



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIA - UNAP
LABORATORIO DE INGENIERIA Y MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS



PROYECTO DE TESIS

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro DEL
EXTRACTO ETANÓLICO Y ACUOSO DE *Brosimum rubescens* “Palisangre”
MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR”**

Para Optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por los Bachilleres:

DEL AGUILA TANG ROGER

JAVIER

MACEDO GARCIA PATRICIA

ELVA

Asesores:

Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIERREZ A.

ING. ALENGUER GERÓNIMO ALVA ARÉVALO DR.

BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE MG

IQUITOS-PERU

2012

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y ACUOSO DE *Brosimum rubescens* “Palisangre” MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

DEL AGUILA TANG R; MACEDO GARCIA P.

RESUMEN

La actividad antibacteriana de muchos medicamentos actúa de forma bacteriostática o bactericida capaces de controlar a los diferentes agentes patógenos que causan enfermedades, pero a medida que van pasando los años y con el mal uso y abuso indiscriminado en la administración de los mismos, originan adherencia a que las bacterias mantengan cepas cada vez más resistentes.

Actualmente, en la Amazonía Peruana se han reportado, por lo menos, 3140 especies útiles de las cuales aproximadamente 1044 especies tienen uso medicinal. El propósito del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) para la cual la muestra en estudio fue recolectada en la zona de Reserva de Alpahuayo-Mishana e identificada taxonómicamente en el *Herbarium Amazonense* de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana y depositada en el laboratorio de Ingeniería y Microbiología de la Facultad de Industrias alimentarias (Planta piloto - UNAP). Del tronco se prepararon 02 extractos; acuoso y etanólico para las evaluaciones de la actividad antibacterianas.

Las técnicas empleadas en el laboratorio para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* fueron el método de difusión en discos (agar) y de dilución en caldo (macrodilución) utilizando cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

El resultados de las técnicas aplicadas a cada extracto, evidenció la presencia de actividad antibacteriana en el extracto etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* (palisangre) frente a *Staphylococcus aureus* y del extracto acuoso frente a *Escherichia coli*.

Se puede concluir que ambos extractos presentaron actividad antibacteriana *in vitro*, siendo el extracto etanólico que mejor respuesta presentó en la inhibición del crecimiento bacteriano, es probablemente debido a la combinación de compuestos fitoquímicos presente en dicho extracto.

Palabras claves: *Brosimum rubescens* (palisangre), extractos acuoso, Extracto etanólico, actividad antibacteriana, ATCC, susceptibilidad, macrodilucion.

DETERMINATION In Vitro ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ETHANOL AND AQUEOUS EXTRACT OF *Brosimum rubescens* “Palisangre” BY THE METHOD OF AGAR DIFUSSION

DEL AGUILA TANG, R; MACEDO GARCIA P.

ABSTRACT

The antibacterial activity of many drugs such acts bacteriostatic or bactericidalable to control different disease – causing pathogens, but as the yers go by and the misuse and abuse of them, cause bacteria adhesión to maintin increasingly resistant strains.

Currently, in the Peruvian Amazon have been reported, at least, 3140 useful species of which approximately 1044 species have medicinal use.

The purpose of this study was to determine the antibacterial activity *in vitro* stem *rubescens Brosimum* Taubert (Palisangre) for which the study sample was collected in the Alpahuayo - Mishana Reserve and identified taxonomically in the *Herbarium* of the University *Amazonense* of the Peruvian Amazon, and deposited in the laboratory of Engineering and Microbiology, the Faculty of Food Industry (Pilot plant - UNAP). Of the 02 extracts were prepared crust; aqueous and ethanol for antibacterial activity assessments.

The techniques used in the laboratory for the determination of the antibacterial activity *in vitro* were the disk diffusion method (agar) and broth dilution (macrodilution) using strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

The results of techniques applied to each extract, showed the presence of antibacterial activity in the ethanol extract of the stem of *Brosimum rubescens* (palisangre) against *Staphylococcus aureus* and the aqueous extract against *Escherichia coli*.

One can conclude that both extracts showed *in vitro* antibacterial activity, with the best response ethanolic extract obtained bacterial growth inhibition is probably a combination of phytochemicals present in the extract

Keywords: *Brosimum rubescens* (palisangre), aqueous and etanolic extracts, antibacterial activity, ATCC, suceptibility, macrodilution.

PAGINA DE APROBACION

.....
Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALA
PRESIDENTE

.....
ING. GLADYS CARDENAS CARDENAS
MIEMBRO

.....
DR. CHARLES OCAMPO SOUZA
MIEMBRO

.....
Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIERREZ ALVARADO
ASESOR

.....
ING. ALENGUER GERONIMO ALVA AREVALO DR.
ASESOR

.....
BLGA. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE MG.
ASESOR

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico en primer lugar a DIOS

Por permitirme cada día guiarme en este difícil camino que me ha puesto en la vida

A mis padres JAIRO y YOLANDA, por su amor, protección, y entrega total para alcanzar a ser un buen profesional de éxito.

A mi Hijo NESTOR SEBASTIAN, por ser la razón existencia y superación.

A mi familia, por estar siempre conmigo todo momento

A la Sra. SEMIRA MANRIQUE ALVAN, por ser una gran persona,

Por sus consejos y su apoyo moral incondicional.

Bach. Roger Javier Del Aguila Tang.

El presente trabajo se lo dedico a mi padres

Victor y Elizabeth que cada día a contribuido con su esfuerzo, teson y paciencia la realización

para la culminación de mi éxito profesional.

A mi lindo hijo Jorge Alejandro por ser el motor que Contribuyo a que mis expectativas se hagan realidad.

Bach. Patricia Elva Macedo Garcia

Agradecimiento

Dedicamos este apartado especial a todas las personas que compartieron cada momento de nuestra vida profesional entre los amigos, compañeros, profesores de nuestra facultad.

Para aquellas personas que día a día compartieron sus vivencias, sus anhelos y metas a lado nuestro y para aquellos a quienes en el camino de su vida Dios le ha permitido encontrarlos y tenerlos a su lado.

A todos ellos muchas gracias.

Este presente trabajo no habría sido culminado si el apoyo de las siguientes personas:

- *Al Profesor de nuestra facultad **Q.F. Wilfredo Oswaldo Gutierrez Alvarado**, brindarnos parte de su tiempo en entregarnos el apoyo incondicional en sus conocimientos y redacción del trabajo de tesis.*
- *Al **Ing. Alenguer Alva Arévalo. Dr.** Expresándole nuestra inmensa gratitud por permitirnos acceder a su centro de trabajo, brindando la ayuda desmesurada, aconsejándonos en la forma de elaboración y mirando siempre la forma de culminar nuestro trabajo, a usted Dr. Mil gracias.*
- *A la **Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe Mg.** Por las indicaciones, y consejos de cómo debemos dirigir nuestro trabajo de investigación y por abrirnos las puertas del Laboratorio de Microbiología y permitirnos el desarrollo del presente trabajo.*

Agradecemos mucho a nuestro compañero, y a la asistente de laboratorio Tany Lopez Ruiz por la ayuda ofrecida realización y manejo dentro del análisis microbiológico.

A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron en la realización de la presente tesis.
MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
PAGINA DE APROBACION	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v

CAPITULO I **01**

1.1. INTRODUCCION.....	02
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	05
1.3. OBJETIVOS.....	06
1.3.1. Objetivos Generales.....	06
1.3.2. Objetivos Específicos.....	06

CAPITULO II 07

2.1. MARCO TEORICO.....	08
2.1.1. ANTECEDENTES.....	10
2.1.1.1. Estudios Fitoquímicos.....	09
2.1.1.2. Estudios Farmacológicos.....	11
2.1.1.3. Estudios Toxicológicos.....	12
2.1.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.....	12
2.1.2.1. Clasificación Taxonómica.....	12
2.1.2.2. Descripción Botánica.....	13
2.1.2.3. Uso Tradicional.....	15
2.1.3. ENSAYOS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	14
2.1.3.1. Método de Difusión en Agar.....	15
2.1.4. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CEPA EN ESTUDIO.....	20
2.1.4.1. <i>Staphylococcus Aureus</i>	20
2.1.4.1.1. Clasificación Científica.....	20
2.1.4.1.2. El Genoma de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.4.2. <i>Escherichia Coli</i>	21
2.1.4.2.1. Clasificación Científica.....	21
2.1.4.2.2. Etiología e Epidemiología.....	22

2.1.4.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga.....	23
2.1.4.2.2.2. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxígenica.....	24
2.1.4.2.2.3. <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena.....	25
2.1.4.2.2.4. <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora.....	25
2.1.4.2.2.5. <i>Escherichia coli</i> Enteroagregante y Adherencia Difusa.....	26
2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES.....	27
2.2.1. Variable independiente.....	27
2.2.2. Variable dependiente.....	27
2.3. INDICADORES.....	27
2.3.1. Independiente.....	27
2.3.1.1. Método por difusión en agar.....	27
2.3.2.1. Método por macrodilucion.....	27
2.3.2. Dependiente.....	27
2.3.2.1. Método por difusión en agar.....	27
2.3.2.2. Método por macrodilucion.....	27
2.4. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	28
2.5. HIPOTESIS.....	30

CAPITULO III	31
4.1. METODOLOGIA DE INVESTIGACION.....	32
3.1.1. Tipo de investigación.....	32
3.1.2. Diseño de investigación.....	32
3.1.3. Flujograma de investigación.....	36
4.2. POBLACION Y MUESTRA.....	37
3.2.1. Población.....	37
3.2.1. Muestra.....	37
3.2.2. Criterios de selección de la muestra.....	37
3.2.2.1. Criterios de inclusión.....	37
3.2.2.2. Criterios de exclusión.....	37
4.3. TECNICAS E INSTRUMENTOS.....	38
3.3.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	38
3.3.1.2. Ubicación geográfica de la especie.....	38
3.3.1.2. Selección de la especie vegetal.....	38
3.3.1.3. Recolección y transporte de la muestras.....	38
3.3.1.4. Identificación taxonómica.....	38
3.3.1.5. Secado y molienda de la muestra.....	39
3.3.1.6. PROCESAMIENTO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.....	39
3.3.1.6.1. Obtención del extracto acuoso.....	39
3.3.1.6.2. Obtención del extracto etanólico.....	40

3.3.1.7.	PRUEBA DE SUCEPTIBILIDAD Y ACCION ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION POR DISCO.....	41
3.3.1.7.1.	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	42
3.3.1.7.2.	INOCULACIÓN.....	42
3.3.1.7.2.1.	Preparación del inóculo.....	42
3.3.1.7.2.2.	Inoculación de las placas.....	43
3.3.1.7.3.	APLICACIÓN DE LOS DISCOS.....	43
3.3.1.7.4.	INCUBACION.....	44
3.3.1.7.5.	LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.....	44
3.3.1.8.	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA POR EL METODO DE DIFUSION EN CALDO...	45
3.3.1.8.2.	PREPARACION Y ALAMCENAMIENTO DE LAS DILUCIONES.....	45
3.3.1.8.2.1.	METODO DE DILUCION EN CALDO.....	46
3.3.1.8.3.	PREPARACION DE LOS CONTROLES.....	45
3.3.1.8.4.	PRUEBA DE DILUCION EN CALDO.....	46
3.3.1.8.4.1.	Preparación del inóculo.....	46
3.3.1.8.4.2.	Incubación.....	46
3.3.1.8.4.3.	Lectura de los resultados.....	46

3.3.2. MATERIALES

3.3.2.1. Medios de cultivo y Reactivos químicos.....	47
3.3.2.2. Preparación de los extractos vegetales.....	47
3.3.2.2.1. Material biológico.....	47
3.3.2.2.1.1. Extracto acuoso.....	47
3.3.2.2.1.2. Extracto etanólico.....	47
3.3.2.3. Materiales de vidrio.....	48
3.3.2.4. Material de metal.....	48
3.3.2.5. Otros materiales.....	49
3.3.2.6. Equipos.....	50

3.3.3. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS Y DE LOS

ANIMALES.....	51
3.3.3. CRITERIOS DE BIOSEGURIDAD.....	54
3.3.3.1. Área física del laboratorio.....	54
3.3.3.2. Lavados de Manos.....	54
3.3.3.3. Uso de bata o mandil en el laboratorio.....	54

CAPITULO IV **55**

4.1. RESULTADOS.....	56
4.1.1. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>In Vitro</i> . ..	56
4.1.1.1. Método de Difusión en Disco (Agar).....	56

4.1.1.2. Método de Dilución en Caldo (macrodilución).....	59
4.1.2. RESULTADO DEL ANALISIS ESTADISTICO.....	61
4.2. DISCUSION.....	72
4.3. CONCLUSIONES.....	74
4.4. RECOMENDACIONES.....	75
4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76


ANEXOS

81

✚	Anexo N° 01. Ubicación Geográfica de la Reserva Nacional Alpahuayo – Mishana.....	82
✚	Anexo N° 02. Ficha de Recolección de datos de la especie vegetal en estudio.....	83
✚	Anexo N° 03. Reconocimiento y selección de la especie vegetal en estudio.....	84
✚	Anexo N° 04. Muestra botánica.....	85
✚	Anexo N° 05. Constancia de la especie vegetal en estudio.....	86
✚	Anexo N° 06. Molienda de la muestra vegetal.....	87
✚	Anexo N° 07. Obtención de los extractos vegetales.....	88
✚	Anexo N° 08. Obtención de los extractos vegetales.....	89
✚	Anexo N° 09. Preparación de los extractos vegetales para la Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana Mediante el Método de Difusión en Agar.....	90
✚	Anexo N° 10. Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana Mediante el Método de Difusión en Agar.....	91
✚	Anexo N° 11. Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana Mediante el Método de Difusión en Agar.....	92
✚	Anexo N° 12. Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana Mediante el Método de Difusión en Agar.....	93
✚	Anexo N° 13. Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana Mediante el Método de Difusión en Agar.....	94
✚	Anexo N° 14. Resultados de las lecturas de halos de inhibición de los extractos vegetales para la evaluación de la susceptibilidad antibacteriana mediante el método de Difusión en Agar.....	95

✚	Anexo N° 15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante dilución en caldo (Macrodilución) – Preparación de los controles antibacterianas.....	98
✚	Anexo N° 16. Determinacion de la Concentracion Minima Inhibitoria mediante dilución en caldo (Macrodilucion) – Preparación de los extractos vegetales.....	99
✚	Anexo N° 17. Resultado de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólicos del tallo de <i>Brosimum rubescens</i> mediante el Metodo de Dilución en caldo (Macrodilución).....	100
✚	Anexo N° 18. Resultado de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólicos del tallo de <i>Brosimum rubescens</i> mediante el Método de Dilución en caldo (Macrodilución).....	101

ÍNDICE DE IMAGENES

 IMAGEN 01. Ubicación Satelital de la Reserva Nacional Alpahuayo – Mishana.....	82
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

✚ <u>Tabla N° 01.</u>	Diseño de investigación de las concentraciones Empleadas en difusión en agar.....	33
✚ <u>Tabla N° 02.</u>	Diseño de investigación de las diluciones empleadas En los extractos vegetales por el método de macrodilución.....	34
✚ <u>Tabla N° 03.</u>	Diseño de investigación de las diluciones empleadas En el control positivo por método de macrodilución.....	35
✚ <u>Tabla N° 04.</u>	Porcentaje de inhibición de los extractos Acuoso y Etanólico del tallo de <i>Brosimum rubescens</i> frente al control positivo en cepa <i>Escherichia coli</i>	56
✚ <u>Tabla N° 05.</u>	Porcentaje de inhibición de los extractos Acuoso y Etanólico del tallo de <i>Brosimum rubescens</i> frente al control positivo en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	57
✚ <u>Tabla N° 06.</u>	Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Acuoso en cepa <i>Escherichia coli</i>	61
✚ <u>Tabla N° 07.</u>	Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Acuoso en cepa <i>Escherichia coli</i>	61
✚ <u>Tabla N° 08.</u>	Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Etanólico en cepa <i>Escherichia coli</i>	64
✚ <u>Tabla N° 09.</u>	Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Acuoso en cepa <i>Escherichia coli</i>	64
✚ <u>Tabla N° 10.</u>	Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Acuoso en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	66
✚ <u>Tabla N° 11.</u>	Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Acuoso en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	67

✚ <u>Tabla N° 12.</u> Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Etanólico en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	69
✚ <u>Tabla N° 13.</u> Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Etanólico en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	69

ÍNDICE DE GRAFICOS

✚ <u>Grafico N° 01.</u> Porcentaje de Inhibición del extracto Acuoso de <i>Brosimum rubescens</i> frente al control positivo en cepa <i>Escherichia coli</i>	56
✚ <u>Grafico N° 02.</u> Porcentaje de Inhibición del extracto Etanólico de <i>Brosimum rubescens</i> frente al control positivo en cepa <i>Escherichia coli</i>	57
✚ <u>Grafico N° 03.</u> Porcentaje de Inhibición del extracto Acuoso de <i>Brosimum rubescens</i> frente al control positivo en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	58
✚ <u>Grafico N° 04.</u> Porcentaje de Inhibición del extracto Etanólico de <i>Brosimum rubescens</i> frente al control positivo en cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	58
✚ <u>Grafico N° 05.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto Acuoso de <i>Brosimum rubescens</i> “Palisangre” frente a <i>Staphylococcus Aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> en comparación al control positivo.....	59
✚ <u>Grafico N° 06.</u> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto etanólico de <i>Brosimum rubescens</i> “Palisangre” frente a <i>Staphylococcus Aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> en comparación al control positivo.....	59

ÍNDICE DE ESQUEMAS

✚ <u>Esquema N° 01.</u>	Distribución los concentraciones en discos por método de difusión en agar.....	33
✚ <u>Esquema N° 02.</u>	Flujograma de distribución de concentración de los extractos en tubos por el método de macrodilucion.....	34
✚ <u>Esquema N° 03.</u>	Flujograma de distribución de concentración de los controles en tubos por el método de macrodilucion.....	36
✚ <u>Esquema N° 04.</u>	Obtención del extracto Acuoso del tallo de <i>Brosimum rubescens</i>	40
✚ <u>Esquema N° 05.</u>	Obtención del extracto Etanólico del tallo de <i>Brosimum rubescens</i>	41

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCION

Entre los diversos factores que han contribuido al incremento significativo de la expectativa de vida durante el siglo pasado se encuentra sin duda el control de numerosas enfermedades infecciosas gracias a intervenciones como vacunas y antibióticos específicamente.

La utilización terapéutica de la penicilina y otros antibióticos a partir de los años cuarenta ha sido uno de los logros más importantes, desde entonces se han obtenido, comercializado y utilizado una gran cantidad de medicamentos antimicrobianos y, sin embargo, así como al comienzo de la era antibiótica se tenía la falsa esperanza de que las enfermedades producidas por microbios desaparecerían, pronto se puso de manifiesto que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos de resistencia y es que así en los años 60 ya existían reportes de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y posteriormente diversos mecanismos resistencia a los medicamentos betalactámicos.^{1,2,3}

La actividad antibacteriana de muchos medicamentos actúa de forma bacteriostática o bactericida capaces de controlar a los diferentes agentes patógenos que causan enfermedades, pero a medida que van pasando los años y con el mal uso y abuso indiscriminado en la administración de los mismos, originan adherencia a que las bacterias mantengan cepas cada vez más resistentes.

Nuestra Amazonía Peruana constituye una de las más grandes dispensas y reservas de recursos terapéuticos utilizados por pobladores nativos y migrantes de la región formando parte de la medicina popular y herboristería actual.⁷

Tradicionalmente, las plantas son consideradas como un laboratorio biosintético que no sólo elaboran compuestos químicos fisiológicamente activos, llamados metabolitos primarios, sino también por una gran cantidad de sustancias químicas de estructura relativamente compleja llamados metabolitos secundarios, que son de gran importancia atribuyendo propiedades medicinales y curativas como en el caso de enfermedades respiratorias, problemas gastrointestinales, también propiedades anticancerígenas, antibióticas, antidiabéticas, antioxidantes, dermatológicas y otras más, por lo que constituyen una fuente casi inagotable de moléculas, cuyos análisis se está facilitando por la disponibilidad de bioensayos *in vitro* e *in vivo*.⁴

Dentro de estas plantas, la familia *Moraceae* comprende 37 géneros y 1100 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. Entre las especies sobresalientes de la familia esta *Brosimum rubescens* conocido en la región Amazónica como "palo sangre del rojo" o "granadillo del más colorado", cuya madera, corteza y hojas tradicionalmente se le ha atribuido propiedades medicinales como, tónico fortificante, antiartrítico, antirreumático, anticonceptivo, antihemorrágico, así como para combatir descensos y para tratar fiebres posiblemente causadas por malaria.^{42, 43}

Actualmente, se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento.

Es por tal motivo consideramos de gran importancia el estudio de la actividad antibacteriana de *Brosimum rubescens*, como alternativa futura para contrarrestar la farmacoresistencia producidas por las infecciones bacterianas, esperando que nuestro estudio contribuya a incentivar a estudios posteriores e implementar otras atribuciones ya aplicadas en el uso de esta planta.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Presentará actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* el extracto etanólico y acuoso del tallo de *Brosimum rubescens*?

1.3. **OBJETIVOS**

1.3.1. **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso obtenidos del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre), utilizando pruebas de sensibilidad antibacteriana mediante el método de difusión en agar.

1.3.2. **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ❖ Obtener el extracto etanólico y acuoso del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre).
- ❖ Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico y acuoso del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre), utilizando pruebas de sensibilidad mediante difusión en agar frente a *Escherichia coli* cepa ATCC 25922y *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.
- ❖ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico y acuoso del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) por el método de macrodilución.

CAPITULO II

2.1. MARCO TEORICO

La selva tropical amazónica, es una de las áreas de biodiversidad más abundante en el mundo el cual alberga numerosas especies vegetales, y han venido siendo utilizadas para diferentes fines por los pobladores de las comunidades nativas que moran allí desde muchas décadas pasadas, siendo más importantes aquellas plantas que presentan propiedades medicinales.⁵

La utilización de los recursos naturales, siempre estuvo vinculada a la historia del desarrollo de las sociedades humanas y es uno de los recursos que aun en la actualidad tienen contribuido grandemente para la sobrevivencia de los pueblos; es el conjunto de especies vegetales, que se componen de los más variados biomas que están insertas en tales poblaciones.⁸

En muchos países del mundo, dentro de sus sistemas de salud, es frecuente el uso de plantas medicinales o de sus principios activos en la terapéutica de diversas enfermedades. En efecto, las plantas medicinales son capaces de sintetizar una gran variedad de sustancias bioactivas denominadas metabolitos secundarios. Esas sustancias, encontradas en cantidades pequeñas, presentan una diversidad química y brindan a las plantas protección contra insectos y microorganismos fitopatógenos, resaltándose que muchos de esos metabolitos ejercen actividades biológicas y farmacológicas que son importantes para el hombre¹¹, por el cual el reconocimiento del valor curativo y la importancia de los conocimientos etnobotánicos en la medicina tradicional han sido la principal fuente de búsqueda e investigación de principios activos que sirvan para el desarrollo de nuevos fármacos.

Muchas áreas están envueltas en la investigación de nuevas sustancias oriundas de plantas, como la fitoquímica, que trabaja en el aislamiento, purificación y caracterización de los principios activos; la etnobotánica y la etnofarmacología, buscan informaciones a partir del conocimiento de diferentes pueblos y etnias, y la farmacología, estudia los efectos farmacológicos de los extractos y de los constituyentes químicos aislados.^{9, 10}. El progreso de la industria farmacéutica, y la producción de drogas sintéticas, han limitado de alguna medida la utilización de fitomedicamentos, pero sin embargo, en los últimos años ha venido creciendo el interés por las plantas medicinales y la amazonía se considera una de las áreas más prominentes del mundo.⁶

En países como el nuestro, las plantas medicinales contribuyen al fortalecimiento de los programas de salud y también de la economía del país, siendo aprovechadas como materia prima, como extractos alcohólicos o acuosos, en forma semipurificada o también como sustancias puras o semisintéticas.

El hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado identificar y utilizar una buena cantidad de especies vegetales, llegando a conocer y usar unas dos a tres mil plantas medicinales. Pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales y tóxicas de estas plantas han sido realizados. De las 1516 especies (distribuidas en 145 familias y 594 géneros), un 50% tienen alguna investigación y la mayoría han sido examinada por su utilidad como maderas, para la confección de pulpa de papel o por sus aplicaciones en la alimentación humana o en la industria.⁵

Los compuestos aislados de las plantas son sustancias cuya estructura química, con raras excepciones, presentan grandes diferencias estructurales en relación al

antibiótico derivados de microorganismos. Estos agentes antimicrobianos aislados de plantas superiores pueden reaccionar como reguladores del metabolismo intermediario, activando o bloqueando reacciones enzimáticas, afectando directamente una síntesis enzimática sea en nivel nuclear o ribosomal o mismo alterando las estructuras de las membranas.

La identificación de nuevos compuestos presentes en las plantas buscan ampliar los recursos tecnológicos nacionales en diversos sectores: a través de los posibles efectos indeseados que algunas sustancias químicas sintéticas puedan provocar por medio de la disminución de la resistencia bacteriana y minimizando los costos en el desarrollo de medicamentos.¹³ La comprobación de eficacia terapéutica de los constituyentes químicos obtenidos a partir de las plantas, impulsan nuevas investigaciones en busca de especies que presenten actividad biológica¹⁴

En diversos artículos se han establecido que muchas plantas de la familia Moraceae poseen actividad antibacteriana, antifúngicos e inclusive antiparasitaria.

2.1.1. ANTECEDENTES

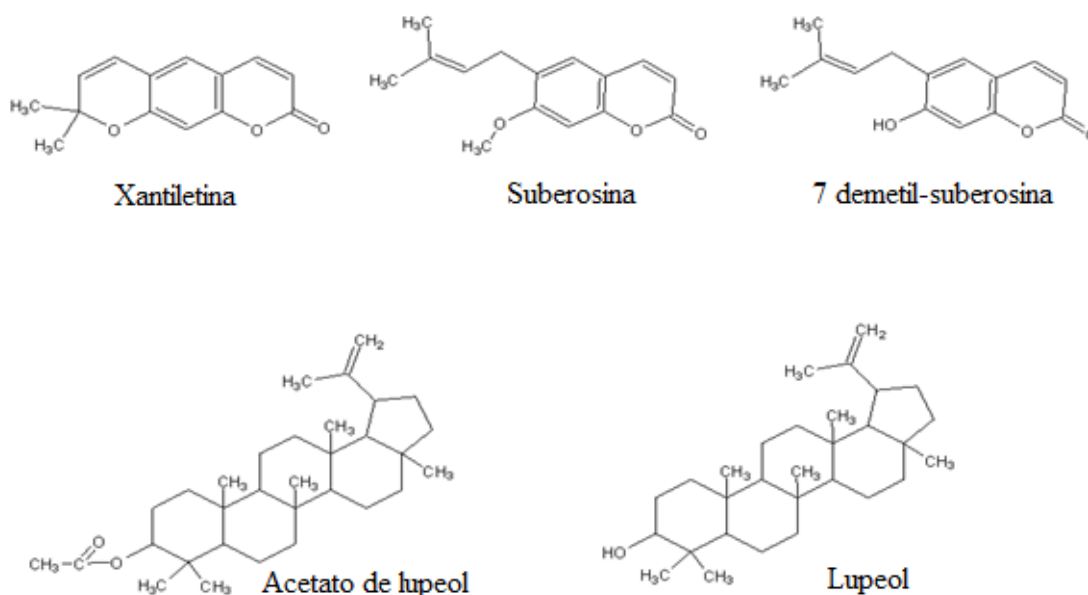
2.1.1.1. Estudios Fitoquímicos

En el año 2007 se reportó un estudio fitoquímico parcial de los extractos etanólico de madera, hojas y corteza de la especie *Brosimum rubescens* de las cuales se aislaron 3 cumarinas: Xantiletina, suberosina y 7-dimetil-suberosina; además 2 triterpenos: acetato de lupeol y lupeol, su estructura fue elucidada por Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C .^{9 15}

Se evaluaron la cantidad aproximada de componentes estructurales y macromoleculares presentes en el aserrín de la madera del *Brosimum*

rubescens (palisangre) como celulosa (56,6%), hemicelulosa (25,2%), lignina (33,0%), y de metabolitos secundarios (22,23%). Estudios químicos de sus metabolitos secundarios indicaron que los extractos del aserrín de palisangre contienen mucha xantiletina y otras cumarinas en cantidades relativamente pequeñas como luvangetina, brosiparina, 7-demetilsuberosina y brosiprenina²⁰

Figura N°05: Estructuras de compuestos aislados de *Brosimum rubescens*



2.1.1.2. Estudios Farmacológicos

LOIZEAUY SPICHTER (1990), describieron el género y sus especies; estudiaron el palisangre demostrando que desde el punto de vista médico es eficaz para la contención de las hemorragias.¹⁶

DIAWARA Y TRUMBLE (1997), mencionan que las furanocumarinas aisladas de la especie *Brosimum* son utilizadas desde épocas remotas para el tratamiento de enfermedades de la piel, tales como psoriasis, vitíligo, leucodermia, micosis, dermatitis y eczemas.¹⁷

SANDOVAL ET AL (2007) determinaron la eficacia *in vitro* de los extractos etanólicos de madera, hojas, corteza y de algunos metabolitos secundarios reportados en el tamizaje fitoquímico de la especie *Brosimum rubescens* contra *Plasmodium falciparum*. El extracto etanólico de la madera es el que mejor actividad antimalárica presenta y se sabe que la xantiletina no es la responsable de dicha actividad.¹⁵

La xantiletina presente en el género *Brosimum* es una piranocumarina que presenta actividad antiplaquetaria y anticancerígena; presenta potencial herbicida e inhibe el crecimiento de hongos simbióticos¹⁸

2.1.1.3. Estudios toxicológicos

De acuerdo a la literatura la xantiletina es una piranocumarina con actividades biológicas, como antitumoral y antibacteriana. Por tratarse de un producto natural abundante que se encuentra en diversas especies de plantas pertenecientes a las familias Rutaceae, Umbeliferaceae y Moraceae, resaltándose que la especie *Brosimum rubescens*, una planta del género *Brosimum*; la xantiletina está presente en abundancia. La xantiletina fue sometida a algunas modificaciones moleculares y subsecuentemente el producto natural y sus derivados clorados tuvieron una actividad larvicida frente a *Artemia salina*.^{18, 19}

2.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO

2.1.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La clasificación taxonómica es la siguiente²¹:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Rosales
Familia	:	MORACEAE
Género	:	<i>Brosimum</i>
Especie	:	<i>Brosimum rubescens</i>
N. científico	:	<i>Brosimum rubescens</i> Taubert
N. común	:	Palisangre ^{4, 19} (Perú); muirapiranga, pau-rainha ²¹ (Brasil).

2.1.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA^{21,22}

Brosimum rubescens (Palisangre), es un árbol de 40 a 120 cm de diámetro y de 20 a 30 m de altura, con fuste cilíndrico, ramificación del segundo al tercer tercio, la base del fuste recta o con raíces superficiales cilíndricas y cortas.

La corteza externa posee una forma lenticelada de color marrón rojizo, alargadas y protuberantes, de unos 4 a 6mm x 10 a 20 mm, dispuestas en hileras horizontales, muy congestionadas y conspicuas hacia la parte basal del fuste. La corteza interna es homogénea, de color amarillo blanquecino, con secreción de látex blanco, abundante y de flujo rápido.

Las ramas terminales son cortas con sección circular, de color marrón claro cuando se encuentran secas, de unos 2 a 4 mm de diámetro, de forma lisas, glabras, con estípulas terminales muy largas y delgadas, características, de 1.5 a 3.5 cm de longitud, en forma de punta de lanza.

Las hojas tienen simples, alternas y dísticas, de unos 6 a 11 cm de longitud y de 2.5 a 4 cm de ancho, el pecíolo de 4 a 8 mm de longitud, en forma de las láminas elípticas u oblongas, enteras, la nerviación pinnada, los nervios secundarios poseen de 14 a 18 pares, muy tenues sobre todo en la cercanía de los bordes. El ápice es largamente acuminado, con la base aguda, las hojas glabras y rígidas. La especie es usualmente monoica y produce inflorescencia bisexual o unisexual, en cabezuelas más o menos globosas de unos 3 a 8 mm de diámetro con pocas a numerosas flores.

Las flores son unisexuales, muy pequeñas, con el perianto reducido, las flores femeninas van acompañadas de brácteas diminutas (hasta 1 mm de longitud), el ovario diminuto, estilo y estigma de 1 a 2 mm de longitud. Las flores masculinas poseen un perianto irregular y diminuto de casi 1 mm de longitud, estambres de 1 a 2, de casi 1 mm de longitud. Los frutos son pequeñas drupas en infrutescencias globosas o subglobosas de hasta 2 cm de diámetro, rojizas cuando maduras.

2.1.2.3. USO TRADICIONAL

El uso de esta planta es muy variable comenzado desde su principal uso como la madera el cual es adecuada para manufacturar productos de artesanía como muebles de lujo, escaleras, pisos, instrumentos musicales, faquires decorativos y objetos de adorno, entre otros.

La especie *Brosimum rubescens*, en medicina etnobotánica, es utilizada como antiartrítico, antirreumático, fortificante, para combatir los descensos, la hemorragia y la sífilis. Los nativos amazónicos brasileiros lo utilizaban como anticonceptivo, antihemorrágico, tónico y para tratar la fiebre posiblemente causada por malaria.²¹

2.1.3. ENSAYOS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en las plantas puede ser realizada por intermedio de pruebas de inhibición del crecimiento de microorganismos, colocados en contacto con tejidos o extractos de esa planta. Las pruebas diferencian en el que se refiere a la sensibilidad o a sus principios. Los resultados obtenidos pueden sufrir influencia de método escogido y de los microorganismos utilizados como indicadores de la actividad antimicrobiana.²³

A parte de las plantas utilizadas también tiene papel fundamental, bien como la forma de uso: jugo, extracto (extracción por agua u otros solventes), u aceite esencial.

Existe una gran variedad de métodos para detectar actividad antimicrobiana. Dependiendo del método, los resultados pueden ser

grandemente influenciados una vez que ellos no son igualmente sensitivos o no se basan en los mismos principios. De esta forma, familiarizarse con los principios de los métodos disponibles, sus limitaciones y las modificaciones propuestas en la literatura es de extrema importancia.

Normalmente, esos métodos son clasificados en tres grandes grupos: métodos de difusión, dilución y antibiograma. Estos son los más comúnmente utilizados por los grupos de búsqueda de antimicrobianos de origen vegetal y serán descritos abajo.

2.1.3.1. Método de Difusión en Agar ^{24, 25}

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

El microorganismo puede ser inoculado de diferentes formas. Normalmente ellos son inoculados en la superficie de agar sólido, pero también pueden ser mezclados en el agar de 45 a 50°C ^{24, 25}. Algunos autores utilizan placas Petri conteniendo dos capas de medio. La primera capa es colocada en la placa y luego, después de su solidificación, otro tipo de agar mezclado con microorganismos es colocado por encima del primero.

Existen diferentes reservorios, como discos de papel, cilindros de acero inoxidable y cavidades perforadas del agar. Algunos autores consideran las cavidades el único reservorio apropiado para extractos acuosos, pues la interferencia de las partículas es mucho menor. Muchas veces, antes de impregnar la muestra en los reservorios, estos son esterilizadas por medio de filtración con filtros millipore de 0.45 μm . Tal procedimiento es hecho principalmente cuando se trata de extractos acuosos ^{26,27}

Antes de incubar el sistema inoculado, puede ser mantenido a temperaturas más bajas por algunas horas con el objetivo de facilitar la difusión de la muestra y, consecuentemente, aumentar el diámetro de inhibición mejorando el límite de detección. Algunos estudios consideran suficiente mantener las placas a 4° C por 1 a 2 horas ^{25, 28,29}.

Otros consideran suficiente dejar las placas a temperatura ambiente por 30 minutos³⁰. Aun utilizan film plástico para sellar las placas Petri con la intención de evitar una eventual evaporación de las muestras ³¹.

Los diámetros de las zonas de inhibición son normalmente medidas con un parquímetro. El diámetro también puede ser medido automáticamente con la ayuda de software. Con el objetivo de facilitar la medida del halo, las placas Petri pueden ser rociadas después del periodo de incubación con indicadores redox del tipo sal de tetrazolium.

No existe ningún valor patrón que determina que la muestra es activa o no. Es frecuente expresar los resultados como un criterio para determinar la susceptibilidad, susceptibilidad intermedia y la resistencia. En estos casos, son creadas escalas basadas en el tamaño de las zonas de inhibición. Cuanto

mayor sea el halo, más sensible es el microorganismo^{32,33}. También es posible comparar los halos de las muestras con los halos formados por los controles (antibiótico o antifúngico). Algunos autores afirman que el diámetro del halo formado está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo. La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes y pueda establecerse una correlación con los valores de CMI donde los halos pequeños se relacionan con valores altos de CMI (resistentes) y halos grandes con CMI bajas (sensibles).³⁵

Por otra parte otros autores mencionan, si el halo de inhibición de un extracto vegetal presenta un diámetro mayor a 9 mm el resultado de la actividad antibacteriana es positiva. Si el halo presenta entre 6-9 mm la actividad del extracto vegetal se considera intermedia o moderada, y si el halo de inhibición fue inferior a 6 mm es considerada negativa (sin actividad).³⁶

Existe una variación del método de difusión en agar utilizado tanto para aceites esenciales como para extractos brutos. En esta técnica, los microorganismos son inoculados en la superficie del agar y después de 10 minutos, una gota de 10 μ L de la muestra es colocada en el centro de la placa. Después del periodo de incubación, el diámetro de la zona de inhibición es medido³⁴.

Algunos estudios validan la actividad antimicrobiana activada por la luz utilizando la técnica de difusión en agar. En estos casos, una placa es expuesta a la luz UV por dos horas, en cuantas otras placas son mantenidas

en el oscuro. Después del periodo de incubación, los diámetros son medidos y se verifica la exposición a la luz UV fue capaz de aumentar ese halo, sugiriendo la presencia de sustancias activadas por fluorescencia. Para algunos autores, la actividad de la luz UV es considerada positiva si ambas placas, aquella dejada al oscuro y aquella dejada en el UV, muestran zonas de inhibición. Si apenas la placa expuesta al UV presentase halos, la luz es considerada fototóxica.²⁵

El método de difusión en agar no es apropiado para investigar la actividad de muestras no polares o aquellas que no se difunden fácilmente en el agar. En general, las diferencias en la propiedad química, como solubilidad, volatilidad y difusión pueden afectar la potencia de diferentes muestras.

Este método, simple y no oneroso, es generalmente usado para la separación de varios extractos. El extracto que presenta la actividad presentará su Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) calculada posteriormente por los métodos de dilución. Es importante enfatizar que el método de difusión en agar es utilizado para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana. Normalmente, esa técnica verifica cuales extractos presentan potencial actividad y cuales organismos son susceptibles.

2.1.4. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CEPAS EN ESTUDIO

2.1.4.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS³⁷

2.1.4.1.1. Clasificación Científica

Reino	:	Bacteria
Filo	:	Firmicutes
Clase	:	Bacilli
Orden	:	Bacillales
Familia	:	Staphylococca
Género	:	<i>Staphylococcus</i>
Especie	:	<i>Staphylococcus aureus</i>

Es una bacteria anaeróbica, facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo.

Esta especie puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de la mucosa relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía.

Las 33 especies de estafilococos son patógenos pertenecientes a la familia Micrococcaceae. Existen sistemas diagnósticos automatizados y también estuches para la tipificación bioquímica de todas las especies.

Un método que ha demostrado ser fiable para diferenciar una especie de otra es el análisis del RNA ribosómico de 16S.

Con pocas excepciones, *Staphylococcus aureus* se distingue de las demás especies de estafilococos por su producción de coagulasa, una enzima superficial que transforma el fibrinógeno en fibrina. La mayor parte de los demás estafilococos de importancia clínica son coagulasa negativos. *Staphylococcus aureus* también fermenta el manitol, posee proteína A y produce ADNasa. En las placas de agar-sangre, *Staphylococcus aureus* tiende a formar colonias betahemolíticas doradas; por lo contrario, los *Staphylococcus Aureus* Coagulasa Negativa (CoNS) producen colonias no hemolíticas de color blanco.

Los estafilococos son cocos grampositivos que se agrupan en forma de racimos de uvas al ser teñidos por el colorante de Gram. Poseen catalasa (catalasa-positivos) (a diferencia de las especies de estreptococos) y son inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos. Estos microorganismos resistentes pueden vivir mucho tiempo en superficies del entorno y en condiciones diversas.

2.1.4.1.2. El Genoma de *Staphylococcus aureus*

Se conoce la secuencia de todo el genoma de varias cepas de *Staphylococcus aureus*. Entre los datos más interesantes están los siguientes:

- Se advierte un alto grado de semejanza en cuanto a secuencias de nucleótidos entre las distintas cepas.
- Se adquiere una cantidad bastante grande de información genética por transferencia horizontal a partir de otras especies bacterianas.

- *Staphylococcus aureus* contiene diversos islotes de "patogenicidad" o "genómicos" característicos; se trata de elementos genéticos móviles que contienen cúmulos de genes de enterotoxinas y exotoxinas o determinantes de resistencia antimicrobiana.

2.1.4.2. ESCHERICHIA COLI ³⁷

2.1.4.2.1. Clasificación Científica

Reino	:	Bacteria
Filo	:	Proteobacteria
Clase	:	Gammaproteobacteria
Orden	:	Enterobacteriales
Familia	:	Enterobacteriaceae
Género	:	<i>Escherichia</i>
Especie	:	<i>Escherichia Coli</i>

2.1.4.2.2. Etiología e epidemiología

Existen por lo menos seis "patotipos" distintos de *Escherichia coli* patógena intestinal: ***Escherichia coli* productora de toxina shiga** (*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)/ *Escherichia coli* enterohemorrágica (*enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC), ***Escherichia coli* enteropatógena** (*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC), ***Escherichia coli* enteroinvasora** (*enteroinvasive Escherichia coli*, EIEC), ***Escherichia coli* enteroagregante** (*enteroaggregative*

Escherichia coli, EAEC), ***Escherichia coli* con adherencia difusa** (*diffusel adherent Escherichia coli*, DAEC).

Los microorganismos de estos patotipos se adquieren a través de la vía fecal-oral. Se transmiten básicamente por alimentos y agua contaminados con ETEC, STEC, EIEC, EAEC y DAEC y de persona a persona para EPEC (y en ocasiones STEC), puesto que la gama de hospedadores al parecer depende de ciertos factores de adherencia específicos de cada especie.

2.1.4.2.2.1. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)

Estas cepas forman un grupo de microorganismo patógenos que originan colitis hemorrágica y síndrome hemolítico-urémico (*hemolytic-uremic syndrome*, HUS). El serotipo más sobresaliente es O157:H7, pero también O6, O26, O55, O91, O103, O111, O113 y OX3 se han vinculado con estos síndromes. La facultad de producir toxina Shiga (Stx2 y/o Stx1) u otras toxinas similares constituye el factor clave que dicta si una bacteria causará el síndrome STEC.

La carne molida de vacuno y ovejas, son los alimentos que con mayor frecuencia transmiten la infección de cepas STEC y se contamina frecuentemente durante su elaboración. Se calcula que menos de 10^3 UFC (unidades formadoras de colonias [*colony-forming units*]) de STEC son patógenas. Por consiguiente, no sólo la contaminación reducida de los alimentos o el ambiente puede provocar enfermedad, sino que también la transmisión de persona a

persona, convirtiéndose en un vehículo importante de diseminación secundaria. Asimismo, existen infecciones transmitidas en laboratorios, a las que se atribuyen tanto brotes epidémicos como casos esporádicos, que alcanzan su punto máximo durante los meses del verano.

2.1.4.2.2.2. Escherichia coli Enterotoxígena (ETEC)

Constituye una causa importante de diarrea endémica, en países desarrollados y subdesarrollados. Después de dejar el amamantamiento materno, niños sufren varios accesos de infección por esta cepa en los primeros tres años de edad, que con frecuencia va disminuyendo con la generación de inmunidad de la mucosa con ciertos factores de colonización.

Una concentración de 10^6 a 10^{10} UFC son capaces de causar la enfermedad diarreica. Entre 12 y 72 h después de ingerir agua o alimentos contaminados (en especial alimentos crudos, sin pelar o sin refrigerar) surge la adherencia intestinal mediada por el factor de colonización.

El espectro de esta enfermedad varía desde una afección leve hasta un trastorno grave similar al cólera. Aunque los síntomas desaparecen solos (típicamente desaparecen en 3 días), la infección puede causar una morbilidad y mortalidad considerables cuando la atención sanitaria es deficiente en niños con cuadros de desnutrición.

2.1.4.2.2.3. Escherichia coli Enteropatógena (EPEC)

Es una cepa patógena que afecta principalmente en niños, incluyendo a los neonatos. Esta cepa ocasionó brotes epidémicos de diarrea infantil (incluyendo algunos brotes en guarderías de hospitales) en países desarrollados entre los años de 1940 y 1950.

Sin embargo, en la actualidad la infección por EPEC es rara en los países desarrollados. Por lo contrario, en los subdesarrollados este microorganismo es causa importante de diarrea infantil (tanto brotes epidémicos como casos aislados). La alimentación al seno materno reduce la frecuencia de la infección por EPEC. También puede ocurrir diseminación rápida de persona a persona. Una vez que se coloniza el intestino delgado, los síntomas aparecen después de un período breve de incubación (1 o 2 días).

La adherencia circunscrita inicial provoca borramiento característico de las microvellosidades, con la formación de pedestales con forma de taza en los que abunda la actina. Las evacuaciones diarreicas contienen moco, pero no sangre. Aunque la diarrea por EPEC es autolimitada (dura 5 a 15 días), en ocasiones persiste varias semanas.

2.1.4.2.2.4. Escherichia coli Enteroinvasora

En los países en desarrollo es raro observar casos esporádicos en niños y turistas. EIEC comparte varias características genéticas y clínicas con Shigella; sin embargo, a diferencia de ésta, EIEC causa enfermedad cuando alcanza concentraciones altas (de 10^8 a 10^{10}

UFC), la cual comienza después de un período de incubación de 1 a 3 días. Se piensa que al principio las enterotoxinas inducen una diarrea secretora del intestino delgado. Más tarde, la colonización e invasión de la mucosa del colon, seguida de la multiplicación y diseminación entre las células, originan colitis inflamatoria caracterizada por fiebre, dolor abdominal, tenesmo y evacuaciones escasas con moco, sangre y células inflamatorias. Los síntomas casi siempre desaparecen solos (tras un lapso de 7 a 10 días).

2.1.4.2.2.5. Escherichia coli enteroagregante y adherencia difusa

EAEC y DAEC se observan básicamente en los países en desarrollo y en niños pequeños. Estas cepas pueden causar diarrea del turista. Se necesita una gran concentración para que haya infección. *In vitro*, los microorganismos presentan un patrón de adherencia difuso o "en pila de ladrillos". El cuadro clínico conlleva diarrea líquida prolongada.

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES

2.2.1. Variable Independiente

- ▶ Extracto etanólico obtenido del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre)
- ▶ Extracto acuoso obtenido del tallo de *Brosimum Rubescens* (palisangre)

2.2.2. Variable Dependiente

- ▶ Actividad antibacteriana in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

2.3. INDICADORES.

2.3.1. Independiente (X): concentración del extracto acuoso y etanólico de *Brosimum rubescens*

2.3.1.1. Método de difusión en disco:

- Concentración baja: 5.0 mg en disco
- Concentración media: 10 mg en disco
- Concentración alta: 15 mg en disco
- Concentración muy alta: 20 mg en disco

2.3.1.2. Método de Macrodilución

- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): de 32 mg/ml hasta 0.25mg/ml

2.3.2. Dependiente (Y): Grado de sensibilidad y turbidez de la muestra

2.1.2.1. Método de difusión en disco: Presencia y no de halos de inhibición

2.1.2.2. Método de macrodilución: Mínima concentración que no presenta turbidez

2.4. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE		DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICES	ESCALA DE MEDICION	TIPO DE VARIABLES
INDEPENDI ETE	Extracto etanólico y acuoso del tallo de <i>Brosimum rubescens</i> (palisangre).	Producto que se obtendrá mediante el método de extracción con etanol y agua respectivamente por rotavapor.	El solvente en contacto con la especie vegetal arrastrará los metabolitos secundarios solubles en él con extracción en rotavapor a una temperatura de 60 y 80 °C respectivamente durante 3 horas	Concentración del extracto etanólico y acuoso de la corteza de <i>Brosimum rubescens</i> (palisangre).	<p>Método de Difusión en Disco:</p> <p><u>Concentración baja:</u> 5.0 mg en disco</p> <p><u>Concentración media:</u> 10.0 mg en disco</p> <p><u>Concentración alta:</u> 15.0 mg en disco</p> <p><u>Concentración muy alta:</u> 20.0 mg en disco</p> <p>Método de Macrodilución: CMI: De 32 mg/ml a 0.25 mg/ml</p>	Nominal	Cualitativa

VARIABLE		DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICES	ESCALA DE MEDICION	TIPO DE VARIABLES
DEPENDIEN TE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo.	El grado de sensibilidad que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> expuesta al extracto en estudio El grado de turbidez que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> expuesta al extracto en estudio	<ul style="list-style-type: none"> • Grado de sensibilidad • Grado de Turbidez 	<p><u>Método de Difusión en Disco:</u></p> <p>Presenta halo de Inhibición</p> <p>No presenta halo de Inhibición</p> <p><u>Método de Macrodilución:</u></p> <p>Mínima Concentración que no presenta turbidez</p>	Nominal	Cuantitativa

2.5. HIPOTESIS

Los extractos acuosos y etanólicos del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

CAPITULO III

3.1. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.

3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Se empleó el *diseño experimental, descriptivo, prospectivo y longitudinal* donde se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de extracto acuoso y etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre y seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión de la muestra.

- ▶ *Experimental.* porque se evalúa un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.
- ▶ *Descriptivo.* Porque se redactará en forma clara y precisa los fenómenos que se presentan en la investigación o estudio.
- ▶ *Prospectivo.* Porque se desarrolla a través del tiempo.
- ▶ *Longitudinal.* porque permite realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

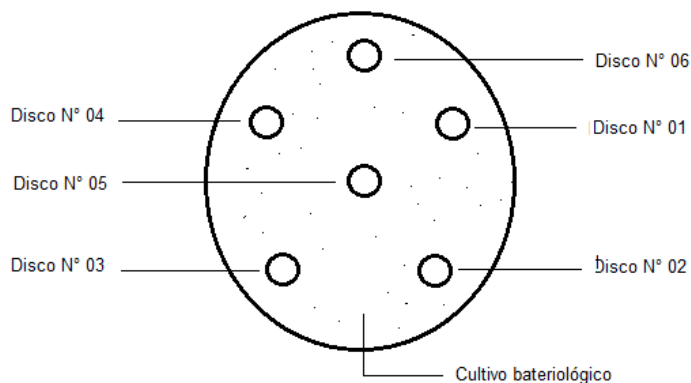
3.1.2. Diseño de investigación

Se preparó 500 mg del extracto etanólico y 500 mg de extracto acuoso del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre), cada una en 1 ml de metanol:agua para obtener una concentración de 500mg/ml. Posteriormente se procedió a realizar el método de difusión en disco, colocando diferentes concentraciones en cada disco.

TABLA N° 01. **Diseño de investigación de las concentraciones empleadas en difusión en agar**

Concentración madre	Distribución de concentraciones de los extractos de <i>Brosimum rubescens</i>	Distribución en discos
500mg/ml	5m/ml	01
	10mg/ml	02
	15mg/ml	03
	20 mg/ml	04
Control positivo (Gentamicina 160mg/2ml)	10µg/ml	05
Control negativo	Blanco	06

ESQUEMA N° 01. **Distribución de las concentraciones en discos por método de difusión en agar.**

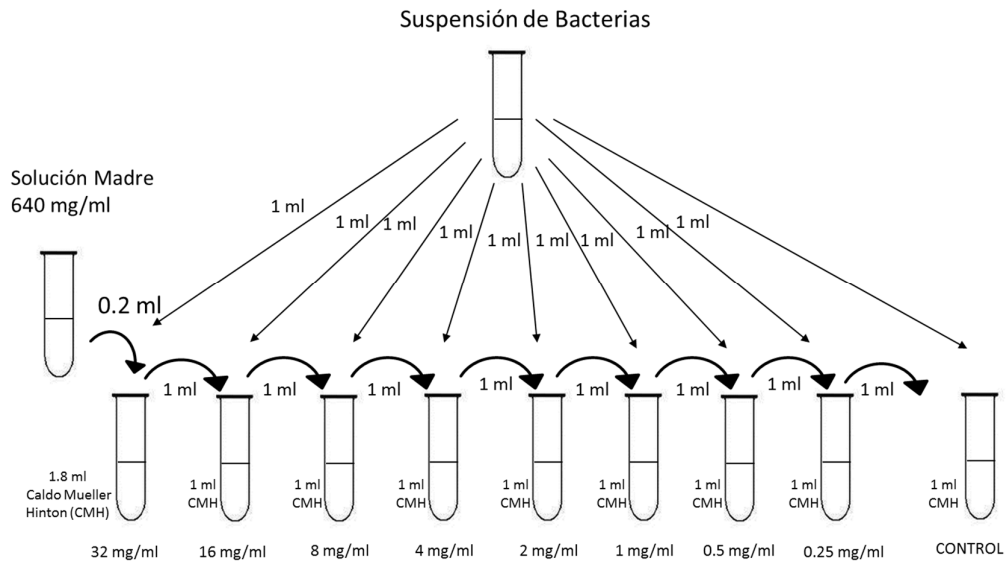


Para el método de macro dilución se preparó 650 mg de cada extracto en 1 ml de metanol:agua para obtener una concentración madre de 650 mg/ml para posteriormente ser colocadas en tubos en concentraciones distribuidas en 32mg/ml a 0.25mg/ml

TABLA N°02. Diseño de investigación de las diluciones empleadas en los extractos vegetales por el método de macrodilución

Concentración madre	Transferir	Al tubo que contiene	Concentración resultante	N° del tubos
640mg/ml del extracto	0.2 ml de cc madre	1.8 ml de caldo Müeller - Hilton	32mg/ml	Tubo N° 01
	1ml del tubo N° 01	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	16mg/ml	Tubo N° 02
	1ml del tubo N° 02	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	8mg/ml	Tubo N° 03
	1ml del tubo N° 03	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	4mg/ml	Tubo N° 04
	1ml del tubo N° 04	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	2mg/ml	Tubo N° 05
	1ml del tubo N° 05	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	1mg/ml	Tubo N° 06
	1ml del tubo N° 06	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	0.5mg/ml	Tubo N° 07
	1ml del tubo N° 07	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	0.25mg/ml	Tubo N° 08

ESQUEMA N° 02. Flujograma de distribución de concentración de los extractos en tubos por el método de macrodilución.

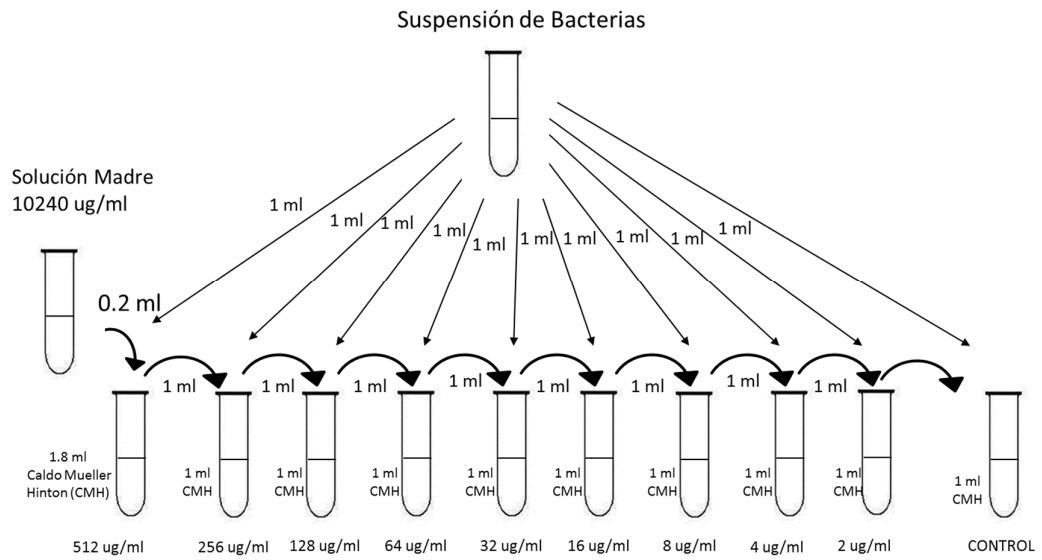


Para la preparación de los controles se empleó 0.64 ml de gentamicina sultafó (160mg/2ml) enrazado con agua destilada hasta 5ml para obtener una concentración madre de 10240 $\mu\text{g/ml}$ para posteriormente ser colocadas en tubos en diferentes concentraciones distribuidas en concentraciones de 512 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$.

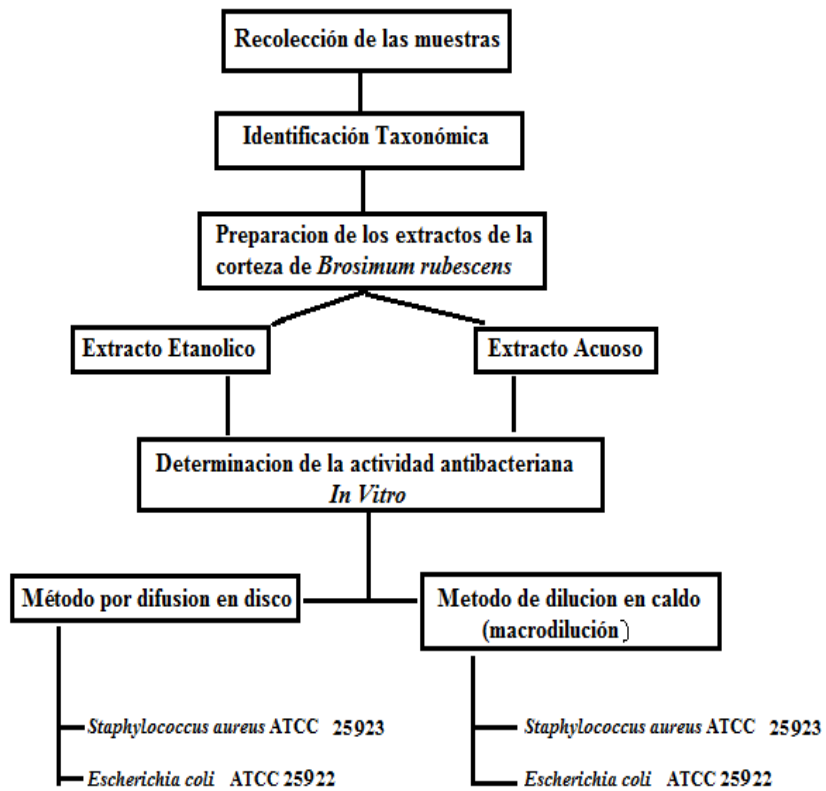
TABLA N° 03. Diseño de investigación de las diluciones empleadas en el control positivo por el método de macrodilución

Concentración control positivo	Transferir	Al tubo que contiene	Concentración resultante	N° del tubos
10240 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina	0.2 ml de cc madre	1.8 ml de caldo Müeller – Hilton	512 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 01
	1ml del tubo N° 01	1 ml de caldo de Müeller - Hilton	256 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 02
	1ml del tubo N° 02	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	128 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 03
	1ml del tubo N° 03	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	64 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 04
	1ml del tubo N° 04	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	32 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 05
	1ml del tubo N° 05	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	16 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 06
	1ml del tubo N° 06	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	8 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 07
	1ml del tubo N° 07	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	4 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 08
	1ml del tubo N° 08	1 ml de caldo de Müeller – Hilton	2 $\mu\text{g/ml}$	Tubo N° 09

ESQUEMA N° 03. **Flujograma de distribución de concentración de los controles en tubos por el método de macrodilución.**



3.1.3. **Flujograma de investigación**



3.2. POBLACION Y MUESTRA

3.2.1. POBLACIÓN

La población estuvo constituida por lo siguiente:

- **Vegetal.** Estuvo constituido por la especie *Brosimum rubescens* (Palisangre)
- **Microbiológica.** Estuvo constituida por las bacterias.

3.2.2. MUESTRA

Las muestras estuvieron constituidas por lo siguiente:

- **Vegetal.** Estuvieron constituidas por los extractos acuoso y etanólico extraídas del tallo de la especie vegetal adulta *Brosimum rubescens* (palisangre)
- **Microbiológica.** Estuvieron constituidas por las cepas bacterianas:
 - *Staphylococcus aureus* **ATCC 25922**
 - *Escherichia coli* **ATCC25922**

3.2.2.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

3.2.2.1.1. Criterios de inclusión

- La especie vegetal adulta seleccionada en estudio, debe estar libre de la presencia de microorganismos (hongos, bacterias y/o parásitos)
- Identificación de la especie vegetal adulta por un profesional botánico

3.2.2.1.2. Criterios de exclusión

- Presencia de microorganismos (hongos, bacterias y/o parásitos) en la vegetal adulta seleccionada.
- Especie vegetal adulta no identificada por un profesional botánico.

3.3. TECNICAS E INSTRUMENTOS

3.3.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ESPECIE VEGETAL

La ubicación de la especie vegetal en estudio se realizó en la Reserva de Alpahuayo Mishana – IIAP localizado a 26 km de la carretera Iquitos – Nauta. (**Anexo 01**)

3.3.1.2. SELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

La selección de la especie vegetal en estudio, se realizó de acuerdo a la aplicación de la experiencia del profesional botánico al momento del reconocimiento del mismo y seleccionándolo y describiéndolo de acuerdo a sus características morfológicas, como tamaño de la especie, grosor y espesor de tronco, etc. (**Anexo 02 y Anexo 03**)

3.3.1.3. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Con el apoyo del profesional botánico, se colectaron las muestras y fueron colocados en bolsas plásticas negras, para protegerlo de la incidencia de la luz solar y facilitar el transporte del mismo.

3.3.1.4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La especie vegetal en estudio fue llevada al *Herbarium Amazonense* de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), para su identificación taxonómica por el profesional botánico responsable del área Ing. forestal *Juan Macedo Ruiz*, quedando identificada por el código 39486,

donde se expidió un certificado de la especie vegetal colectada. (**Anexo 04 y Anexo 05**). Posteriormente la muestra fue depositada en el Laboratorio de Ingeniería y Microbiología Alimentaria de la UNAP.

3.3.1.5. SECADO Y MOLIENDA DE LA MUESTRA

El tallo de la especie vegetal adulta seleccionada, se procedió a cortarlos en pequeños trocitos (en forma de viruta) y secarlo a temperatura ambiente (entre 23 y 30° C), en un lugar apartado del laboratorio, exento de humedad y por un periodo de aproximado de 7 días. (**Anexo 06**).

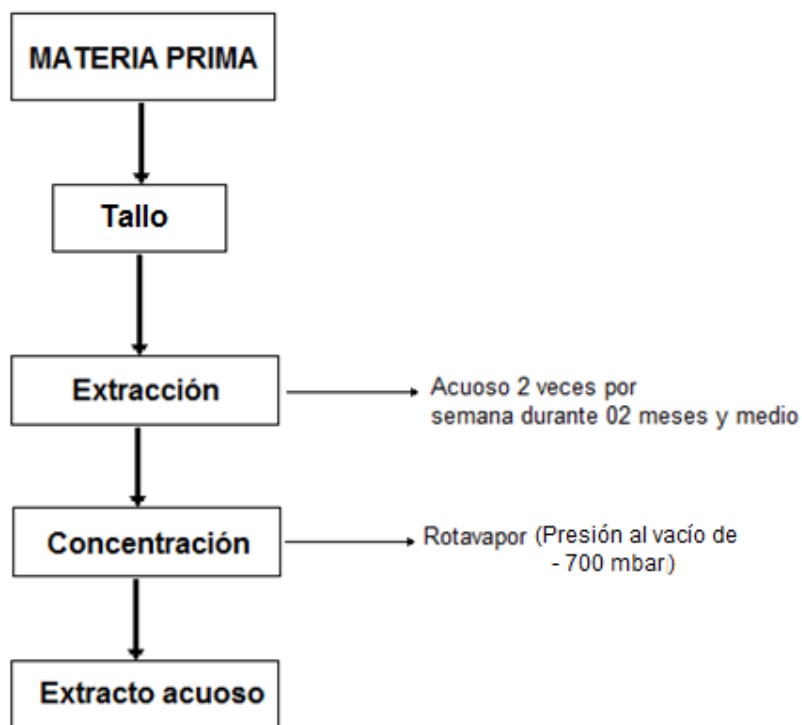
Terminado el periodo de secado, se envaso en recipientes adecuados y fueron conservadas en lugares frescos y secos.

3.3.1.6. PROCESAMIENTOS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

3.3.1.6.1. Obtención del Extracto Acuoso

El extracto acuoso se obtuvo por maceración de la muestra realizándolo por 20 veces consecutivas con agua destilada durante 3 a 4 días por cada extracción. Para cada extracción se pesaron 1000 gramos de la muestra (palisangre), en 2500 ml de agua, dejándolo reposar por un periodo de 4 días. La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 80° C a una presión de 690 mmHg por 03 horas aproximadamente, y posteriormente se dejó reposar para que la concentración de la muestra seque a temperatura ambiente por 2 días. (**Ver Esquema N° 04 y Anexo N° 07**)

ESQUEMA N° 04. **Obtención del extracto Acuoso del tallo de**
Brosimum rubescens

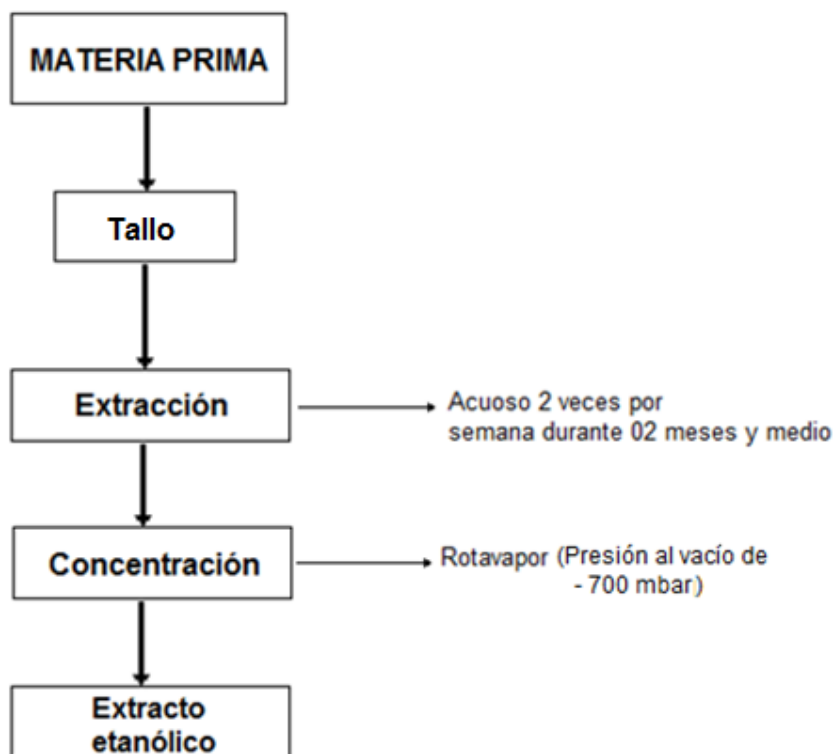


3.3.1.6.2. Obtención del Extracto Etanólico

El extracto etanólico se obtuvo por maceración de la muestra, realizándolo por 10 veces consecutivas con etanol durante 7 días por cada extracción.

Para cada extracción se maceraron 1200 g de materia prima (palisangre), en 3 000 ml de etanol, durante 7 días. La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 60° C y a una presión de 690 mmHg, por espacio de 3 horas aproximadamente, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 3 días (Ver Esquema N° 05 y Anexo N° 07)

ESQUEMA N° 05. **Obtención del extracto Etanólico del tallo de**
Brosimum rubescens.



3.3.1.7. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD Y ACCIÓN ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN POR DISCO.

Esta técnica fue utilizada para determinar la sensibilidad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* (Palisangre) frente a las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

El método empleado para esta prueba fue realizado según los procedimientos establecidos en la Serie de Normas Técnicas N° 30, del Centro de Documentación del Instituto Nacional de Salud (INS)³⁸ tomando como referencia el protocolo M2-A8 - NCCLS.

3.3.1.7.1. PREPARACIÓN Y CONTROL DE LOS EXTRACTOS

Se pesó 500 mg del extracto vegetal colocándolo en viales de tipo Eppendorf estériles, y diluyéndolo en 1 ml de disolución metanol/agua estéril (1:1), alcanzando una concentración de prueba de 500 mg/ml en la concentración madre, para luego pasar a homogeneizarlos mediante vórtex hasta la disolución completa. Aquellos extractos que no se disolvieron por agitación se procedió a colocarlos en baño maría a una temperatura de 40°C por 10 minutos y colocados nuevamente en el vórtex hasta homogenización. Finalizada la homogenización de la concentración madre se preparó los discos para ser impregnados con las diferentes concentraciones en estudio, utilizando una micropipeta de 100 µl y extrayendo 40 µl del extracto para la concentración de 20 mg, 30 µl del extracto para la concentración de 15 mg, 20 µl del extracto para la concentración de 10mg y 10µl para la concentración de 5mg en disco (**Ver Tabla N° 01 en Anexo N° 09**).

Para el control positivo se utilizaron discos impregnados con 10 µg de Gentamicina, los cuales se obtuvieron de una casa matriz y el control negativo se utilizaron discos impregnados con 30 µL. de metanol/agua estéril (1:1)

3.3.1.7.2. INOCULACIÓN

3.3.1.7.2.1. Preparación del inóculo

Se seleccionó cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en agar Müeller - Hilton. Con un asa de siembra se rasgó la superficie del agar de cada colonia y se transfirió a un tubo que contiene de 4 a 5 mL de caldo Müeller Hilton. Se procedió luego a incubar

el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta alcanzar a la turbidez del estándar de 0,5 de la escala de Mc Farland en un lapso de 2 a 6 horas.

Se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina hasta el tubo a 0.5 de la escala de McFarland, por comparación visual con el estándar, utilizando una luz apropiada, y observando los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste (**Ver Anexo N° 10**)

3.3.1.7.2.2. Inoculación de las Placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Müeller - Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

3.3.1.7.3. APLICACIÓN DE LOS DISCOS

Se colocó los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro para evitar la superposición de las zonas de inhibición. El disco no fue removido una vez que tomó contacto con la

superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente. (Ver Anexo N° 10)

3.3.1.7.4. INCUBACIÓN

Se incubó las placas en posición invertida a 35°C 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. (Ver Anexo N° 11)

3.3.1.7.5. 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 un paquímetro o calibrador. Se mantuvo iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro. Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.

El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio visible, que podrá ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que podrán ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. (Ver Anexo N° 11 y Anexo N° 12)

3.3.1.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO (MACRODILUCIÓN)

3.3.1.8.1. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS DILUCIONES

3.3.1.8.1.1. MÉTODO DE DILUCION EN CALDO

Se procedió al pesado de 640 mg de los extractos en viales tipo ependorff estériles, diluidos en 1 ml de disolución metanol/agua (1:1) para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/ ml (Solución madre o Stock).

De la solución madre se extrajo 0.2 ml y fueron añadido al tubo N° 01 que contuvo 1.8 ml de caldo Müeller Hinton. Del tubo N° 01 se extrajo 1 ml para ser añadido al Tubo N° 02 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N°08 y de esta última se extrajo 1 ml la cual fue desechada (**Ver Tabla N° 02, Esquema N° 02, Anexo N° 16**)

Después de este proceso se añadió a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana, siendo 2ml el volumen final mínimo, para cada tubo. Las concentraciones fueron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml.

3.3.1.8.2. PREPARACIÓN DE CONTROLES

El control positivo empleada en la prueba fue el antibiótico gentamicina sulfato (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enraso hasta 5 ml en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10240 µg/ml.

De la solución madre se extrajo 0.2 ml y fue añadido al tubo N° 01 que contuvo 1.8 ml de caldo Müeller Hinton. Del tubo N° 01 se extrajo 1 ml

para ser añadido al Tubo N° 02 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09, de este último se extrajo 1 ml que fue desechado.

Después de este proceso se añadieron a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana. Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 5120 µg/ml a 20 µg/ml. (Ver Tabla N° 03, Esquema N° 03, Anexo N° 15)

3.3.1.8.3. PRUEBA DE DILUCIÓN EN CALDO

3.3.1.8.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo estándar, para macrodilución en caldo, se obtuvo por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica, hasta alcanzar dicha turbidez.

3.3.1.8.3.2. Incubación

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos fue de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución.

3.3.1.8.3.3. Lectura de los resultados

La CIM fue la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo. El punto final quedó definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Para determinar el punto final de desarrollo, se comparó cada tubo con el tubo control de crecimiento.

3.3.2. MATERIALES

3.3.2.1. Medios de cultivo y Reactivos químicos:

- Agar papa dextrosa.
- Agua desionizada
- Agua destilada
- Alcohol 70°
- Alcohol de 96°
- Agar Müeller - Hinton (Laboratorios Merck)
- Caldo Müeller - Hinton (Laboratorios Merck)
- Cloruro de Bario (BaCl_2), para la preparación de Estándar 0.5 de Mc Farland
- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), para la preparación de Estándar 0.5 de Mc Farland
- Solución de MgCl_2

3.3.2.2. Preparación de los extractos vegetales:

3.3.2.1.1. Material biológico

3.3.2.2.1.1. Extracto acuoso

- 1000 g de la muestra seca divididas en pequeños trocitos (viruta)

3.3.2.2.1.2. Extracto etanólico

- 1200 g de la muestra seca dividida en pequeños trocitos (viruta)

3.3.2.3. Materiales de vidrio

- Matraz 1000 ml.
- Vaso precipitado 5, 10, 20, 50 y 100 ml.
- Erlenmeyer 250 y 500 ml.
- Pipeta graduada de 10, 5 y 1 mL.
- Placas Petri
- Pipeta Pasteur
- Probeta 10, 100, 250 y 1000 ml.
- Frascos de vidrio.
- Embudos.
- Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- Bagueta.

3.3.2.4. Material de metal

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

3.3.2.5. Otros materiales

- Algodón.
- Detergente.
- Guantes quirúrgicos.
- Hisopos.
- Mascarillas.
- Papel aluminio.
- Papel de despacho.
- Papel secante.
- Papel tissue.
- Parafilm 2' x 250'
- Plumón marcador.
- Soportes para tubos
- Viales (Eppendorf)
- Cinta adhesiva
- Gasa
- Gorro
- Mascarillas
- Solución desinfectante

- Mandiles
- Disco impregnados con antibiótico y con muestra problema.
- Mortero
- Lentes de protección
- Tubos de hemólisis

3.3.2.6. Equipos

- Autoclave AUTESTER
- Balanza analítica SARTORIUS
- Baño termostado SELECTA PRECISTERM
- Cámara fotográfica profesional
- Centrifuga CHRIST
- Cocina eléctrica.
- Equipo de filtración.
- Estufa SELECTA
- Incubadora Microbiológica.
- Potenciómetro - pHmeter CORNING PR 15
- Refrigeradora FRIOLUX
- Rotavapor BÜCHI
- Cabina de bioseguridad

- Desionizador de agua
- Micropipetas de 10, 20, 30 y 40 uL.
- Pipeteador automático
- Mechero de bunsen
- Bomba al vacío
- Vórtex

3.3.3. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS Y DE LOS ANIMALES

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial³⁹

Principios básicos para la investigación:

- En la investigación, es deber del investigador proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano.
- La investigación en los seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en los experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno.
- Todo proyecto de investigación en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos calculados con los beneficios previsibles para el individuo o para otros. Esto no impide la participación de voluntarios sanos en la investigación. El diseño de todos los estudios debe estar disponible para el público.

- Los investigadores deben abstenerse de participar en proyectos de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.
- La investigación sólo se justifica si existen posibilidades razonables de que la población, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.
- Para tomar parte en un proyecto de investigación, los individuos deben ser participantes voluntarios e informados.
- Siempre debe respetarse el derecho de los participantes en la investigación a proteger su integridad. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de los individuos, la confidencialidad de la información del paciente y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su personalidad e integridad física y mental.
- En toda investigación en seres humanos, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posible conflictos de interés, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. La persona debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represarías.

- Tanto los autores como los editores tienen obligaciones éticas. Al publicar los resultados de su investigación, el médico está obligado a mantener la exactitud de los datos y resultados. Se deben publicar tanto los resultados negativos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y cualquier posible conflicto de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.⁵⁹

3.3.4. CRITERIOS DE BIOSEGURIDAD

3.3.4.1. Área física del laboratorio.

- Se restringió el acceso a personas ajenas al laboratorio.
- Se colocó stickers de señalización de bioseguridad en la entrada al laboratorio.
- En el trabajo diario se descontaminó el área de trabajo (mesa de losa), antes y después de su uso con un desinfectante apropiado.
- En el área de trabajo se tuvo total abstinencia a productos como alimentos, productos de belleza, etc. que pudieran contaminar los cultivos bacteriológicos y las muestras en estudio.

3.3.4.2. Lavados de Manos

- El lavado de manos fue fundamental dentro de la manipulación de cultivos bacteriológicos en estudio, realizándolo en forma correcta con jabón antiséptico adecuado antes y después de utilizar los guantes descartables y en cualquier otra actividad realizada en el laboratorio.

3.3.4.3. Uso de bata o mandil en el laboratorio

- El uso de la bata o mandil fue permanente durante la realización del trabajo en el laboratorio utilizándolo antes de ingresar y retirándolo después de cada jornada en el laboratorio siendo su limpieza en forma interdiaria.⁶⁰

CAPITULO IV

4.1. RESULTADOS

4.1.1. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro

4.1.1.1. METODO POR DIFUSION EN DISCO (AGAR)

El resultado de la actividad antibacteriana de los extractos del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre”, para los organismos padronizados *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), están presentados en las siguientes tablas y gráficos:

TABLA N° 04. Porcentaje de inhibición de los extractos Acuoso y Etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Escherichia coli*.

Cepa <i>Escherichia coli</i>		Extracto			
		Acuoso		Etanólico	
		Inhibición		Inhibición	
		Media	%	Media	%
Concentración del Extracto	5 mg	5,55 ± 0,74	3.61	5,47 ± 0,64	3.06
	10 mg	6,12 ± 0,90	7.36	6,22 ± 0,65	7.93
	15 mg	6,25 ± 0,50	8.21	6,13 ± 0,22	7.35
	20 mg	6,60 ± 0,47	10.51	6,30 ± 0,79	8.45
	Gentamicina 10 µg	20,22 ± 1,10	100.00	20,38 ± 1,13	100.00
	Control Negativo	5,00 ± 0,00	0.00	5,00 ± 0,00	0.00

GRAFICO N° 01. Porcentaje de Inhibición del extracto Acuoso de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Escherichia coli*.

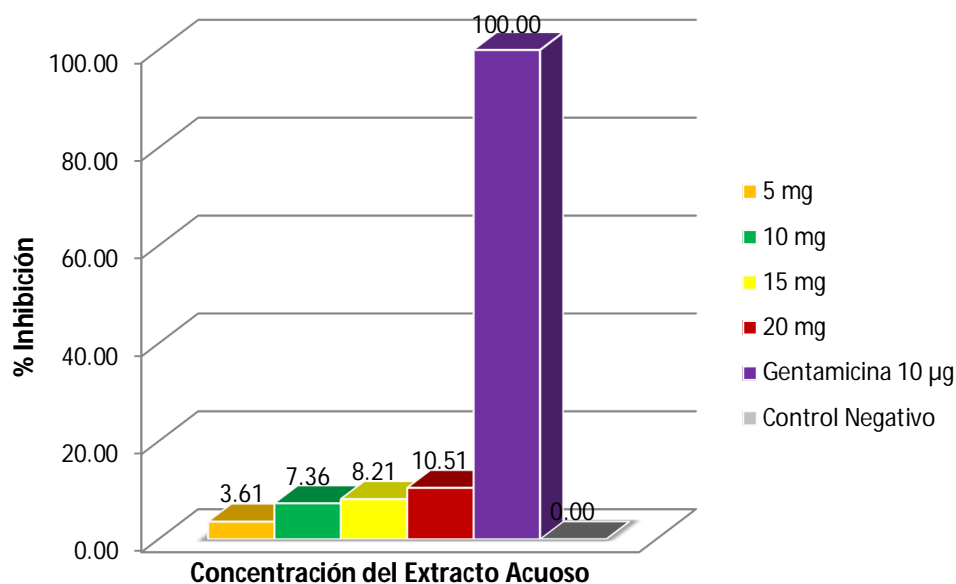
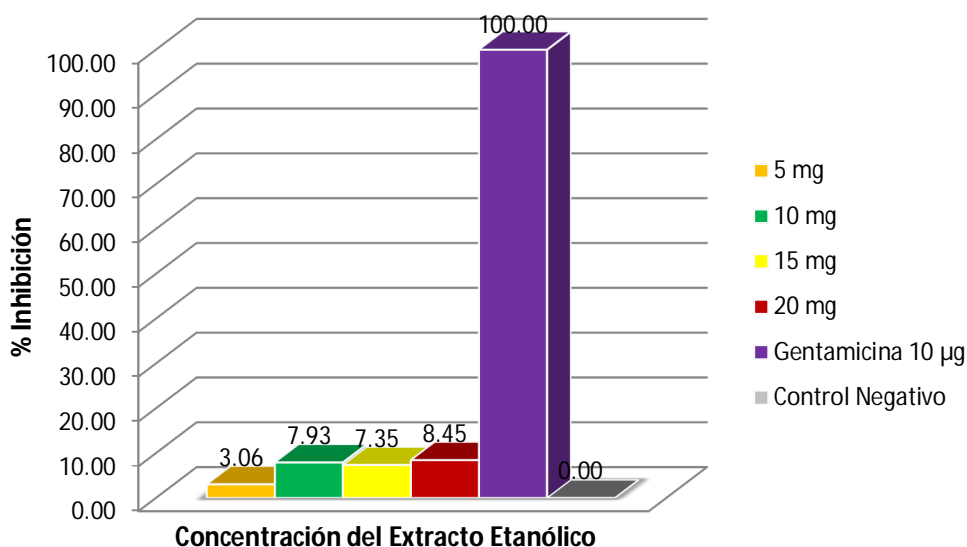


GRAFICO N° 02. Porcentaje de Inhibición del extracto Etanólico de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Escherichia coli*.



En la Tabla N° 04 y Gráficos N° 01 y 02, se puede apreciar que el mayor porcentaje de inhibición tanto del extracto acuoso como etanólico en cepa *Escherichia coli*, se manifestó en la concentración de 20 mg, así mismo notamos que el menor porcentaje de inhibición fue la concentración de 5mg, respectivamente.

TABLA N°05. Porcentaje de inhibición de los extractos Acuoso y Etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Staphylococcus aureus*.

Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	Concentración del Extracto	Extracto			
		Acuoso		Etanólico	
		Media	%	Media	%
	5 mg	5,33 ± 0,41	2.13	5,92 ± 0,66	5.75
	10 mg	5,90 ± 0,48	5.81	7,67 ± 0,88	16.69
	15 mg	6,08 ± 0,85	6.97	7,52 ± 1,21	15.75
	20 mg	5,83 ± 0,52	5.35	7,17 ± 0,82	13.56
	Gentamicina 10 µg	20,50 ± 0,89	100.00	21,00 ± 1,41	100.00
	Control Negativo	5,00 ± 0,00	0.00	5,00 ± 0,00	0.00

GRAFICO N° 03. Porcentaje de Inhibición del extracto Acuoso de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Staphylococcus aureus*.

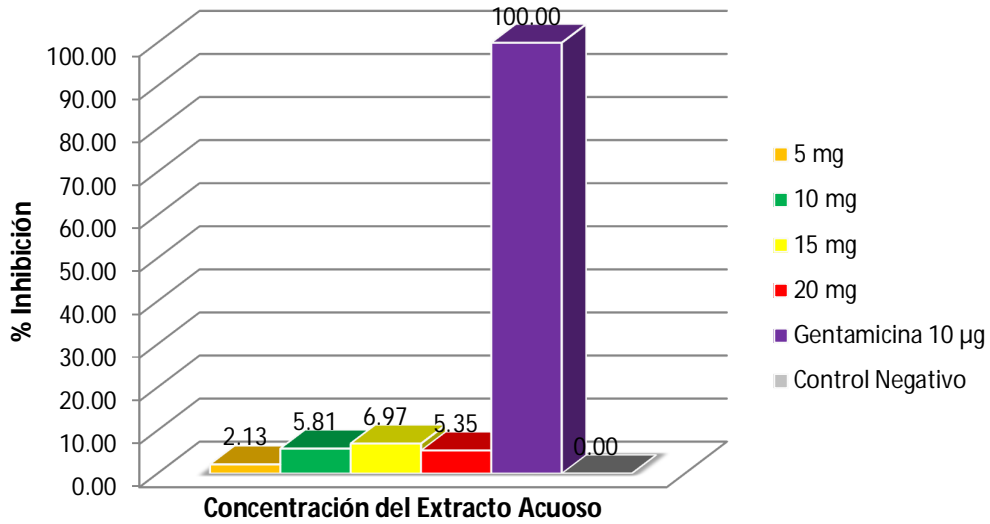
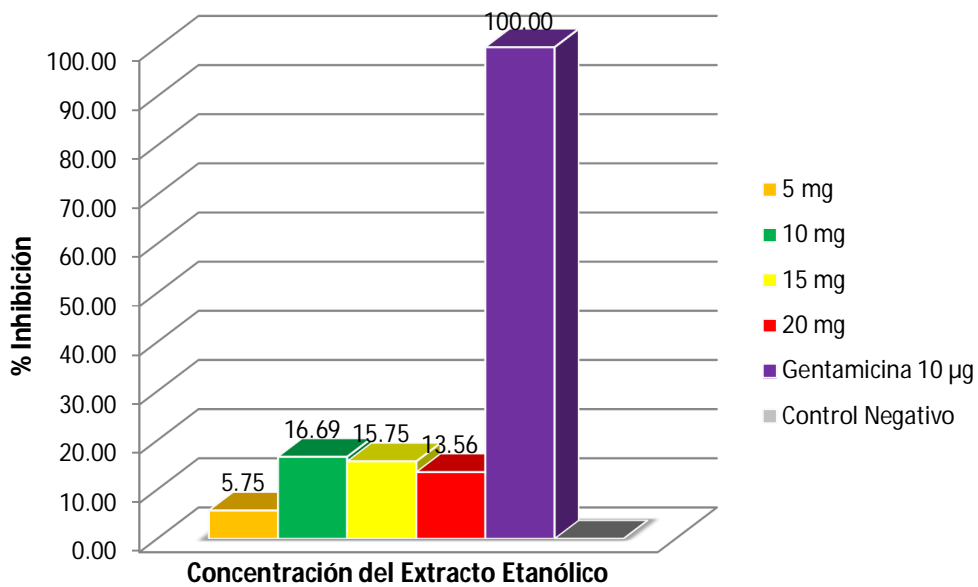


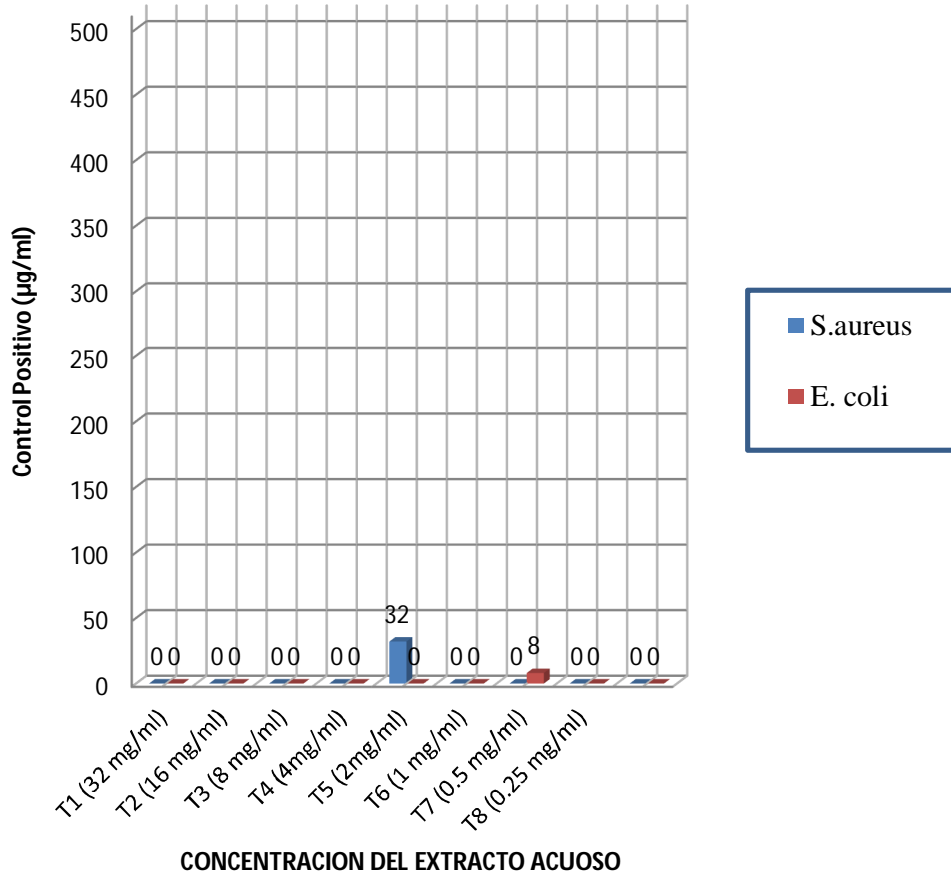
GRAFICO N° 04. Porcentaje de Inhibición del extracto Etanólico de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Staphylococcus aureus*.



En la Tabla N° 05 y Gráficos N° 03 y 04, se puede apreciar que el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento de cepa *Staphylococcus aureus*, se manifestó en la concentración de 10 mg en el extracto etanólico, y en la concentración de 15 mg para el extracto acuoso, así mismo notamos que el menor porcentaje de inhibición en ambos extractos se presentó en concentración de 5mg, respectivamente.

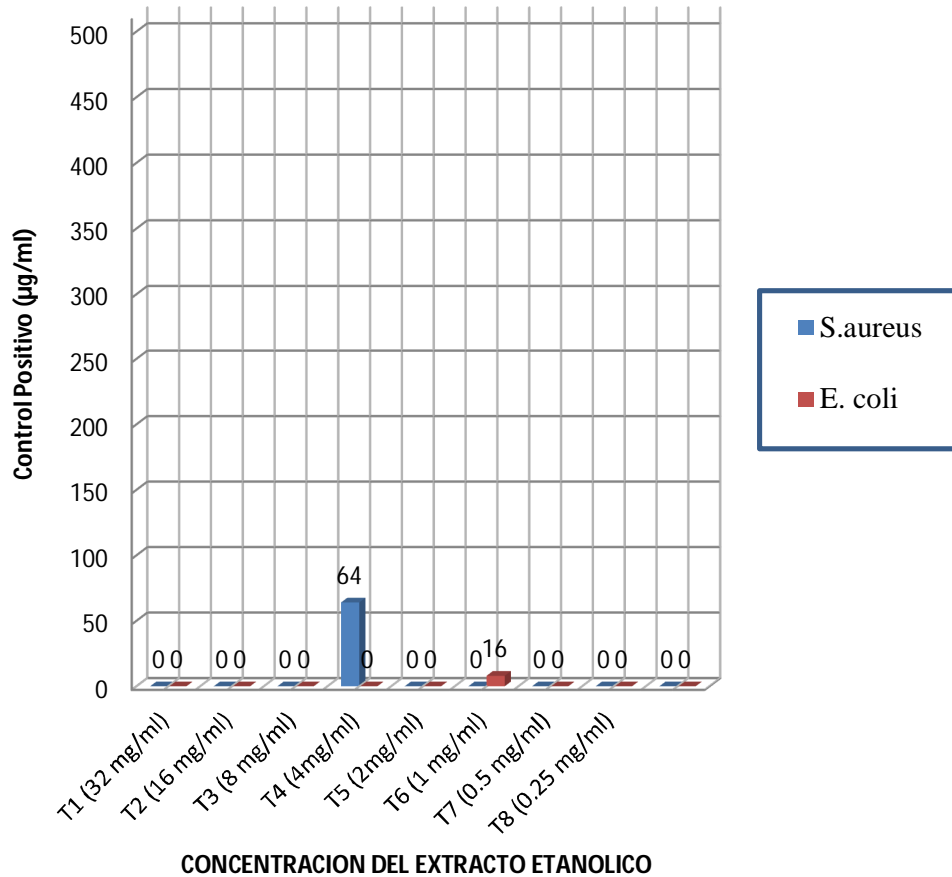
4.1.1.2. METODO DE DILUCION EN CALDO (MACRODILUCION)

GRAFICO N° 05. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto Acuoso de *Brosimum rubescens* “Palisangre” frente a *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli* en comparación al control positivo.



En el Grafico N° 05, se aprecia que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), entre las cepas de bacterias en estudio, la mayor efectividad de CMI se manifestó en el Tubo N° 05 frente a *Staphylococcus aureus*, con una concentración de 2mg/ml comparados frente a su control positivo (32µg/ml), así mismo notamos que la CMI para *Escherichia coli*, se manifestó en el Tubo N° 07, que contuvo la concentración de 0.5mg/ml y comparados frente a su control positivo (83µg/ml).

GRAFICO N° 06. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto etanólico de *Brosimum rubescens* “Palisangre” frente a *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli* en comparación al control positivo.



En el Grafico N° 06, se aprecia que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), entre las cepas de bacterias en estudio, la mayor efectividad de CMI se manifestó en el Tubo N° 04 frente a *Staphylococcus aureus*, con una concentración de 4mg/ml comparados frente a su control positivo (64µg/ml), así mismo notamos que la CMI para *Escherichia coli*, se manifestó en el Tubo N° 06, que contuvo la concentración de 1mg/ml y comparados frente a su control positivo (16µg/ml).

4.1.2. RESULTADOS DE ANALISIS ESTADISTICO

TABLA N° 06. **Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Acuoso en cepa *Escherichia coli*.**

Análisis de varianza para Inhibición, tipo III suma de cuadrados					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1033,909	5	206,782	407,407	0,000
Intersección	2473,404	1	2473,404	4873,170	0,000
CONCENT	1033,909	5	206,782	407,407	0,000
Error	15,227	30	0,508		
Total	3522,540	36			
Total corregida	1049,136	35			

TABLA N° 07. **Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Acuoso en cepa *Escherichia coli*.**

Comparaciones múltiples para Inhibición por Concentración						
Método: DHS de Tukey al 95%						
(I)Concentración del Extracto	(J)Concentración del Extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
5 mg	10 mg	-0,5667	0,41132	0,740	-1,8177	0,6844
	15 mg	-0,7000	0,41132	0,541	-1,9511	0,5511
	20 mg	-1,0500	0,41132	0,141	-2,3011	0,2011
	Gentamicina 10 µg	-14,6667 *	0,41132	0,000	-15,9177	-13,4156
	Control Negativo	0,5500	0,41132	0,762	-0,7011	1,8011
10 mg	5 mg	0,5667	0,41132	0,740	-0,6844	1,8177
	15 mg	-0,1333	0,41132	0,999	-1,3844	1,1177
	20 mg	-0,4833	0,41132	0,845	-1,7344	0,7677
	Gentamicina 10 µg	-14,1000 *	0,41132	0,000	-15,3511	-12,8489
	Control Negativo	1,1167	0,41132	0,102	-0,1344	2,3677
15 mg	5 mg	0,7000	0,41132	0,541	-0,5511	1,9511
	10 mg	0,1333	0,41132	0,999	-1,1177	1,3844
	20 mg	-0,3500	0,41132	0,955	-1,6011	0,9011

	Gentamicina 10 µg	-13,9667 *	0,41132	0,000	-15,2177	-12,7156
	Control Negativo	1,2500	0,41132	0,050	-0,0011	2,5011
20 mg	5 mg	1,0500	0,41132	0,141	-0,2011	2,3011
	10 mg	0,4833	0,41132	0,845	-0,7677	1,7344
	15 mg	0,3500	0,41132	0,955	-0,9011	1,6011
	Gentamicina 10 µg	-13,6167 *	0,41132	0,000	-14,8677	-12,3656
	Control Negativo	1,6000 *	0,41132	0,006	0,3489	2,8511
Gentamicina 10 µg	5 mg	14,6667 *	0,41132	0,000	13,4156	15,9177
	10 mg	14,1000 *	0,41132	0,000	12,8489	15,3511
	15 mg	13,9667 *	0,41132	0,000	12,7156	15,2177
	20 mg	13,6167 *	0,41132	0,000	12,3656	14,8677
	Control Negativo	15,2167 *	0,41132	0,000	13,9656	16,4677
Control Negativo	5 mg	-0,5500	0,41132	0,762	-1,8011	0,7011
	10 mg	-1,1167	0,41132	0,102	-2,3677	0,1344
	15 mg	-1,2500	0,41132	0,050	-2,5011	0,0011
	20 mg	-1,6000 *	0,41132	0,006	-2,8511	-,3489
	Gentamicina 10 µg	-15,2167 *	0,41132	0,000	-16,4677	-13,9656

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .508.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

En el análisis de comparación múltiple de extracto acuoso en la cepa *Escherichia coli*, observamos que la concentración de 20mg presenta una diferencia de media significativa frente al control negativo, con lo que se confirma como la única concentración con mayor efectividad.

Subconjuntos homogéneos

Inhibición

DHS de Tukey^{a,b}

Concentración del Extracto	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control Negativo	6	5,0000		
5 mg	6	5,5500	5,5500	
10 mg	6	6,1167	6,1167	
15 mg	6	6,2500	6,2500	
20 mg	6		6,6000	
Gentamicina 10 µg	6			20,2167
Sig.		0,050	0,141	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .508.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

El análisis de los subconjuntos homogéneos confirma que la media de la concentración de 20 mg es la única significativamente diferente al subconjunto 1, al cual pertenece el control negativo, determinando así que esta concentración es la de mayor efectividad.

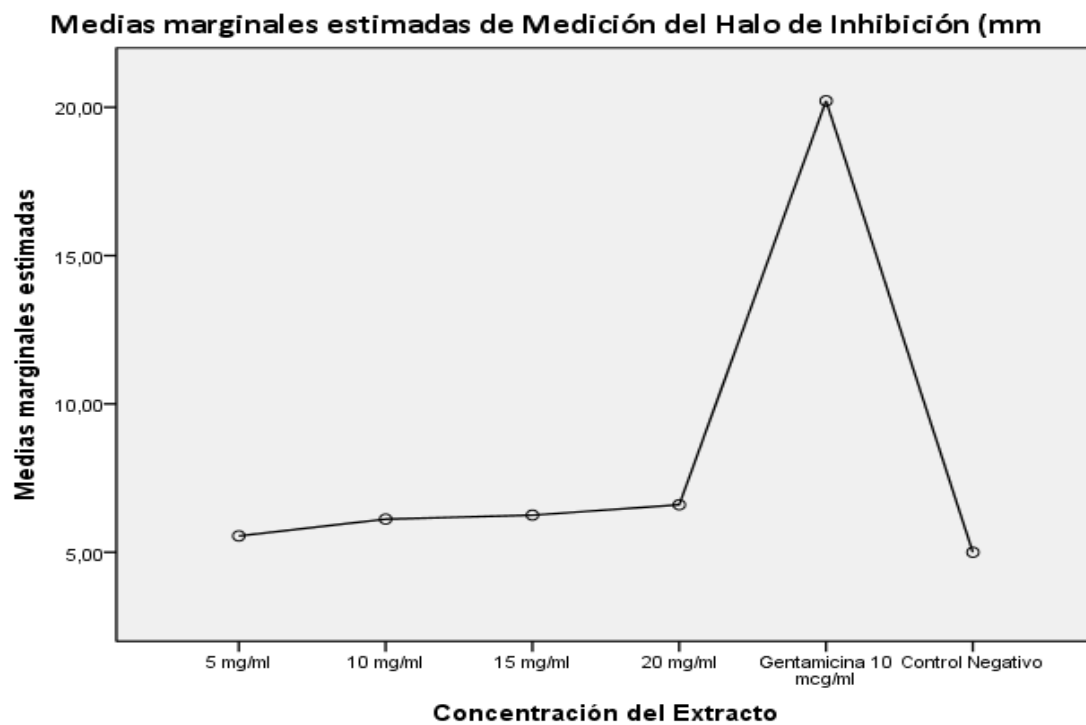


TABLA N° 08. Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Etanólico en cepa *Escherichia coli*

Análisis de varianza para Inhibición, tipo III suma de cuadrados					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1067,667 ^a	5	213,533	461,417	0,000
Intersección	2450,250	1	2450,250	5294,658	0,000
CONCENT	1067,667	5	213,533	461,417	0,000
Error	13,883	30	0,463		
Total	3531,800	36			
Total corregida	1081,550	35			

TABLA N° 09. Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Acuoso en cepa *Escherichia coli*

Comparaciones múltiples para Inhibición por Concentración						
Método: DHS de Tukey al 95%						
(I)Concentración del Extracto	(J)Concentración del Extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
5 mg	10 mg	-0,7500	0,39276	0,416	-1,9446	0,4446
	15 mg	-0,6667	0,39276	0,544	-1,8613	0,5279
	20 mg	-0,8333	0,39276	0,304	-2,0279	0,3613
	Gentamicina 10 mcg	-14,9167*	0,39276	0,000	-16,1113	-13,7221
	Control Negativo	0,4667	0,39276	0,839	-0,7279	1,6613
10 mg	5 ml	0,7500	0,39276	0,416	-0,4446	1,9446
	15 mg	0,0833	0,39276	1,000	-1,1113	1,2779
	20 mg	-0,0833	0,39276	1,000	-1,2779	1,1113
	Gentamicina 10 µg	-14,1667*	0,39276	0,000	-15,3613	-12,9721
	Control Negativo	1,2167*	0,39276	0,044	0,0221	2,4113
15 mg	5 mg	0,6667	0,39276	0,544	-0,5279	1,8613
	10 mg	-0,0833	0,39276	1,000	-1,2779	1,1113
	20 mg	-0,1667	0,39276	0,998	-1,3613	1,0279
	Gentamicina 10 µg	-14,2500*	0,39276	0,000	-15,4446	-13,0554
	Control Negativo	1,1333	0,39276	0,071	-0,0613	2,3279
20 mg	5 mg	0,8333	0,39276	0,304	-0,3613	2,0279
	10 mg	0,0833	0,39276	1,000	-1,1113	1,2779
	15 mg	0,1667	0,39276	0,998	-1,0279	1,3613
	Gentamicina 10 µg	-14,0833*	0,39276	0,000	-15,2779	-12,8887

	Control Negativo	1,3000*	0,39276	0,027	0,1054	2,4946
Gentamicina 10 µg	5 mg	14,9167*	0,39276	0,000	13,7221	16,1113
	10 mg	14,1667*	0,39276	0,000	12,9721	15,3613
	15 mg	14,2500*	0,39276	0,000	13,0554	15,4446
	20 mg	14,0833*	0,39276	0,000	12,8887	15,2779
	Control Negativo	15,3833*	0,39276	0,000	14,1887	16,5779
Control Negativo	5 mg	-0,4667*	0,39276	0,839	-1,6613	0,7279
	10 mg	-1,2167*	0,39276	0,044	-2,4113	-0,0221
	15 mg	-1,1333*	0,39276	0,071	-2,3279	0,0613
	20 mg	-1,3000*	0,39276	0,027	-2,4946	-0,1054
	Gentamicina 10 µg	-15,3833*	0,39276	0,000	-16,5779	-14,1887

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .463. *

La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

En el análisis de comparación múltiple de extracto etanólico en la cepa *Escherichia coli*, observamos que las concentraciones de 20 mg y 10 mg presentan una diferencia de media significativa frente al control negativo, con lo que se confirma como las concentraciones de mayor efectividad.

Subconjuntos homogéneos

Inhibición

DHS de Tukey^{a,b}

Concentración del Extracto	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control Negativo	6	5,0000		
5 mg	6	5,4667	5,4667	
15 mg	6	6,1333	6,1333	
10 mg	6		6,2167	
20 mg	6		6,3000	
Gentamicina 10 µg	6			20,3833
Sig.		0,071	0,304	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .463.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

El análisis de los subconjuntos homogéneos confirma que la media de las concentraciones de 20 y 10 mg son las únicas significativamente diferentes al subconjunto 1, al cual pertenece el control negativo, determinando así que estas concentraciones son la de mayor efectividad

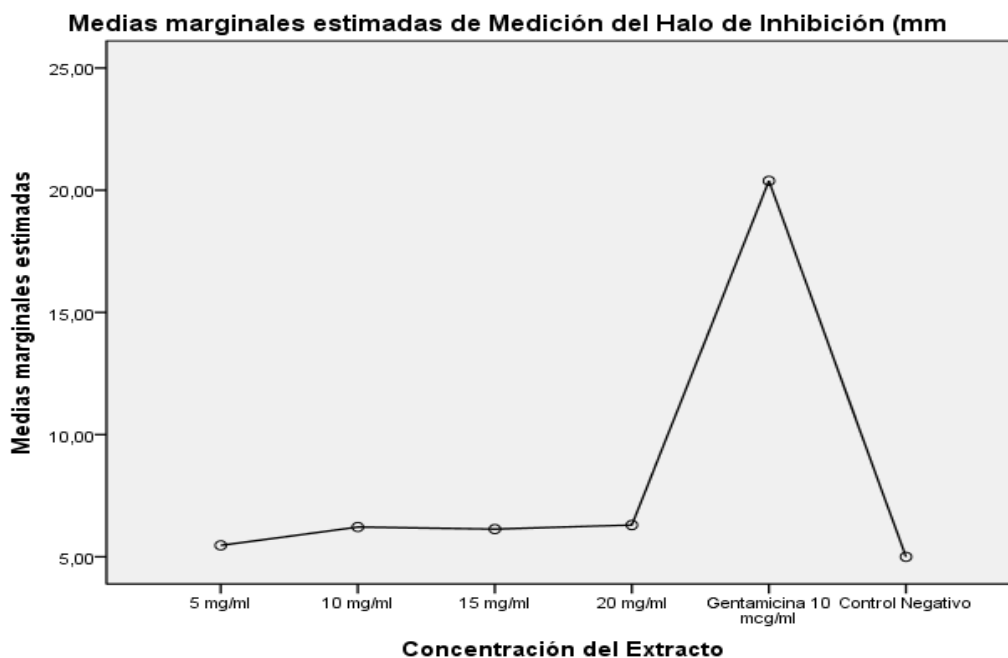


TABLA N° 10. Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Acuoso en cepa *Staphylococcus aureus*.

Análisis de varianza para Inhibición, tipo III suma de cuadrados

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1110,412 ^a	5	222,082	611,517	0,000
Intersección	2366,822	1	2366,822	6517,180	0,000
CONCENT	1110,413	5	222,083	611,517	0,000
Error	10,895	30	0,363		
Total	3488,130	36			
Total corregida	1121,307	35			

**TABLA N° 11. Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición –
Concentración del Extracto Acuoso en cepa *Staphylococcus aureus*.**

Comparaciones múltiples para Inhibición por Concentración						
Método: DHS de Tukey al 95%						
(I)Concentración del Extracto	(J)Concentración del Extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
5 mg	10 mg	-0,5667	0,34793	0,587	-1,6249	0,4916
	15 mg	-0,7500	0,34793	0,288	-1,8083	0,3083
	20 mg	-0,5000*	0,34793	0,705	-1,5583	0,5583
	Gentamicina 10 µg	-15,1667*	0,34793	0,000	-16,2249	-14,1084
	Control Negativo	0,3333	0,34793	0,927	-0,7249	1,3916
10 mg	5 mg	0,5667	0,34793	0,587	-0,4916	1,6249
	15 mg	-0,1833	0,34793	0,995	-1,2416	0,8749
	20 mg	0,0667*	0,34793	1,000	-0,9916	1,1249
	Gentamicina 10 µg	-14,6000*	0,34793	0,000	-15,6583	-13,5417
	Control Negativo	0,9000	0,34793	0,132	-0,1583	1,9583
15 mg	5 mg	0,7500	0,34793	0,288	-0,3083	1,8083
	10 mg	0,1833	0,34793	0,995	-0,8749	1,2416
	20 mg	0,2500*	0,34793	0,978	-0,8083	1,3083
	Gentamicina 10 µg	-14,4167*	0,34793	0,000	-15,4749	-13,3584
	Control Negativo	1,0833	0,34793	0,042	0,0251	2,1416
20 mg	5 mg	0,5000	0,34793	0,705	-0,5583	1,5583
	10 mg	-0,0667	0,34793	1,000	-1,1249	0,9916
	15 mg	-0,2500*	0,34793	0,978	-1,3083	0,8083
	Gentamicina 10 µg	-14,6667*	0,34793	0,000	-15,7249	-13,6084
	Control Negativo	0,8333	0,34793	0,190	-0,2249	1,8916
Gentamicina 10 µg	5 mg	15,1667*	0,34793	0,000	14,1084	16,2249
	10 mg	14,6000*	0,34793	0,000	13,5417	15,6583
	15 mg	14,4167*	0,34793	0,000	13,3584	15,4749
	20 mg	14,6667*	0,34793	0,000	13,6084	15,7249
	Control Negativo	15,5000*	0,34793	0,000	14,4417	16,5583
Control Negativo	5 mg	-0,3333	0,34793	0,927	-1,3916	0,7249
	10 mg	-0,9000*	0,34793	0,132	-1,9583	0,1583
	15 mg	-1,0833*	0,34793	0,042	-2,1416	-0,0251
	20 mg	-0,8333*	0,34793	0,190	-1,8916	0,2249
	Gentamicina 10 µg	-15,5000*	0,34793	0,000	-16,5583	-14,4417

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .363.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

En el análisis de comparación múltiple Extracto Acuoso en cepa *Staphylococcus aureus*, observamos que la concentración de 15 mg presenta una diferencia de media significativa frente al control negativo, con lo que se confirma como la concentración de mayor efectividad.

Subconjuntos homogéneos

Inhibición

DHS de Tukey^{a,b}

Concentración del Extracto	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control Negativo	6	5,0000		
5 mg	6	5,3333	5,3333	
20 mg	6	5,8333	5,8333	
10 mg	6	5,9000	5,9000	
15 mg	6		6,0833	
Gentamicina 10 µg	6			20,5000
Sig.		0,132	0,288	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .363.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

El análisis de los subconjuntos homogéneos confirma que la media de la concentración de 15 mg es la única significativamente diferente al subconjunto 1, al cual pertenece el control negativo, determinando así que esta concentración es la de mayor efectividad.

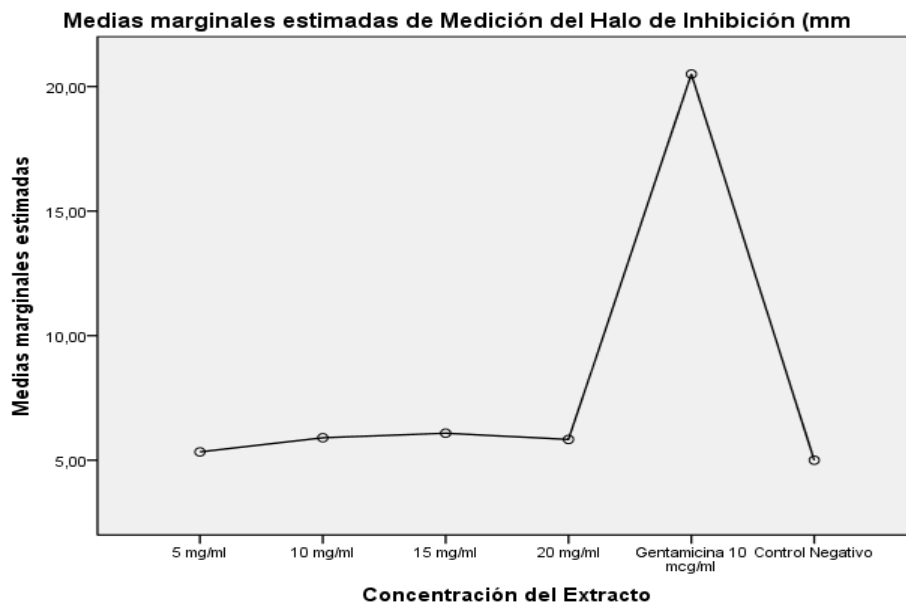


TABLA N° 12. Análisis estadístico por el método ANOVA de las interacciones entre las concentraciones del extracto Etanólico en cepa *Staphylococcus aureus*.

Análisis de varianza para Inhibición, tipo III suma de cuadrados					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1061,006	5	212,201	238,577	0,000
Intersección	2944,871	1	2944,871	3310,911	0,000
CONCENT	1061,006	5	212,201	238,577	0,000
Error	26,683	30	0,889		
Total	4032,560	36			
Total corregida	1087,689	35			

TABLA N° 13. Análisis de comparación múltiple para la interacción inhibición – Concentración del Extracto Etanólico en cepa *Staphylococcus aureus*.

Comparaciones múltiples para Inhibición por Concentración						
Método: DHS de Tukey al 95%						
(I)Concentración del Extracto	(J)Concentración del Extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
5 mg	10 mg	-1,7500*	0,54450	0,034	-3,4062	-0,0938
	15 mg	-1,6000	0,54450	0,063	-3,2562	0,0562
	20 mg	-1,2500	0,54450	0,227	-2,9062	0,4062
	Gentamicina 10 µg	-15,0833*	0,54450	0,000	-16,7395	-13,4272
	Control Negativo	0,9167	0,54450	0,553	-,7395	2,5728
10 mg	5 mg	1,7500*	0,54450	0,034	0,0938	3,4062
	15 mg	0,1500	0,54450	1,000	-1,5062	1,8062
	20 mg	0,5000	0,54450	0,939	-1,1562	2,1562
	Gentamicina 10 µg	-13,3333*	0,54450	0,000	-14,9895	-11,6772
	Control Negativo	2,6667*	0,54450	0,000	1,0105	4,3228
15 mg	5 mg	1,6000	0,54450	0,063	-0,0562	3,2562
	10 mg	-0,1500	0,54450	1,000	-1,8062	1,5062
	20 mg	0,3500	0,54450	0,987	-1,3062	2,0062
	Gentamicina 10 µg	-13,4833*	0,54450	0,000	-15,1395	-11,8272
	Control Negativo	2,5167*	0,54450	0,001	0,8605	4,1728
20 mg	5 mg	1,2500	0,54450	0,227	-0,4062	2,9062
	10 mg	-0,5000	0,54450	0,939	-2,1562	1,1562
	15 mg	-0,3500*	0,54450	0,987	-2,0062	1,3062
	Gentamicina 10 µg	-13,8333*	0,54450	0,000	-15,4895	-12,1772

	Control Negativo	2,1667*	0,54450	0,005	0,5105	3,8228
Gentamicina 10 µg	5 mg	15,0833*	0,54450	0,000	13,4272	16,7395
	10 mg	13,3333*	0,54450	0,000	11,6772	14,9895
	15 mg	13,4833*	0,54450	0,000	11,8272	15,1395
	20 mg	13,8333*	0,54450	0,000	12,1772	15,4895
	Control Negativo	16,0000	0,54450	0,000	14,3438	17,6562
Control Negativo	5 mg	-0,9167*	0,54450	0,553	-2,5728	0,7395
	10 mg	-2,6667*	0,54450	0,000	-4,3228	-1,0105
	15 mg	-2,5167*	0,54450	0,001	-4,1728	-0,8605
	20 mg	-2,1667*	0,54450	0,005	-3,8228	-0,5105
	Gentamicina 10 µg	-16,0000	0,54450	0,000	-17,6562	-14,3438

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .889.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05

En el análisis de comparación múltiple Extracto etanólico en cepa *Staphylococcus aureus*, observamos que las concentraciones de 10, 15, 20 mg presentan una diferencia de media significativa frente al control negativo, con lo que se confirma como las concentraciones de mayor efectividad.

Subconjuntos homogéneos

Inhibición

DHS de Tukey^{a,b}

Concentración del Extracto	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Control Negativo	6	5,0000			
5 mg	6	5,9167	5,9167		
20 mg	6		7,1667	7,1667	
15 mg	6		7,5167	7,5167	
10 mg	6			7,6667	
Gentamicina 10 µg	6				21,0000
Sig.		0,553	0,063	0,939	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

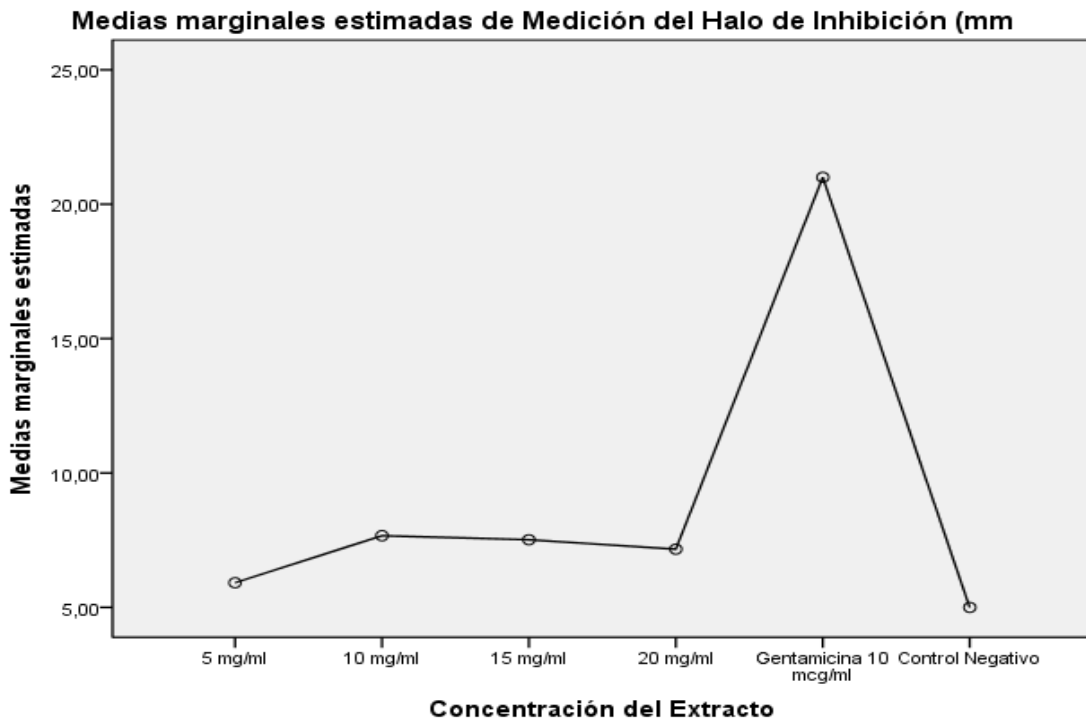
Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .889.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000

b. Alfa = .05.

El análisis de los subconjuntos homogéneos confirma que la media de la concentración de 10, 15 y 20 mg son las únicas significativamente diferentes al subconjunto 1, al cual pertenece el control negativo, determinando así que estas concentraciones son la de mayor efectividad.



4.2. DISCUSION

El método de difusión en agar es una técnica de bioensayo utilizado para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana. Normalmente, esa técnica verifica cuales extractos vegetales presentan potencial actividad antimicrobiana y cuales organismos son susceptibles.

El análisis antibacteriano de *Brosimum rubescens* (Palisangre), realizado en este estudio, presentó consistencia en sus propiedades antibacterianas, pues de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos, se comprobó la actividad antibacteriana de la planta, de acuerdo a los estudios realizados a la misma.

El presente trabajo de investigación, en los ensayos realizados para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso y etanólico del tallo de *Brosimum rubescens*, mediante el método de Difusión en Agar, mostraron que presenta actividad antibacteriana, en 10.51% de inhibición, para el extracto acuoso frente a *Escherichia coli* y 16.69% de inhibición, para el extracto Etanólico frente a *Staphylococcus aureus*. Este resultado es semejante al estudio realizado por **Alanís Ríos A. (2006)**, quien utiliza en la determinación de la actividad antibacteriana, a *dorsteria contrajeva* “Mano de León”, una especie perteneciente a la familia moraceae, encontrando en el extracto hidroalcohólico, a la concentración del extracto de 8mg/ml, una inhibición del crecimiento bacteriano del 35% frente a *Escherichia coli*.

En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, los resultados obtenidos por el método de Dilución en caldo (Macro dilucion) los extractos del tallo de *Brosimum rubescens*, mostró una inhibición del crecimiento bacteriano de 2mg/ml para el extracto acuoso frente a la cepa de *Escherichia coli* y de 4mg/ml para el extracto etanólico frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*. Estos resultados fueron comparados con trabajos realizados por **Bussman et al**⁴¹ en octubre del 2011, titulado “Minimum Inhibitory Concentration of medicinal plants in Northen Peru as antibacterial remedies”, donde menciona que los extractos que presentan una CMI > 5mg/ml son sustancias candidatas a producir una fuerte actividad antimicrobiana y en

sus resultados encontrados para la especie *Brosimum rubescens* (palisangre) fueron de 4 mg/ml para extracto etanólico y 2mg/ml para el extracto acuoso respectivamente, siendo similar a los resultados encontrados en nuestro estudio de experimentación.

La no inhibición de crecimiento con el control, muestra que el etanol no ejerció influencia sobre los resultados de la actividad de los extractos. Siendo así el resultado indica que los mismos microorganismos en los ensayos de difusión fueron afectados por el extracto bruto.

4.3. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo en base a las condiciones experimentales, se puede concluir que en la evaluación de la actividad antibacteriana utilizando el método de difusión en agar, el extracto del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre” presentó actividad antibacteriana *in vitro*, inhibiendo el crecimiento de las respectivas bacterias, en un 10.51% para el extracto acuoso frente a cepa *Escherichia coli* y 16.69% para el extracto etanólico frente a la cepa *Staphylococcus aureus*, así con mayor sensibilidad posible para afirmar su actividad, existiendo diferencias significativas en el promedio del crecimiento de las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con relación al extracto etanólico y esto en comparación con el control positivo en cada microorganismo evaluado.

Aunque la búsqueda de nuevos antibacterianos puede permitir una mejoría en el tratamiento de las infecciones por microorganismos patógenos a moléculas convencionales, donde actualmente estas cepas están siendo controladas por pocos antibacterianos, contra los cuales puede rápidamente surgir un proceso de resistencia. Con estas nuevas fuentes para el descubrimiento de antibacterianos, sean esos de origen vegetal, animal o sintética, son de gran interés para la comunidad mundial.

4.4. **RECOMENDACIONES**

Debido a que dentro del trabajo en estudio, se utilizó el extracto bruto del tallo de la muestra vegetal, se recomienda realizar estudios de fraccionamiento de los extractos que presentaron mayor actividad antibacteriana, con el objetivo de profundizar su estudio.

El método de difusión en agar, es una técnica de laboratorio no confirmativa total en la determinación de la eficacia de las plantas utilizadas en medicina tradicional, sin embargo confirma por este método simple de laboratorio, en efecto, es muy adecuado para la evaluación inicial de la eficacia de los extractos de vegetales en la inhibición del crecimiento bacteriano, por lo que en el presente estudio realizado, se recomienda desarrollar protocolos de investigación a fin de corroborar la susceptibilidad bacteriana, para así validar los resultados obtenidos en el presente estudio, Así como controlar los intervalos que influyen en la determinación de la actividad antibacteriana a fin de evitar de posibles errores que puedan repercutir en los resultados así como prevenir la contaminación de microorganismos dentro de los ensayos en estudio.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **BURKE A.** *Antibiotic Resistance*. Medical Clinic of North America. 84(6): November, 2000.
2. **SUSSMANN O.** *Apuntes de resistencia bacteriana*, (2001) inédito.
3. **DAZA PEREZ R.M.** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Revista de Información terapéutica del Sistema nacional de Salud. Vol. 22 – N° 3. Madrid – España 1998
4. **VIEIRA, L.** Fitoterapia da Amazonas. Manual das Plantas Medicinal. Sao Paulo: Editora Agronómica Ceres (1992). . Pág 15-20.
5. **BRACK, A.** Plantas utilizadas en el Perú en relación con la salud humana. En salud y población indígena de la amazonia. Quito 1993. Cap. II: 61 – 175
6. **BURIGO, M.** “O resgate da tradição fitoterapêutica. En salud y población indígena de la amazonia. Quito 1993. Cap II: 47 – 59
7. **MEJIA K, RENGIFO E.** Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. Segunda edición AECI-GRL-IIAP. Pág 7 - 8
8. **CUNHA, A. P.** Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa. Fundação Catalouste. Gulbenkian, 2005
9. **MENDOÇA – FILHO, R. F. MENEZES, F. S.** Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande – RJ. Bras Farmacogn 13 (Supl): 55 – 58. 2003
10. **VENDRUSCOLO, G. S. RATES, S. M. MENTZ, L. A.** Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grosso, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2005

11. **ALVES, L. F.** O laboratorio da Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. *Revistas Fitos*. V1, n.2, Pag. 30 – 40. São Paulo. 2005
12. **SINGH, K. SHUKLA, N.** Activity on multiple resisten bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia*, v. 55. P 313 – 315. 1984
13. **AVANCINI, C. W IEST, J. MUNDTOCK, E.** Bacteriostatic and bactericidal of the *Baccharis trimera* (Less) D.C. – Compositae decoto, as desinfectant or antisseptic. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*.V.52, pag. 230 – 234 (2000)
14. **MIGUEL M. D. MIGUELO O. G.** Desenvolvimento de fitoterápicos. 2ª ed. São Paulo: Robe Editorial. 2004
15. **SANDOVAL M., CUCA SUÁREZ L.** Identificación de metabolitos secundarios de *Brosimum rubescens* (MORACEAE). Determinación de Actividad Antimalárica. *Scientia et técnica*; 1997. vol. XIII, nº 033, Universidad Tecnológica de Pereira; Colombia. P.129-131
16. **LOIZEAU, P. A; SPICHIGER, RODOLPHE.** Contribución a la Flora de la Amazonía Peruana. Génova, 1990. p. 17-85. IIAP-PUB.033.
17. **DIWARA, M.M.; TRUMBLE, J. T.** Linear Furanocoumarins. In: D’MELLO, J. P. (Ed). *Handbook of Plant Fungal Toxicants*. New York; CRC Press, 1997. Cap.12, p.175-189
18. **GODOY, M. BELLINI, A. GUERREIRO, G. ROCHA, W. BUENO, O. HEBLING, M. BACCCI-JR, M. SILVA, M. VIEIRA, P. FERNANDES, J. PAGNOCCA, F.** Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cuttingants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; 2005. 16(3B): 669-672
19. **YVONE B. M. POULIQUEN, A, DE SOUZA L, GILVANDETE M. P. SANTIAGO, ANGELA MARTHA C. ARRIAGA E MARCOS CARLOS DE MATTOS.** Estudo da toxicidade de produtos obtidos da reação da xantiletina com hipoclorito de sódio sobre *artemia salina*; 2005

20. **HAYASIDA, WILLIAN ET AL.** Proposta de aproveitamento em resíduos de pau-rainha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo setor madeireiro. Acta Amazônia, 2008 vol. 38, Nº4, pp. 749-752.
21. **REYNEL, C. PENNINGTON, T. PENNINGTON, R. FLORES, C. DAZA, A.** Árboles útiles de la Amazonia Peruana y sus usos. Manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Ilustraciones C. Reynel. 2003
22. **VÁSQUEZ R.** Florula de las Reservas Biológicas de Iquitos - Perú; 1ra edición. Missouri Botanical Garden (USA) 1997.
23. **SOUZA, F. MELO, C. CITÓ, M. FELIX, F. VASCONCELOS, S. FONTELES, M. BARBOSA-FILHO, J. VIANA, G.** Plantas medicinais e seus constituintes bioativos. Uma revisão da bioactividade e potenciais beneficios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. Farmacogn 18: 642 – 654. 2008
24. **SACSAQUISPE, R. VELÁSQUEZ, J.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.
http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf
25. **GARCIA, J. CANTON, F. GARCIA SANCHEZ J. MARTINEZ L. RODRIGUEZ, C. VILA, J.** Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid. 2000
26. **PROESTOS, C. BOZIARIS, I.S. NYCHAS, G.J.E. KOMAITIS, M.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chem. 2006; 95: 664-671.
27. **RADULOVIC, N., STANKOV-JOVANOVIC, G., SMELCEROVIC, A., SPITELLER, M., ASAKAWA, Y.** Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. Food Chem. 2007; 103(1): 15-21.

28. **KUCUK, M. KOLAYLI, S. KARAOGLU, S. ULUSOY, E. BALTACI, C. CANDAN, F.** Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from *Anatolia*. *Food Chem.* 2007; 100: 526-534.
29. **KELMANSON, J. E. JAGER, A. K. VAN STADEN, J.** Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 69: 241-246.
30. **CIMANGA, K., KAMBU, K., TONA, L., APERS, S., DE BRUYNE, T., HERMANS, N., TOTTÉ, J., PIETERS, L., VLIETINCK, A.J.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 79: 213-220.
31. **FENNELL, C.W. LINDSEY, K. L. MCGAWB, L. J. SPARG, S. G. STAFFORD, G. I. ELGORASHI, E. E. GRACE, O. M. VAN STADEN, J.** Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94: 205-217.
32. **MORENO, G.M.** “El nance [(*Byrsonima crassifolia* L) H.B.K.] como recurso natural antimicrobiano en enfermedades gastrointestinales y respiratorias”. Universidad de Ciencias y Artes del estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, 2000; Pág. 74.
33. **JOVEL, E.M. CABANILLAS, J. TOWERS, G.H.** An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Meztizo people of Suni Mirafío, Loreto, Peru. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 53: 149-156.
34. **DORDEVIC, S. PETROVIC, S. DOBRIC, S. MILENKOVIC, M. VUCICEVIC, D. ZIZIC, S. KUKIC, J.** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 109: 458-463.
35. **CERCENADO E. Y SAAVEDRA - LOZANO J.** Desde el laboratorio a la clínica. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continental.* 2009;7(4):214-7
36. **ALONSO J. Y DESMARCHELIER C.** Técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales. *FITOMEDICINA.* (2006). Disponible en

http://www.plantasmedicinales.org/archivos/tecnicas_de_comprobacion_de_actividades_biologicas_con_extractos_vegetales.pdf

37. **BOOKS F, BUTEL J, MORSE S.** Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Aldelberg. Ed. Manual moderno 18^a edición, MEXICO 2005. Pág 159-192
38. **NCCLS. ANTIMICROBIAL DISK DIFFUSION SUSCEPTIBILITY (BAUER, KIRBY, SHERRIS AND TURK METHOD).**
<http://www.cms.gov/regulationsandguidance/legislation/cia/downloads/sc04163.pdf>
39. **ASOCIACION MÉDICA MUNDIAL (WMA - 2012).** Declaración de Helsinki. Principios éticos en la investigación Seres Humanos. Disponible en
<Http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html>
40. **ALANIS R. ELMA.** Evaluación de la actividad de algunas plantas medicinales, utilizadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum L.* (Granado). Instituto politécnico Nacional. Mexico. 2006
41. **BUSSMANN R.W, MALCA-GARCÍA G, GLENN A, SHARON D, CHAIT G, DÍAZ D, POURMAND K, JONAT B, SOMOGY S, GUARDADO G, AGUIRRE C, CHAN R, MEYER K, KUHLMAN A, TOWNESMIT A, EFFIO-CARBAJAL J, FRÍAS-FERNANDEZ F, BENITO M.** Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Perú as antibacterial remedies. J Ethnopharmacol October. 2011
42. **OBREGÓN L.** Fitoterapia: *Importancia de su desarrollo al servicio de salud FITO 2003.* Lima, Perú.
43. **MACHADO L.** *Materia primas vegetales para la industria de fitofármacos FITO 2003* Lima- Perú.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO N° 01.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA RESERVA NACIONAL ALPAHUAYO – MISHANA

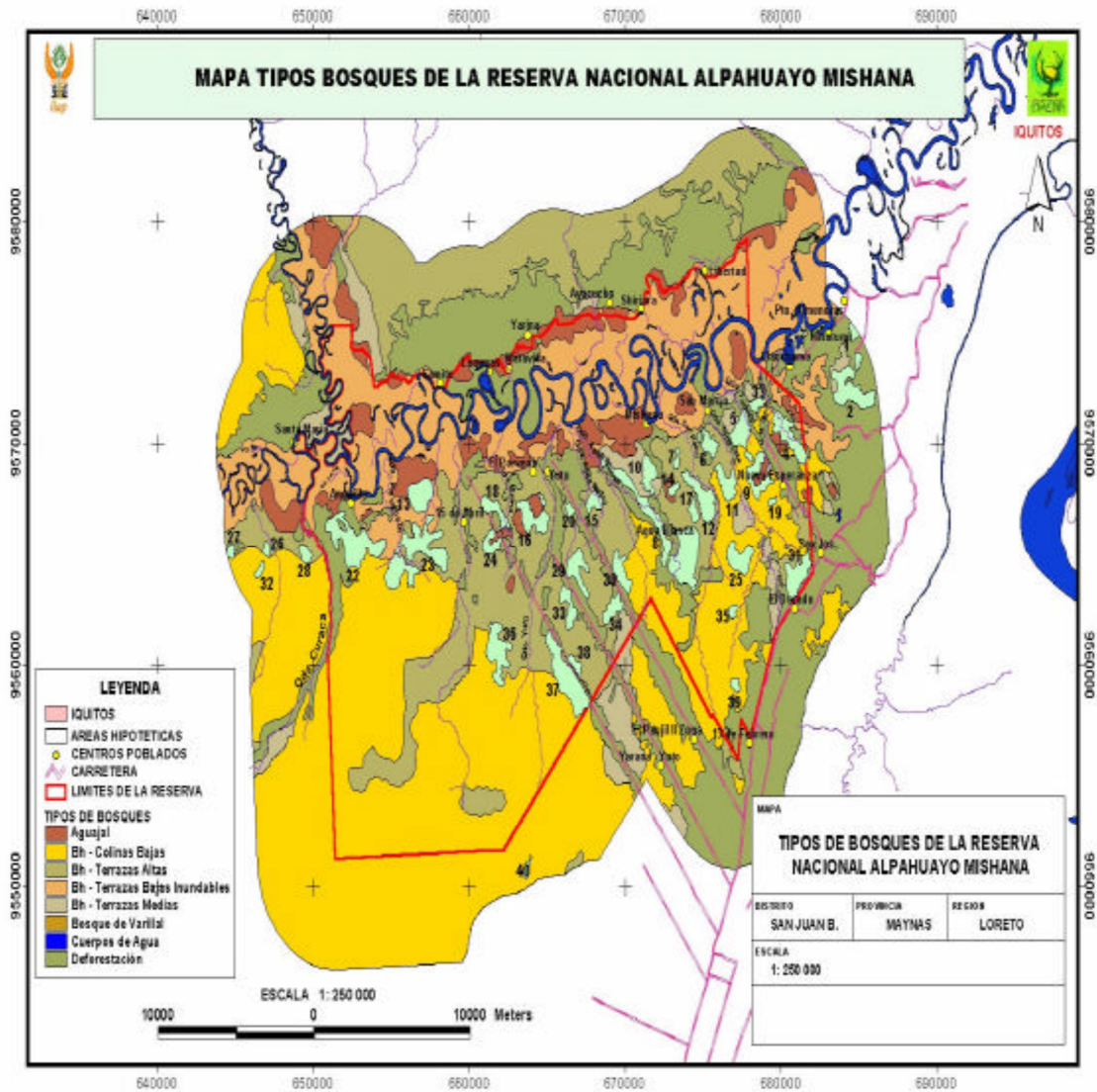


IMAGEN 01. Ubicación Satelital de la Reserva Nacional Alpuhuayo – Mishana.

ANEXO N° 02.

FICHA DE COLECCIÓN DE DATOS DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.

<u>FICHA DE CAMPO</u>	Ficha N° _____
I. 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:.....	
II. TAXONOMÍA:	
Familia Vegetal:.....Nombre Científico:..... Nombre Vulgar:.....	
III. CARACTERÍSTICAS VEGETALES:	
Habitat:.....Estadío 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:.....	
IV. 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:.....	
V. COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:	
Peso:..... Parte Colectada:..... Observaciones:.....	

ANEXO 03.

RECONOCIMIENTO Y SELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO



Fotos N° 01. Reconocimiento de *Brosimum rubescens* (“Palisangre”) dentro de las áreas de la Reserva Nacional Alpahuayo - Mishana ubicado en el km. 27 de la carretera Iquitos - Nauta

ANEXO 04.

MUESTRA BOTANICA



Figura 01. Escapita de una muestra botánica de *Brosimum rubencens* Taubert, utilizada para la identificación de la especie vegetal en estudio

ANEXO N° 05

CONSTANCIA DE IDENTIFICACION DE ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO



UNAP

Herbarium Amazonense - AMAZ

Centro de Investigación de Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 04

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

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por los Bachilleres, **DEL AGUILA TANG ROGER JAVIER** y **MACEDO GARCÍA PATRICIA ELVA**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; son parte de la tesis titulada: “**Determinación de la Actividad Antibacteriana in vitro del Extracto Etanólico y Acuoso de *Brosimum rubescens* “palisangre” Mediante el Método de Difusión en Agar.**”. La cual fue verificado e identificado en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Nombre común	Nombre Científico	Familia
“palisangre”	<i>Brosimum rubescens</i> Taubert.	MORACEAE

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

Iquitos, 06 de Febrero del 2013

Atentamente,

Bfga. FELICIA DIAZ JARAMA M.sc.
Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP



ANEXO N° 06

MOLIENDA DE LA MUESTRA VEGETAL



Foto N° 02. Muestra de *Bromisum rubescens* (Palisangre) procesada en forma de “virutas” y siendo colocada en frasco para su maceración dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos – Planta Piloto (UNAP)

ANEXO N° 07

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES



Foto N° 03. Proceso de filtrado de los extractos acuoso y etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre” realizados en el laboratorio de Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNAP



Foto N° 04. Proceso de extracción etanólica de los extractos vegetales del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre” mediante utilización de rotavapor realizados dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNAP

ANEXO N° 08

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

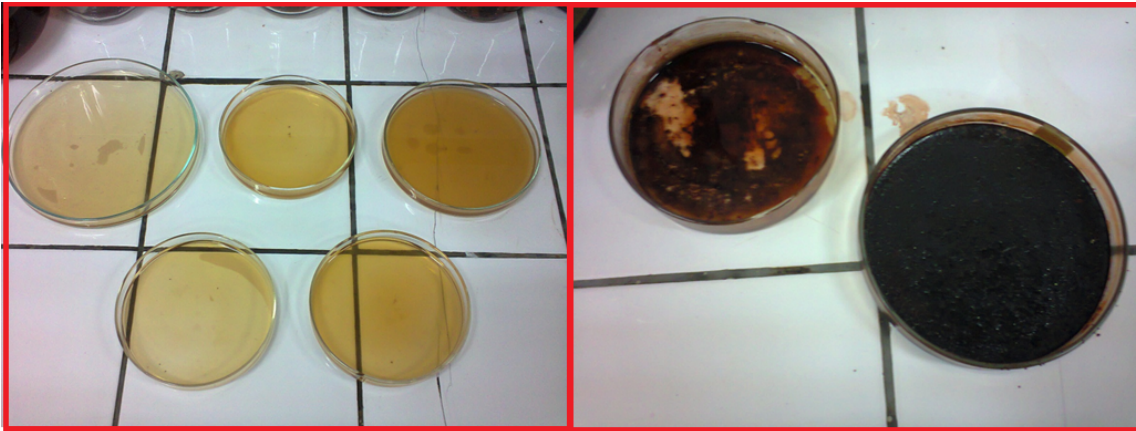


Foto N° 05. Proceso de secado de los extractos vegetales del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre” a temperatura ambiente realizados dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNAP

ANEXO N° 09

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES PARA LA EVALUACION DE LA SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

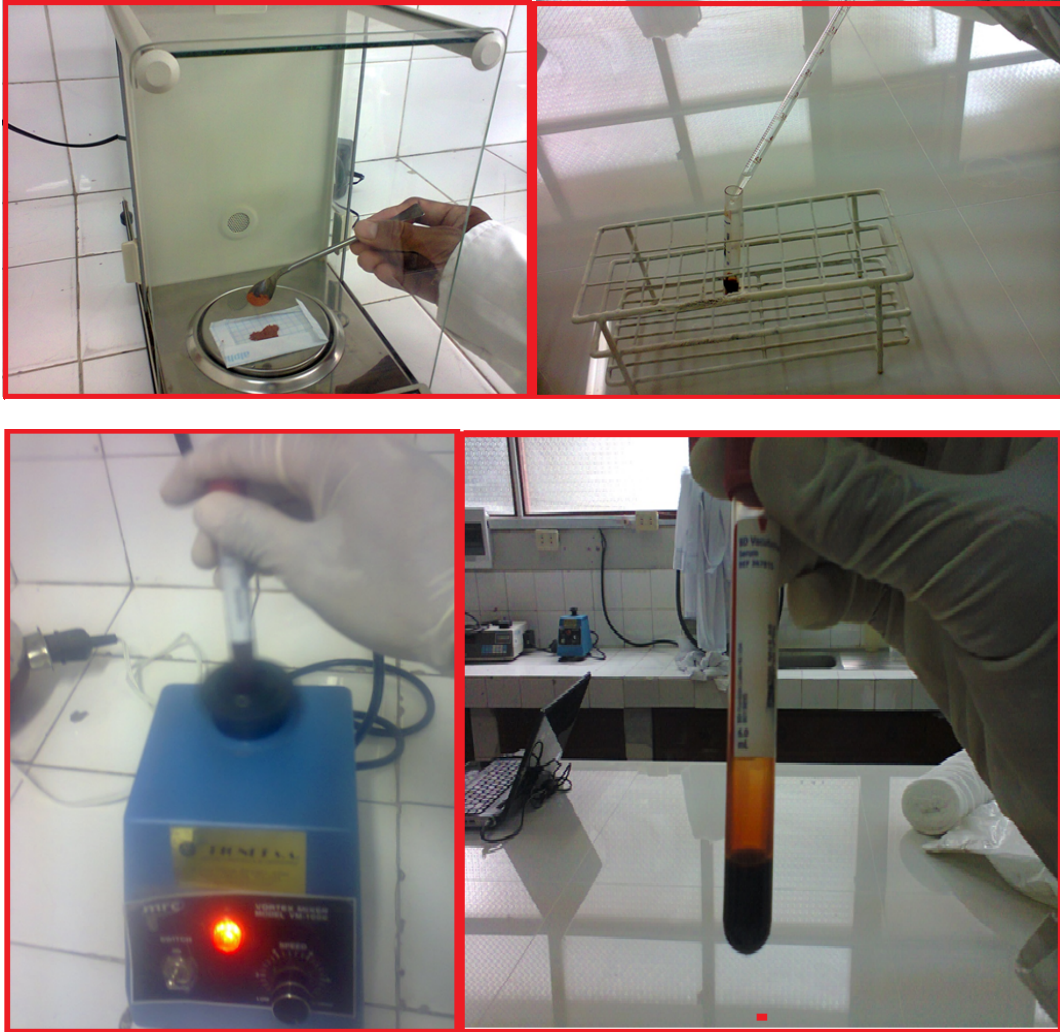


Foto N° 06. Preparación de la solución madre donde se realizó el pesado, dilución e homogenización de del extracto seco del tallo de *Brosimum rubescens* dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNAP

ANEXO N° 10

EVALUACION DE LA SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

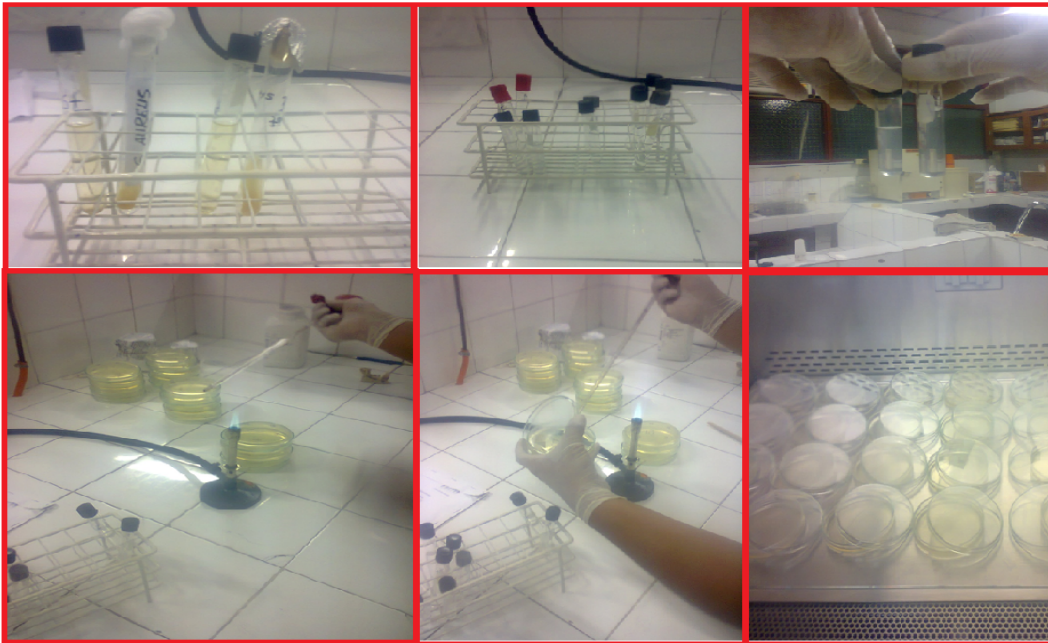


Foto N° 07. Preparación e inoculación de los cultivos de cepas bacterianas en agar, realizadas dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería e Industrias Alimentarias – UNAP

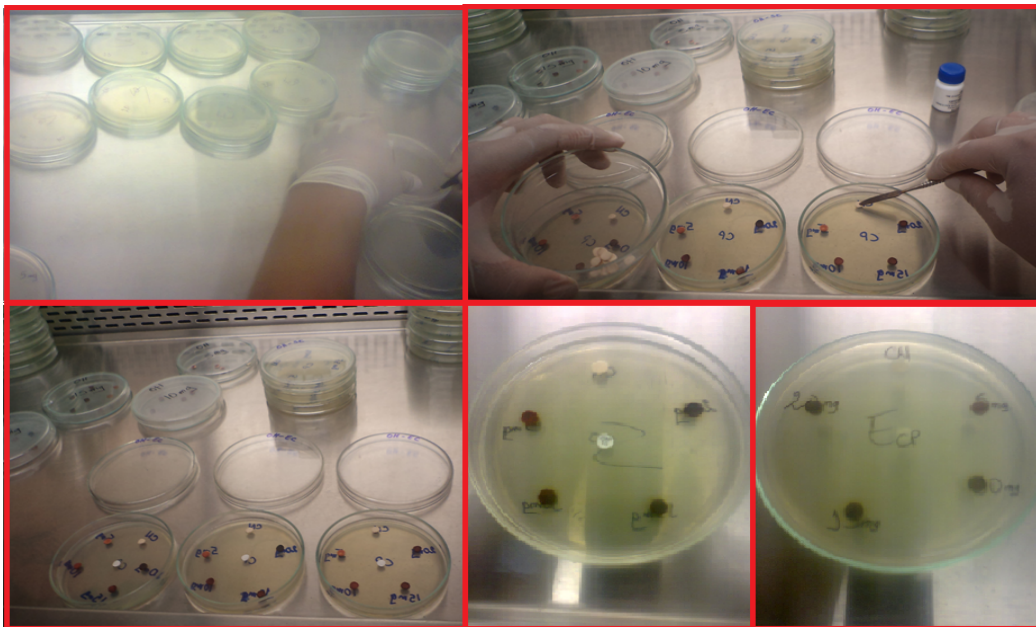


Foto N° 08. Aplicación de los discos impregnados con los extractos de la corteza de *Brosimum rubescens* (“palisangre”) para su posterior incubación.

ANEXO N° 11

EVALUACION DE LA SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION EN AGAR



Foto N° 09. Incubación de las cultivos bacterianos con los discos impregnados con los extractos de la corteza de *Brosimum rubescens* (“palisangre”) realizadas dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNAP

ANEXO N° 12

EVALUACION DE LA SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

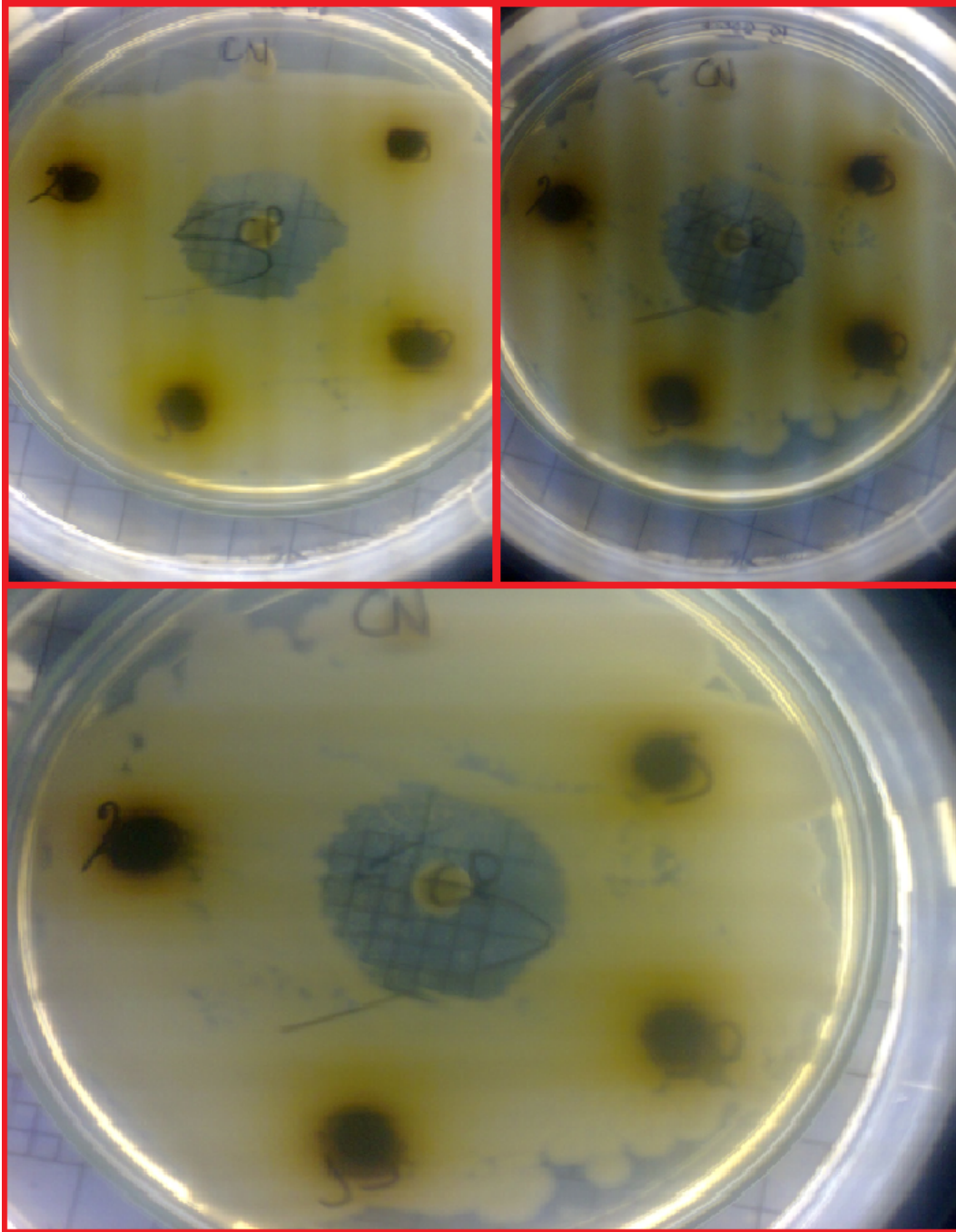


Foto N° 10. Lectura y medición de halos de los discos impregnados con los extractos de la corteza de *Brosimum rubescens* (“palisangre”) frente a la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ANEXO N° 13

EVALUACION DE LA SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

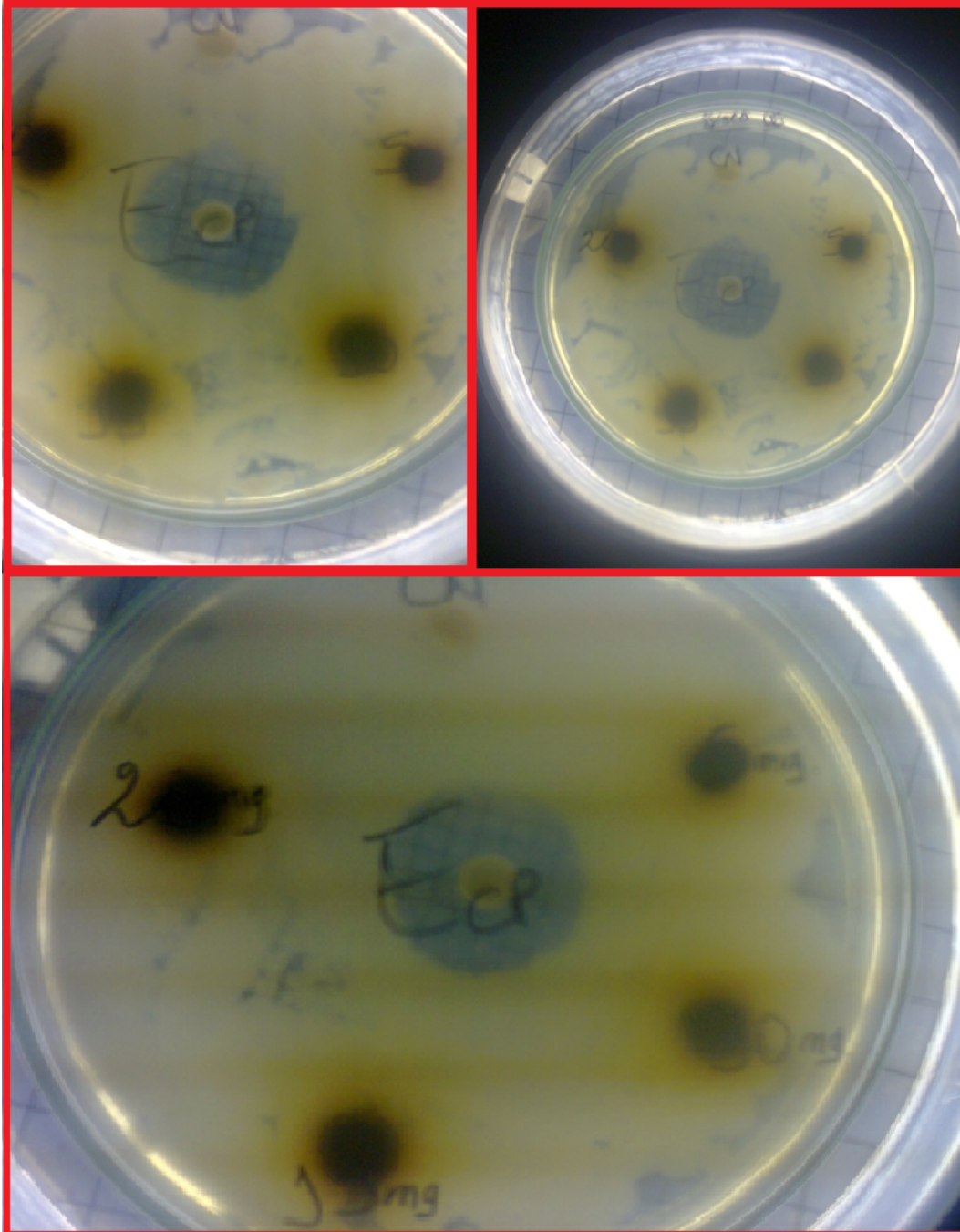


Foto N° 11. Lectura y medición de halos de los discos impregnados con los extractos del tronco de *Brosimum rubescens* (“palisangre”) frente a la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922

ANEXO N° 14

**RESULTADO DE LAS LECTURAS DE HALOS DE INHIBICION DE LOS
EXTRACTOS VEGETALES PARA LA EVALUACION DE LA SUCEPTIBILIDAD
ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL METODO DE DIFUSION EN AGAR**

1. **EXTRACTO ACUOSO (STAPHYLOCOCCUS AUREUS)**

1er ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.0	5.0	5.5
10 mg	6.5	5.5	5.8
15 mg	6.7	5.0	6.5
20 mg	6.5	5.0	6.0
Control Positivo	21.0	20.0	21.5
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

2do ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.5	5.0	6.0
10 mg	6.5	5.5	5.6
15 mg	6.8	5.0	6.5
20 mg	6.0	5.5	6.0
Control Positivo	21.0	21.0	20.5
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

2. **EXTRACTO ACUOSO (ESCHERICHIA COLI)**

1er ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.0	5.0	6.5
10 mg	7.5	5.4	5.8
15 mg	7.0	5.5	6.2
20 mg	6.8	7.0	6.0
Control Positivo	20.0	21.0	22.0
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

2do ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.0	5.3	6.5
10 mg	7.0	5.5	5.5
15 mg	6.5	6.0	6.3
20 mg	6.8	7.0	6.0
Control Positivo	19.0	19.8	19.5
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

3. **EXTRACTO ETANOLICO (STAPHYLOCOCCUS AUREUS)**

1er ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	7.0	6.0	6.0
10 mg	8.0	9.0	8.0
15 mg	9.1	8.5	8.0
20 mg	8.0	6.5	6.0
Control Positivo	21.0	20.0	19.0
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

2do ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.5	6.0	5.0
10 mg	7.0	7.5	6.5
15 mg	6.0	7.0	6.5
20 mg	7.0	8.0	7.5
Control Positivo	22.0	23.0	21.0
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

4. **EXTRACTO ETANOLICO (ESCHERICHIA COLI)**

1er ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.0	6.0	5.0
10 mg	6.0	6.5	6.8
15 mg	6.0	6.0	6.0
20 mg	5.0	7.0	6.0
Control Positivo	22.0	21.0	21.0
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

2do ensayo

CONCENTRACION DEL EXTRACTO	MEDICION DE HALOS (mm)		
	DISCO 01	DISCO 02	DISCO 03
5mg	5.0	5.0	6.0
10 mg	5.8	6.0	6.5
15 mg	6.2	5.8	6.0
20 mg	5.0	6.7	6.0
Control Positivo	22.0	21.0	21.0
Control Negativo	5.0	5.0	5.0

ANEXO N° 15

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
MEDIANTE DILUCION EN CALDO (MACRODILUCION)
PREPARACION DE LOS CONTROLES ANTIBACTERIANOS**



Foto N° 12. Preparación de la solución madre del agente antibacteriano utilizando (Gentamicina) como control positivo.

ANEXO N° 16

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
MEDIANTE DILUCION EN CALDO (MACRODILUCION)**

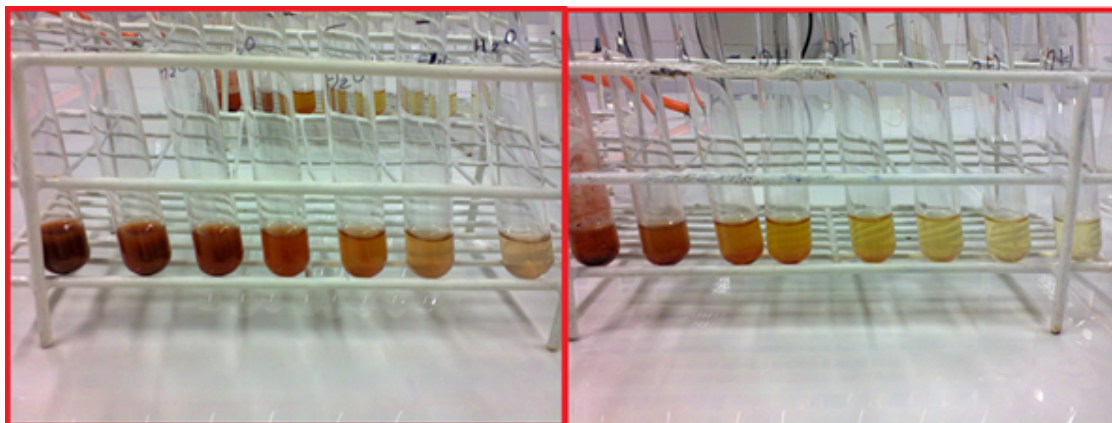
PREPARACION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES



Foto N° 13. Preparación de los extractos acuoso y etanólico del tallo de *Brosimum rubescens* “Palisangre” para su posterior determinación de la CMI de cada extracto.

ANEXO N° 17

**RESULTADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS
ACUOSO Y ETANOLICO DEL TALLO DE *Brosimum Rubescens* MEDIANTE EL
METODO DE DILUCION EN CALDO (MACRODILUCION)**



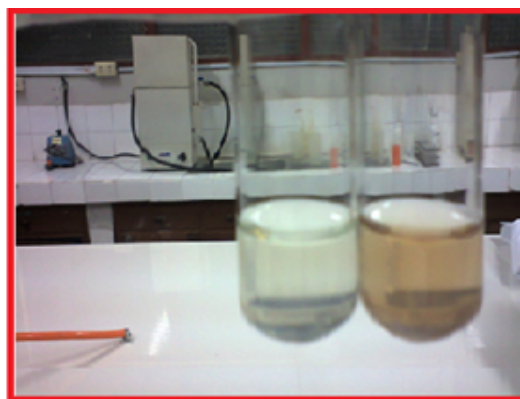
(A)

(B)

Foto N° 14. Resultados de los determinación de la actividad antibacteriana de los extractos del tallo de *Brosimum rubescens* (“Palisangre”) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. (A) Extracto acuoso; (B) Extracto etanólico.



(A)

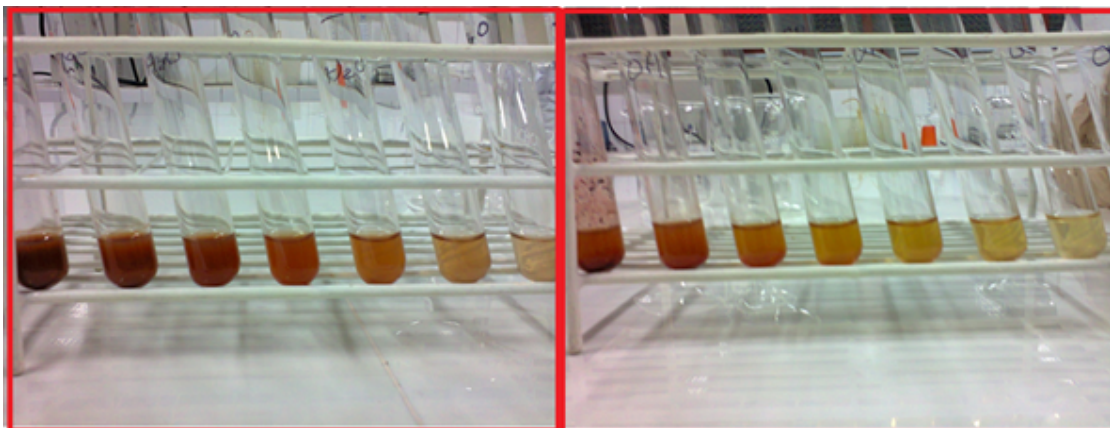


(B)

Foto N° 15. Comparación de turbidez de los extractos y su control positivo (Gentamicina) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

ANEXO N° 18

**RESULTADO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS
ACUOSO Y ETANOLICO DEL TALLO DE *Brosimum Rubescens* MEDIANTE EL
METODO DE DILUCION EN CALDO (MACRODILUCION)**



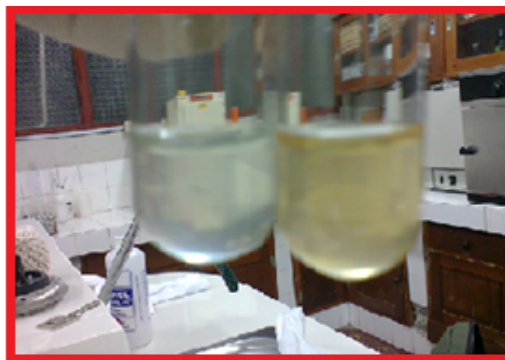
(A)

(B)

Foto N° 16. Resultados de los determinación de la actividad antibacteriana de los extractos del tallo de *Brosimum rubescens* (“Palisangre”) frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **(A) Extracto acuoso; (B) Extracto etanólico.**



(A)



(B)

Foto N° 17. Comparación de turbidez de los extractos y su control positivo (Gentamicina) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923