

“AÑO DE LA CONSOLIDACIÓN DEL MAR DE GRAU”

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (Paico), FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN. IQUITOS-PERÚ-2015

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. ROJAS GONZALES NILSSA MELISSA

Bach. DEL CASTILLO PAREDES CLARA ISABEL

ASESOR:

MC. CHARLES OCAMPO FALCÓN

IQUITOS – PERÚ

2016



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 06 días del mes de Junio del dos mil dieciséis, siendo las 18:00 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 232-FFB-UNAP-2015, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- ✓ ING. CLETO JARA HERRERA PRESIDENTE
- ✓ BLGO. FELIPE RIOS ISERN MIEMBRO
- ✓ Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG MIEMBRO



Se constituyeron en las instalaciones del Auditorio de la Oficina General de Bienestar Universitario de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA in vitro DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (Palco), FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN", presentado por las Bachilleres NILSSA MELISSA ROJAS GONZALES y CLARA ISABEL DEL CASTILLO PAREDES, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de 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 19:00 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a las sustentantes por su acertada exposición

ING. CLETO JARA HERRERA
PRESIDENTE

BLGO. FELIPE RIOS ISERN
MIEMBRO

Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
MIEMBRO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

Facultad de Farmacia y Bioquímica

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (Paico), FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, MEDIANTE LOS MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN. IQUITOS-PERÚ-2015

MIEMBROS DEL JURADO



ING. CLETO JARA HERRERA

PRESIDENTE



Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO
WONG
PRIMER MIEMBRO



BLGO. FELIPE RIOS
ISERN
SEGUNDO MIEMBRO

ASESOR



MC. CHARLES OCAMPO FALCÓN

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (Paico), FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, MEDIANTE LOS MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN.

ROJAS G. N. M.¹; DEL CASTILLO P. C. I. ¹

1: BACHILLERES: FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, UNAP.

RESUMEN

Las plantas son fuentes importantes de una diversidad de compuestos para el tratamiento de muchas enfermedades que afectan a la humanidad, destacando así la importancia y conveniencia de la realización de investigaciones referentes a la determinación de actividad antibacteriana⁽¹⁾. En el presente trabajo de investigación, se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mediante los método de difusión en agar y macrodilución. La muestra vegetal, fue recolectada del Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional (IMET)-Es Salud-Iquitos, se identificó taxonómicamente en el *Herbarium Amazonense*-UNAP y se depositó para su conservación en la Xiloteca de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias (FIIA-UNAP). La determinación se realizó en el laboratorio del área de microbiología de FIIA-UNAP, para el estudio de la actividad antibacteriana *in vitro*, mediante los métodos de difusión en agar y macrodilución se utilizó cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218. Los resultados obtenidos mediante el método de difusión en agar a concentraciones de 12mg y 6mg; no evidenciaron actividad antibacteriana en los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* frente a dichas cepas bacterianas; y por el método de macrodilución demostró concentración mínima inhibitoria (CMI) tanto para el extracto acuoso y etanólico en 32mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, una CMI de 8mg/ml para *Staphylococcus aureus* con el extracto etanólico, mientras que para Concentración Mínima Bactericida no se obtuvieron evidencia alguna. Estos resultados mostraron ser inactivo y poco activo de acción antibacteriana de los extractos contra los microorganismos empleados en el estudio.

PALABRAS CLAVES: *Chenopodium ambrosioides*, Paico, Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida.

***in vitro* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT ETHANOL AND LEAVES *Chenopodium ambrosioides* (PAICO), AGAINST *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* AND *Escherichia coli*, THROUGH THE METHODS OF DISSEMINATION IN AGAR AND MACRODILUTION.**

ROJAS G. N. M.¹; DEL CASTILLO P. C. I.¹

1:BACHILLERES: FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, UNAP.

SUMMARY

Plants are important sources of a variety of compounds for the treatment of many diseases that affect humanity, highlighting the importance and desirability of conducting research concerning the determination of antibacterial activity.⁽¹⁾In this research, *in vitro* antibacterial activity of aqueous extract and ethanol extract of the leaves of *Chenopodium ambrosioides* (paico), against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was determined by the agar diffusion method and Macrodilution. The plant sample was collected from the Botanical Garden of the Institute of Traditional Medicine (IMET) - Is Health-Iquitos; he was taxonomically identified in the Herbarium Amazonense-UNAP and deposited for preservation in the Xiloteca of the Faculty of Engineering of Food Industries (FIIA-UNAP).The determination was performed in the laboratory of microbiology area of FIIA-UNAP, for the study of the antibacterial activity *in vitro*, using methods agar diffusion and Macrodilution bacterial strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was used and *Escherichia coli* ATCC 35218.The results obtained by the agar diffusion method at concentrations of 12 mg and 6 mg; showed no antibacterial activity in aqueous and ethanol extracts of *Chenopodium ambrosioides* leaves against such bacterial strains; and by the macrodilution method it showed minimal inhibitory concentration (MIC) for both the aqueous and ethanolic extract 32mg/ml for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, a MIC of 8mg/ml for *Staphylococcus aureus* with ethanolic extract, wehile for Bactericidal Concentration Low no evidence was obtained. These results showed to be inactive and indolent antibacterial activity of the extracts against microorganisms used in the study.

KEY WORDS: *Chenopodium ambrosioides*, Paico, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

DEDICATORIA

Nilssa Melissa Rojas Gonzales:

*A mis Queridos padres **Pedro Rojas Reátegui** y **Gilma Gonzales Paredes**, por su apoyo incondicional, cariño, amor, y sus consejos que me ayudaron a superar los momentos más difíciles en mi vida de estudiante y el trabajo que hicieron para que nunca me falte nada es digno de reconocimiento, quiero darles las gracias por creer en mí y motivarme a ser una mujer de éxito.*

*A mi Hermano **Miguel Angel**, por ser mi compañero, consejero y ejemplo a seguir.*

*A **Cesar Vásquez e Isabel Sangama**, por su apoyo, cariño y amistad incondicional.*

Clara Isabel Del Castillo Paredes:

*A mis adorados padres **Wilmer Del Castillo** y **Clara Paredes**, quienes por ellos soy lo que soy, por su apoyo, consejos, comprensión y amor. Gracias a ustedes, pude lograr conseguir mis objetivos*

A Dios por darme la vida haciendo posible lograr mis metas y guiarme en todo momento.

*A mí querida tía **Lita Paredes** por su apoyo, consejo y cariño.*

*A mí abuelita **Eleuteria Shupingahua** por todo su amor.*

AGRADECIMIENTO

A nuestra prestigiosa Universidad **Nacional de la Amazonia Peruana** y a nuestra querida **Facultad de Farmacia y Bioquímica** por los años inolvidables y permitir conocer a grandes docentes que se dedican a forjar futuros profesionales capaces y competitivos para formar un Perú mejor.

Al **Mc. CHARLES OCAMPO FALCÓN**, por ser un gran orientador y ejemplo a seguir.

Al **Ing. ALENGUER ALVA ARÉVALO DR**, por sus enseñanzas; por lo que queremos expresarle nuestro respeto y agradecimiento.

Al **IQ.F. JEAN PIERRE LÓPEZ MESÍA**, por su apoyo, enseñanzas, preocupación y guía en todo momento, para la ejecución nuestra tesis.

Al **Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG, ING. CLETO JARA HERRERA y BLGO. FELIPE RIOS ISERN**, por su apoyo, consejos y asesoramiento durante la redacción del presente trabajo de investigación.

A nuestros familiares y queridos amigos, por su apoyo incondicional e incentivarnos a ser mejores cada día y luchar por nuestros sueños.

Bach. Nilssa M. Rojas Gonzales & Clara I. Del Castillo

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. OBJETIVOS	16
CAPITULO II.....	17
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1. ANTECEDENTES:.....	18
2.2. MARCO CONCEPTUAL	21
2.2.1. Base teórica de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico).....	21
2.2.1.1. Clasificación Taxonomía de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico).....	21
2.2.2. Base teórica de las cepas en estudio:.....	26
2.2.2.1. Clasificación Taxonómica del <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.2.3. Directrices para las pruebas de Sensibilidad a Antimicrobianos	29
2.2.4. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica:.....	29
CAPITULO III	35
III. METODOLOGÍA	36
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	36
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	36
3.3. DEFINICIONES OPERACIONALES:.....	37
3.4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	40
CAPITULO IV	53
IV. RESULTADOS.....	54
4.1. Rendimiento de los procesos de extracción del extracto acuoso y etanólico de las hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico).....	54
4.2. Actividad antibacteriana de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico)	55
4.3. DISCUSIÓN.	71
4.4. CONCLUSIONES:	74
4.5. RECOMENDACIONES:	75
4.6. BIBLIOGRAFIA.....	76
4.7. ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Clasificación taxonomía de <i>chenopodium ambrosioides</i> (paico)	21
Tabla 2: Valor nutricional del paico (<i>chenopodium ambrosioides</i>).....	23
Tabla 3: Clasificación taxonómica del <i>staphylococcus aureus</i>	26
Tabla 4: Clasificación taxonómica <i>pseudomonas aeruginosa</i>	27
Tabla 5: Clasificación taxonómica de <i>escherichia coli</i>	28
Tabla 6: Antibióticos y diámetros críticos para <i>staphylococcus spp.</i>	46
Tabla 7: Categotización.....	46
Tabla 8: Distribución de los grupos de trabajo por el método de macrodilución para el extracto acuoso y etanólico de <i>chenopodium ambrosioides</i> (paico).	49
Tabla 9: Distribución de los grupos de trabajo por el método de macrodilución para el control positivo.....	51
Tabla 10: Porcentaje de rendimiento obtenido del extracto acuoso y etanólico de las hojas de <i>chenopodium ambrosioides</i> (paico).....	54
Tabla 11: Actividad antibacteriana del extracto acuoso de <i>chenopodium ambrosioide</i> frente a <i>staphylococcus aureus</i> , <i>pseudomas aeruginosa</i> y <i>escherichia coli</i> , según diámetro de la zona de inhibición.....	55
Tabla 12: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>chenopodium ambrosioide</i> frente a <i>staphylococcus aureus</i> , <i>pseudomas aeruginosa</i> y <i>escherichia coli</i> , según diámetro de la zona de inhibición.....	61
Tabla 13: Actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas de <i>chenopodium ambrosioide</i> (paico) según concentración mínima inhibitoria (cim), frente a <i>staphylococcus aureus</i> , <i>pseudomonas aeruginosa</i> y <i>escherichia coli</i>	67
Tabla 14: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>chenopodium ambrosioide</i> (paico) según concentración mínima inhibitoria (cim), frente a <i>staphylococcus aureus</i> , <i>pseudomonas aeruginosa</i> y <i>escherichia coli</i>	68
Tabla 15: Concentración bactericida mínima (cbm) del extracto acuoso y etanólico de las hojas de <i>chenopodium ambrosioides</i> (paico).....	70
Tabla 16: Operacionalización de las variables: difusión en agar.....	105
Tabla 17: Operacionalización de las variables: difusión en agar.....	106
Tabla 18: Operacionalización de las variables: macrodilución.....	107
Tabla 19: Operacionalización de las variables: macrodilución.....	108

Tabla 20: Indicadores para el método de macrodilución: variable independiente	109
Tabla 21: Indicadores para el método de macrodilución: variable independiente	110
Tabla 22: Operacionalización de la variable dependiente	111

ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico N°01: Porcentaje de rendimiento obtenido del extracto acuoso y etanólico de las hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico).....	53
Gráfico N° 02: Categorización del extracto acuoso de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , según Diámetro de la zona de inhibición.....	56
Gráfico N° 03: Categorización del extracto acuoso de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico), frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según diámetro de la zona de inhibición...	57
Gráfico N° 04: Categorización del extracto acuoso de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico), frente a <i>Escherichia coli</i> , según Diámetro de la zona de inhibición.....	58
Gráfico N° 05: Actividad antibacteriana de Extracto acuoso de hojas de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico)según Porcentaje de inhibición.....	59
Gráfico N° 06: Categorización del extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según Diámetro de la zona de inhibición.....	62
Gráfico N° 07: Categorización del extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico), frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según diámetro de la zona de inhibición.....	63
Gráfico N° 08: Categorización del extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico), frente a <i>Escherichia coli</i> , según Diámetro de la zona de inhibición.....	64
Gráfico N° 09: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de hojas de <i>Chenopodium ambrosioide</i> (Paico) según Porcentaje de inhibición.....	65
Gráfico N° 10: Resultados del Control Positivo (Gentamicina) frente a las Bacterias estudiadas, de la Concentración Inhibitoria Mínima del Extracto Acuosos y Etanólico de las hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico), Mediante el Método de Macrodilución.....	68

CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mediante los Método de Difusión en Agar y Macrodilución.

Por tiempos remotos la humanidad ha usado plantas en su intento por curar enfermedades y aliviar el sufrimiento físico. El conocimiento de la existencia de plantas medicinales se deriva de los intentos y de los errores de los primeros humanos que intentaron usar plantas⁽²⁾. El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas está basado en la observación, la experiencia y el conocimiento profundo del entorno, transmitido de generación en generación, enriquecido por la integración cultural de la población nativa y migrante, este saber ha devenido en la medicina popular y la herboristería actual. Para un buen uso de las plantas medicinales es necesario conocer correctamente las especies utilizadas, la forma de preparación y dosificación, así como los cuidados que deben observarse.⁽³⁾

Las plantas nativas que tratan infecciones causadas por virus o bacterias son las más comunes y en el caso del *Chenopodium ambrosioides* (Paico), planta nativa del Perú, poseen un gran potencial antimicrobiano por lo que pueden ser usadas en muchos campos⁽⁴⁾. La especie *Chenopodium ambrosioides* (Paico), posee estudios fármaco- toxicológicos a nivel internacional, nacional y regional pero aún las bases de datos y sistemas informativos están poco documentados al respecto. Con las nuevas investigaciones que existen sobre esta planta, se crean grandes posibilidades de obtener fitofármacos con acción antihelmíntica, antiinflamatoria, relajante muscular y antimicrobiana, entre otras, con menor potencial de efectos adversos.⁽⁵⁾

Las diversas enfermedades ocasionadas por agentes patógenos e inadecuados comportamientos en los distintos estilos de vida del hombre moderno, está creando una necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento, con una tendencia de volver a las costumbres ancestrales del uso de plantas para la cura de sus enfermedades, debido a las múltiples ventajas que aporta en el aspecto medicinal como económico.⁽⁶⁾

Los microorganismos entéricos como *Escherichia coli*, son causantes de una gran parte de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo, como es el caso de nuestro país

y más de nuestra región siendo afectada por estas clases de bacterias entéricas. Otro microorganismo como *Staphylococcus aureus* es el responsable del 50% de las infecciones intrahospitalarias registradas por el Instituto Nacional de Salud. ⁽⁷⁾

Dentro de los microorganismos Nosocomiales se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, esta constituye uno de los patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos, tanto así que se le considera una causa frecuente de neumonía con la ventilación mecánica. ⁽⁸⁾

Sin embargo, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia dentro de los cuales uno de los más eficaces es la síntesis de enzimas, tales como las Betalactamasas denominadas así por atacar el anillo beta-lactámico que forma parte de la sustancia activa de dichos antibióticos, entre los átomos de C y N para formar compuestos inactivos. ⁽⁹⁾

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS) de EUA determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de cepas MRSA (*S. aureus* meticilina resistente) se incrementó del 4% en 1980 a 31.9% en 1996. En 2001 se tenía un 55% de prevalencia y para el 2004, llegó al 60.7%. En algunos hospitales se han reportado incidencias hasta del 80%. La prevalencia actual de cepas MRSA está sujeta a variaciones geográficas. Por ejemplo, en Europa se tienen porcentajes elevados, como un 58% en Italia y 54% en Portugal, mientras que en Japón se tiene un 70%. Por otro lado, los países escandinavos tienen un porcentaje muy bajo de cepas MRSA, alrededor del 1%. ⁽¹⁰⁾

La OMS ha reportado la ocurrencia de 3362 casos de infecciones por *E. coli* enterohemorrágica O104:H4; en total 16 países informaron casos y el 96,8 % (3254/3362) corresponden a Alemania. Del total de casos, el 25 % (823/3362) corresponden a casos de Síndrome Urémico Hemolítico. La tasa de letalidad general es del 1% y la letalidad por SHU 3 %. ⁽¹¹⁾

La diarrea continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños a nivel mundial ⁽¹²⁾. En nuestro país es la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años ⁽¹³⁾. Las *E. coli* diarreogénicas son una causa importante de diarrea en niños pequeños en países en vías de desarrollo, pero no son rutinariamente diagnosticadas y son poco conocidas por el médico clínico. A excepción de la *E. coli* productora de Shiga toxina (en particular de la *E. coli* 0157:H7, asociada al Síndrome Urémico Hemolítico), a nivel mundial las *E. coli*

diarreogénicas no se buscan rutinariamente en los laboratorios clínicos, debido a la falta de métodos diagnósticos rápidos, asequibles, y de muy bajo costo. ⁽¹⁴⁾

En el Perú, se ha registrado 105 321 episodios de enfermedades diarreicas agudas (95 % como EDA acuosa), y cuya tasa de incidencia durante ese periodo fue de 34 episodios por cada 10 mil habitantes, valor menor registrado en los últimos 3 años, lo cual evidencia una tendencia decreciente de las EDAs. Moquegua, Pasco y Amazonas son los departamentos que reportaron las tasas más altas. En la población asegurada, se han notificado 33 452 casos de EDAs, con una tasa de incidencia de 36 episodios por 10,000 asegurados. Del total de episodios por EDAs, el 28% (9,418) se presentaron en menores de 5 años, el 38% (12753) se reportaron en el servicio de consulta externa, 1% (207) en el servicio de hospitalización y el 61% (20,582) fueron atendidos en el servicio de emergencia. Las Redes Asistenciales en la que se presentaron las mayores incidencias de episodios de EDAs fueron: La Libertad, Pasco, Loreto, Moquegua y Lambayeque. ⁽¹⁵⁾

Con los resultados obtenidos esperamos que sea un inicio a proyectos de investigación empleando otras metodologías y con ello beneficiar en el aspecto económico a la población e incrementar el cultivo de “*Chenopodium ambrosioides*(Paico)”; de esta manera poder contar con nuevas alternativas para el gran problema de resistencia bacteriana.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mediante los métodos de difusión en agar y macrodilución.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Obtener los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico).
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), por el método de Difusión en Agar *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), por el Método de Macrodilución *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.
- Comparar la concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico) contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, frente al control positivo (Gentamicina).

CAPITULO II

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES:

Yáñez A., y Velasteguí S. (2014): Investigaron la actividad antimicrobiana y Fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Emplearon 4 metodologías de obtención de extractos de 8 especies vegetales. Las metodologías de extracción involucraron solventes de diferente polaridad tales como: agua, etanol y hexano. Las plantas medicinales estudiadas fueron: albahaca (*Ocimum basilicum*), ambo (*Nicandra physalodes*), guayaba (*Psidium guajava*), hierba luisa (*Cymbopo goncitratus*), matico (*Aristeguietia glutinosa*), ortiga negra (*Urtica dioica*), paico (*Chenopodium ambrosioides*), tomillo (*Thymus vulgaris*). Los resultados obtenidos con el extracto etanólico de paico demostró que inhibe en un 100% el crecimiento de *Escherichia coli* a una concentración de 2500 mg/l. Para la levadura *Candida albicans* el extracto etanólico de paico y el extracto etanólico de tomillo demostraron que inhiben el crecimiento de la levadura a una concentración de 2500 mg/l. El subsecuente análisis Fitoquímica determinó que las hojas de paico y tomillo contienen metabolitos secundarios tales como: aceites esenciales, taninos, flavonoides y triterpenos, esteroides, alcaloides (paico) y saponinas (tomillo).⁽¹⁶⁾

Moreno M., Parada P., Mejía V., y Espinoza M. (2013): Realizaron el estudio para identificar los posibles efectos tóxicos producidos por la infusión de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sobre el modelo biológico utilizado. Emplearon ratones albinos suizos NIH de los 2 sexos, a los que se les administró por vía oral infusiones de la especie estudiada a concentraciones de 32, 64 y 134 mg/ml por 90 días. Al mismo tiempo se realizaron observaciones clínicas diarias con el fin de identificar algún efecto tóxico pos administración de la sustancia. Después fueron sacrificados para realizar los exámenes hematológicos (hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos, glóbulos blancos, neutrófilos y linfocitos) y bioquímicos (alanino amino transferasa y creatinina), así como estudios macroscópicos e histológicos de los órganos internos (riñón, hígado, pulmón e intestino). Cuyos resultados se encontró que la infusión de *Chenopodium ambrosioides* a las dosis administradas no causó efectos de terminantemente significativos en los parámetros toxicológicos, en el peso corporal, en hematología y química sanguínea, al igual que tampoco provocó alteraciones anatómopatológicas sobre los órganos y tejidos evaluados.⁽¹⁷⁾

Jaramillo B., Duarte E., y Delgado W. (2012): Sus estudios realizados, describen que la infusión de hojas y flores de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) son utilizadas como estomacal, carminativa, antihelmíntica y digestiva, debido a su acción paralizante y narcótica sobre ascárides, oxiuros y anquilostomas. ⁽¹⁸⁾

Monzote., L., y colaboradores (2006): Demostraron la actividad *in vitro* del aceite esencial de *C. ambrosioides* contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, así como su eficacia *in vivo* en la leishmaniosis cutánea causada por esta misma especie de Leishmania, a dosis de 30 mg/kg diarios del aceite esencial, en ratones. Un estudio posterior evaluó la eficacia, toxicidad y resistencia del parásito tras la administración intraperitoneal, oral e intralesional en ratones del aceite esencial, siendo la administración intraperitoneal la más efectiva en controlar la enfermedad. ⁽¹⁹⁾

Gómez C. (2008): Realizó una revisión bibliográfica sobre *Chenopodium ambrosioides*, en particular sobre su uso a nivel mundial, encontrando que esta especie tiene un amplio uso como amebicida y vermífugo, como antipalúdico, fungicida y analgésico. Concluyendo que al parecer todas las culturas concuerdan en que, en la cocina, o como infusión, *C. ambrosioides*, sea llamado epazote, paico o con cualquiera de sus nombres vulgares, es un ingrediente indispensable y muy eficaz de la medicina herbolaria. ⁽²⁰⁾

Pérez D. (2002): Evaluó a las Especies con potencial antimalárico en la Región de Ucayali, el contenido es el resultado de la encuesta a 367 personas, quienes mencionaron 55 especies, dentro de ellas a *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae). Sobre los usos de *Chenopodium ambrosioides* y *Zebrina pendula*, los informantes mencionan que toda la planta, macerada y filtrada, se aplica en los depósitos de aguas estancadas para el control de larvas de Anofeles. Las especies de mayor importancia como biosidas son *Mansoa alliacea*, *Petiveria alliacea*, *Gallesia integrifolia*, *Capsicum annum* y *Chenopodium ambrosioides*. ⁽²¹⁾

Nascimento GGF., y colaboradores (2000): Realizaron ensayos del extracto acuoso de las partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* (paico) han exhibido actividad antiulcerosa en dosis de 25 y 100mg/kg administrado vía oral. Los extractos totales de *Chenopodium ambrosioides*, demostraron actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La administración intraperitoneal de 100 y 200mg/kg de extracto metanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* ha logrado disminuir la temperatura rectal en ratas con hiperpirexia inducida por inyección subcutánea de una suspensión acuosa

de levadura. Dicho efecto es ligeramente menor al producido por 400mg ácido acético salicílico. ⁽²²⁾

Okuyama E., y colaboradores(1993): Observaron el efecto farmacológico del ascaridol como principio activo de *C. ambrosioides* en ratones. Reportaron que el ascaridol tiene, a una dosis de 100 mg/kg, un efecto hipotérmico de $\Delta T_{max} - 1,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,01$, 1h), y un efecto analgésico (69%, $p < 0,05$) para la contorsión inducida por ácido acético. A la misma dosis se observó la prolongación del efecto anestésico provocado por el pentobarbital sódico. También, reduce la actividad locomotora, aumentada por la administración de metanfetaminas. Sin embargo, la administración de una dosis de 300 mg/kg produjo convulsiones y toxicidad letal. ⁽²³⁾

García B. (1992): Estudió la flora medicinal de Colombia, donde concluye que dentro de la composición química y las propiedades farmacológicas del “paico”, la droga que se extrae de las hojas, frutos y tallos tiene un olor aromático agradable y contiene 1.5% de aceite de quenopodio y 64.5% de ascaridol. ⁽²⁴⁾

Pousset J, L. (1989): En su estudio de plantas medicinales africanas, llegó a la conclusión que, el ascaridol es el principal responsable del aroma del «paico», así como también de sus propiedades parasitarias y de sus efectos tóxicos. La variada presencia de disacáridos (pectina), de glucósidos (saponinas, flavonoides), taninos, ácidos orgánicos, aceites esenciales, lípidos y vitaminas confieren a la planta total un carácter químico diferente al que tiene exclusivamente el ascaridol, considerado tóxico en dosis inadecuadas, aquí radica la diferencia entre el uso de la planta entera y de sus derivados específicos. ⁽²⁵⁾

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Base teórica de *Chenopodium ambrosioides* (Paico).

2.2.1.1. Clasificación Taxonomía de *Chenopodium ambrosioides* (Paico)

Tabla 1: Clasificación Taxonomía de *Chenopodium ambrosioides* (Paico)

Reino	Plantae
División	Trachebionta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Sub familia	Chenopodioideae
Genero	Chenopodium
Especie	Ambrosioides

Fuente: Science, B, C. ⁽²⁶⁾

2.2.1.2. Generalidades:

2.2.1.2.1. **Nombre común:** payku Tape (kickwa-chafirku), payku (kickawa), paicocomenbra, paicoconomenbaseje`pa (a`ingae); huasieco (paico), epazote, paico, solitario, te de médico (castellano), wormsed (ingles), nerbrena blanca (castellano- lengua no especifico), baiko, subrosia (lengua no especifica).⁽²⁷⁾

2.2.1.2.2. **Hábitat:** Hierba terrestre

2.2.1.2.3. **Origen:** Nativa

2.2.1.2.4. **Etnias:** chachi, kichwa de la sierra, cofán, secoya, kichwa del oriente, mestiza.

⁽²⁷⁾

2.2.1.3. Descripción de *Chenopodium ambrosioides* (Paico)

Es una planta aromática, perenne con una altura aproximada de 40 centímetros; las hojas son oblongo – lanceoladas y serradas de un centímetro de ancho y 4 de longitud. Sus flores son pequeñas verdes en panículos terminales densos con cinco sépalos cada uno. Las semillas son negras no mayores a 0,8 mm de longitud ⁽²⁶⁾. Además, existen en el paico distintos aminoácidos, como el ácido oxálico y el ácido succínico. También se encuentran concentraciones variables de glucosa y ácido málico. ⁽²⁸⁾

El componente activo principal del paico es un aceite esencial que se forma en los pelos glandulares que existen en hojas, flores y frutos. Este aceite es el componente activo de mayor responsabilidad en las propiedades de la planta. Sus componentes son el ascaridol en un 60-80% y otros compuestos hidrocarbonados como el p-cimeno, l-limoneno, d-alcanfor y cineol. ⁽²⁹⁾.

2.2.1.4. Origen de *Chenopodium ambrosioides* (Paico):

El género *Chenopodium* consta de 120 especies, abundantes en las zonas tropicales y cálidas. Este género *Chenopodium ambrosioides* es el más importante por su uso medicinal. La especie es originaria de América, pero ahora crece en Europa y en África. *Chenopodium ambrosioides* es popularmente conocida como “apazote”, “pazote”, “paico” o “mastruz” ⁽³⁰⁾.

El paico crece de manera silvestre y cultivada en la Costa, Sierra y Amazonia, hasta los 4,000 msnm, en los bordes de las chacras, los terrenos de cultivo y los jardines. El paico es cultivado con gran facilidad en climas tropicales, subtropicales y templados, y en suelos de cualquier tipo con abundante materia orgánica. Se propaga por semillas y esquejes, y se le puede sembrar durante todo el año, en asociación con hortalizas. ⁽³¹⁾

2.2.1.5. Valor Nutricional de *Chenopodium ambrosioides* (Paico)

El paico es una planta muy estudiada por investigadores peruanos, pues es utilizado como alimento desde épocas prehispánicas.⁽³²⁾

Tabla 2: Valor Nutricional del Paico (*Chenopodium ambrosioides*).

Cada 100 g. de hojas contiene:	
Proteína	5 g.
Carbohidratos	9.2 g.
Calcio	459 mg.
Fósforo	65 mg.
Hierro	6.3 mg.

(Antunéz de Mayolo, 1981)

Fuente: Antunéz de Mayolo, S⁽³²⁾

2.2.1.6. Características botánicas y distribución de *Chenopodium ambrosioides* (Paico)

Planta herbácea, erecta, de 50-60 cm de alto. Hojas alternas, ovoides y lanceoladas, de bordes dentados o profundamente sinuosos, 5-8 cm de largo y 1-3 cm de ancho, pecíolo corto, verde claro. Flores diminutas, agrupadas en pequeños racimos; cáliz de 5 sépalos, apétalo, verde amarillentas, generalmente hermafroditas. Fruto maduro, envuelto en los restos del cáliz. Semilla lenticular.⁽³³⁾

2.2.1.6.1.1. Distribución: Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Loreto, San Martín.⁽³³⁾

2.2.1.6.2. Composición Química y Principios Activos:

La planta entera es rica en aceite esencial⁽³⁴⁾, el mayor contenido de este aceite se encuentran en las semillas, se ha determinado la presencia de: ascaridol⁽³⁵⁾, que es el causante del efecto antiparasitario de esta planta, p – cimeno, (-)- limoneno, (+)- alcanfor, isoascaridol, aritasona, safrole, N – docosano, N- hentriacontano, N – heptacosano, N- octacosano, pineno, methadieno, metilsalicilato, dimeltilsulfoxido, mirceno, geraniol, ácidos butíricos, tartárico, ferulico, vainillico, salicilato de metilo y de terpinilo. Además, se reportan en diferentes partes los siguientes compuestos; ambrosido, betaina, chenopodiosidos, A y B.⁽³⁵⁾

2.2.1.6.2.1. Compuestos Químicos presentes:

Se han aislado ascaridol(41,8%)⁽³⁶⁾, isoascaridol(18,1%)⁽³⁷⁾, p-cimeno (16,2%), α -terpineno (9,7%) y limoneno (3,8%). Sin embargo, el ascaridol experimenta una isomerización produciendo el isoascaridol.⁽³⁵⁾

2.2.1.7. Usos del paico

Sus usos son medicinales, y en el conocimiento de la gente es difundido puesto que han sido reportados desde la época prehispánica. Actualmente se le atribuye cualidades para calmar dolor de estómago, eliminar lombrices intestinales, curar empacho en los niños, agilizar la memoria. Es usado en caso de cólicos, nerviosidades y calambres al estómago y curar el espanto. También se le utiliza en algunas limpias, (actividad ancestral para eliminar malas energías del cuerpo).⁽³⁸⁾

Es uso generalmente era combatir las lombrices coloradas, oxiuros, y otra clase de parásitos intestinales o dismenorrea. Las siguientes afecciones a la salud son tratadas con distintas preparaciones del paico:⁽³⁸⁾ Dolores de estómago/cólicos, contra la gastritis, hinchazón, abscesos dentales, resfriado, para curar enfermedades de la piel, contra artritis.⁽³⁹⁾

Es también usado como: Purgante, antidiarreico pediátrico, Antitusígeno, Antihelmíntico (ácaros, oxiuros).⁽³⁹⁾

2.2.1.8. Uso de las Partes de la muestra vegetal:

Tallos:

Cólicos: infusión de las hojas y tallos tiernos; un vaso tres o cuatro veces al día en el caso de adultos y tres o cuatro cucharadas, en el caso de niños. Infecciones urinarias: beber una taza caliente del cocimiento de «paico» con «pampa orégano» tres a cuatro veces cada día.⁽⁴⁰⁾

Hojas:

Heridas: Con el cocimiento de las hojas se hacen lavados en la zona afectada; las hojas machacadas se aplican como emplasto sobre ellas.

Antidiarreico: Infusión de las hojas flores: 20 g en un litro de agua. Tomar tres a cuatro tazas al día.

Parasitosis intestinal: Infusión de las hojas y tallos tiernos. Tomar un vaso tres a cuatro veces al día. Tener extrema precaución al preparar la infusión: una infusión demasiado concentrada puede tener efectos tóxicos.

Digestivo: Tomar una taza de la infusión preparada (20 g de hojas en un litro de agua) después de las comidas.

Hemorroides: En baños de asiento con la infusión de las hojas. ⁽⁴⁰⁾

2.2.1.9. Aspectos ecológicos:

Cultivo: Época de siembra: Durante todo el año, de preferencia en días sombreados.

Espaciamiento: Se recomienda un espaciamiento de 1 m x 0,50 m o 0,75 m x 0,75 m. Distanciamiento entre línea de 0,80 m a 1 m y entre plantas de 0,25 m a 0,30 m.

Labores de cultivo: Para el abono, se puede aplicar 2 kg de estiércol de ganado y 1 de gallinaza, 15 días antes de la siembra definitiva. Es recomendable realizar podas de formación. Las semillas demoran 10 días para germinar. Se puede sembrar directamente o por trasplante en terreno definitivo, cuando las plántulas tienen 20 días y haya alcanzado de 10 cm a 12 cm. ^(41, 42)

2.2.1.9.1. Cosecha: Se realiza el primer corte a los 80 días de la siembra y posteriormente cada 30 días a 10 o 12 cm del suelo para facilitar el rebrote. Manejo post-cosecha: Las partes vegetales, después de cosechadas, deben desecarse de preferencia bajo sombra para su conservación. ⁽⁴¹⁾

2.2.2. Base teórica de las cepas en estudio:

2.2.2.1. Clasificación Taxonómica del *Staphylococcus aureus*

Tabla 3: Clasificación Taxonómica del *Staphylococcus aureus*.

<i>Clasificación Taxonómica del Staphylococcus aureus</i>	
Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>
Nombre Binomial	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Botero M.,⁽⁴³⁾

2.2.2.1.1. Características Morfológicas del *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva esférica (cocos) con un diámetro de 1 a 1,3 micras. Cuando se ve al microscopio aparece en racimos, aunque también se evidencia en cadenas cortas. Es inmóvil y no forma esporas. El microorganismo puede crecer tanto con y sin oxígeno (anaerobios facultativos). Sus principales reservorios se encuentran en los seres humanos y los animales. La acción patógena deriva de su propia característica estructural (capsula o capa mucosa, proteína A) que le permite la producción de una isoenzima y toxina específica (catalasa, hemolisina, coagulasa, estafilocinasa, ialuronidasa lipasa) y le dé la capacidad de multiplicarse en todos los sitios del cuerpo causando daño celular localizado en el sitio de infección. La adquisición puede ser exógena o endógena, la transmisión exógena puede llevarse a cabo a través de la contaminación de tejido traumatizado (herida o quemaduras) a través de la contaminación de tejido de material contaminado y la ingestión de alimento o leche contaminados. La infección endógena se trata de la entrada de microorganismos desde la piel, a través de fracturas, herida o cuerpos extraños, desde un lugar donde el microorganismo es comensal.^(44, 45)

2.2.2.2. Clasificación taxonómica *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 4: Clasificación taxonómica *Pseudomonas aeruginosa*.

Clasificación taxonómica <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordenen	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>P. aeruginosa</i>

Fuente: Brea, K., y colaboradores. ⁽⁴⁶⁾

2.2.2.2.1. Características Morfológicas

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, 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. ⁽⁴⁷⁾

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo común en el medio ambiente y pueden 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. *Pseudomonas aeruginosa* es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. ⁽⁴⁶⁾*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. ⁽⁴⁸⁾

2.2.2.3. Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*.

Tabla 5: Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i> .	
<i>Reino</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Filo</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Clase</i>	<i>Gamma proteobacteria</i>
<i>Orden</i>	<i>Enterobacteriales</i>
<i>Familia</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Especie</i>	<i>E. coli</i>

Fuente: Vega M. ⁽⁴¹⁾

2.2.2.3.1. Características Morfológicas

Escherichia coli es un bacilo entérico Gram negativo no esporulado móvil por flagelación peritica, aerobio facultativo, oxidasa negativa, con requerimientos nutritivos muy sencillos, fermentadores de azúcares que puede crecer como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos. ⁽⁴⁹⁾

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de bacterias coliformes. ⁽⁵⁰⁾

El metabolismo de *Escherichia coli* consiste en utilizar azúcares sencillos y requiere nitrógeno soluble, son oxidasa negativos y catalasa positivos, en general indol positivos y descarboxilan la lisina, ureasa negativa e incapaz de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato ^(51,52, 53). Se clasifican en más de 170 serogrupos O ⁽⁵⁴⁾ adaptados a diferentes ambientes, incluso dentro del huésped llegando a ser un patógeno mortal, es por ello que su diagnóstico oportuno y su combate con el uso apropiado de antibióticos resultan de suma importancia para disminuir la incidencia ⁽⁵⁵⁾.

2.2.3. Directrices para las pruebas de Sensibilidad a Antimicrobianos

Se dispone actualmente de varias directrices a nivel mundial para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y para los correspondientes criterios de interpretación de las pruebas. Entre otras, se incluyen las directrices y referencias publicadas por:

Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS), Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC), Comité de Antibiógramas de la Sociedad Francesa de Microbiología (CASFM), Instituto Alemán de Normativas (DIN), Sociedad Japonesa de Quimioterapia (JSC), Workgroups richtlijnen gevoeligheids bepalingen (Sistema WRG, Países Bajos). Hasta ahora, solo el NCCLS ha desarrollado protocolos para ensayos de sensibilidad de bacterias aisladas de animales y ha determinado criterios interpretativos ⁽⁵⁶⁾.

2.2.4. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica:

Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos ⁽⁵⁷⁾:

- **Métodos cuantitativos:** Son aquellos procedimientos que permiten determinar la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). **Se define CIM** como la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes) ⁽⁵⁶⁾. **Se define como CBM** la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial). ⁽⁵⁷⁾
- **Métodos cualitativos (disco difusión):** Son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. ⁽⁵⁷⁾

2.2.4.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN

Fundamento: El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. ⁽⁵⁷⁾

Para el método de difusión se utilizan generalmente discos de papel filtros impregnados con las soluciones antimicrobianas a ensayar, éstos se aplican sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo de prueba. Al ponerse en contacto los discos con el agar, absorben agua del medio, con lo cual se disuelve la solución y empieza a difundir a través de la capa de agar. Al mismo tiempo que el antibiótico va difundiendo ocurre la multiplicación bacteriana. Durante la fase de crecimiento logarítmico en la que la multiplicación bacteriana ocurre más rápidamente que la difusión del antibiótico las bacterias que no han sido inhibidas seguirán multiplicándose, hasta formar un halo alrededor del disco que puede visualizarse luego de cierto tiempo de incubación. No habrá crecimiento en el área donde el antibiótico esté en concentraciones inhibitorias, por lo tanto, mientras más susceptible sea el microorganismo el diámetro del halo será mayor ^(58,59).

Existen distintas metodologías; una de las cuales utiliza un disco de papel de filtro impregnado en la solución de la droga el cual se coloca directamente sobre la superficie del agar mientras todavía estén húmedos, los discos pueden prepararse con precisión si se agrega una cantidad determinada del agente al papel filtro con una micropipeta pudiéndose calcular así la potencia del disco. También se pueden aplicar los antimicrobianos directamente sobre la superficie de las placas sembradas en forma de gota. Este proceso es más sencillo porque evita los problemas de la difusión planteados por los distintos tipos de papel filtro usado con los discos. El inconveniente es que, según sean las características del disolvente del agente, las gotas pueden ser no uniformes por expandirse en forma desigual. También se pueden aplicar los antimicrobianos en cilindros de cristal o metal los cuales se llenan con la solución formando una columna de líquido en contacto directo con la superficie del medio. De igual manera se pueden realizar pocillos en la superficie del agar y llenarlos con el agente antimicrobiano a ensayar ^(60,58).

Ventajas: Es un método sencillo, barato y de fácil control y estandarización. Una ventaja adicional del método y específicamente del medio, es que se le pueden realizar algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma con microorganismos exigentes o muy exigentes que necesitan más nutrientes que los que este medio les puede ofrecer. Un ejemplo claro es *S. pneumoniae*, microorganismo exigente para el cual se puede hacer un agregado de sangre de oveja desfibrinada en una concentración al 5%. Muchas veces estos agregados generan cambios conocidos en los halos de inhibición del crecimiento bacteriano ⁽⁶¹⁾.

2.2.4.2. MÉTODO DE DILUCIÓN

Las primeras determinaciones se realizaron empleando una cantidad considerable de tubos con caldo de cultivo, a los cuales se le colocaban diluciones crecientes de antibióticos con el mismo fundamento que el descrito para el método de dilución en agar. Este procedimiento se denominó macrodilución en caldo. Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución en caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento de su costo. Dentro de estos describiremos la macrodilución en caldo. ⁽⁶²⁾

2.2.4.3. Macrodilución en Caldo

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales eran realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo; partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir, ésta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo ⁽⁶³⁾.

Fundamentos: Consiste en exponer a las cepas en estudio a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) ⁽⁶⁴⁾.

Las pruebas de dilución son utilizadas principalmente para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un extracto, aceite esencial o de una sustancia pura. El método consiste en que a un cultivo del microorganismo en estudio se le inoculan cantidades específicas del antibiótico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada. En este método de dilución en líquido, el indicador de inhibición es la turbidez del medio, cuando no existe crecimiento el medio permanece claro, es decir, el antibiótico inhibe al microorganismo; y cuando el antibiótico no tiene ningún efecto entonces hay crecimiento y el medio aparece turbio.

El grado de inhibición se relaciona con la turbidez y ésta se mide por espectrofotometría. La concentración mínima del antibiótico que no muestre crecimiento es la medida del efecto bacteriostático del mismo sobre el microorganismo ⁽⁵⁸⁾. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente. Se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo <en el caldo. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga 10^5 a 10^6 UFC/ml ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35°C entre 16 y 20 horas. ⁽⁶⁵⁾

2.2.5. CATEGORIAS INTERPRETATIVAS DE LAS BACTERIAS

Las categorías interpretativas de las bacterias son:

- **Sensible:** un microorganismo es sensible a un determinado antimicrobiano cuando el agente antimicrobiano puede alcanzar niveles plasmáticos iguales, por lo menos a la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) en el lugar de la infección.

- **Resistente:** un microorganismo es resistente a un agente antimicrobiano cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede localizar en el lugar de la infección no es suficiente para eliminar el microorganismo, es decir la concentración de agente antimicrobiano necesario para destruir el microorganismo no se puede elevar por más efectos tóxicos secundarios. La concentración de antimicrobiano es menos a la C.M.I. necesaria para destruir el microorganismo.

- **Sensibilidad intermedia:** es cuando el microorganismo no es afectado por dosis normales de agente antimicrobiano dadas a intervalos normales, pero si se produce una acumulación en el lugar de la infección sin llegar a dosis que produzcan efectos tóxicos, se puede eliminar el microorganismo. ⁽⁶⁶⁾

2.2.6. ANTIBIOGRAMA

Un antibiograma es un estudio de la sensibilidad del microorganismo, productor de una enfermedad, a los antimicrobianos ⁽⁶⁶⁾.

Este método fue estandarizado por Bauer en 1966, varios factores afectan el tamaño del halo de inhibición: la carga antibiótica en los discos, la difusión del antibiótico en el medio de cultivo, el tamaño del inóculo bacteriano, la composición y el grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación ⁽⁶⁷⁾.

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con drogas en estado cristalino) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión, se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. ⁽⁶⁸⁾

CAPITULO III

III. METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

En el trabajo de investigación se empleó los diseños:

- **Descriptivo:** Porque en el estudio se describió e interpretó en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- **Experimental:** Porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que se pudieron modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.
- **Prospectivo:** Porque se desarrolló a través del tiempo.
- **Longitudinal:** Porque permitió realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población vegetal

La población vegetal en estudio estuvo constituida por la especie vegetal de *Chenopodium ambrosioides* (*Paico*). Se recolectó del Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional (IMET-Es Salud), ubicado en el Pasaje San Lorenzo 205 – Iquitos, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto-Perú

3.2.2. Muestra vegetal

Hojas de *Chenopodium ambrosioides*.

3.2.2.1. Criterios de inclusión de la muestra vegetal

- Las Hoja no presentaba parásitos, hongos u otros defectos.
- La especie vegetal fue identificada en el “Herbarium Amazonense”.

3.2.2.2. Criterios de exclusión de la muestra vegetal

- Las Hojas que presentaban parásitos, hongos u otros defectos.
- La especie vegetal fue identificada por un profesional botánico.

3.2.3. POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA

La población microbiológica lo constituyeron las bacterias.

3.2.4. MUESTRA MICROBIOLÓGICA

Las muestras microbiológicas estaban constituidas por las bacterias del género: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218.

3.2.4.1. Criterios de Inclusión

Solo fueron empleadas bacterias jóvenes.

3.2.4.2. Criterios de Exclusión

Cepas que presentaron contaminantes.

3.3. DEFINICIONES OPERACIONALES:

3.3.1. VARIABLES

3.3.1.1. Independiente: Extracto Acuoso y Etanólico de las Hojas de *Chenopodium ambrosioides*(Paico)

3.3.1.2. Dependiente: Actividad antibacteriana *in vitro*.

3.3.2. INDICADORES: (Ver anexo N° 23al 29)

3.3.2.1.INDICADORES PARA EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

3.3.2.1.1. Independiente: Concentración del extracto

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

3.3.2.1.2. Dependiente : Grado de sensibilidad

3.3.2.2. INDICADORES PARA EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

3.3.2.2.1. Independiente : Concentración del extracto

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

3.3.2.2.2. Dependientes : Grado de turbidez

3.3.3. DISTRIBUCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO.

3.3.3.1. Método de difusión en agar

- **Grupo experimental:** Discos impregnados de 12 mg y 6 mg del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de extracto *Chenopodium ambrosioides*(Paico).
- **Grupo control positivo:** Discos de Gentamicina.
- **Grupo control negativo:** Agua estéril, R.S. N°E-1190-6, Lote: 121001, FV: 10/17, Lab. Pharmagen.

3.3.3.2. Método de macrodilución

- **Grupo experimental:** Microtubos que contuvieron 32, 16, 8, 4,2, 1, 0.5 y 0.25mg/ml del extracto acuosos y etanólico de las hojas de extracto *Chenopodium ambrosioides*(Paico).
- **Grupo control positivo:** Gentamicina 160mg/2ml (Rigaminol), R.S. N°13583, Lote: 1090623, FV: Set/2017, Lab. Medifarma. A Concentración de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, µg/ ml
- **Grupo control negativo:** Microtubos que contengan solo medio de cultivo

3.4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. Recolección de la muestra vegetal

La muestra de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), fueron recolectados del Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional (IMET-Es Salud), ubicado en el Pasaje San Lorenzo 205 – Iquitos, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto. (Ver anexo N°2)

3.4.2. Identificación de la muestra vegetal

Parte de la muestra vegetal de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), se identificó Taxonómicamente en el *Herbarium Amazonense*-CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), por lo que nos otorgaron una Constancia de Acreditación (Ver ANEXO N°30). Luego la muestra vegetal fue depositada para su conservación en la Xiloteca de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias (FIIA)-UNAP, Ubicado en la Av. Freyre N° 610 – Iquitos.

3.4.3. Obtención de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico).

3.4.4. Obtención del extracto acuoso

Se Licuó 200 gr de las hojas frescas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) con 1000 ml de agua destilada, una vez licuado se pasterizó a 85°C por 5 minutos, posteriormente se filtró con algodón y con papel filtro, la muestra filtrada se pesó y se dejó secar en un ambiente entre 30 y 40 °C por un periodo de 7 días; para acelerar el secado y evitar el crecimiento de microorganismos, se adicionó 50 ml de Etanol de 96°. Una vez seco el Extracto Acuoso, se pesó y se embazó en un frasco de vidrio estéril para su posterior utilización en la determinación de la actividad antibacteriana. (Ver esquema N° 01) (Ver anexo N°03).

3.4.4.1. Obtención del extracto etanólico

Las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) se secó a temperatura ambiente; al aire libre, una vez seco fue molido lo suficientemente pequeña, envasado y conservado en un lugar seco y fresco. Posteriormente se pesó 100 gr de la muestra en polvo, y se maceró con 1000 ml de etanol al 96 °, durante 28 días. Pasado los 14 días se filtró (1er. Filtro) con algodón y papel filtro; la muestra vegetal sobrante se volvió a macerar con 1000 ml de etanol al 96°, por un periodo de 14 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, se eliminó el disolvente por presión reducida, con una temperatura de 65° C, a una presión de 690 mmHg, por espacio de 3 horas ⁽⁶⁹⁾.

Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente por 7 días, una vez seco el extracto etanólico se pesó y se embazó en un frasco de vidrio estéril para su posterior utilización en la determinación de la Actividad Antibacteriana. (Ver esquema N° 01) (Ver anexo N°04).

3.4.5. Rendimiento de los procesos de extracción de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico).

$$n = \frac{M_{EXT.}}{M_o} \times 100$$

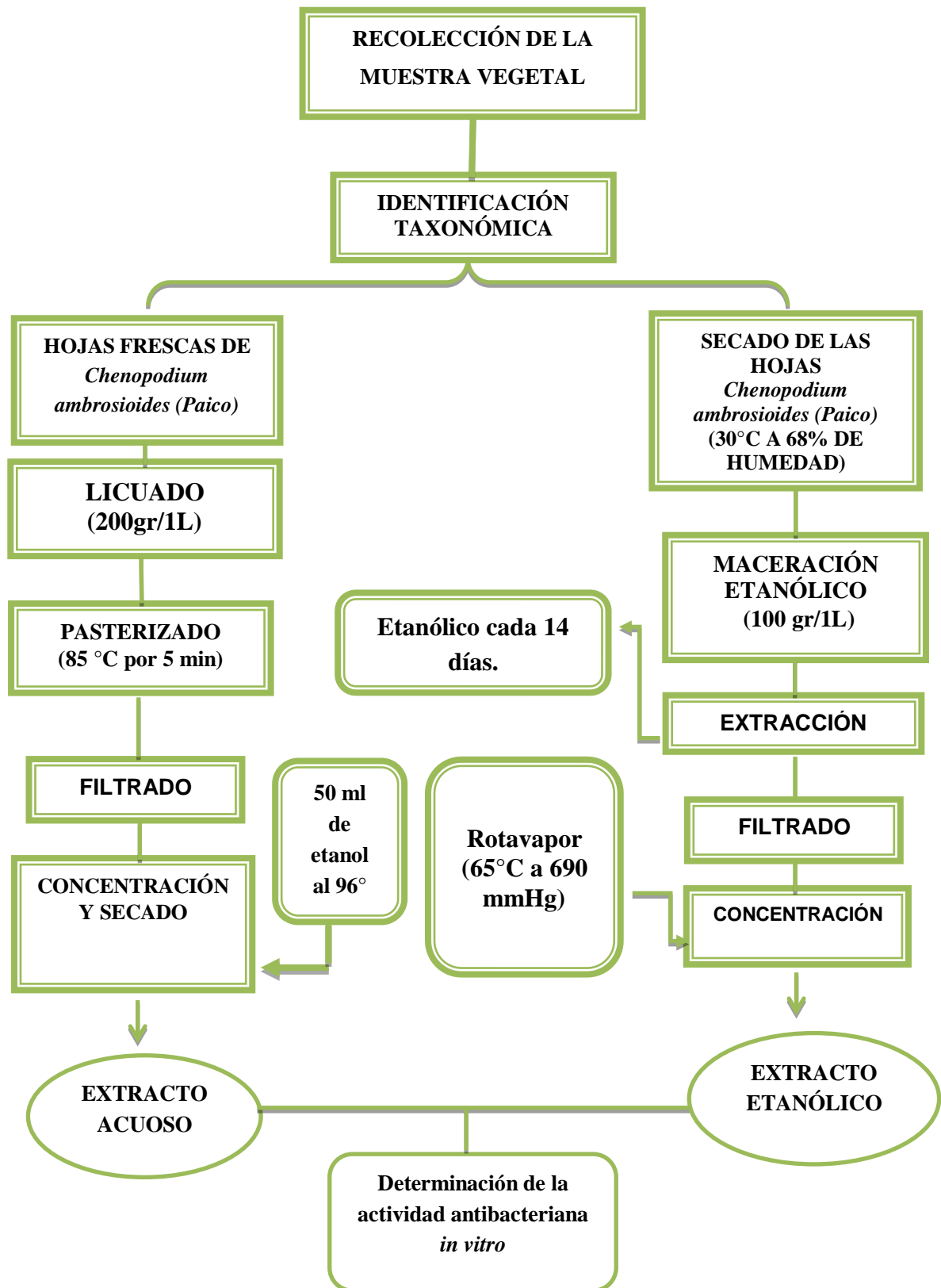
n : Rendimiento del extracto

$M_{EXT.}$: Peso del extracto seco

M_o : Peso inicial

100: Factor matemático para los cálculos

ESQUEMA N° 01: FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (Paico.)



3.4.6. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), por el método de difusión en agar y macrodilución *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

3.4.6.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR. (Ver anexo N°09)

3.4.6.1.1. Preparación del inóculo

- Se seleccionó tres a cuatro colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa con agar M-H.
- Se Tocó la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transfirió a un tubo que contiene de 3 ml de NaCl 0,9 %.
- Se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar.
- La suspensión preparada contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. ^(70,71,72)(Ver anexo N°10)

3.4.6.1.2. Dilución de extractos

- Se pesó 360 mg de cada extracto en microtubos estériles y diluyó con 0,6 ml de una mezcla Etanol/Agua estéril (3:3) para alcanzar una concentración de 600 mg/ml (Concentración A.) en la separación inicial.
- Los extractos diluidos se homogenizó en vórtex hasta la disolución completa.
- Para preparar la concentración B, se tomó 0,2 ml de la Concentración A y se disolvió en 0,2 ml de una mezcla Etanol/Agua estéril (1:1) para alcanzar una concentración de 300 mg/ml (Concentración B).
- Se procedió a impregnar cada disco con 20 μ L de cada concentración, obteniendo discos impregnados de 12 y 6 mg, finalmente se llevó a incubación por 15 minutos a 35°C ^(70,71)(Ver anexo N°10)

3.4.6.1.3. Inoculación de las placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se inoculó 100 µL del inóculo sobre la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, diseminando con la espátula de Drigalsky en todas las direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido. (Ver anexo N°11).

3.4.6.1.4. Aplicación de los discos

- Se colocó los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril, se presionó suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- Se colocó los discos uniformemente, de modo que estuvieron a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. ^(71,72) (Ver anexo N° 11).

3.4.6.1.5. Incubación

- Se incubó las placas en posición invertida a 35°C por 24 horas; dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- Después del tiempo recomendado de incubación, se examinó cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. ⁽⁷¹⁾ (Ver anexo N°11).

3.4.6.1.6. 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 Calibrador Vernier.

El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que se pudo detectar mediante observación visual, no incluyó velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que pudieron ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. (Ver anexo N°12 al 16).

3.4.6.1.7. 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 CIM 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.⁽⁷³⁾

3.4.6.1.8. Procedimiento de categorización

Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios (Ver Tabla N° 07): 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⁽⁷⁴⁾.

Tabla 6: Antibióticos y diámetros críticos para *Staphylococcus spp.*

TABLA N° 07 ANTIBIOTICOS Y DIAMETROS CRITICOS PARA <i>Staphylococcus spp.</i>				
ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilinas	10 unidades	≤ 28	-	≥ 29
Oxacilina (S. aureus)	1 ug	≤ 10	11 a 12	≥ 13
Oxacilina (Staphylococcus cuagulasa positivos)	1 ug	≤ 17	-	≥ 18
GLUCOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 ug	-	-	≥ 15
Teicoplanina	30 ug	≤ 10	11 a 13	≥ 14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 ug	≤ 12	13 a 14	≥ 15
VALORES TOMADOS DEL NCCLS 2010				

Tabla 7: CATEGOTIZACIÓN

Categorías	Concentración inhibitoria mínima (mg/L)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
S	$CIM \leq c$	$DHI \geq D$
R	$CIM > C$	$DHI < d$
I	$c < CIM \leq C$	$d \in DHI < D$

3.4.6.2. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.

Esta técnica fue utilizada para evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. El método ensayado se realizó según los procedimientos establecidos en el Protocolo del 2007 por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) por su sigla en inglés, anteriormente conocido como NCCLS).

A. Preparación del inóculo

- Se seleccionó tres a cuatro colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa con agar M-H.
- Se tocó la superficie de cada colonia en un asa de siembra estéril y se transfirió a cada uno estas bacterias a los tubos que contenía 3 ml de NaCl 0,9 %, posteriormente se ajustó el inóculo a través de la comparación visual con el estándar de turbidez al 0.5 de la escala de Mc. Farland ^(71, 72,75).
- Finalmente se realizó una dilución 1:100 de cada inóculo; disolviendo 0,1 ml del inóculo en 9,9 ml de Caldo M-H. ⁽⁷⁵⁾ (Ver tabla N°08) (Ver anexo N°17)

B. Preparación de diluciones

- Se pesó 320mg del extracto en un microtubo estéril y se diluyó en 0,5 ml con agua estéril, para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/ml (Solución madre o Stock).
- De la solución madre se tomó 0.1 ml y se añadió al microtubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.
- Del microtubo N° 01 se tomó 0.5 ml y se añadió al microtubo N° 02, que contenía 0.5 ml del caldo Mueller Hinton y así sucesivamente, hasta llegar al microtubo N°08, excepto con microtubo N° 09 que solo contenía 0.5 ml caldo Mueller Hinton.

- Del microtubo N° 08 se tomó 0.5 ml que fue desechado; este mismo procedimiento se realizó para el control negativo.
- Después de este proceso se añadió a todos los microtubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana a concentración de 5×10^6 UFC/ml (que se obtuvo al hacer dilución de 1:100 de inóculo 0.5 de Mac Farland), excepto a los microtubos del control negativo. El volumen final mínimo en cada tubo, fue de 1 ml.
- El mismo procedimiento se realizó para ambos extractos, con cada uno de los inóculos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218.
- Finalmente se llevó el kit de microtubos a incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 horas. Las concentraciones estaban comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml. (Ver tabla N°08), (Ver anexo N°18)

Tabla 8: Distribución de los grupos de trabajo por el método de macrodilución para el extracto acuoso y etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (Paico).

Distribución de los grupos de trabajo por el Método de Macrodilución									
Microtubos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Caldo M-H(ml)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Extracto 640 mg/ml (Solución madre)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Concentración inicial del extracto mg/ml	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0
Inóculo bacteriano (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Concentración final del extracto (mg/ml)	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0
VOLUMEN FINAL (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CONTROL NEGATIVO									
Microtubos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Caldo M-H(ml)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Extracto 640 mg/ml Solución madre	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
VOLUMEN FINAL (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Nota:

- Extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico)
- Inóculo bacteriano: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218. (No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo.)

Elaborado por: Melissa Rojas y Clara Del Castillo

Fuente: Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias (FIIA) – Área de Microbiología.

C. Preparación del control positivo:

- El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico Gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enrasó hasta 5ml con agua estéril, para obtener una solución madre o stock de 10240 µg/ml.
- De la solución madre se tomó 0.1 ml y se añadió al microtubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.
- Del microtubo N° 01 se tomó 0.5 ml y se añadió al microtubo N° 02, que contenía 0.5 ml del caldo Mueller Hinton y así sucesivamente, hasta llegar al microtubo N°09, excepto con microtubo N° 10 que solo contenía 0.5 ml caldo Mueller Hinton.
- Del microtubo N° 09 se tomó 0.5 ml que fue desechado; este mismo procedimiento se realizó para el control negativo.
- Después de este proceso se añadió a todos los microtubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana a concentración de 5×10^6 UFC/ml (que se obtuvo al hacer dilución de 1:100 de inóculo 0.5 de Mac Farland), excepto a los microtubos del control negativo. Finalmente se llevó el kit de microtubos a incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 horas. Las concentraciones estaban comprendidas entre los rangos de 512 µg/ml a 2 µg/ml. (Ver tabla N°09).

Tabla 9: Distribución de los grupos de trabajo por el método de macrodilución para el control positivo.

Distribución de los grupos de trabajo por el Método de Macrodilución										
Microtubos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Caldo M-H(ml)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antibiótico 10240 µg/ml (Solución madre)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Concentración inicial del Antibiótico µg/ml	10240	512	256	128	64	32	16	8	4	0
Inóculo bacteriano (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Concentración final del Antibiótico µg/ml	512	256	128	64	32	16	8	4	2	0
VOLUMEN FINAL (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CONTROL NEGATIVO										
Microtubos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Caldo M-H(ml)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antibiótico 10240 µg/ml (Solución madre)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
VOLUMEN FINAL (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Nota:

- Inóculo bacteriano: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218. (No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo.)
- Antibiótico Gentamicina 160 mg/2ml, como control positivo

Elaborado por: Melissa Rojas y Clara Del Castillo

Fuente: Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias (FIIA) – Área de Microbiología.

D. Lectura e interpretación de la CMI

La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CIM se expresa en µg/ml. ⁽⁷⁶⁾(Ver anexo N°19 al 22)

3.4.6.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Para determinar la CMB (Concentración Mínima Bactericida) se extrajo 100 µL de los microtubos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria (inhibición de crecimiento); esta suspensión fue inoculada en placas Petri que contenía agar MH, debidamente rotuladas con la concentración correspondiente. Se utilizó como control positivo agar MH con 100 µL de inóculo sin antimicrobiano, y como control negativo, agar MH sin inóculo y sin antimicrobiano. Las placas se dejaron incubar durante 24 horas a 35 °C. (Ver anexo N°22). La lectura de los resultados se realizó en aquellas placas donde el antibacteriana fue capaz de eliminar completamente el desarrollo bacteriano o que eliminó al 99,9% de bacterias, comparándolo con el control positivo. ^(76,77)

3.4.7. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS.

Los datos fueron procesados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con un nivel significativo de $P > 0.05$, que permitió establecer diferencias entre los tratamientos. Los datos obtenidos de los tratamientos de la especie bacteriana se procesó mediante el Software estadístico SPSS versión 21.0 para Windows, con los cuales nos permitió elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular los datos estadísticos necesarios para el estudio.

CAPITULO IV

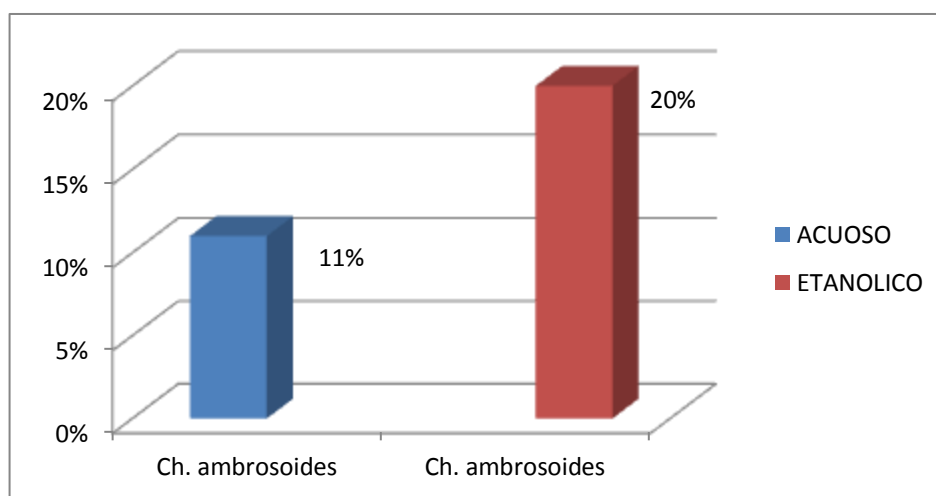
IV. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de los procesos de extracción del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico).

Tabla 10: Porcentaje de rendimiento obtenido del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico).

TIPO DE EXTRACTO	Cantidad de Muestra vegetal (g.)	Cantidad de Muestra para maceración (g.)	Cantidad de Extracto seco (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Acuoso	600	200	22.0	11.0 %
Etanólico	400	100	20.0	20.0%

Gráfico N°01: Porcentaje de rendimiento obtenido del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*(paico).



La Tabla N°10 y el gráfico N° 01 representan, el rendimiento en porcentaje obtenido de los procesos de extracción del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), donde nos proveyó un 11% para el extracto acuoso y 20% para el extracto etanólico.

4.2. Actividad antibacteriana de *Chenopodium ambrosioides* (paico)

4.2.1. Método de difusión en agar (Kirby - Bauer).

4.2.1.1. Actividad antibacteriana obtenida del extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, según diámetro de la zona de inhibición.

Tabla 11: Actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, según diámetro de la zona de inhibición

BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ACUOSO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	HOJAS	(mm)	RESULTADO	%	RESULTADO
	(mg)	X ± SD	(Kirby – Bauer)	INHIBICIÓN	
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA 10ug	20.0 ± 3.2	SENSIBLE		

* Esquema DZI frente a Control positivo
 Resistente: <12 mm
 Intermedio: 13 - 14 mm
 Sensible: > 15 mm
 Fuente: MPPSAMDD⁽⁶⁴⁾

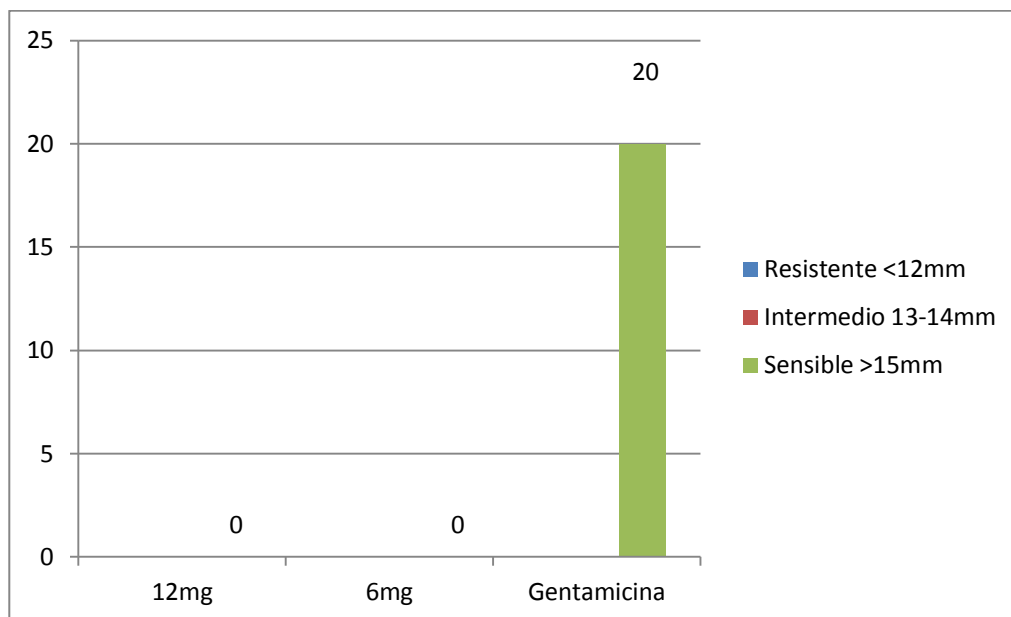
& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición
 Inactivo: < 40%
 Poco activo: 40 – 50%
 Moderadamente activo: 51 – 75%
 Buena actividad :> 76 %

La tabla N°11, 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 acuoso de hojas de *Chenopodium ambrosioides* "Paico" frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

El control Positivo (Gentamicina 10ug), obtuvo un promedio de 20.0 mm, en el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (Sensible = >15 ms.).

En el extracto acuoso de hojas *Chenopodium ambrosioides* "Paico", se evaluaron a concentraciones de 12 y 6 mg. encontrándose tanto para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, diámetros en la zona de inhibición de 0.0mm, 0.0mm y 0.0mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE, por no registrar inhibición del crecimiento bacteriano (Resistente = <12 mm).

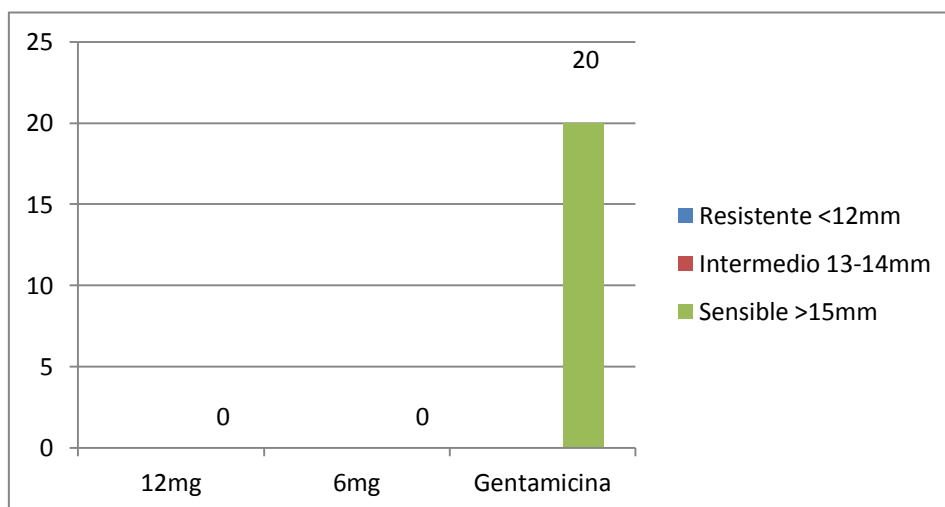
Gráfico N° 02: Categorización del extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Staphylococcus aureus*, según Diámetro de la zona de inhibición.



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

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20 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 acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

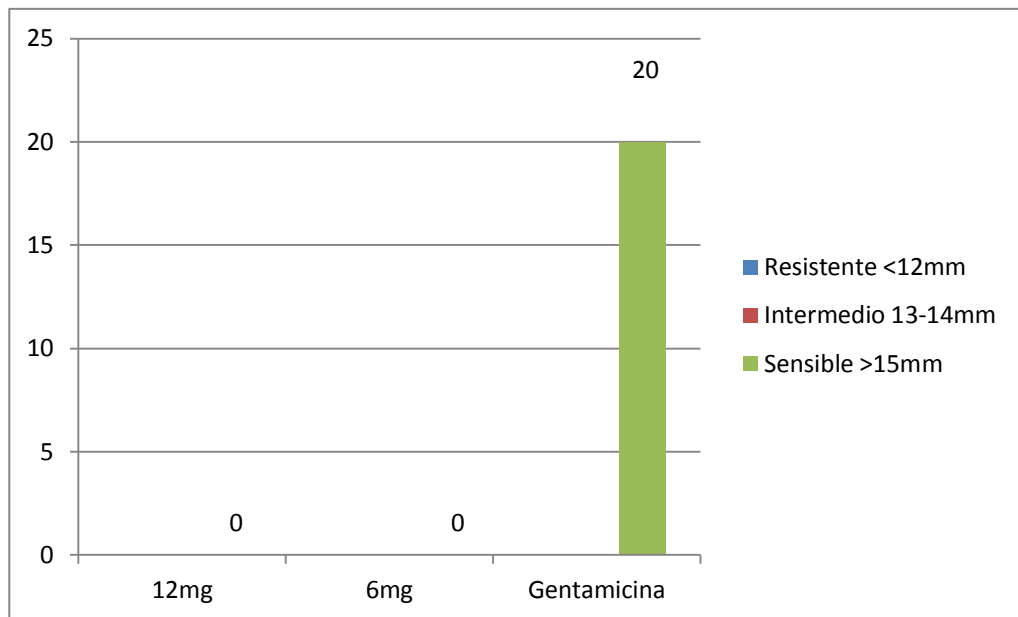
Gráfico N° 03: Categorización del extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 03, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* y del control positivo (Gentamicina 10 µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20 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 acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

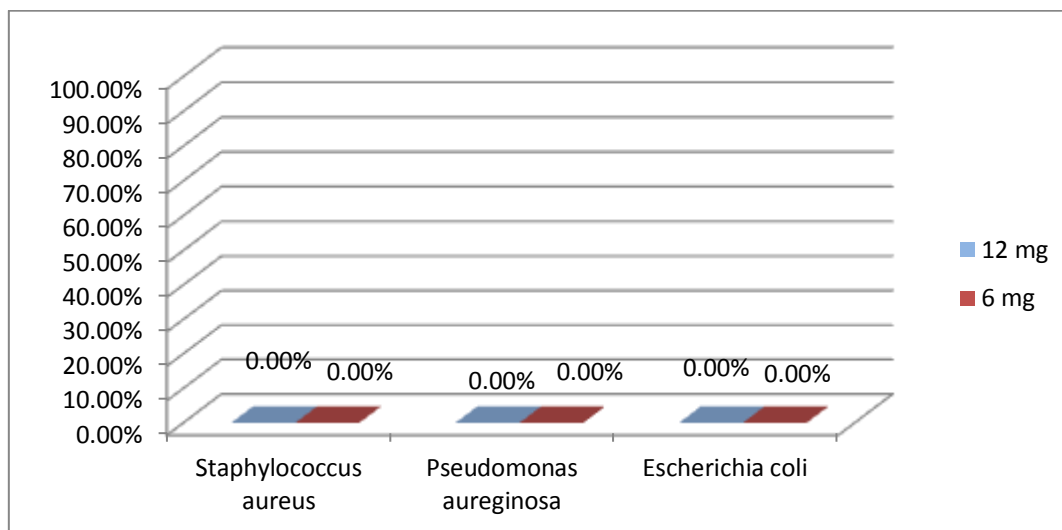
Gráfico N° 04: Categorización del extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Escherichia coli*, según Diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 04, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* y del control positivo (Gentamicina 10 µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20 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 acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

Gráfico N° 05: Actividad antibacteriana de Extracto acuoso de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) según Porcentaje de inhibición.



El gráfico N° 05, muestra los porcentajes de inhibición del extracto acuoso de hojas *Chenopodium ambrosioides* (Paico) en las diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos acuosos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose tanto para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* un porcentaje de inhibición de 0% en ambas concentraciones de 12mg y 6mg; lo cual se obtiene como resultado INACTIVO, por encontrarse por debajo de 40% (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75%, Buena actividad : > 76 %)

4.2.1.2. Actividad antibacteriana obtenida del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, según diámetro de la zona de inhibición.

Tabla 12: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, según diámetro de la zona de inhibición.

BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANOLICO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	HOJAS	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)	%	RESULTADO
	(mg)				
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA 10ug	19.3 ± 3.2	SENSIBLE		

* Esquema DZI frente a Control positivo

Resistente : <12 mm
Intermedio : 13 - 14 mm
Sensible : > 15 mm
Fuente: MPPSAMDD⁽⁶⁴⁾

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición

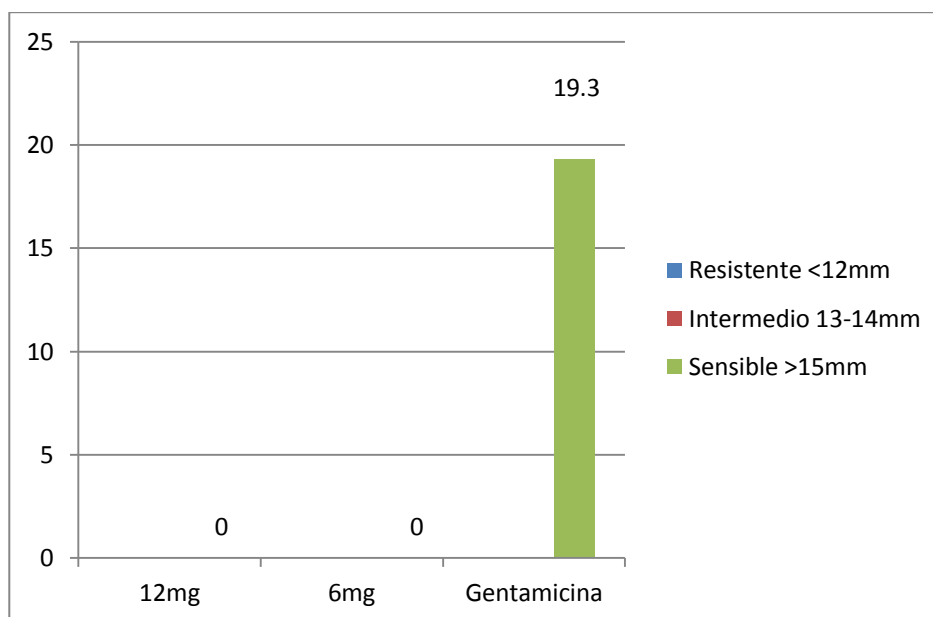
Inactivo : < 40%
Poco activo : 40 – 50%
Moderadamente activo: 51 – 75%
Buena actividad :> 76 %

La tabla N°12, 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 *Chenopodium ambrosioides* "Paico" frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

El control Positivo (Gentamicina 10ug), obtuvo un promedio de 19.3 mm. en el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (Sensible = >15 mm.).

En el extracto etanólico de hojas *Chenopodium ambrosioides* "Paico", se evaluaron a concentraciones de 12 y 6 mg. encontrándose tanto para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, diámetros en la zona de inhibición de 0.0mm, 0.0mm y 0.0mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE, por no registrar inhibición del crecimiento bacteriano (Resistente = <12 mm).

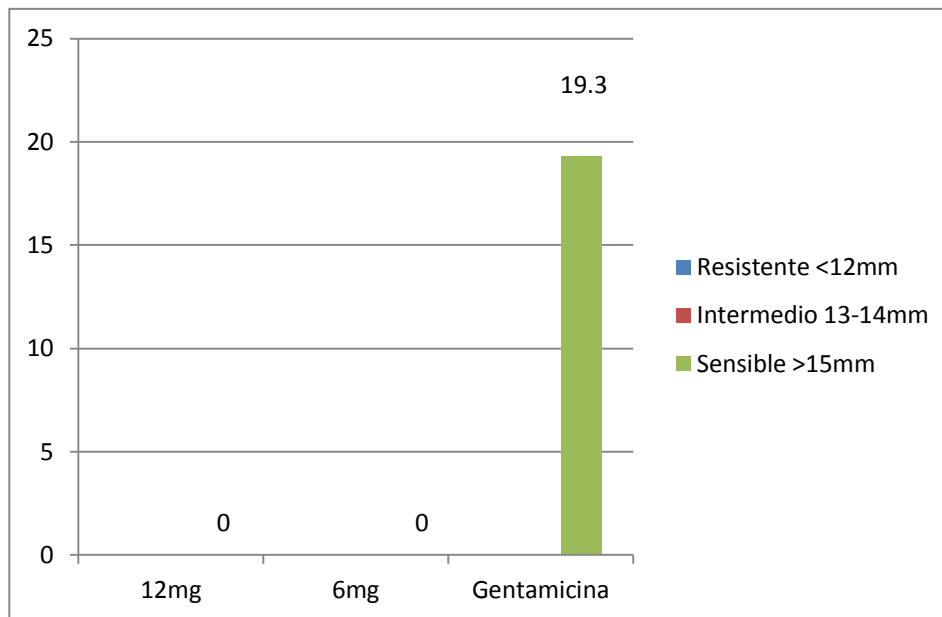
Gráfico N° 06: Categorización del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 06, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* y del control positivo (Gentamicina 10 µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 19.3 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 etanolico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

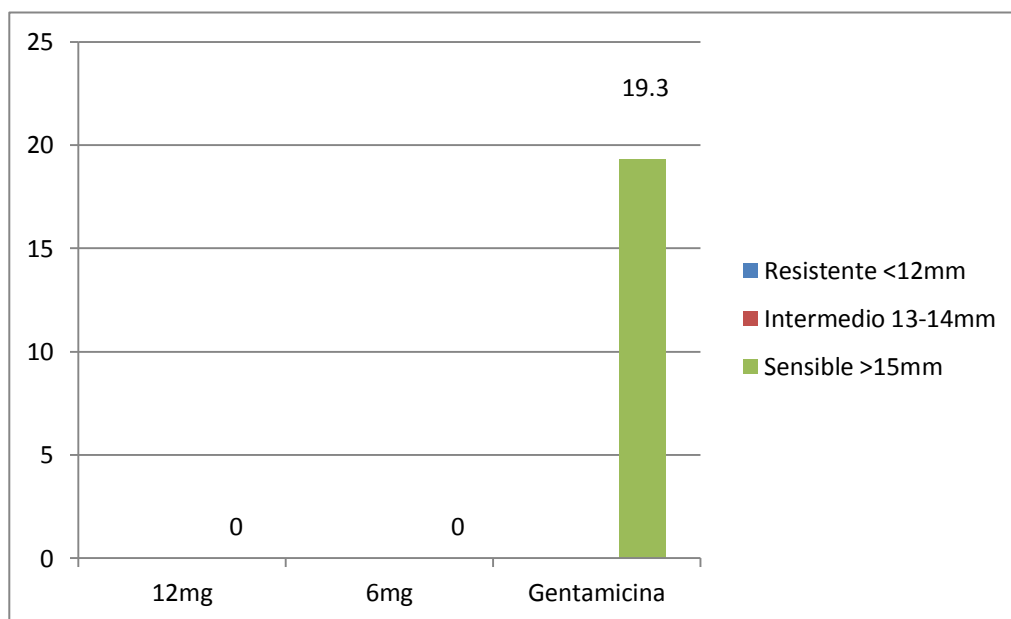
Gráfico N° 07: Categorización del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 07, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* y del control positivo (Gentamicina 10 µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 19.3 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 *Chenopodium ambrosioides*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

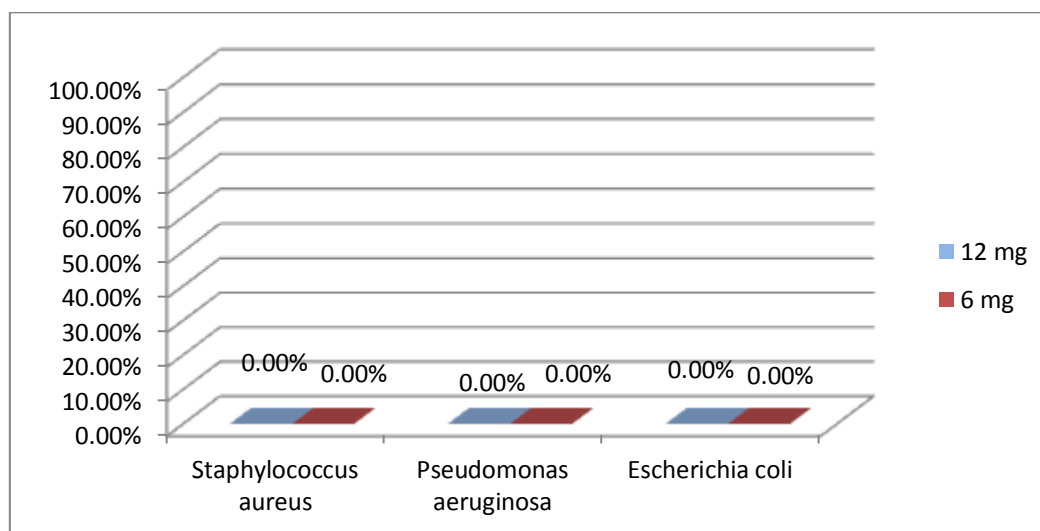
Gráfico N° 08: Categorización del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), frente a *Escherichia coli*, según Diámetro de la zona de inhibición.



El gráfico N° 08, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* y del control positivo (Gentamicina 10 µg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 19.3 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 *Chenopodium ambrosioides*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

Gráfico N° 09: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) según Porcentaje de inhibición.



El gráfico N° 09, muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanólico de hojas *Chenopodium ambrosioides* (Paico) en las diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

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*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, un porcentaje de inhibición de 0% en ambas concentraciones de 12mg y 6mg; lo cual se obtiene como resultado INACTIVO, por encontrarse por debajo de 40% (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75%, Buena actividad : > 76 %)

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

4.2.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM): Extracto acuoso de *Chenopodium ambrosioides*.

Tabla 13: Actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

BACTERIA EN ESTUDIO	Nº DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	INACTIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C1	32 mg/ml	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	C1	32 mg/ml	INACTIVO

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderado activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

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

En la Tabla N°13, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas *Chenopodium ambrosioides* (Paico) según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

En el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, no fue encontrada en el ensayo de macrodilución, por lo tanto, el efecto del extracto acuoso de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) demostró ser Inactivo frente a *Staphylococcus aureus*.

Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución, fue en la Concentración 32mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto acuoso de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) demostró ser Inactivo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

En el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 32mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto acuoso de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) demostró ser Inactivo frente a *Escherichia coli*.

4.2.2.2.Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM): Extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides*.

Tabla 14: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

BACTERIA EN ESTUDIO	N° DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C1	32 mg/ml	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	C1	32 mg/ml	INACTIVO

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderado activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

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

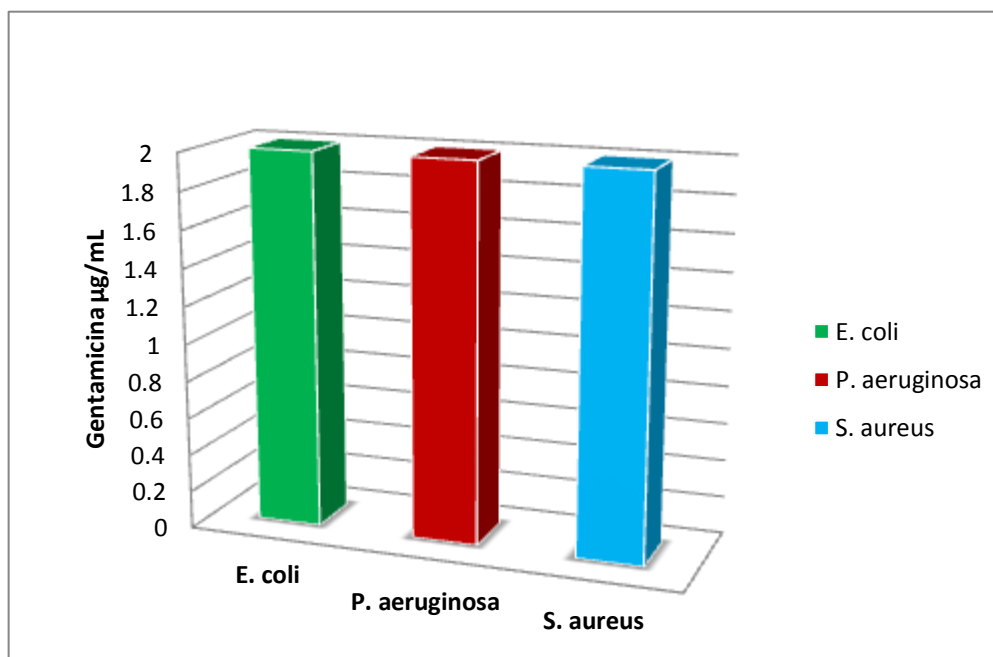
En la Tabla N° 14, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas *Chenopodium ambrosioides* (Paico) según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

En el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, fue encontrada en el ensayo de macrodilución, en la Concentración 8 mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) demostró ser Poco activo frente a *Staphylococcus aureus*.

Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución, fue en la Concentración 32mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) demostró ser Inactivo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

En el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) demostró ser Inactivo frente a *Escherichia coli*.

Gráfico N° 10: Resultados del Control Positivo (Gentamicina) frente a las Bacterias estudiadas, de la Concentración Inhibitoria Mínima del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), Mediante el Método de Macrodilución.



El gráfico N°10, se observa que las cepas utilizadas para el estudio fueron **Sensibles** al tratamiento con el control positivo “GENTAMICINA” (fármaco), mostrando una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 2 $\mu\text{g/ml}$ para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, tanto para el extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), según el rango de lectura para el grado de sensibilidad.

4.2.2.2.1. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Tabla 15: Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico).

Actividad antibacteriana obtenida del Extracto Acuoso de <i>Chenopodium ambrosioides</i>.			
Especies bacterianas	Clasificación	CMI	CMB
P. aeruginosa	Bacilos Gram-negativos	32 mg/ml	0.00mg/ml
E. coli	bacilo entérico Gram negativo	32mg/ml	0.00mg/ml
Actividad antibacteriana obtenida del Extracto Etanólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i>.			
Especies bacterianas	Clasificación	CMI	CMB
P. aeruginosa	Bacilos Gram-negativos	32 mg/ml	0.00mg/ml
E. coli	bacilo entérico Gram negativo	32mg/ml	0.00mg/ml
S. aureus	Bacilos Gram-positivo	8mg/ml	0.00mg/ml
		16mg/ml	0.00mg/ml
		32mg/ml	0.00mg/ml

En la tabla N°15, se muestra la concentración Bactericida mínima presentada por la acción del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Según rango de lectura, se considera que el Extracto acuoso y etanólico de *Chenopodium ambrosioides* no presenta efecto bactericida frente a dichas Cepas Bacterianas.

4.3.DISCUSIÓN.

En el presente trabajo de investigación fue diseñado para obtener información sobre la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico) frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mediante los métodos de difusión en agar y macrodilución. Las hojas de “paico” fueron recolectadas del Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) Es Salud, de la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto.

Para la preparación de los extractos vegetales, se utilizaron hojas en buen estado, los cuales fueron cortados, molidos y secados a temperatura ambiente; se utilizaron las hojas con superficie amplia y de color verde, en las cuales se concentra la mayor parte de los metabolitos secundarios solubles en alcohol (sustancias polares). Las hojas sanas y frescas fueron cortadas en trozos pequeños antes de iniciar el secado y la molienda.

Para la obtención del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico) se utilizó una metodología basado en la recopilación de los conocimientos tradicionales, mejorada en el laboratorio, por lo que se pesó 200gr de las hojas frescas *Chenopodium ambrosioides* (paico), se licuó con 1000ml de agua destilada, luego se pasterizó, filtró y se llevó a secar por un periodo de 7 días. Para el extracto etanólico se pesó 100gr de la muestra en polvo y se maceró con 1000ml de agua destilada, la concentración del extracto etanólico se realizó por eliminación de disolventes a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 65°C y a una presión de 690 mmHg por espacio de 3 horas aproximadamente, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 7 días. ⁽⁶⁹⁾

El procedimiento fue estandarizado mediante la evaluación de la Gentamicina frente a las bacterias utilizadas en el estudio de la actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico); determinando que la concentración mínima inhibitoria de la Gentamicina frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* fue de 2 µg/ml, en ambos extractos, respectivamente y los halos de inhibición mediante el método de difusión en agar con el extracto acuoso frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* fue 20mm respectivamente; mientras que con el extracto etanólico de 19.3mm, respectivamente, clasificando a las bacterias utilizadas como sensibles.

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran el extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico); a las diversas concentraciones evaluadas. No encontrándose actividad en ninguna de las concentraciones ensayadas; lo cual demuestran ser INACTIVOS (0.0% (conc. 12mg) y 0.0% (conc. 6mg), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Asi mismo con el método de macrodilución el extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*, presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 32mg/ml frente a *Pseudomas aeruginosa* y *Escherichia coli*, y una CMI de 8mg/ml para *Staphylococcus aureus* con el extracto etanólico; considerándose como inactivo y poco activo, respectivamente, para la concentración bactericida mínima (CMB) no se obtuvieron evidencia alguna.

Yáñez A., y Velasteguí S⁽¹⁶⁾(2014), confirmaron que el extracto Etanólico del paico, inhibió en un 100% el crecimiento de *Escherichia coli* a una concentración de 2500 mg/l, como también inhibió el crecimiento de *Candida albicans* a una concentración de 2500mg/l, y los estudios de Nascimento GGF., y colaboradores⁽²²⁾ (2000), sobre ensayos del extracto acuoso de las partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* (paico) han demostrado la actividad antiulcerosa en dosis de 25 y 100mg/kg administrado vía oral, los extractos totales de *Chenopodium ambrosioides*, demostraron actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, la administración intraperitoneal de 100 y 200mg/kg de extracto metanólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* ha logrado disminuir la temperatura rectal en ratas con hiperpirexia inducida por inyección subcutánea de una suspensión acuosa de levadura.

El % de Rendimiento obtenido de los procesos de extracción del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*(paico), fue un 11% para el extracto acuoso y 20% para el extracto etanólico; cantidad significativa que se utilizó para la ejecución de la actividad antibacteriana *in vitro*.

Otros autores, realizaron estudios con *Chenopodium ambrosioides*(paico), para determinar principalmente su actividad Antifúngica como Kumar R, Kumar A, Dubey N.K, Tripathi Y.B,⁽⁷⁸⁾ que evaluaron el aceite de *Ch. ambrosioides* como fuente de potencial Antifúngica, antioxidante y antiaflatoxigenico. Demostrando un inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium*

rolfsii, *Macrophomina phaseolina*, *cladosporioides* *Cladosporium*, *Helminthosporium oryzae* y *Pythium debaryanum*.

Marangon C, Newandram G, Moreira M.⁽⁷⁹⁾, realizaron un estudio donde se logró identificar los principales componentes α -Terpinene, p-cymene, p-cresol, α -Terpinol, Z-ascaridole, E-ascaridole piperitone, carvacrol; y concluyeron que los responsables de la actividad antimicótica son los Ascaridoles. Asimismo, *Paré P, Zajicek J, Ferracini V, Melo I.*⁽⁸⁰⁾ que estudió la actividad antimicótica de dos monoterpenos de *Chenopodium ambrosioides*, con buenos resultados.

Chenopodium ambrosioides (paico) contiene un compuesto principal que es el ascaridol responsable del aroma del paico, así como también de sus propiedades parasitarias y de sus efectos tóxicos. La variada presencia disacáridos (pectina), de glucósidos (saponinas, flavonoides), taninos, ácidos orgánicos, aceites esenciales, lípidos y vitaminas confieren a la planta total un carácter químico diferente al que tiene exclusivamente el ascaridol, considerado tóxico en dosis inadecuadas, aquí radica la diferencia entre el uso de la planta entera y de sus derivados específicos.⁽²⁵⁾

El etanol como disolvente tiene la propiedad de arrastrar gran cantidad de metabolitos como saponinas, taninos, flavonoides esteres y terpenos, estos metabolitos secundarios tienen la propiedad antibacteriana cuyo mecanismo es inhibir la síntesis o dañar la pared celular o inhibir la síntesis de ADN o ARN ya que la estructura que tienen éstos compuesto es similar a la de las bases púricas y pirimídicas y se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno, alterando así la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos. (Acción bactericida y acción bacteriostática).⁽⁸¹⁾

La poca presencia de metabolitos con actividad antibacteriana en los extractos acuoso y etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (paico), puede deberse a la diferencia de condiciones agroecológicas del cultivo, cambios morfológicos, histológicos, fisiológicos y a los distintos parámetros operativos del proceso de extracción tales como tiempo, temperatura de extracción y cantidad de agua empleado.⁽⁸²⁾

4.4. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), el % de rendimiento fue de 11% y 20% para el extracto acuoso y etanólico, respectivamente.
- Se determinó la actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) por el método de difusión en agar, no presentó actividad antibacteriana, los cuales demuestran ser Inactivos; 0.0% a concentración de 12mg y 6mg, respectivamente, frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.
- Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CMI) del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), mediante el método de macrodilución, se obtuvo una CMI de 32mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*; considerándose como inactivo, mientras que el resultado no resultó activo frente *Staphylococcus aureus*
- Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), mediante el método de macrodilución, se obtuvo una CMI de 32mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, y una CMI de 8mg/ml para *Staphylococcus aureus*, considerándose como inactivos y poco activo, respectivamente.
- Se evaluó y determinó la concentración bactericida mínima (CMB) del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), no se obtuvieron evidencia alguna frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.
- Se comparó la actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de la hoja de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a Gentamicina, respectivamente, obteniendo una CMI de 2 µg/ml; por lo que las cepas bacterianas que se utilizó en el estudio fueron Sensibles al tratamiento con el control positivo.

4.5.RECOMENDACIONES

- Es importante preservar el conocimiento tradicional que existe en nuestra selva Amazónica y hacer uso del mismo para desarrollar alternativas confiables y visibles para el tratamiento de diversas enfermedades.
- Es recomendable que se realicen otros trabajos sobre esta especie, aumentando las concentraciones utilizadas en la determinación de la CMI.
- Se recomienda emplear otras metodologías ya sea cualitativas y cuantitativas para la Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Antifúngica de *Chenopodium ambrosioides* (paico).
- Se recomienda realizar estudios analíticos para separar e identificar con mayor exactitud los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico).
- Se recomienda realizar estudios de comparación sobre la actividad antibacteriana de *Chenopodium ambrosioides* (paico), tomando muestras de diferentes lugares de zonas de cultivos.
- Que se realicen estudios pre-clínicos, clínicos y toxicológico de *Chenopodium ambrosioides* (paico), para su aplicación en preparados farmacéuticos contra bacterias patógenas.

4.6. BIBLIOGRAFIA

1. Werner, D., Thuman, C. y Maxwell, J. Donde no hay Doctor. 1ra. ed. Ecuador. Pax. 1996. Págs. 49, 58.
2. Kumar A. Medicinal Plants. Mittal Publications. 2010. India. Pp.: 1.
3. Mejía k, y Rengifo E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana, 1995., Agencia Española de Cooperación Internacional. 1ª ed.: 1995. 2ª ed. Corregida y aumentada: setiembre 2000. 286 p.; il.; 23 cm. Pg.: 8 – 9
4. Osuna Torres L, Tapia Pérez M., E y Aguilar Contreras A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, estudio etnobotánica, fitoquímico y farmacológico. Publicaciones y Ed. de la Universidad de Barcelona. España; 2005. Pg:25
5. Villegas L. La Investigación y el desarrollo integral de la biodiversidad en el Perú. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2005; Pg: 26.
6. Mori Del Aguila, T., D., Ruiz Sánchez, E., Bardales García, J., García Dávila, M., Tresierra Ayala, A., Arévalo Encinas, L., y otros. EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Myrciaria dubia* “CAMU CAMU” y *Cyperus luzulae* “PIRIPIRI” SOBRE MICROORGANISMOS PATOGENOS. UNAP - IQUITOS-PERU. 2010. Pg.: 4.
7. Villar L. Villavicencio O. Manual de Fitoterapia. Organización Panamericana de la Salud. Es Salud-Lima. 2001; Pg.:7 – 8.
8. Esnard S., Díaz O., Identificación y caracterización de bacilos Gram negativos no fermentadores aislados en el medio hospitalario. Rev. Cubana higiene epidemia. 1997, 35 (1). Pg.: 30 – 7.
9. Lemus R, Determinación de betalactamasas de espectro ampliado y de espectro extendido, en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas en pacientes del Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), por medio del Método de Difusión en Disco. USAC. 2004.

10. Jaime A. Bustos-Martínez, Aída Hamdan-Partida, Marcia Gutiérrez-Cárdenas. Staphylococcus aureus: la emergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed. 2006; 17. Pg.:287-305.
11. Brote de Síndrome Hemolítico Urémico por E. coli entero hemorrágico O104:H4 en Alemania 2011. Bol Epidemiol. (Lima). 2011; 20 (23): 461 - 462. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/bol>
12. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? Lancet. 2003; 362(9380):262.
13. Huicho L, Trelles M, Gonzales F. National and sub- national under-five mortality profiles in Peru: a basis for informed policy decisions. BMC Public Health. 2006; 6:173.
14. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1):142-201.
15. Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs), EsSalud -GCPS-OPIS, Lima (2012) Bol. EPI N °02 -2012, Pg: 1.
16. Yáñez A., y Velasteguí S., Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. 2014. Universidad Técnica de Ambato, Campus Huachi: Disponible: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/8462>
17. Moreno Mendoza M., Parada Palacios E., Mejía Valencia J., Espinoza Madrid P. Toxicología subcrónica de infusión de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) por administración oral en ratones NIH. Rev. Cubana Plant Med. Vol.18 N°1 ene.-mar. 2013. versión ISSN 1028-4796.
18. Jaramillo, B. Duarte, E y Delgado, W. (2012) recuperado 18 de febrero del 2012.
19. Monzote, L., Montalvo, A.M., Almanonni, A.S., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J. 2006. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*, 52(3):130-136.

20. Gómez C., José R., 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*), Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 7 (1), 3 – 9.
21. Pérez D. Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali., folia amazónica vol. 13 (1-2) – 2002.
22. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. Braz J Microbiology. 2000; 31:247-56.
23. Okuyama, E., Umeyama, K., Saito, Y., Yamazaki, M., Satake, M. 1993. Ascaridole as a pharmacologically active principle of "Paico", a medicinal Peruvian plant. Chem. Pharm. Bull., 41(7):1309-1311.
24. García., B. 1992. Flora medicinal de Colombia. Tercer Mundo Editores, Bogotá; 3 vols.
25. Pousset., J.L. 1989. Plantes Medicinales Africaines. Ed. Marketing, París, pg. 56-57.
26. Science, B, C. (2008) Recuperado el 28 de octubre del 2012, <http://www.bayercropscience.com.pe>
27. De La Torre, L., y Navarrete, H., (2008) Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Quito: Herbario Nacional QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE.
28. Gadano, A. G. (2006). Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Ethnopharmacol.*
29. Montes, M. W. (1985). Medicina tradicional chilena. *Chile: Ediciones Universidad de Concepción.*
30. Pardo, M., Blanco, E., & Morales, R. (2005). Plants known as té in Spain: An ethnopharmacobotanical review. *J Ethnopharmacol. Pg: 1-19.*
31. Urrutia, A. (2007). Perú ecológico. Recuperado el 15 de octubre de 2012, de http://www.peruecologico.com.pe/flo_paico_1.htm

32. Antunéz de Mayolo, S. (1981). La nutrición del antiguo Perú. Banco Central de Reserva del Perú Fondo Editorial, 103-106.
33. Mejía k. y Rengifo, E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana, 1995., Agencia Española de Cooperación Internacional. Primera edición: 1995. Segunda edición corregida y aumentada: setiembre 2000. 286 p.; il.; 23 cm. Pg: 143
34. De La Torre, L., y Navarrete, H., (2008) Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Quito: Herbario Nacional QCA, de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE.
35. Vega, M., (2001) Recuperado el 31 de diciembre de 2012, Disponible: <http://books.google.com.ec>
36. Al- Yahya, M.A. 1986. Phytochemical studies of the plants used in tradicional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia* **62**, 179 – 182.
37. Barba, C.J.M. 1997. Introducción al laboratorio de Fotoquímica. *Universidad Autónoma Metropolitana*. México. Pp. 14 – 16.
38. Tyler, E., Brady, R., & Robbers, E. (1979). Farmacognosia. Buenos Aires: El Ateneo.
39. Chiriboga, X. B. (1995). Actividad antibacteriana y antimicótica de las plantas medicinales del Ecuador. *Quito: Corporación Editorial nacional*.
40. Mejía k. y Rengifo, E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana, 1995., Agencia Española de Cooperación Internacional. 1ra. Ed.: 1995. 2da. Ed. corregida y aumentada: setiembre2000. 286 p.; il.; 23 cm. Pg.: 143
41. Vega, M., (2001) Recuperado el 31 de diciembre de 2012, de <http://books.google.com.ec>
42. Leon, C., (2009) Recuperado el 9 de marzo del 2013, de <http://www.unac.edu.pe>.
43. Boderó, M., (2010) Recuperado el 6 de septiembre del 2012, de <http://dspace.spoeh.edu.ec>
44. Doctors, F., (2008) Recuperado el 10 de junio de 2013, de <http://Food doctor>
45. Carlone, N., y Pompei R., (2013) Microbiología Farmacéutica. Napoli: EdiSES.

46. Brea, K., Alcantara, F., Acosta, S., y Padron, Y. (2012) Recuperado el 7 de septiembre de 2012 de [http:// www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)
47. Madigan M., Martinko, J., y Parker, J., (1999) Brock Biología de los Microorganismos Madrid: Prentice Hall Iberia
48. Manimome, S. (2004), Recuperado el 27 junio del 2012, de <http://ww.codeinep.org>
49. Madigan M., Martinko, J., y Parker, J., (1999) Block biología de los Microorganismos Madrid: Prentice Hall Iberia
50. Custodio, J., (2009) Recuperado el 30 de diciembre de 2011, de <http://slideshare.net>
51. Souza V, Castillo A, Rocha M. Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. Rev. INCI 2001; 26(10): 513-17.
52. Viñas M, Sanz M, Padola N, Etcheverría A, Parma A. *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): su transmisión por alimentos. Rev. Ciencia Hoy en línea 2000; 10(55): 47-52.
53. Larcón B y Li J. Serotipificación de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en cuadros diarreicos agudos de niños menores de cinco años: Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, noviembre 2000-marzo 2001. Tesis de Licenciado en Tecnología Médica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2007.
54. Villacís M, Costa A. Determinación de la cinética de inactivación de la *Escherichia coli* con ozono. Dspace Repositorio de la Escuela Superior Politécnica del Litoral. 2009. Ecuador. Disponible en:
<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1578/1/3082.pdf>.
55. Giglio C, Toro C. Sensibilidad a antimicrobianos comunes de bacterias obtenidas en uro cultivos positivos de niños. Rev. Chil. Pediatr. 1992; 63(5); 264-270.
56. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2002). Document M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Second Edition. Document M31-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 80 pp.
57. R. Taroco, V. Seija, R. Vignol. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA. CAP. 32. Pg: 665.

58. Burlingame E, Reddish G. Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *J Lab Clin Med.* 1973.14:649-665.
59. Pfaller M, *et al.* Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. NCCLS 2002. M38-A; 22: 16. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9):3359–3361.
60. Gaitán I, *et al.* Micosis subcutáneas: esporotricosis, eunicetomas y cromoblatomicosis en Zacchino S, Gupta, M. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. 1ed., Rosario: Corpus Editorial y Distribuidora, 2007, 169 p. (p. 27-30).
61. R. Taroco, V. Seija, R. Vignol. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA. CAP. 32. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Pg: 667.
62. Ferraro, M.J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition. Vol 20, N° 2, M7-A5 NCCLS.
63. Taroco, V. Seija, R. Vignol. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA. CAP. 32. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Pg:668-669
64. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2002). Ministerio de Salud del Perú. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de normas técnicas n° 30, pp 1:67. Lima – Perú.
65. Sacsquispe, R., Velasquez J.: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión. Ministerio de salud, instituto nacional de salud.2000.
66. Granados R., y Villaverde M. (2002) Microbiología 2. Magallanes: Paraningo.
67. López G y Díaz, R. (2005) Manual práctico de Microbiología. Barcelona: Editorial MASSON S.A.
68. Malbran C. (2001) Recuperado el 27 de junio de 2012 de [http:// www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
69. BRUNETON, J (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2a. Ed. Zaragoza: Acribia S.A. 1100. Pg: ISBN 84-200-0956-3

- 70.** Brea K, Alcantara F, Acosta S, Padron Y.2009. Recuperado el 7 de septiembre de 2012 de [http:// www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)
- 71.** Sheagren J, Schaberg D.1998. “Staphylococci, en infectious diseases. Gorbach, barlett and blacklow”. Pag.1697-1703. edwbsaunders.
- 72.** Waldvogel F.2000. “Staphylococcus aureus. Mandel, douglas, bennet principles and practice of infectious diseases”. Edwbsaunders.
- 73.** Maradan C., Moreira B., Boyle-vavra S. et al.: Antimicrobial resistance in staphylococci. Infectious diseases of North America. 1997. Vol.11. (4). Pg.: 813-841.
- 74.** Hardalo C. y Edberg S: Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk from Drinking water. Critical reviews in microbiology, 23:47–75.1997.
- 75.** Waldvogel F.: Staphylococcus aureus. Mandel, Douglas, bennet principles and practice of infectious diseases... 2000. Edwbsaunders
- 76.** Taroco R., Seija V., Vignoli R.: Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica; pag.669-670.
- 77.** HORNA QUINTANA Gertrudis, SILVA DIAZ María, VICENTE TABOADA William, TAMARIZ ORTIZ Jesús. Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration of ciprofloxacin in uropathogens isolated at Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Rev. Med. Hered. 16 (1), 2005. Pg: 39-45.
- 78.** Kumar R, Kumar A, Dubey N.K, Tripathi Y.B. Evaluation of Chenopodium ambrosioides oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology. 2007; 115(2):159-164.).
- 79.** Marangon C, Newandram G, Moreira M. Compositium and Antifungal Activity of the Essential oil of the Brazilian Chenopodium ambrosioides L. J Chem Ecol 2008; 34: 1213 – 1218.)
- 80.** Paré P, Zajicek J, Ferracini V, Melo I. Antifungal terpenoids from Chenopodium ambrosioides. Biochemical Systematics and Ecology 1993; 21: 649-653.

81. Espinoza, I. 2003. Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana de *Tillandsia revurvata*. Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp.: 2-30.)

82. Acosta de la Luz Lérica. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2003 Abr [citado 2016 Mayo 24] 8; (1) disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962003000100008&lng=es.)

4.7. ANEXOS

ANEXO N° 01

DATOS DE PASAPORTE DE COLECCIÓN DE ESPECIES DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN ESTUDIO

N° de Ficha:

FICHA DE CAMPO

DATOS GENERALES:

Lugar de colección:.....Distrito:.....Provincia:.....
Fecha:.....Tipo de Bosque:.....
Coordenadas UTM: (X).....(Y).....
Tipo de Suelo:.....Otras características:.....
Nombre del Colector:.....N° Colección:.....

TAXONOMÍA:

Familia Vegetal:.....Nombre Científico:.....
Nombre Vulgar:.....

CARACTERÍSTICAS VEGETALES:

Habitat:.....Estadio Productivo.....
Posición de Hojas:.....Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:.....
Forma del Tallo:.....Órganos Accesorios en Tallo:.....
Características de la Corteza:.....Látex:.....Color de Látex:.....
Tipo de Inflorescencia:.....Posición de Inflorescencia:.....
Tipo de Flor por Sexo:.....N° de Pétalos:.....Unión de Sépalos:.....
N de Estambres:.....Posición de Estambres:.....
Posición de Ovarios:.....N° de Carpelos:.....
Tipo de Fruto:.....Consistencia:.....Dehiscencia:.....

DATOS ETNOFARMACOLÓGICOS:

Uso Medicinal 1:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 2:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 3:.....Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....Forma de Preparación:.....

COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

Peso:.....
Parte Colectada:.....

Observaciones:.....
.....
.....

ANEXO N° 02

MUESTRA BOTÁNICA



FOTO N° 1: Hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), recolectada del Instituto de Medicina Tradicional (IMET)-Es Salud- IQUITOS.

ANEXO N° 03

Procedimiento para obtención del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico)



Foto N°2 Obtención del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico), realizado en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos ubicado en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP)

ANEXO N° 04

Procedimiento para obtención del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico).



Fotos N° 03 Obtención del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (paico), realizado en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos ubicado en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP)

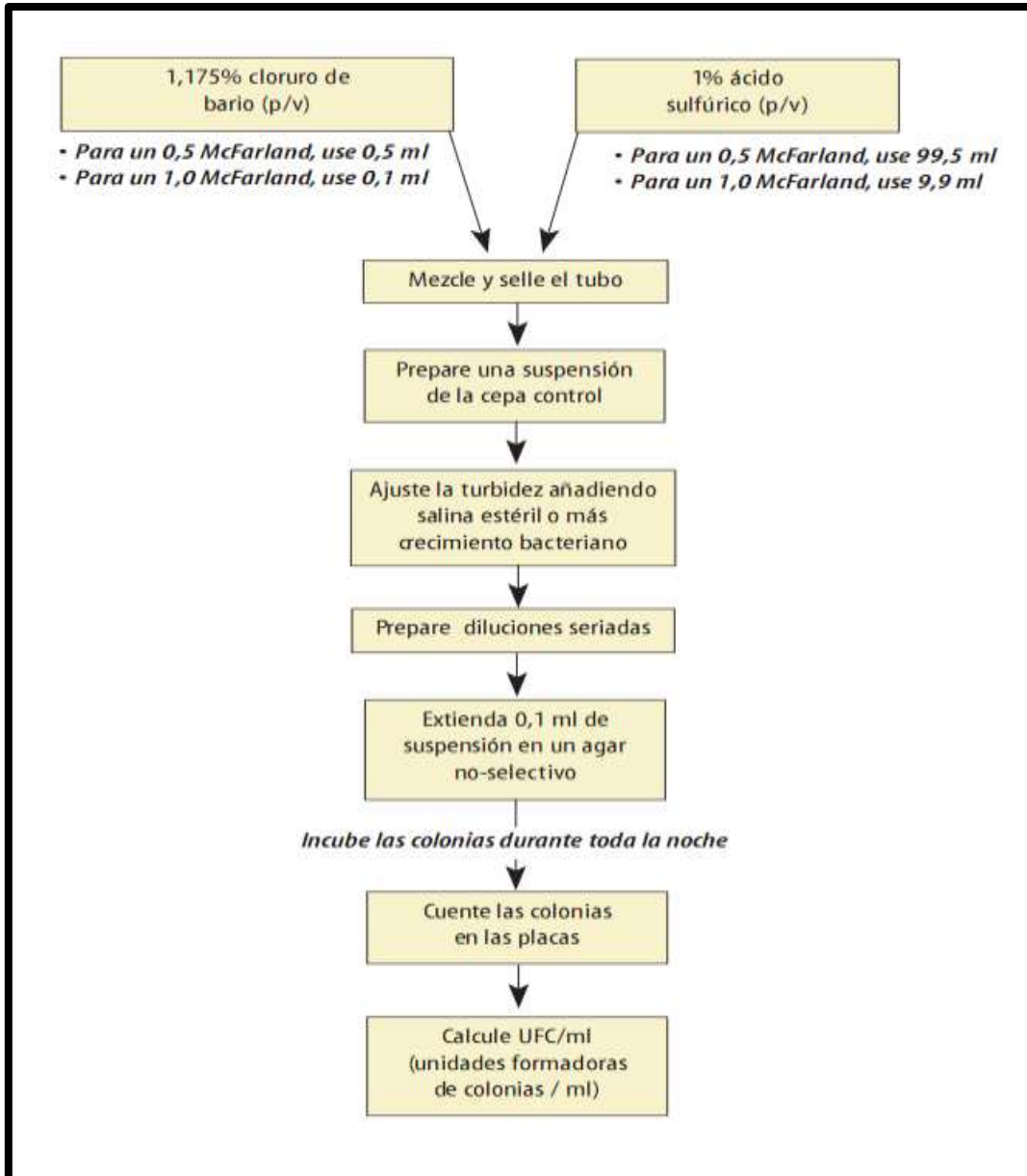
ANEXO N° 05

PREPARACIÓN DEL AGAR MUELLER HINTON

1. Se preparó el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
2. Se autoclavó a una temperatura de 121°C por 15 minutos para esterilizar el medio, finalizado el autoclavado se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C - 50°C.
3. Se midió el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse:
 - a. Utilizando un electrodo de superficie
 - b. Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión
 - c. Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro.
4. Se repartió el medio en placas Petri (60 ml – 70 ml o 25 ml – 30 ml, para placas de 150 mm o 100 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm..
5. Se realizó las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30°C – 35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser, luego, descartadas.⁽⁶⁴⁾

ANEXO N° 06

Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de McFarland.



ANEXO N° 07

RECUPERACIÓN DE CULTIVOS CONSERVADOS

1. Congelados:

Se descongeló a temperatura ambiente o en baño de agua a 36°C – 37°C. Se transfirió a una alícuota del criotubo a un medio apropiado como Caldo Nutritivo, incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

2. Cultivos en agar:

Con asa de siembra estéril, del caldo se tomó una asada para sembrar en medio sólido (Agar Müller Hinton)

3. Se incubó a 35 – 37°C durante 18 – 24 horas, y antes de utilizarlos se realizó previamente otro subcultivo obteniendo colonias aisladas. ⁽⁶⁹⁾

ANEXO N° 08

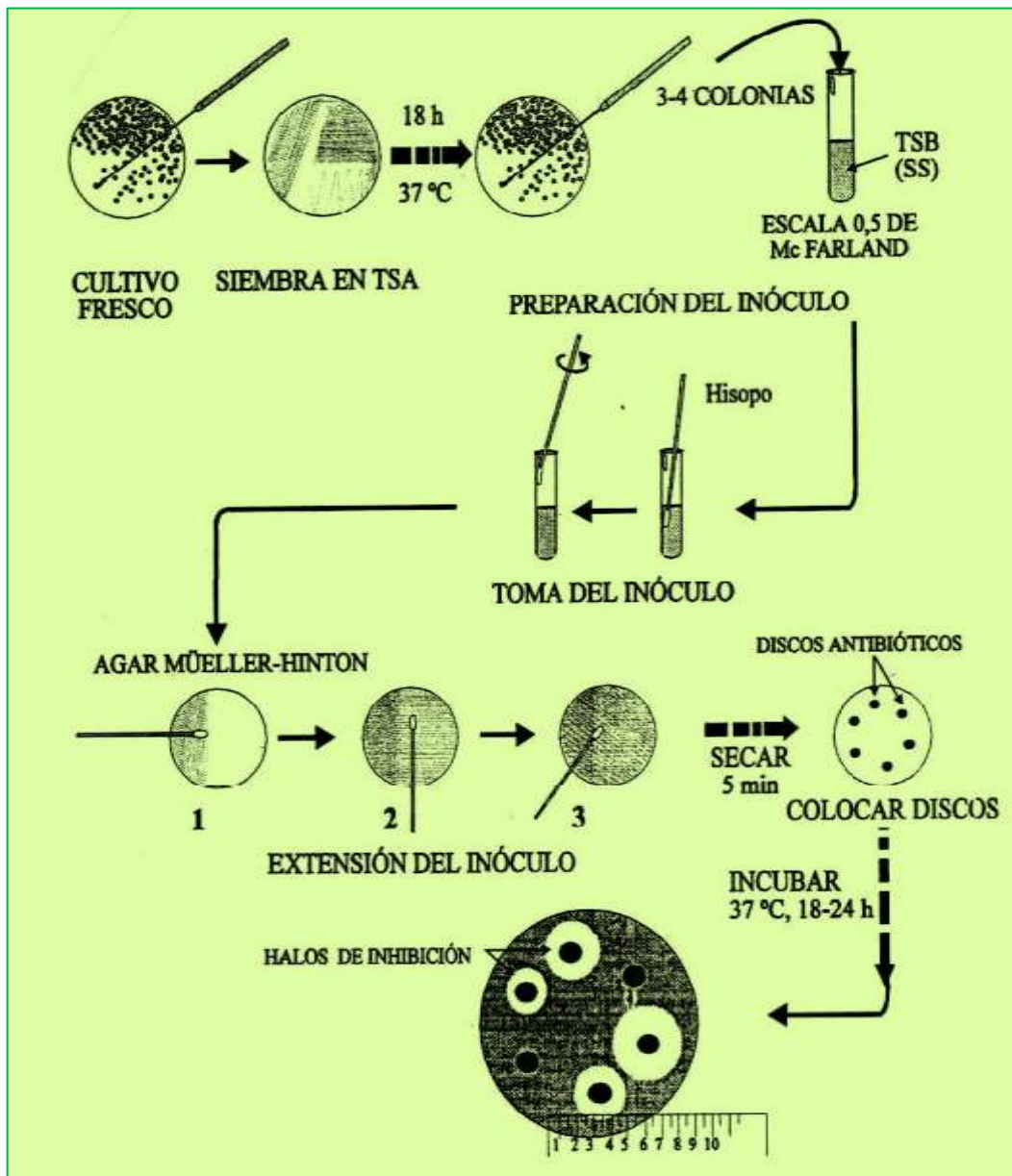
Muestras Bacteriológicas del Estudio



Imagen (A) *Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. *Escherichia coli* (Imagen (c)) es quizás el microorganismo procariota más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, por ende en las aguas negras. *Staphylococcus aureus*, (Imagen (B)) conocido comúnmente como estafilococo áureo o dorado, es una bacteria anaerobia gram positiva productora de coagulasa y catalasa.

ANEXO N° 09

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR



ANEXO N° 10

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Preparación del inoculo



Foto N°04: Crecimiento de colonias bacterianas en agar M-H (A), Selección y siembra de colonias bacterianas en 3ml de Cl Na 0.9 % (B), comparación visual con el estándar Mc. Farland.

Dilución de extractos

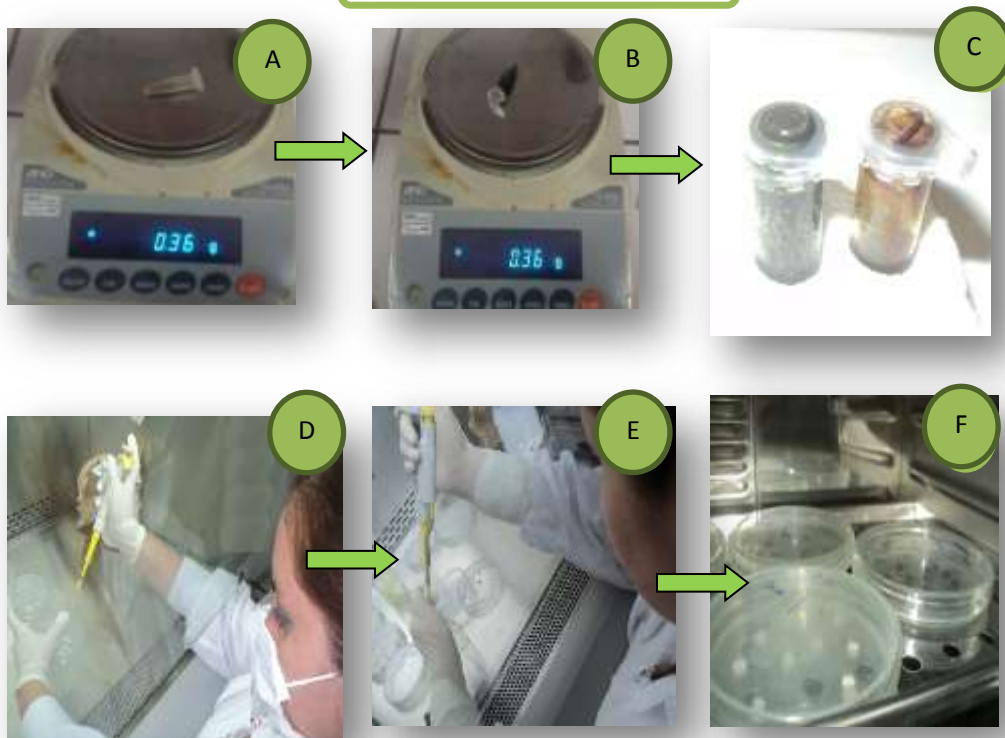


Foto N°05: Peso del Extracto acuoso 0.36g (A), Peso del extracto etanólico 0.36g (B), muestras diluidas con etanol/agua (1:1) (C), impregnación en los disco con 20 µL de la concentración de cada extracto (D) y (E), incubación de discos impregnados con cada extracto, teniendo así discos impregnados de 12mg, 6 mg y control negativo (F).

ANEXO N° 11

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Inoculación de las placas

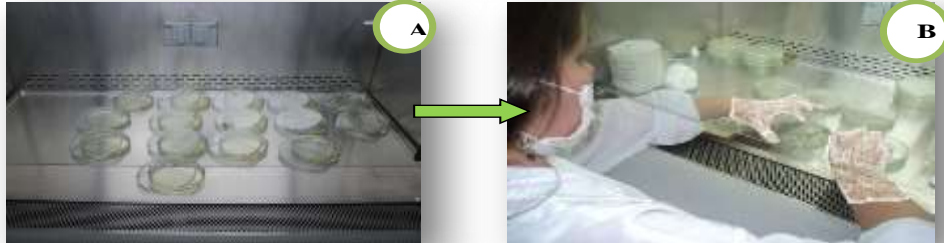


Foto N°06: Placas con Mueller Hinton (A), diseminación con la espátula de Drigalsky, 100 μ L del inóculo en todas las direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (B)

Aplicación de discos

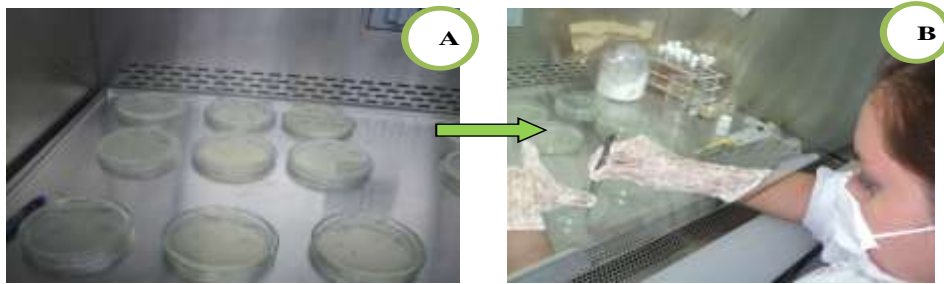


Foto N°07: Antes de colocar los discos se dejó secar las placas a temperatura ambiente durante 5 min (A), colocación de los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril, cada placa contiene discos de 12mg, 6mg, control positivo (Gentamicina) y control negativo (agua estéril) (B).

Incubación



Foto N°08: Incubación de las placas en posición invertida a 35°C por 24 horas, después de 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.

ANEXO N° 12

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Lectura e interpretación de resultados










Halos obtenidos del Extracto Acuoso de *Chenopodium ambrosioides*(paico).



Resultado de la lectura de placas de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso *Chenopodium ambrosioides*(paico), donde nos proveyó Crecimiento Bacteriano solo en el Control Positivo (*).

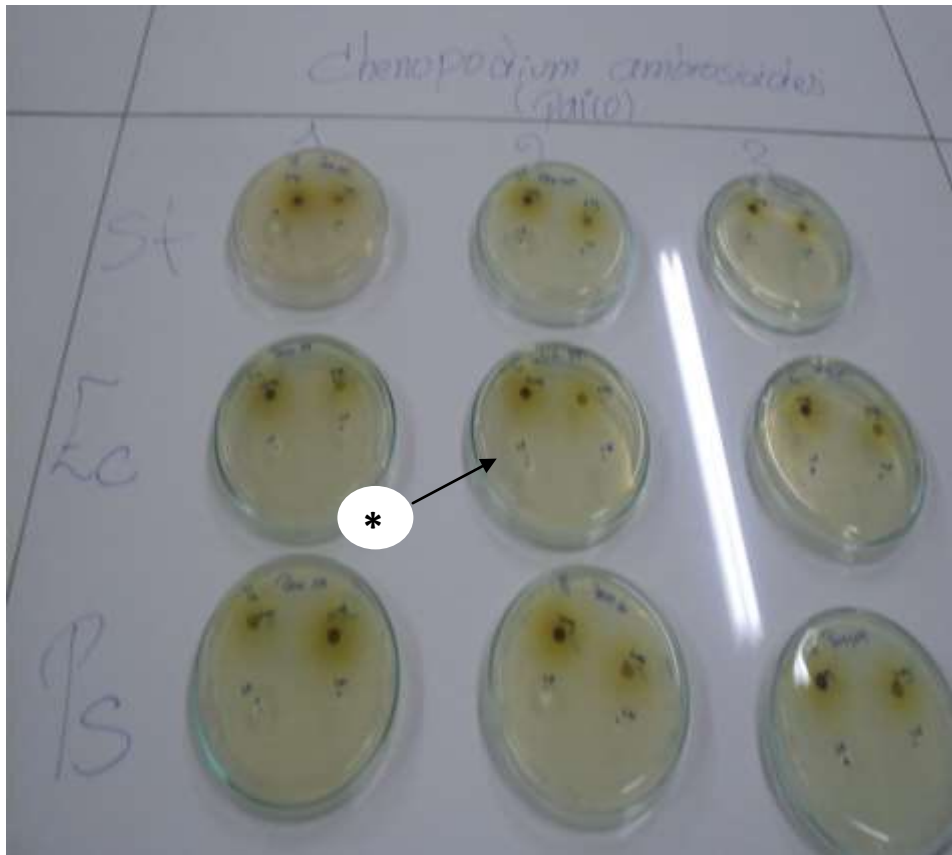
Anexo N° 13

Diámetro de halos en mm, obtenidos de la Actividad Antibacteriana *In vitro* del Extracto Acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*(paico), mediante el Método de Difusión en Agar.

Resultados de Actividad Antibacteriana del Extracto Acuoso de las hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico), por el Método de Difusión.			
BACTERIAS	Placa N°01	Placa N°02	Placa N°03
<i>E. coli</i>			
<i>P. Aeruginosa</i>			
<i>S. Aureus</i>			
<p>Leyenda: <i>S. aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923), <i>P. aeruginosa</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853) y <i>E. coli</i> (<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218).</p>			

Anexo N°14










Halos obtenidos del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (paico)



La Figura muestra, el resultado de la lectura de placas de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (paico), donde nos proveyó Crecimiento Bacteriano solo en el control positivo (*).

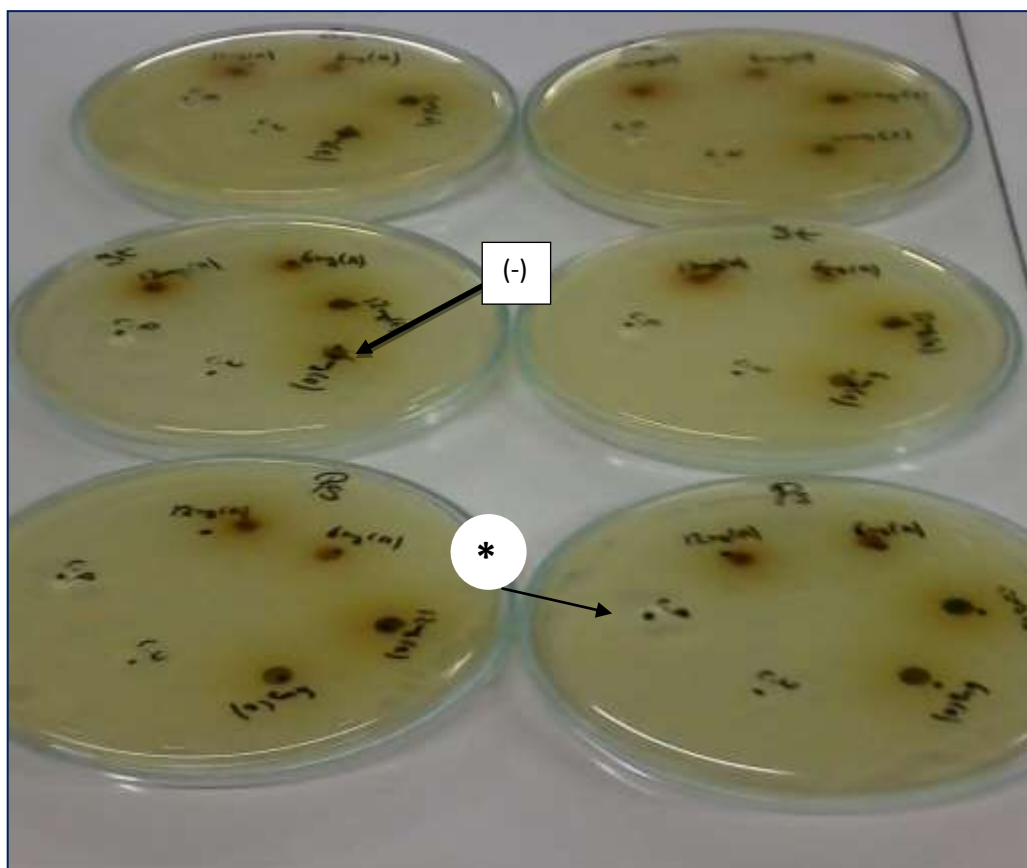
Anexo N° 15

Diámetro de halos en mm, obtenidos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*(paico), mediante el Método de Difusión en agar.

Resultados de actividad antibacteriana del Extracto Etanólico de las hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico), por el método de difusión en Agar			
BACTERIAS	Placa N°01	Placa N°02	Placa N°03
<i>S. Aureus</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>P. aeruginosa</i>			 19 mm*
Leyenda: <i>S. aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923), <i>P. aeruginosa</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853) y <i>E. coli</i> (<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218).			

Anexo N° 16

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSOS Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides*(paico), MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR: SEGUNDA REPETICIÓN.



La Figura muestra, los Resultados de la lectura de placas de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paico); para mayor confiabilidad en la Ejecución de la Actividad antibacteriana *in vitro* mediante el Método de Difusión en agar, se realizó una segunda prueba para corroborar los resultados obtenidos en la primera prueba, donde obtuvimos Crecimiento bacteriano solo en el control positivo(*), (-) no presentó crecimiento bacteriano.

ANEXO N° 17

Procedimiento del método de Macrodilución

PREPARACIÓN DEL INÓCULO



- A. Activación y Crecimiento de colonias bacterianas en agar M-H
- B. Preparación del inóculo en tubos de ClNa 0.9 % siguiendo el estándar de Mac Farland.
- C. Comparación visual con el estándar Mc. Farland.

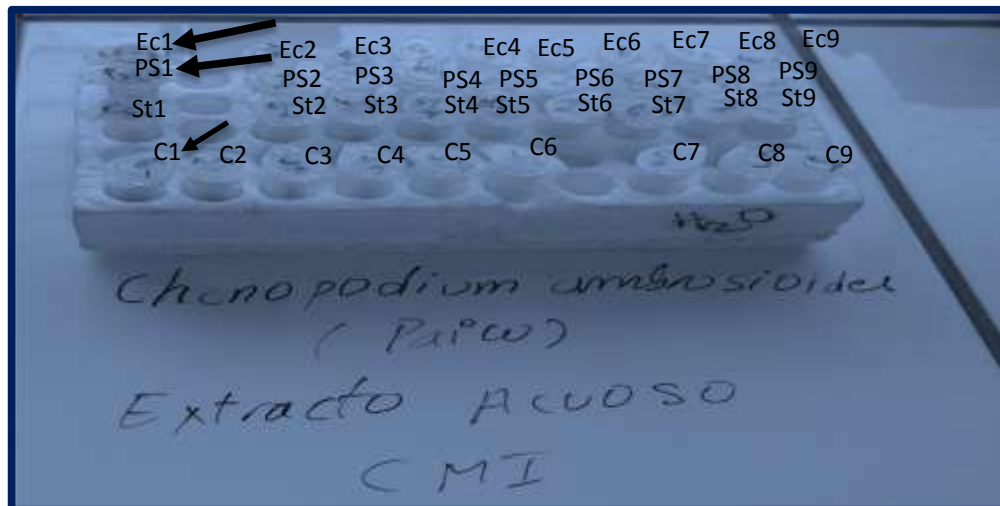
INCUBACIÓN DE LOS MICROTUBOS



Incubación de los microtubos con las diluciones de los extractos, el inóculo bacteriano, control positivo y control negativo a 35°C por 24 horas.

Anexo N°18

Kit de microtubos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (paico).



La figura, muestra el kit de microtubos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del Extracto Acuoso de *Chenopodium ambrosioides* (paico) frente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mediante el método de Macrodilución.

Elaborado por: Melissa Rojas y Clara Del Castillo
Fuente: Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias
(FIIA) – Área de Microbiología

Anexo N° 19

Resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) del Extracto Acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* por el método de Macrodilución Frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

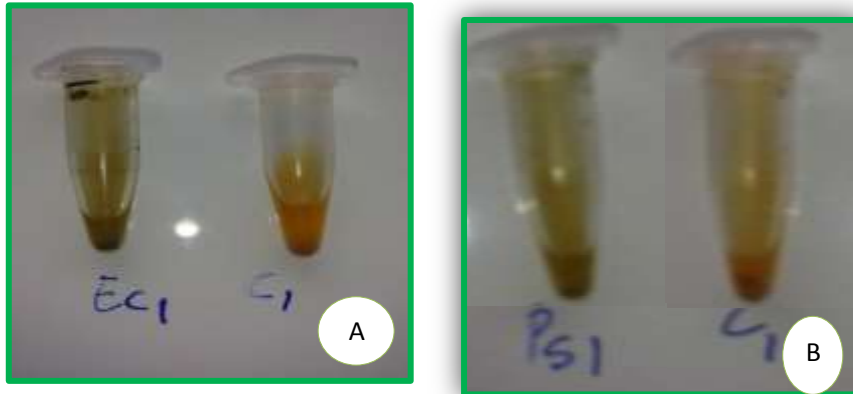
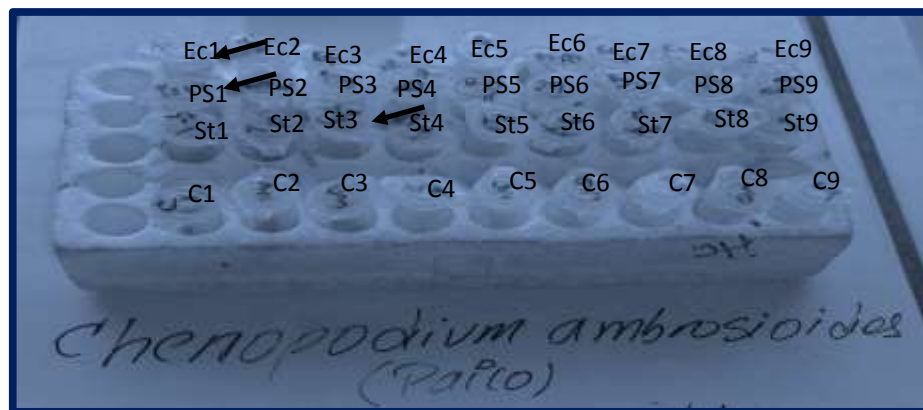


Figura (A) muestra la CMI del extracto acuoso de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* por el Método de Macrodilución frente a *Escherichia coli* (Ec₁), con una CMI de 32mg/ml; se realizó la comparación visual con el control negativo (C1). La imagen (B) muestra la CMI de *Pseudomonas aeruginosa*(Ps₁), con una CMI de 32mg/ml; se realizó la comparación visual con el control negativo (C1).

Anexo N° 20

Kit de microtubos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (paico).



La figura, muestra el kit de microtubos de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (paico) frente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mediante el método de Macrodilución.

Elaborado por: Melissa Rojas y Clara Del Castillo

Fuente: Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias (FIIA) – Área de Microbiología

Anexo N° 21

Resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) del Extracto Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* por el método de Macrodilución Frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

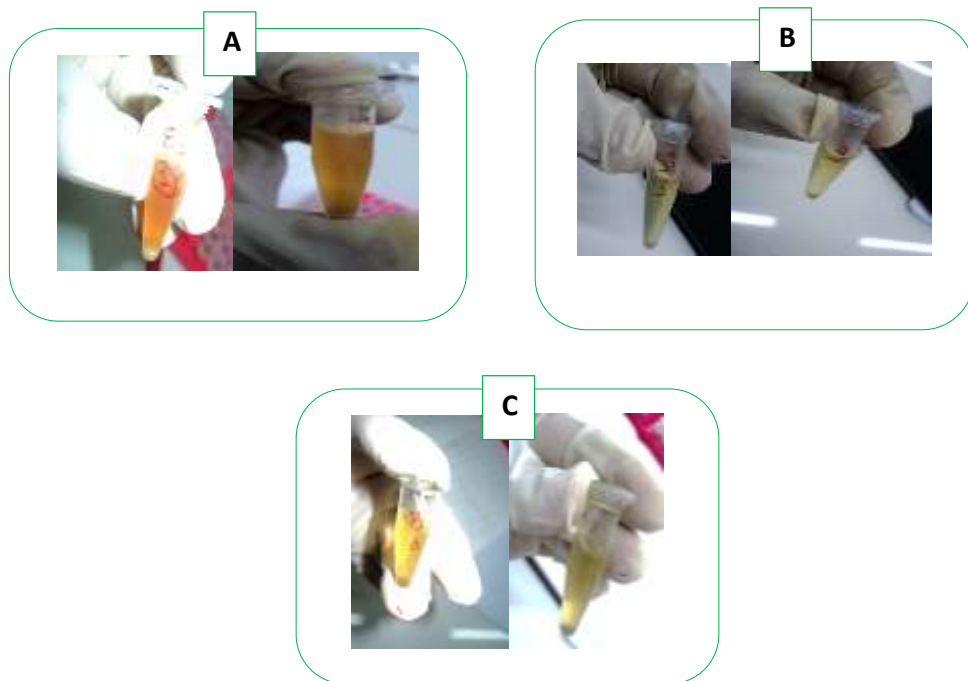


Figura (A) muestra la CMI del Extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* por el Método de Macrodilución frente a *Escherichia coli* (Ec_1), con un CMI de 32mg/ml; se realizó la comparación visual con el control negativo (C1). La imagen (B) muestra la CMI 8mg/ml frente a *Staphylococcus aureus* (St_3); se realizó la comparación visual con el control negativo (C3). La imagen (C) muestra la CMI 32mg/ml frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Ps_1), se realizó la comparación visual con el control negativo (C1).

Anexo N°22

Resultado de la Concentración Bactericida Mínima (CBI) del Extracto Acuoso y Etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides*, a partir del Método de Macrodilución.



La figura, muestra la lectura de placas de la Concentración Bactericida Mínima del Extracto acuoso y etanólico de *Chenopodium ambrosioides*, a partir del Método de Macrodilución, donde se puede apreciar crecimiento bacteriano en las placas que contenían *Staphylococcus aureus* (St1, St2, y St3), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps1 extracto etanólico y acuoso) y *Escherichia coli* (Ec1 extracto etanólico y acuoso) por lo que se considera que los extractos acuoso y etanólico de *Chenopodium ambrosioides* no presenta efecto bactericida frente a dichas Cepas Bacterianas.

Anexo N° 23

Tabla 16: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES: DIFUSIÓN EN AGAR

Variable Independiente	Definición Conceptual	Indicador	Índices	Definición Operacional	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extracto Acuoso de las hojas frescas de Chenopodium ambrosioides (Paico)	Producto obtenido mediante el método de extracción con agua destilada.	Concentración del extracto acuoso de las hojas de Chenopodium ambrosioides (Paico)	Concentración alta: 12mg Concentración baja: 6mg	La especie vegetal fresca en contacto con el agua como solvente para arrastrar los metabolitos secundarios solubles en ellas, cuya extracción se realizó mediante el licuado de las hojas frescas y pasterizado a 85°C por 5 minutos	Nominal	Cualitativa

Anexo N°24

Tabla 17: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES: DIFUSIÓN EN AGAR

Variable Independiente	Definición Conceptual	Indicador	Índices	Definición Operacional	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extracto etanólico de las <i>hojas secas</i> de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor.	Concentración del extracto etanólico de las hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Concentración alta: 12mg Concentración baja: 6mg	La especie vegetal seco, en contacto con etanol como solvente para arrastrar los metabolitos secundarios solubles en ellas y cuya extracción se realizó en rotavapor a una temperatura de 65° C durante 3 horas.	Nominal	Cualitativa

Anexo N°25

Tabla 18: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES: MACRODILUCIÓN

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extracto acuoso obtenido de las hojas frescas de Chenopodium ambrosioides (Paico)	Producto obtenido mediante el método de extracción con agua destilada.	La especie vegetal fresca en contacto con el agua como solvente para arrastrar los metabolitos secundarios solubles en ellas, cuya extracción se realizó mediante el licuado de las hojas frescas y pasterizado a 85°C por 5 minutos	Concentración del extracto etanólico de la hoja de secas de Chenopodium ambrosioides (Paico)	Método de Macrodilución: Concentración baja: 0.25 mg/ml Concentración media: 4.0 mg/ml Concentración alta: 32mg/ml	Nominal	Cuantitativa

Anexo N° 26

Tabla 19: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES: MACRODILUCIÓN

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extracto etanólico de las hojas secas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor.	Producto obtenido por un proceso de maceración en etanol, el que se utilizará para elaborar soluciones a diferentes concentraciones	Concentración del extracto etanólico de la hoja de secas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Método de Macrodilución: Concentración baja: 0.25 mg/ml Concentración media: 4.0 mg/ml Concentración alta: 32mg/ml	Nominal	Cuantitativa

Anexo N° 27

Tabla 20: INDICADORES PARA EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN: VARIABLE INDEPENDIENTE

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extracto etanólico de las hojas secas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor.	Producto obtenido por un proceso de maceración en etanol, el que se utilizará para elaborar soluciones a diferentes concentraciones	Concentración del extracto etanólico de la hoja de secas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Método de Macrodilución: Concentración baja: 0.25 mg/ml Concentración media: 4.0 mg/ml Concentración alta: 32mg/ml	Nominal	Cuantitativa

Anexo N°28

Tabla 21: INDICADORES PARA EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN: VARIABLE INDEPENDIENTE

VARIABLE INDEPENDIENTE (X)	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Extracto etanólico obtenido de las hojas secas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Producto del secado de especie vegetal, para luego ser macerada en etanol.	Producto obtenido por un proceso de maceración en etanol, el que se utilizó para elaborar soluciones a diferentes concentraciones.	Concentración del extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	1.Prueba de sensibilidad: Concentración de 32, 16, 8, 4,2, 1, 0.5 y 0.25mg/ml. 2.Prueba de sensibilidad: Concentración de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25mg/ml	Intercalar. Tipo cuantitativo.

Anexo N° 29

Tabla 22: OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE

<i>VARIABLE DEPENDIENTE (Y)</i>	<i>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</i>	<i>DEFINICIÓN OPERACIONAL</i>	<i>INDICADOR</i>	<i>INDICE</i>	<i>ESCALA</i>
Actividad antibacteriana de Chenopodium ambrosioides frente a Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli.	Capacidad de una sustancia cualquiera para inhibir el crecimiento y/o producir la muerte de una o más bacterias.	<p>Sensibilidad bacteriana</p> <p>Grado de susceptibilidad de los microorganismos frente al extracto de la especie vegetal en estudio, con la formación de un halo de inhibición.</p> <p>Concentración inhibitoria mínima:</p> <p>Es la mínima concentración con la cual el extracto de la especie vegetal en estudio es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos.</p>	<p>Diámetro en milímetros (mm) del halo inhibición.</p> <p>Presencia de precipitado en el fondo del tubo de ensayo.</p> <p>Turbidez del medio de cultivo.</p>	<p>Grado de sensibilidad.</p> <p>Resistente <12 mm</p> <p>Intermedio 13 - 14 mm</p> <p>Sensible > 15 mm</p> <p>Capacidad inhibitoria.</p> <p>Buena actividad > 76 %</p> <p>Moderadamente activo 51 – 75%</p> <p>Inactivo < 40%</p> <p>Poco activo 40 – 50%</p>	<p>Intercalar</p> <p>Tipo cuantitativo.</p>

CONSTANCIA



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
 Centro de Investigación
 de Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 022-2016-AMAZ-UNAP

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

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por las bachilleres: **CLARA ISABEL DEL CASTILLO PAREDES** y **NILSSA MELISSA ROJAS GONZALES**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: **“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (paico) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN”**. 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 Vulgar
012042	CHENOPODIACEAE	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	“paico”

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

Iquitos 25 de Abril del 2016

Atentamente,



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