaron resultados positivos respecto a la actividad antioxidante, los mayores resultados se obtuvieron para las fracciones E4L y E4F 2.0258 y 2.0657 µeq de DPPH/g de fracción seca, resultado muy próximo a la actividad del control (ácido ascórbico, 2.51 µeq de DPPH/g de ácido ascórbico).

La purificación adicional, identificación y caracterización de los compuestos activos podrían ser nuestra prioridad en futuros estudios con esta especie *Clidemia hirta* "Mullaca morada". .

CAPITULO VI

VI.- CONCLUSIONES

Las hojas y frutos de la especie de *Clidemia hirta* D. Don., evidencian la presencia de una gran variedad de metabolitos secundarios.

Se encontró en forma abundante en las hojas: triterpenos y esteroides, aceites esenciales y grasas, compuestos fenólicos, flavonoides y compuestos reductores.

En los frutos encontramos Triterpenos y esteroides, alcaloides, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenos, aceites esenciales, y azúcares reductores.

Se encontró medianamente en las hojas saponinas y carotenos.

En poca cantidad encontramos quinonas en las hojas y agrupamientos lactónicos en frutos.

En ninguno de los órganos evaluados se encontró la presencia de aminoácidos y aminas, resinas y mucílagos.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta*, se utilizó el método de Kirby –Bauer o disco difusión, según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión aprobado por el Instituto Nacional de Salud. [84]

En nuestro estudio se utilizó como Control positivo (Antibiótico) a Gentamicina 10µg, además del extracto etanólico de hojas de *Clidemia hirta "*mullaca morada" en 3 niveles de concentraciones.

Los diámetros de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina 10µg) fueron de 20.0 mm, 18.0 mm y 18.7 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*).

En la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Clidemia hirta "*mullaca morada" frente a *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de 6mg/ml y

12mg/ml, se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano, evidenciando un diámetro de zona de inhibición (DZI) de 9.3 ± 1.5 mm y 11.7 ± 0.6 mm respectivamente; el cual nos indicaron como resultado RESISTENTE 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; en cambio la concentración de 19mg/ml demostró un 13.3 mm y se categoriza como INTERMEDIO cuando el halo de inhibición se encuentra entre 13 - 14mm.

Frente a *Escherichia coli*, a concentración de 19mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de 15.3 ± 1.5 mm, con el cual se categoriza como SENSIBLE y a 12mg/ml obtuvo 13.3 ± 2.1 mm; con el cual se categorizan como inhibición INTERMEDIA, y a 6mg/ml obtuvo un 11.3 ± 2.1 mm, categorizándose como RESISTENTE, por tener un halo de inhibición <12mm.

Frente a *Pseudomonas aeruginosa*, no se evidenció inhibición del crecimiento bacteriano a ninguna de las concentraciones ensayadas, con el cual fueron categorizados como RESISTENTES.

CAPITULO VII

VII.- RECOMENDACIONES

La especie en estudio es muy promisoria por lo que se debe realizar trabajos de investigación para aislar e identificar los compuestos químicos presentes en esta especie para poder determinar las moléculas responsables de muchas actividades biológicas o farmacológicas, lo cual podría justificar algunos usos etnobotánicos de esta planta.

Esta especie es considerada como una plaga en el ecosistema ya que no requiere cuidados para su propagación en el medio natural por lo que crece indiscriminadamente, afectando algunos cultivos de pan llevar, por lo que no sería difícil su aprovechamiento para que pueda ser aplicado en la industria farmacéutica.

CAPITULO VIII

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mandell GL. 1994. Introducción a las enfermedades microbianas. En: Wyngaarden JB, Smith LIH, Bennet JC ed. Cecil. Tratado de Medicina Interna, 19a ed. México DF:Interamericana- Mc Graw- -Hill, vol 2, part 20, cap 282:1823-4.

2. OMS. 2015. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva Nº194. Disponible en http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/

3. World Health Organization. 1988. Traditional medicine - growing needs and potential. Bull World Health Organ. 66 (2): 266-267.

4. Rengifo E. 2007. Las Ramas Floridas del Bosque. Experiencias en el Manejo de Plantas Medicinales Amazónicas. Iquitos.

5. De la Cruz Beranza, B. 2005. Caracterización de Cinco Extractos de plantas Medicinales Nativas de Guatemala, Validadas científicamente. Informe de Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala.

6. Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios. Reseña mundial. Organización Mundial de la Salud. Pag-1.

7. Márquez Vizcaíno R.; Mercado Pérez A.; Vargas Montero C.; De La Rosa Torres C. 2005. Actividad antibacterial de Pedilanthus tithymaloides (L.) poit (ultimorrial). En: Actualidades biológicas (suplemento), volumen 27, p 21. ISSN 0304-3584.

8. Loeffier, J; Stevens, D.A. 2003. Antifungal drug resistance. Clin infect dis. 36: 31-41.

9. Bernal H., García Martínez H., Quevedo Sánchez G. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia.

10. Torres M.; Tovar N.; Delgado S., Rincon R.; Bonilla D.; Rojas A., et al. Libro resumen de las plantas útiles de la cuenca del rio Orotoy. 2011. Universidad de los Llanos. 128 p. www.unillanos.edu.co

11. Ramírez Aristizabal L., Marín D., Jiménez González F. 2013. *Grupo Polifenoles, Escuela de Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia*

12. Duque Betancur N. 2008. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Miconia caudata, Miconia sp*, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*; frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Universidad Tecnológica de Pereira Facultad de Tecnología Programa de Tecnología Química Pereira.

13. Oblitas G, Hernández-Córdova G, Chiclla A, Antich-Barrientos M, Ccorihuamán-Cusitito L, Romaní F. 2013. Empleo de plantas medicinales en usuarios de dos hospitales referenciales del Cusco, Perú. Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco. Cusco, Perú. Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. Departamento Académico de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Vol. 30 N° 1 Lima ene. 2013. Versión impresa ISSN 1726-46347.

14. Jiménez F. Actividad alelopática y antibacterial in vitro de los extractos EtOH y CHCl3 y de sus fracciones en obtenidas por cromatografía en columna en DIAION HP-20, Toyopearl HW-40, MCI-GEL y ODS de las hojas de la planta *Henriettella trachyphylla*. Actividad Alelopática del extracto isopropanol-agua de *Henriettella trachyphylla* (melastomataceae). Institución:VIII Congreso Colombiano de Fitoquímica en Sincelejo. Categoria: Ponencia en evento especializado. Disponible en http://www.utp.edu.co/vicerrectoria/investigaciones/investigaciones/DetallesProyecto/267

15. Mosquera O., Echeverry L., Niño Osorio J. 2009. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Scientia et Technica Año XV, No 41, Mayo de 2009. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701

16. Haminton Salas-Moreno M. 2014. Identificación de flavonoles en un extracto polar de *Aciotis polystachya* (Bonpland) Triana (Melastomataceae). Revista Biodiversidad Neotropical, ISSN 2027-8918, ISSN-e 2256-5426, Vol. 4, Nº. 1, 2014 (Ejemplar dedicado a: Revista Biodiversidad Neotropical), págs. 21-27. Disponible en https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5168082

17. Ocampo D., Colmenares A., Isaza J. 2014. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hexanoico de *Meriania speciosa* (melastomataceae) por cg-em. Revista productos naturales video cartagena es. Xii congreso colombiano de fitoquímica. Xii congreso colombiano de fitoquímica. Fitoquímica Farmacognosia y Química Medicinal. Disponible en https://www.pronatplus.com/congresofitoquimica/index.php/fitoXII/fitoXII/paper/view/132

18. Bomfim P. MC. 2001. Salatino A, Martins AB, Wurdack JJ, Salatino ML Flavonoids of Lavoisiera, Microlicia and Trembleya (Melastomataceae) and their taxonomic meaning.

19. Arias C. 2008. Elucidación estructural por GC-MS de Metabolitos del extracto en Diclorometano de la Melastomatáceas *Clidemia rubra*. Universidad Tecnológica de Pereira Facultad de Tecnologïa Escuela de Quimica Grupo Polifenoles Pereira. Noviembre de 2008. Disponible en http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1814/1/58376J25.pdf

20. Mimura, M., Salatino, A., Salatino, M. 2004. Distribution of flavonoids and the taxonomy of Huberia (Melastomataceae). Biochemical Systematics and Ecology 2004, 27-34. Disponible en: http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15382831

21. Isaza, J. H., Ito, H., Yoshida, T. 2004. Oligomeric Hydrolyzable Tannins from Monochaetum multiflorum. Phytochemistry 2004, 65, 359-367. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/8896654_Oligomeric_hydrolyzable_tannins_from_Monochaetum_multiflorum

22. Jang, D. S., Su B., Pawlus D A., Kang Y., Kardono L., Riswan S., Afriastini J., Fong H., Pezzuto, J., Kinghorn A., D. 2006. Beccaridiol, an unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of Diplectria beccariana. . Phytochemistry 2006, (16), 1832-7

23. Zuluaga G. 2016. Plantas Medicinales en el Mundo Moderno.., publicado el 02/05/2013 wanamey cultura, plantas medicinales, propiedades plantas medicinales, usos de plantas, usos de plantas medicinales. Disponible en http://www.wanamey.org/plantas-medicinales-2/plantas-medicinales-mundo.htm

24. *Clidemia hirta*. *Germplasm Resources Information Network*. United States Department of Agriculture. 23 de agosto de 1994. Consultado el 18 de febrero de 2009. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Clidemia_hirta

25. Paine, R.W. (1934): The control of Koster's curse (*Clidemia hirta*) on Taveuni. *Fiji Agricultural Journal* 7 10-21. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Clidemia_hirta

26. 2016. Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis. 2015. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. http://catalogoplantascolombia.unal.edu.co Derechos reservados Universidad Nacional de Colombia - Instituto de Ciencias Naturales 2015.

27. Simmonds, H. W. (1933): Biological control of *Clidemia hirta*. *Fiji Agricultural Journal*, 6 : 32–33.Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Clidemia_hirta

28. «*Clidemia hirta*». *Tropicos.org. Missouri Botanical Garden*. Consultado el 7 de noviembre de 2014. https://es.wikipedia.org/wiki/Clidemia_hirta

29. Torres, C. M. 2004. Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hjas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis-subdirección científica Bogotá D.C. Pag. 2-14

30. Ruíz M., Susunaga C. 2000. Actividad antimicrobiana presentes en partes aereas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens (BURSERACEAS), frente a microorganismos como: Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium oxysporum, Trichoderma viride y Btrytis cinerea. Carrera Microbiología Industrial. Facultad de ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo Pregrado. Bogotá D.C. Pág. 40

31. Ramayoni S. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y acidos organicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad y Anatomía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

32. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

33. Barreto J. 1997. Efectos Antimicrobianos del diente de leon (Taxaxacum officinale) y el gualanday (Jacaranda obtusifolia) sobre Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa causantes de enfermedades de la piel. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicos. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C. Pag. 9, 23-29.

34. Arévalo M., Enciso A. 1996. Deerminación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de Espeletias encntradas en el páramo de Guasca. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas.

Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javariana. Bogotá D.C. Pag. 14, 16-18, 21-25.

35. Carey F.A. 2003. Organc Chemistry, 5ª ed. Mc Graw-Hill.

36. López D.– Brea M. 2003. Plantas con actividad antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioterapia. España. 16(4): 385-393.

37. Calsamiglia S., Castillejos L., Busquet M. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI Curso de especialización FEDNA. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Ciencias Animal de los Alimentos. España.

38. Pelczar M. J., Reid R.D. 1992. Microbiología. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 664 pp.

39. Scherriber K., Aurich O., Oskke G. 1963. Solanum Alkaloiden XVIII. Dunnschitcht Chromatographie von Solanm . Seroidalkaloiden und Steroidsapogeninen J. Chromatogr. 12, 63-69.

40. Peñaranda L., Sierra M. 2003. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera Simanba y Bursera graveolans* contra algunos microorganismos patógenos. Carrera Microbiologá. Facultad Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C. Pág. 50-53, 61 y 68.

41. Uribe C. 2003. Seguimiento epidemiológico de infección nosocomial por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente mediante electroforesis de campo pulsado. Carrera Microbiología Microbiología. Facultad de Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Pág. 21 y 22.

42. Rodriguez P., Uribe N. 1995. Efecto antagónico de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *E. coli* y *Shiguella sp* aislados de materia fecal obtenida de un grupo de niños entre 1 y 7 años. Carrera Bacteriología.

Facultad de Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Pág. 20.

43. Mandell G.L., Bennett J.E. Dolin R. 2010. Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica. 7° Edición. Editorial Ellseiver.

44. Ausina Ruíz V., Moreno Guillén S. 2005. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Buenos Aires; Madrid; Panamericana.

45. Harrison´s. Principles of Internal Medicine, 17 th ed Pseudomonas aeruginosa 202-208.

46. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature;406:959-964.

47. Engel J, Balachandran P. 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. Curr Opin Microbiol;12:61-66.

48. Breidenstein EBM, De la Fuente-Nuñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol 2011;19:419-426.

49. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. Salud Publica Mex 2009;51(suppl 3):S439-S446.

50. Tan TT. “Future” threat of gram-negative resistance in Singapore. Ann Acad Med Singapore 2008;37:884-890.

51. Sánchez A, Salso S, Culebras E, Picazo JJ. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Esp Quimioter. 2004;17:336-340.

52. Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. Effl ux pumps expression and its association with porin downregulation and β-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. BMC Microbiol 2010;10:217.

53. Pitout JD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki B, Nordmann P, et al. Metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. Clin Microbiol Infect 2008;14:755-759.

54. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al. Molecular epidemiology of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of internacional clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:346-352.

55. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005;43:3129-3135.

56. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofi lms. Int J Oral Sci 2011;3:55-65.

57. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofi lm development. Curr Opin Microbiol 2007;10:644-648.

58. Kipnis E, Sawa T, Wiwnwr-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect 2006;36:78-91.

59. Bartram J et al. (eds.), 2003: Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing.

60. De Victorica J, Galván M, 2001: Pseudomonas aeruginosa as an indicator of health risk in water for human consumption. Water Science and Technology, 4 86-3:49–52.

61. Hardalo C y Edberg SC, 1997: Pseudomonas aeruginosa: Assessment of risk from drinking-water. Critical Reviews in Microbiology, 23:47–75.

62. Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000). *100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database*. Publicado por el Grupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI), un grupo especialista de la Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN), 12pp. Primera edición, en inglés, sacada junto con el número 12 de la revista Aliens, Diciembre 2000. Versión traducida y actualizada: Noviembre 2004. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Clidemia_hirta.

63. Logan, M. 1973. Digestive disorders and plant medicinals in Highland Guatemala. Anthropos. 68:537-547.

64. Ganosa M. 2000. Fundamentación Química de las Reacciones de coloración y Precipitación en la identificación de Metabolitos Secundarios de Plantas Medicinales. (Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico). Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 14-45p.

65. Murray M. 2005. Química Orgánica" 6taed. TOMPSON. España. 805p-807p.

66. Schabra, S.C. 1984. Phytochemical screening of tanzanian medical plants. Etnopharmacol., 11, pp.157–159.

67. Lock de Ugaz, O. Investigación fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1988. p.14-15

68. Miranda, M. & A. Cuéllar. 2002. Manual de Prácticas de laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad Habana. pp. 41-52

69. Marcano, D.; Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 588 pp.

70. Jang, D.S., et al. (2006) Chem. Pharm. Bull. 54: 1315–1317.

71. Usubillaga, A.; I. Aziz; M. C. Tettamanzi; R. Waibel & H. Achenbach. 1997. Steroidal alkaloids from Solanum sycophanta. Phytochem. 44 (3): 537-543.

72. Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Ed. Omega S.A. España. pp. 106-109.

73. Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 3: 27–36

74. Martínez, M. A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia

75. Hernández, J.; Y. Flórez & G. Vallejo. 2010. Evaluación de la actividad insecticida de Solanum macranthum (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de Rhodnius pallescens, Rhodnius prolixus, Rhodnius colombiensis. Revista Cubana de Farmacia. 45 (1): 71-78..

76. Chang, L.; Y. Rosabal & J. Morales. 2013. Composición fitoquímica de los tallos y hojas de la especie Solanum nigrum L. que crece en Cuba. Rev Cubana Plant Med [online]. vol.18, n.1, pp. 10-16.ISSN 1028-4796.

77. Lacaille-Dubois, M. A. & H. A. Wagner. 1996. Review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine 4: 363-386. Lien, E.; Lien, L.; Wang, R.; Wang, J. 2012. Phytochemical analysis of medicinal plants with kidney protective activities. Chin. J. Integr. Med. (China). 18 (10): 790-800.

78. Coutinho, E. M. 2009. Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de Solanum (Solanaceae) – Dissertação. 167.

79. Martínez, M. A. 2001. Saponinas esteroides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia

80. Pighin, J. A.; H. Zheng; L. J. Balakshin; I. P. Goodman; T. L. Western; R. Jetter; L. Kunst & L. Samuels. 2004. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. Science 306: 702-704.

81. Cameron, K. D.; M. A. Teece & L. B. Smart. 2006. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. Plant Physiol. 140: 176-183.

82. Jeffree, C. E. 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Biology of the Plant Cuticle. M. Riederer, C Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissens chaften Universität Würzburg, Germany. pp:11-110.

83. 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.

84. Instituto Nacional de Salud (INS). Manual De Procedimientos Para La Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana Por El Método De Disco Difusión. Ministerio de Salud. LIMA -2002. Pág.: 13-19; 60-63.

85. 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.

86. 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

ANEXOS

Anexo N° 01: CERTIFICACIÓN DE HERBARIO

UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación
de Recursos Naturales

CONSTANCIA Nº 029-2016-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 los bachilleres: **DANITZA GABRIELA GARCÍA MEDINA y LUIS DANIEL SALDAÑA SUNCIÓN,** de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: **"EVALUACIÓN FITOQUIMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA** *in vitro* **DE** *Clidemia hirta* (L.) Don **POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN FRENTE A MICRORGANISMOS PATOGENOS.".** La cual fue verificado y determinado en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP. Que a continuación se indica:

Código de Herbarium	Familia	Nombre Científico	Nombre común
000186	**MELASTOMATACEAE**	*Clidemia hirta* (L.) D. Don	"mullaca morada"

Se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Iquitos 13 de Junio del 2016

Atentamente,

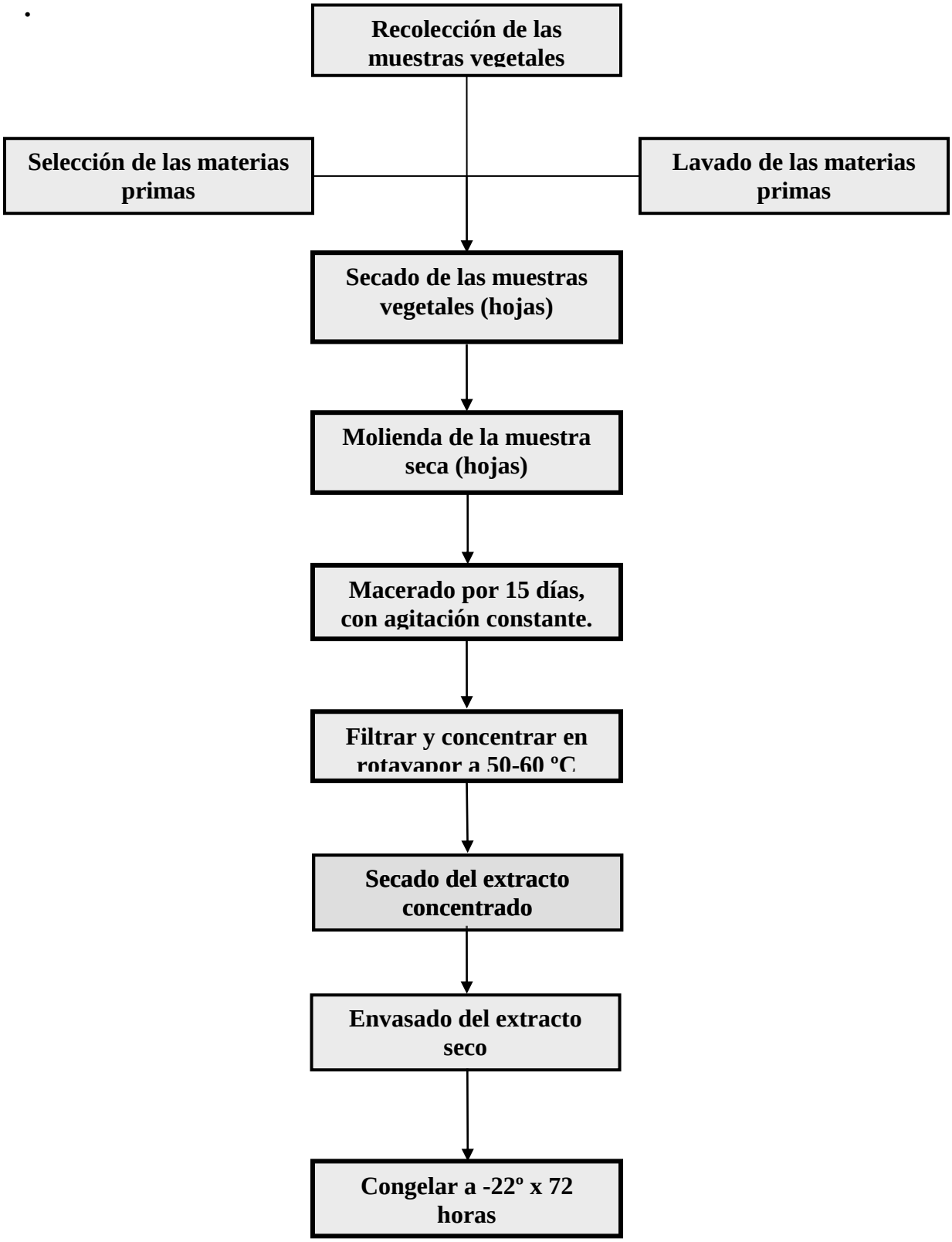
Blgo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA M.Sc.
Coordinador del Herbarium AMAZ
CIRNA-UNAP

Dirección Pevas/Nanay – Iquitos Perú
Apdo. 496

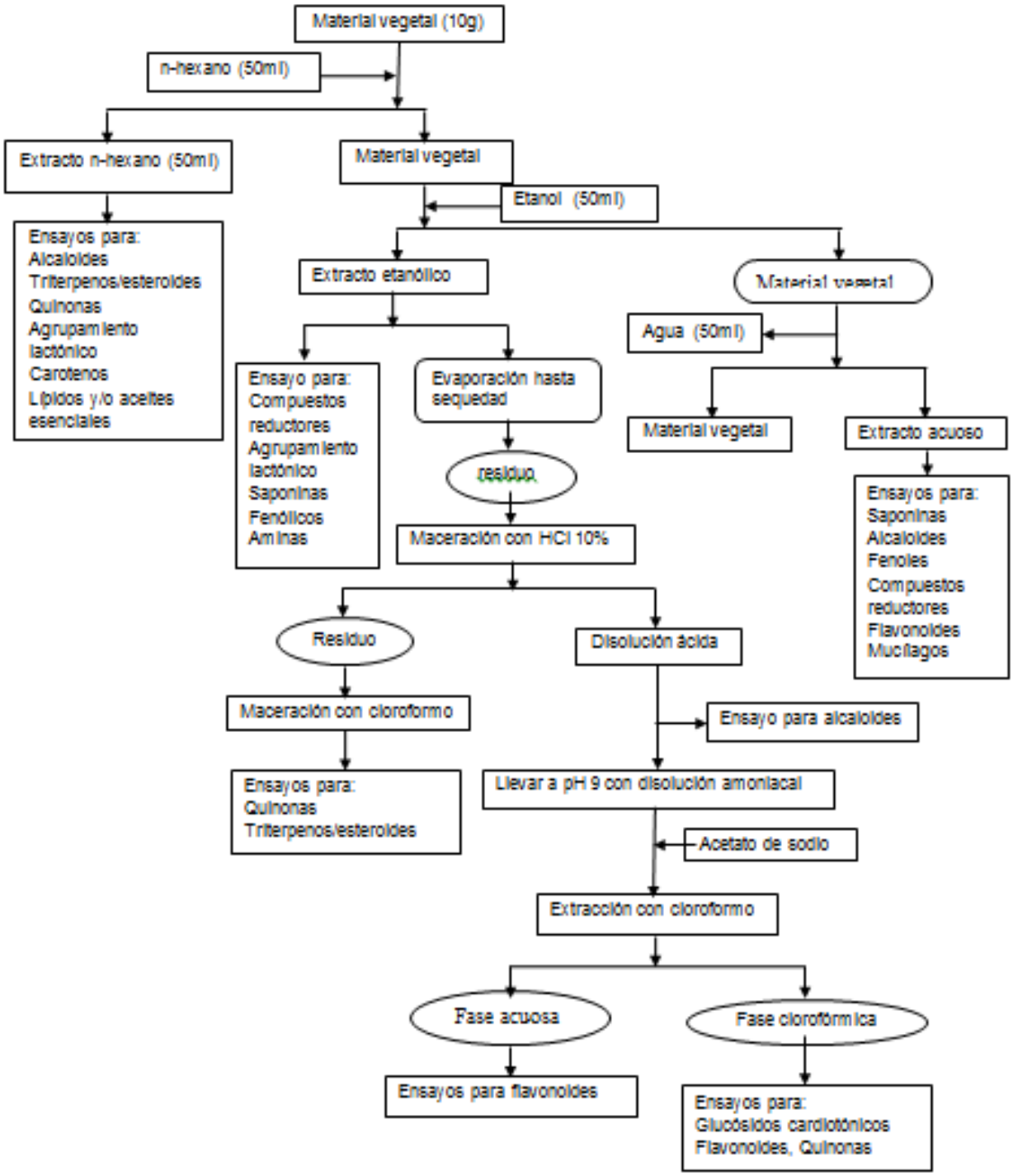
Página 1 de 1

Centro de Investigaciones de Recursos Naturales

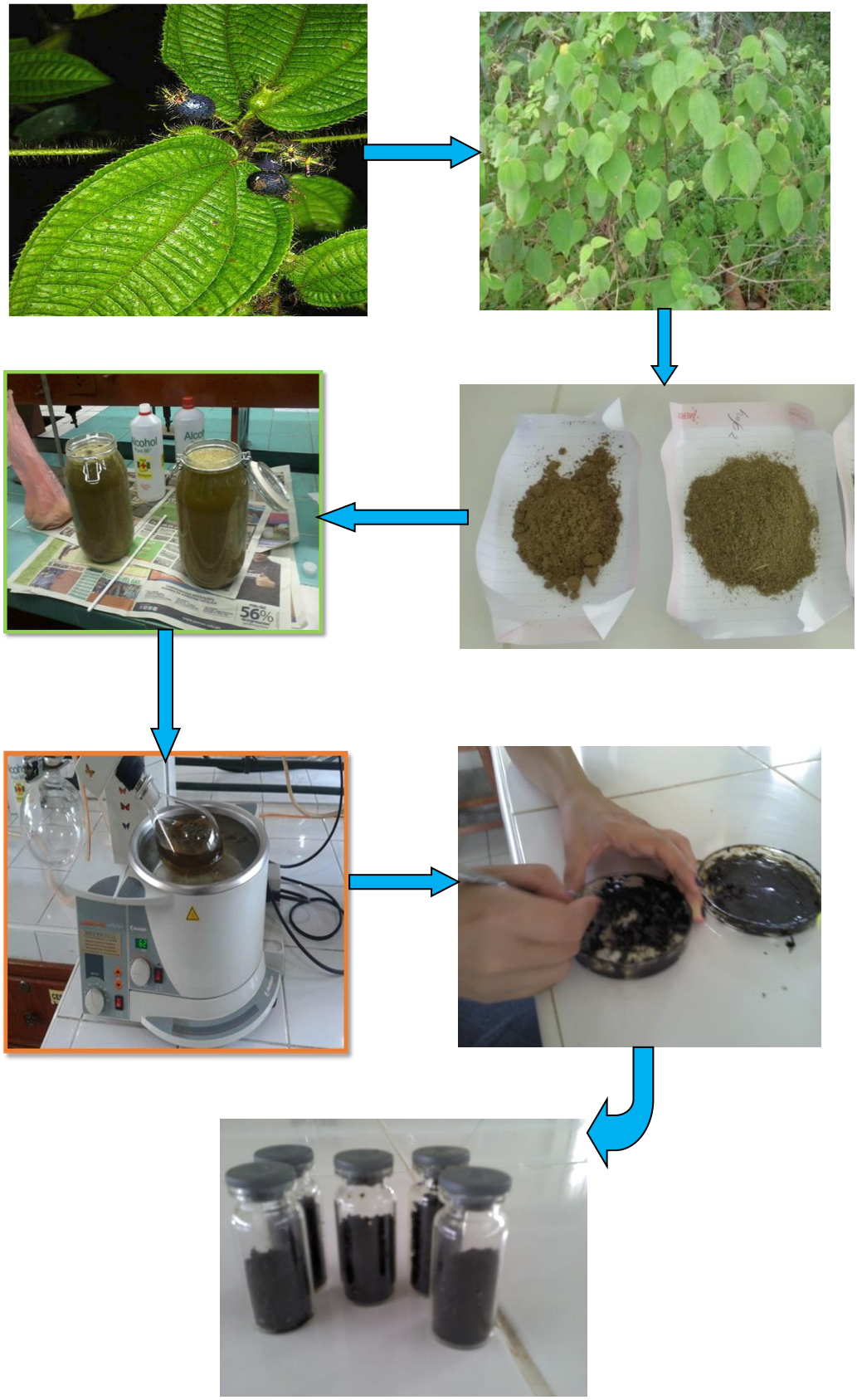
Anexo N° 02: FLUJOGRAMA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN ANTIBACTERIAL



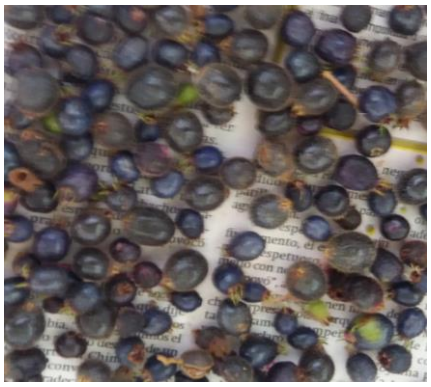
ANEXO N° 03: FLUJOGRAMA DE TAMIZAJE FITOQUIMICO

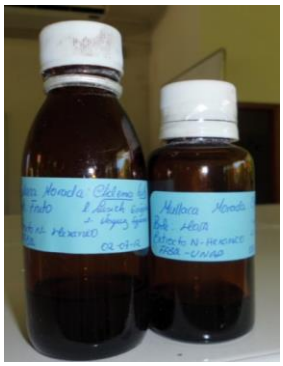


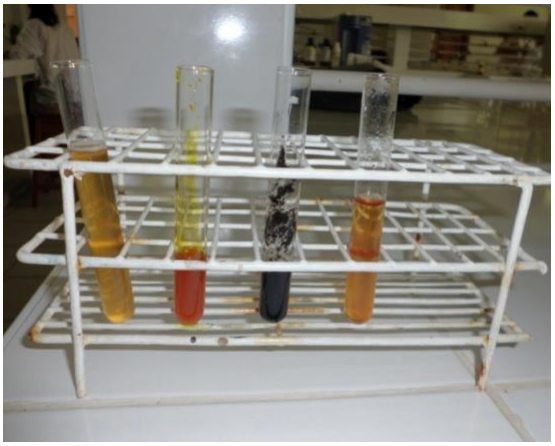
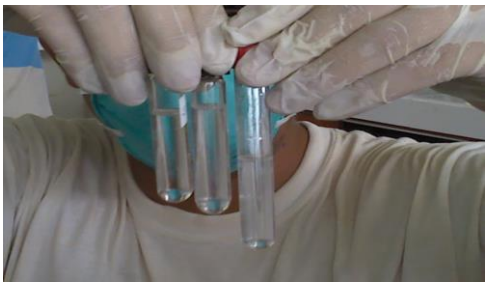
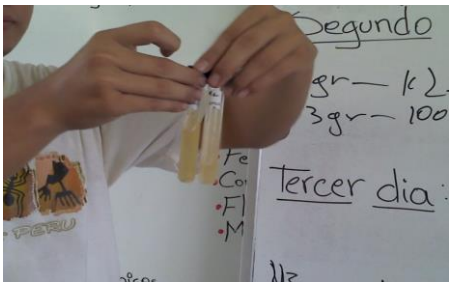
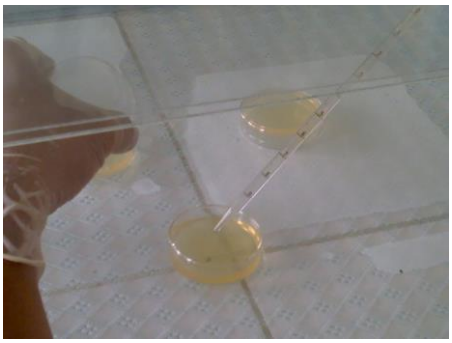
ANEXO N° 04: PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO



ANEXO N° 05: TAMIZAJE FITQUIMICO







ANEXO N° 06: ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL