

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A CEPAS BACTERIANAS POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN. IQUITOS, 2017”

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

ZAGACETA GARCÍA JAVIER FELIPE

ASESORES:

ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS VDA DE REATEGUI, Dra.

ING. ALENGUER GERÓNIMO ALVA AREVALO, Dr.

BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, MSc.

IQUITOS – PERÚ

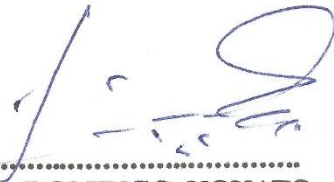
2017


**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE HOJAS DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A
CEPAS BACTERIANAS POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN
AGAR Y MACRODILUCIÓN. IQUITOS, 2017”**

PAGINA DE APROBACIÓN

JURADO CALIFICADOR


.....
QF. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA, Dr.
PRESIDENTE



.....
**QF. LUIS DOMINGO NONATO
RAMÍREZ, Dr**
MIEMBRO


.....
**QF. CARLOS ENRIQUE CALLOPAZA
VALLADARES, Mgr**
MIEMBRO

ASESORES:


.....
**ING. GLADYS CARDENAS VDA.
DE REATEGUI DRA.**


.....
**ING. ALENGUER ALVA
AREVALO DR**


.....
**BLGA. JESSY PATRICIA
VAZQUEZ CHUMBE**



UNAP

Facultad de Farmacia y Bioquímica

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

Dirección: carretera Zunirurococha - Nina Rumi, San Juan Bautista - Maynas - Loreto - Perú

www.unap.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los ¹³ días del mes de ^{abril} del dos mil dieciocho, siendo las ^{08:30} horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución Decanal N° 235-FFB-UNAP-2017, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA, Dr. PRESIDENTE
- Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMIREZ, Dr. MIEMBRO
- Q.F. CARLOS ENRIQUE CALLOAPAZA VALLADARES, Mgr. MIEMBRO



[Handwritten signature]

Se constituyeron en las instalaciones de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, sala de docentes; para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A CEPAS BACTERIANAS POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN. IQUITOS, 2017", presentado por el Bachiller: ZAGACETA GARCIA JAVIER FELIPE, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

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

satisfactoriamente

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido *aprobada por Unanimidad*
- 2.- Observaciones *Ninguna*



Siendo las ^{09:20} horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su *acertada sustentación*.

[Signature]
Q.F. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA
Presidente

[Signature]
Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMIREZ, Dr.
Miembro

[Signature]
Q.F. CARLOS ENRIQUE CALLOAPAZA VALLADARES, Mgr.
Miembro

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Chamaesyce thymifolia* FRENTE A CEPAS BACTERIANAS POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN. IQUITOS, 2017”

ZAGACETA GARCÍA, JAVIER FELIPE ⁽¹⁾

1: Bachiller en Farmacia y Bioquímica; FFBQ-UNAP-IQUITOS

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó y determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* utilizando los métodos de Difusión en agar y Macrodilución. Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Como control positivo se utilizó gentamicina, meropenem, vancomicina y ciprofloxacino; como control negativo, solución de etanol/agua 1:1. Por el método de difusión en agar, los resultados demostraron que el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* presenta actividad antibacteriana a la concentración de 25 mg/ml un rango de lectura Sensible frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por el método de Macrodilución, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a 16 mg/ml del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*, es Inactivo frente a *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. A 8 mg/ml, es Poco Activo frente a las mismas bacterias. A 4mg/ml, el efecto del extracto etanólico es Moderadamente Activo frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, *Chamaesyce thymifolia*, macrodilución, difusión en agar.

**“ANTIBACTERIAL ACTIVITY *IN VITRO* OF THE ETHANOLIC EXTRACT
OF SHEETS OF *Chamaesyce thymifolia* IN FRONT OF BACTERIA BY THE
METHODS OF DIFFUSION IN AGAR AND MACRODILUCIÓN. IQUITOS,
2017**

ZAGACETA GARCÍA, JAVIER FELIPE ⁽¹⁾

1: Degree in Pharmacy and Biochemistry; FFBQ-UNAP-IQUITOS

ABSTRACT

In the present research work, the in vitro antibacterial activity of the ethanolic extract of *Chamaesyce thymifolia* was evaluated using agar diffusion and macrodilution methods. The bacterial strains used were: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. As a positive control, the antibiotics gentamicin, meropenem, vancomycin and ciprofloxacin were used; as a negative control, an ethanol / water solution at a 1: 1 concentration. By the agar diffusion method, in the concentration of 25mg/ml the results showed that the ethanolic extract of *Chamaesyce thymifolia* shows antibacterial activity reflected in the inhibition diameters, obtaining a reading range Sensitive against *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. By the Macrodilution method according to reading range, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) at 16 mg / ml of the ethanolic extract of *Chamaesyce thymifolia* leaves proved to be inactive against *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. At the concentration of 8 mg / ml, it proved to be not very active against the same bacteria. At the concentration of 4mg / ml, it was demonstrated that the effect of the ethanolic extract of *Chamaesyce thymifolia* leaves is Moderately Active against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.

Key words: Antibacterial activity, *Chamaesyce thymifolia*, macrodilution, agar diffusion.

DEDICATORIA

*A mis padres, **Javier Zagaceta Rumrill** y **Rosario del Carmen Garcia Lopez**, porque son el motor y motivo para mi vida, por su apoyo constante e incondicional y sobre todo porque siempre creyeron en mí.*

*A mi hermano **Alonso Mateo Zagaceta Garcia** porque siempre está ahí dándome fuerzas para seguir adelante con mis metas y siempre seguir mirando con positivismo todos los obstáculos que se me presentan en la vida.*

*A mi tía **Corina Estefita Garcia Lopez** por su apoyo incondicional y desinteresado cuando lo necesito.*

*A mis abuelitos queridos **José Felipe Garcia Hidalgo**, **Estefanía Lopez Rodríguez** porque son un motivo más para seguir saliendo adelante.*

Javier Felipe Zagaceta Garcia.

AGRADECIMIENTOS

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

A mis Asesores:

- *A LA ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS VDA. DE REÁTEGUI; por apoyarme con sus conocimientos referentes al trabajo y siempre estar ahí con dedicación y esmero.*
- *Al ING. ALLENGUER GERÓNIMO ALVA Arévalo; por brindarme el laboratorio el cual está a cargo, para realizar la obtención de los extractos para nuestro trabajo.*
- *A la BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, por hacer posible la realización de los ensayos del estudio, brindándome el laboratorio de microbiología.*
- *A ALEXANDER JAVIER IMAN TORRES por haberme apoyado de manera desinteresada durante todo el proceso de la tesis.*

A mis jurados:

- *QF. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA, Dr., por su aporte y ayuda en la corrección de mi proyecto de tesis.*
- *QF. LUÍS DOMINGO NONATORAMÍREZ, Dr, por la tolerancia, tiempo que me brindó y ayuda en las correcciones de mi proyecto de tesis.*
- *QF. CARLOS ENRIQUE CALLOAPAZA VALLADARES, Mgr, por el tiempo, apoyo y ayuda en las correcciones de mi proyecto de tesis.*

A mis amigos que siempre estuvieron ayudándome para la realización de mi proyecto de tesis y a una de las personas que siempre supo estar ahí para mí, Astrid Stephany Uribe Gonzales, por su apoyo incondicional en las buenas y malas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN	2
1.2 OBJETIVOS	4
1.2.1 GENERAL:	4
1.2.2 ESPECÍFICO:.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2.1 MARCO TEÓRICO:	6
2.1.1 ANTECEDENTES:.....	6
2.1.2 MARCO CONCEPTUAL	7
2.1.2.1 Chamaesyce thymifolia.....	7
2.1.2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	9
2.1.2.3 CEPAS DE ESTUDIOS.	10
2.1.2.4 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	
22	
2.1.2.5 ANTIBIÓTICOS.....	24
2.1.3 HIPOTESIS	27
CAPÍTULO III	28
3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION.....	29
3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	29
3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
3.1.3 ÁMBITO DE ESTUDIO	30
3.1.4 DISEÑO MUESTRAL	30
3.1.4.1 POBLACIÓN VEGETAL.....	30
3.1.4.2 POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	30
3.1.4.3 CONTROLES POSITIVOS:	30
3.1.4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	30
3.1.4.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	31
3.1.5 DEFINICION OPERACIONALES DE LAS VARIABLES.....	31

3.1.5.1 VARIABLE INDEPENDIENTE:	31
3.1.5.2 INDICADORES DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE.....	31
3.1.5.3 VARIABLE DEPENDIENTE:	31
3.1.5.4 INDICADORES DE LA VARIABLE DEPENDIENTE:	31
3.1.5.5 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	32
3.1.6 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	34
3.1.6.1 FLUJOGRAMA DE OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Chamaesyce thymifolia</i>	34
3.1.7 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	35
3.1.7.1 OBTENCION DEL EXTRACTO ETANÓLICO POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN	35
3.1.7.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVADA ANTIBACTERIANA	35
3.2 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	43
3.2.1 REACTIVOS.....	43
3.2.2 MATERIALES	43
3.2.2.1 MATERIAL DE VIDRIO, PLASTICO Y OTROS	43
3.2.3 EQUIPOS	44
CAPÍTULO IV	45
4.1.1 RESULTADOS.....	46
4.1.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.	46
4.1.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Chamaesyce thymifolia</i>	48
4.1.2 DISCUSIÓN.....	59
CAPÍTULO V.....	60
5.1 CONCLUSIONES	61
5.2. RECOMENDACIONES.....	63
CAPÍTULO VI	64
6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6.1.2 BIBLIOGRAFÍA	65
6.1.3 WEBGRAFÍA	68
ANEXOS.....	70

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1: Clasificación taxonómica del <i>Chamaesyce thymifolia</i>	7
TABLA N° 2: Clasificación taxonómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
TABLA N° 3: Clasificación taxonómica de <i>Proteus vulgaris</i>	11
TABLA N° 4: Clasificación taxonómica de <i>Salmonella</i>	13
TABLA N° 5: Clasificación taxonómica de <i>Bacillus cereus</i>	14
TABLA N° 6: Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	16
TABLA N° 7: Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
TABLA N° 8: Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	19
TABLA N° 9: Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
TABLA N° 10: Operacionalización de variables	32
TABLA N° 11: Rendimiento del extracto etanólico de las hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i>	46
TABLA N° 12: Tamizaje Fitoquímico del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i>	47
TABLA N° 13: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	48
TABLA N° 14: Actividad antibacteriana de los controles positivos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	50
TABLA N° 15: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> según Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aureginosa</i>	57
TABLA N° 16: Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de las hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aureginosa</i>	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N° 1: <i>Chamaesyce thymofilia</i>	7
FIGURA N° 2: <i>Klebsiella pneumoneae</i>	10
FIGURA N° 3: <i>Proteus vulgaris</i>	11
FIGURA N° 4: <i>Salmonella</i> sp.	12
FIGURA N° 5: <i>Bacillus cereus</i>	14
FIGURA N° 6: <i>Bacillus subtilis</i>	15
FIGURA N° 7: <i>Staphylococcus aureus</i>	17
FIGURA N° 8: <i>Escherichia coli</i>	19
FIGURA N° 9: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
FIGURA N° 10: Macrodilución	22
FIGURA N° 11: Difusión en Agar	23
FIGURA N° 12: Vancomicina	24
FIGURA N° 13: Gentamicina	24
FIGURA N° 14: Meropenem.....	25
FIGURA N° 15: Ciprofloxacino.....	26
FIGURA N° 16: Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar..	37
FIGURA N° 17: Aplicación de discos antibióticos	38

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	52
GRÁFICO N° 2: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Proteus vulgaris</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	53
GRÁFICO N° 3: Actividad antibacteriana y Categorización del Extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Salmonella sp.</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	53
GRÁFICO N° 4: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Bacillus cereus</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	54
GRÁFICO N° 5: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Bacillus subtiliss</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	54
GRÁFICO N° 6: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	55
GRÁFICO N° 7: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Escherichia coli</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	55
GRÁFICO N° 8: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	56

LISTA DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> después de la molienda.....	71
ANEXO N° 2: <i>Chamaesyce thymifolia</i>	71
ANEXO N° 3: Hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> en el proceso de maceración en etanol.....	71
ANEXO N° 4: Extracto etanólico de las Hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i>	71
ANEXO N° 5: Concentración del extracto etanólico de las Hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> utilizando el rotavapor.....	71
ANEXO N° 6: Cepas bacterianas	71
ANEXO N° 7: Sembrado de las bacterias en placas de agar Muller Hinton.....	71
ANEXO N° 8: Materiales listos para esterilizar.....	71
ANEXO N° 9: Bacterias que utilizaron en los ensayos	71
ANEXO N° 10: Inóculo bacteriano en tubos de NaCl comparados con el Estándar de McFarland	71
ANEXO N° 11: Preparación de discos impregnados con el extracto etanólico y preparación de los microtubos con caldo Muller Hinton	71
ANEXO N° 12: Aplicación de los discos impregnados con el extracto.....	71
ANEXO N° 13: Resultados de los ensayos realizados por el método de difusión en Agar	71
ANEXO N° 14: Resultados de los ensayos realizados, por el método de Macrodilución.....	71
ANEXO N° 15: Constancia del herbarium amazonenses	71

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Según los expertos en salud del G20, se necesitan antibióticos eficaces para nuestros sistemas de salud en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos. ⁽¹⁾

Según la OMS la resistencia antimicrobiana es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, el proceso se ve acelerado por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos. La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta, nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia o la gonorrea, son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia. ⁽²⁾

En la actualidad las plantas continúan siendo utilizadas en el tratamiento de muchas enfermedades, tanto en los países en vías de desarrollo como en los no desarrollados.

El hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado identificar y utilizar una buena cantidad de especies vegetales. Sin embargo, pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales de estas plantas han sido realizados. ⁽³⁾

En el reino de las plantas hay abundancia de virtudes curativas, propias para las necesidades del hombre. Las plantas medicinales son la fuente de compuestos biológicamente activos y siempre han sido de gran interés como agentes quimioterapéuticos eficaces, ofreciendo un amplio espectro de actividad con mayor acción preventiva. El Perú es un país con una geografía accidentada que determina la existencia de una gran variabilidad de flora y fauna, citándose especies endémicas, nativas e introducidas. ⁽⁴⁾

Por todo lo mencionado anteriormente se investigó la planta *Chamaesyce thymifolia*, para obtener la información necesaria respecto a su actividad antibacteriana.

El estudio de la planta *Chamaesyce thymifolia* se plasmó en los siguientes capítulos:

CAPÍTULO I: Introducción, objetivo general y objetivos específicos.

CAPÍTULO II: Revisión de la Literatura, en el que se logró recopilar información de estudios referente a la planta en estudio, así como también información referente a su actividad antibacteriana y las cepas bacterianas utilizadas; en este capítulo también se estudiaron las variables operacionales, indicadores e hipótesis.

CAPÍTULO III: Materiales y Métodos, en el que se explican todos los materiales que se utilizaron para este estudio; de igual modo los métodos utilizados. Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizó el método de difusión en agar por el método de Kirby-Bauer, y macrodilución por el método de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

CAPÍTULO IV: Resultados y discusión. Donde se evalúa la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *chamaesyce thymifolia* frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO VI: Bibliografía y Referencias bibliográficas utilizadas en el presente trabajo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GENERAL:

- ✚ Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a cepas bacterianas por los métodos de difusión en agar y macrodilución.

1.2.2 ESPECÍFICO:

- ✚ Obtener el extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*.
- ✚ Realizar el tamizaje fitoquímico de *Chamaesyce thymifolia*.
- ✚ Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* mediante el método difusión en agar frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✚ Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanolico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*, mediante el método de macrodilución frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO:

2.1.1 ANTECEDENTES:

✚ **Ríos M y Flores J (2016)** en su tesis titulada “Actividad Antibacteriana De *Chamaesyce thymifolia* Frente A *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* Y *Escherichia coli*; Por El Método de Macrodilución Y Difusión En Agar” Iquitos, 2016, determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* mediante los citados métodos, utilizando gentamicina como control. Como resultado determinaron que el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* presenta actividad antibacteriana significativa en concentraciones 12 y 6 mg /ml frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aureginosa*⁽⁵⁾.

✚ **Amaral A, Kuster R, Gonçalves J, Wigg M (1999)** en su artículo científico “Antiviral Investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*”, tuvieron como objetivo determinar la actividad antiviral de los extractos flavonoídicos de las partes aéreas de *Chamaesyce thymifolia*. Como resultado encontraron una elevada citotoxicidad sobre células HEp-2 y moderada actividad inhibitoria sobre los virus HSV-1 y BVDV⁽⁶⁾.

2.1.2 MARCO CONCEPTUAL

2.1.2.1 Chamaesyce thymifolia



FIGURA N° 1: Chamaesyce thymifolia
Fuente: Wikipedia ⁽¹⁾

2.1.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

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

TABLA N° 1: Clasificación taxonómica del Chamaesyce thymifolia
Fuente: Wikipedia ⁽²⁾

2.1.2.1.2 DISTRIBUCIÓN

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

especies *Euphorbia*. Pertenecientes a esta sección se utilizan con fines medicinales ⁽⁷⁾.

2.1.2.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Los tallos contienen un látex blanco, se difunden en el suelo entre 10 a 20 cm de longitud, con un diámetro de entre 1 a 3 mm; las ramas se irradian, son delgadas, de color rojizo, pubescentes. Las hojas son simples, opuestas, elípticas, oblongas u ovadas, de 4 a 8 mm de largo y 2.5 mm de ancho, con ápice redondeado, la base oblicua y pequeña, de lados desiguales en la base. El peciolo de 3 a 6 mm de largo y 2 a 4 mm de ancho, todo verde pálido, pero a menudo de color rojo cobrizo cuando está fresco, convirtiéndose en gris violáceo oscuro verde o en el secado. La lámina es oval-oblonga u oblicuamente oblonga. Apex es obtuso o redondeado. El margen es dentado hacia el ápice y suave hacia la base y la venación es reticulada. Ciatios en racimos axilares. Los frutos son ovoide-globosos, de 3 lóbulos, casi sésiles con cápsula de 1 mm x 1 mm truncado de base. Las semillas son cónicas, ovoides y obtuso cuadrangular, de hasta 1 mm de largo, de forma aguda, de color marrón rojizo y sin carúncula ⁽⁸⁾.

2.1.2.1.4 USOS Y FARMACOLOGÍA

Se utiliza tradicionalmente las hojas como un purificador de la sangre, sedante, hemostático; aromática, estimulante, astringente para la diarrea y la disentería, antihelmíntico, emoliente, laxante; y también en casos de flatulencia, estreñimiento; en la tos crónica; como un antiviral en el asma bronquial y paroniquia. Las hojas secas y semillas se administran junto con mantequilla de leche a los niños en quejas del intestino. Raíz se da en la amenorrea y la gonorrea. El aceite se utiliza en jabones medicinales para el tratamiento de la erisipela. También se utiliza como vermífugo para perros y zorros de granja. Jugo del polvo de la planta se da con el vino como un remedio para las mordeduras de reptiles venenosos. Se aplica con cloruro de amonio a la curación de la caspa. La planta también se utiliza como un antipirético, en, trastornos crónicos y menstruales, infecciones del tracto urinario, enfermedades de la piel tales como la lepra, el sarampión y otras erupciones de la piel. La planta triturada se frota en la cabeza como un

rubefaciente irritante para promover el crecimiento del cabello en los casos de alopecia. El látex es útil en el acné vulgar y como tónico en la menorragia ⁽⁹⁾.

Tiene acción antihiper glucémica potente, anticonceptiva, larvicida, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antihelmíntica y laxante. Contiene quercetrina, cimol, carvacrol, 2-sesquiterpenos, ácido salicílico; además, esteroides, terpenos, glucósidos, aceites esenciales, minerales, taninos, flavonoides y gran número de compuestos fenólicos ⁽⁹⁾.

2.1.2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La apropiada selección y uso de un agente antimicrobiano están basados en las características del organismo etiológico y en el patrón de susceptibilidad, el huésped y el fármaco.

Los antibiogramas son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y están indicados para cultivos bacterianos clínicamente relevantes (por ejemplo: fluidos normalmente estériles o sitios clínicamente infectados) cuando la susceptibilidad no puede ser afirmada.

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con drogas en estado cristalino) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión, se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria. ⁽¹⁰⁾

2.1.2.3 CEPAS DE ESTUDIOS.

1) *Klebsiella pneumoniae*

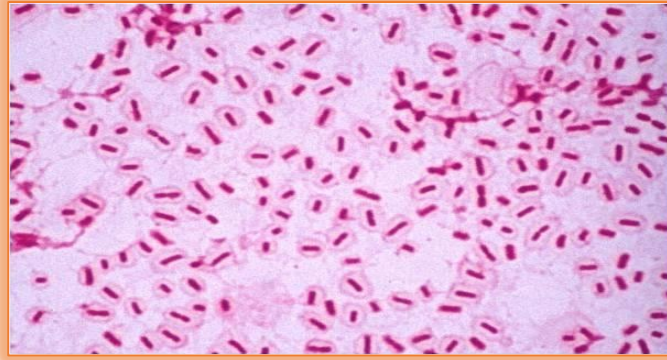


FIGURA N° 2: *Klebsiella pneumoneae*.

Fuente: Wikipedia ⁽³⁾

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas derivadas de las familias TEM y SHV, codificadas en plásmidos, que han substituido de 1 a 3 aminoácidos cercanos al sitio activo confiriendo resistencia a aztreonam, cefotaxima y ceftazidima. En el mundo existen algunos reportes que muestran a *K. pneumoniae* como uno de los principales organismos causantes de infecciones intrahospitalarias, que causan niveles significativos de morbilidad y mortalidad. ⁽¹¹⁾

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	Klebsiella
Especie:	<i>K. pneumoniae</i>

TABLA N° 2: Clasificación taxonómica de *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: Wikipedia ⁽⁴⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Klebsiella pneumoniae constituye el patógeno más importante para la especie humana de todos los que se encuentran en el grupo klebsiella. *K. pneumoniae* es un microorganismo capsulado (tiene una capsula que cubre toda su morfología) semejante al de la disentería bacilar. Eliminan una enterotoxina, lábil al calor, de gran potencia. Son microorganismos inmóviles, Gramnegativas, anaerobias facultativas, con un prominente capsula de polisacáridos. ⁽¹¹⁾.

2) *Proteus vulgaris*

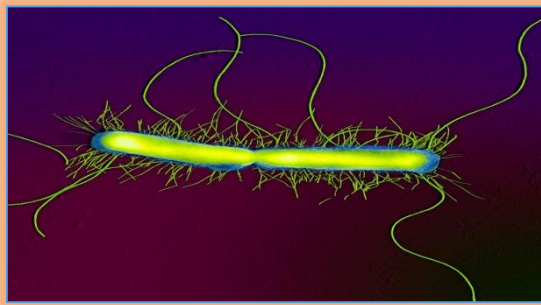


FIGURA N° 3: *Proteus vulgaris*
Fuente: Render ⁽⁵⁾

Proteus vulgaris es una bacteria Gramnegativa, facultativamente anaeróbico en forma de bacilo que habita en el tracto intestinal del hombre y varios animales, produce indol y sulfuro de hidrógeno. Se encuentran en la flora normal intestinal. Son resistentes a los antibióticos (excepto *Proteus mirabilis* que es sensible a la penicilina). Causan infecciones urinarias, septicemias y lesiones purulentas en diferentes órganos ⁽¹²⁾.

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Proteus</i>
Especie:	<i>P. vulgaris</i>

TABLA N° 3: Clasificación taxonómica de *Proteus vulgaris*
Fuente: Wikipedia (6)

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Tienden a ser organismos pleomórficos, no esporulados ni capsulados y son productoras de fenilalanina-desaminasa. Con la excepción de *P. mirabilis*, todos los Proteus reaccionan negativos con la prueba del indol ⁽¹²⁾.

3) *Salmonella sp.*

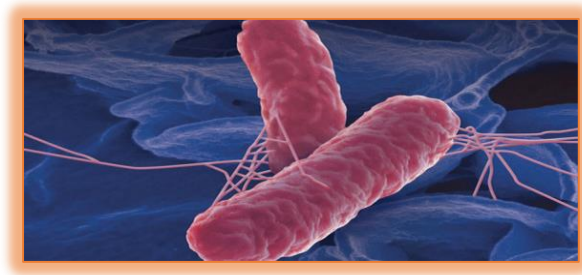


FIGURA N° 4: Salmonella sp.
Fuente: Diamantedegould ⁽⁷⁾

Salmonella pertenece a un grupo de bacterias que están presentes en el intestino de personas y animales sanos, de forma que las heces son el principal foco de contaminación a los alimentos y al agua. Cuando llega a los alimentos frescos, tiene la habilidad de multiplicarse muy rápidamente, y cuando una persona ingiere dicho alimento contaminando, el gran número de bacterias provoca “salmonelosis”, infección gastrointestinal provocada por dicha bacteria. ⁽¹³⁾

El género Salmonella se ubica dentro del Orden Enterobacteriales y la Familia Enterobacteriaceae. Sus miembros son bacilos Gramnegativos, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados. La diferenciación entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta diferentes propiedades bioquímicas. No fermentan la lactosa, excepto *Salmonella cholerae suis* subsp. *arizonae* y *Salmonella cholerae suis* subsp. *diarizonae*, fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. Typhi*), no producen indol, no degradan la úrea, descarboxilan la lisina y la ornitina. Las salmonelas se desarrollan entre 8 y 45°C y a un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70°C. ⁽¹³⁾

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *SALMONELLA*

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

TABLA N° 4: Clasificación taxonómica de Salmonella
Fuente: Wikipedia ⁽⁸⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gramnegativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, no fermentadores de lactosa, anaerobios facultativos, no esporulados generalmente móviles por flagelos peritricos con la excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, responsables de la tifoidea aviar y pullorosis, respectivamente. Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. typhi*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol. ⁽¹⁴⁾

Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella sp.* son relativamente estándares; sin embargo, puede haber variaciones en los medios de cultivo y algunas pruebas bioquímicas, por lo cual como alternativa se están introduciendo cada vez más los métodos moleculares que permiten un diagnóstico más rápido y pueden ser más simples de realizar, pero tienen como desventaja que son de costo elevado. ⁽¹⁴⁾

4) *Bacillus cereus*



FIGURA N° 5: *Bacillus cereus*
Fuente: Wordpress ⁽⁹⁾

Bacillus cereus es una bacteria Grampositiva productora de esporas y formadora de toxinas termoestables ampliamente distribuida en el medio ambiente, que puede ser transmitida al ser humano a través de alimentos contaminados, generándole una toxiinfección alimentaria de dos tipos: por una parte, una intoxicación debido a las propias toxinas y, por otra parte, una infección por la ingesta de células que producen enterotoxinas en el intestino delgado ⁽¹⁵⁾.

Bacillus cereus es una causa importante de enfermedades de transmisión alimentaria en las personas, ya que provoca dos tipos de toxiinfecciones alimentarias: 1) Intoxicación emética debida a la ingesta de la toxina formada en el alimento caracterizada por náuseas y vómitos. 2) Toxiinfección gastrointestinal debida a la ingesta de células y esporas de *B. cereus* que producen enterotoxinas en el intestino delgado, caracterizada por diarrea, náuseas y dolores abdominales. Además, es importante destacar que un número bajo de esporas puede desencadenar la toxiinfección ⁽¹⁶⁾.

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Bacillus cereus*

Reino:	<i>Bacteria</i>
Filo:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden:	<i>Bacillales</i>
Familia:	<i>Bacillaceae</i>
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>Bacillus cereus</i>

TABLA N° 5: Clasificación taxonómica de *Bacillus cereus*
Fuente: Wikipedia ⁽¹⁰⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Bacillus cereus es un bacilo, Grampositivo, móvil, con flagelos distribuidos en toda la superficie celular, puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno atmosférico. Forma una espora única central o paracentral sin destrucción del esporangio. Tiene una morfología celular similar a la del *B. anthracis* pero a diferencia de éste, no es susceptible a la penicilina.

El *Bacillus cereus* contiene un solo plásmido grande que es similar en contenido y organización al gen pXO1 de *B. anthracis* pero carece de la patogenicidad asociada que contiene el ántrax, los genes del complejo de la toxina mortal y del edema ⁽¹⁷⁾.

5) *Bacillus subtilis*



FIGURA N° 6: *Bacillus subtilis*

Fuente: squarespace ⁽¹¹⁾

Históricamente, *B. subtilis* era un término dado a todos los bacilos aeróbicos que forman endosporas, este organismo fue una de las primeras bacterias estudiadas, y fue nombrado *Vibrio subtilis* en 1835 y renombrado *Bacillus subtilis* en el año 1872. Fue descubierta accidentalmente por soldados alemanes durante la 2ª Guerra Mundial, debido al gran número de muertes en soldados por disentería, tras estudios se descubrió esta bacteria en estiércol de camello ⁽¹⁸⁾.

Es una Grampositivas aeróbica, Una característica que ha atraído un gran interés en *B. subtilis* es su capacidad de diferenciarse y formar endosporas. Sus esporas son resistentes a factores ambientales como el calor, el ácido y la sal, y que pueden persistir en el ambiente por largos períodos de tiempo; antes de la decisión de producir la espora de la bacteria podría llegar a ser

móviles, a través de la producción de flagelos, y también tener el ADN del medioambiente mediante el sistema de competencia ⁽¹⁸⁾.

Comúnmente su hábitat la encontramos en el suelo, y la descomposición de residuos vegetales, produce una variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales y contribuir a los ciclos de nutrientes ⁽¹⁹⁾.

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Bacillus subtilis*

Reino:	<i>Bacteria</i>
Filo:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden:	<i>Bacillales</i>
Familia:	<i>Bacillaceae</i>
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>Bacillus subtilis</i>

TABLA N° 6: Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*
Fuente: Wikipedia ⁽¹²⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Bacillus subtilis es un bacilo Grampositivo, catalasa-positivo, aeróbico estricto, productor de endosporas, de antibióticos y matriz extracelular que comúnmente se encuentra en el suelo. En cultivo en placa, las colonias son de color blanco, opacas, con consistencia viscosa, margen ondulado, elevación plana y forma irregular ⁽¹⁹⁾.

6) *Staphylococcus aureus*



FIGURA N° 7: *Staphylococcus aureus*

Fuente: Google_images⁽¹³⁾

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *S. aureus* es la especie tipo del grupo, considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. El impacto de las cepas de *S. aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina. A través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. *S. aureus* forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. En los últimos años han aumentado de forma notable las infecciones por este microorganismo, en especial por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina. El Centro de Enfermedades Infecciosas estima que en EUA en el año 2005 se desarrollaron 94,360 infecciones invasivas por *S. aureus* resistentes a la meticilina. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento progresivo de infecciones producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina, con una sensibilidad a los antibióticos diferente que afecta a la población sana sin haber tenido contacto previo con los hospitales o clínicas de salud. Estas infecciones provocadas por *S. aureus* resistentes a la meticilina adquiridas

en la comunidad pueden desarrollar diferentes enfermedades, siendo las más comunes en la piel y tejidos blandos. Los estudios de epidemiología molecular son de gran importancia ya que nos han permitido entender las relaciones evolutivas entre las cepas, así como conocer el origen de las clonas durante los brotes epidémicos ⁽²⁰⁾.

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>S. aureus</i>

TABLA N° 7: Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*
Fuente: Wikipedia ⁽¹⁴⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es un microorganismo grampositivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como Gramnegativos ⁽²¹⁾.

7) *Escherichia coli*

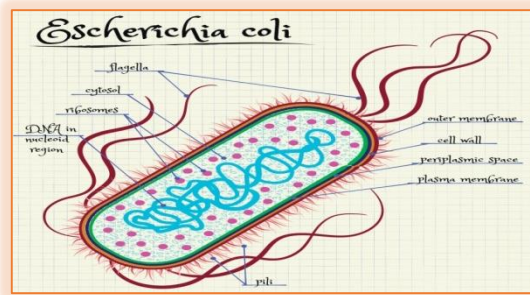


FIGURA N° 8: *Escherichia coli*
Fuente: Deposit_photos⁽¹⁵⁾

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. *Escherichia coli*, el microorganismo más prevalente de esta familia, es una de las bacterias prototípicas sometidas a estudio. *Escherichia coli* es un bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea⁽²²⁾.

✚ **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *ESCHERICHIA COLI***

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Especie	E. coli

TABLA N° 8: Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*
Fuente: Wikipedia⁽¹⁶⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Escherichia coli es un bacilo entérico gram negativo no esporulado móvil por flagelación peritrica, aerobio facultativo, oxidasa negativo, con requerimientos nutritivos muy sencillos, fermentadores de azúcares que puede crecer como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos. ⁽²²⁾

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de bacterias coliformes. ⁽²³⁾

El metabolismo de *Escherichia coli* consiste en utilizar azúcares sencillos y requiere nitrógeno soluble, son oxidasa negativos y catalasa positivos, en general indol positivos y descarboxilan la lisina, ureasa negativa e incapaz de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Se clasifican en más de 170 serogrupos O adaptados a diferentes ambientes, incluso dentro del huésped llegando a ser un patógeno mortal, es por ello que su diagnóstico oportuno y su combate con el uso apropiado de antibióticos resultan de suma importancia para disminuir la incidencia. ⁽²⁴⁾

8) *Pseudomonas aeruginosa*



FIGURA N° 9: *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: Ehgroup ⁽¹⁷⁾

Este tipo de microorganismo patógeno se caracteriza por ser por lo general un agente de infección hospitalaria a través de dispositivos invasivos y medios externos, las infecciones hospitalarias (IH) se definen como "Una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro

establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internamiento. Incluyen también las infecciones contraídas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento", constituyen un serio problema de salud tanto por su difícil manejo (muchos de los patógenos implicados son resistentes a varios antibióticos).⁽²⁵⁾

✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	Pseudomonas
Especie	P. aeruginosa

TABLA N° 9: Clasificación taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: Wikipedia⁽¹⁸⁾

✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Pseudomonas aeruginosa, su morfología colonial es característica de identificación en algunos medios de cultivo, por ejemplo, en medio agar Cetrimida, es un bacilo curvo o recto, aislado o en pareja o cadenas cortas, Gramnegativa (-) esta bacteria tiene motilidad positiva gracias a su flagelo (solo cuenta con uno)⁽²⁶⁾.

Tiene la capacidad de formar biofilm, tiene un ligero aroma a frutas y es una de las principales bacterias oportunistas causantes de infecciones nosocomiales, especialmente en heridas, quemaduras y cuando se presentan cepas mucoides hay una alta mortalidad en casos de fibrosis quística⁽²⁶⁾.

2.1.2.4 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

A. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

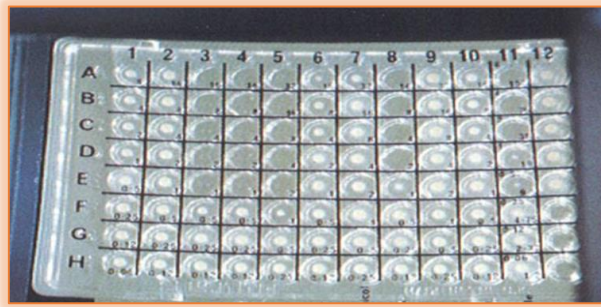


FIGURA N° 10: Macrodilución

Fuente: Campus.usal.es ⁽¹⁹⁾

En 1998 el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) publicó el Método de macrodilución para hongos filamentosos donde se describe un método provisional para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica a los hongos filamentosos formadores de conidias.

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina, sólo están determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con SIDA. Por lo tanto, estos datos pueden variar en el futuro y hay que prestar atención a las nuevas normas que vayan publicando los comités de estandarización de ensayos *in vitro*, tanto europeos (EUCAST) como americanos (NCCLS).

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo MH (Muller Hinton) suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano. ⁽²⁶⁾

Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente. Se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido

del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. ⁽²⁶⁾

El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo <en el caldo. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga 10⁵ a 10⁶ UFC/ml ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35°C entre 16 y 20 horas ⁽²⁶⁾.

B. MÉTODO DIFUSIÓN EN AGAR

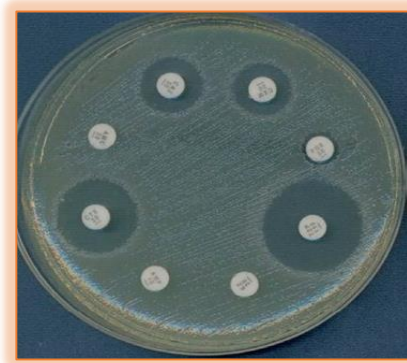


FIGURA N° 11: Difusión en Agar
Fuente: Apcontinuada ⁽²⁰⁾

- ✚ Método de difusión en disco: se emplean discos de papel impregnados de antibiótico localizados en zonas libres de microorganismos con dosis seriada. Observando el tamaño del halo de inhibición de crecimiento se puede obtener resultados semicuantitativos. La sensibilidad está determinada por el diámetro del halo cuya lectura viene estandarizada ⁽²⁷⁾.

2.1.2.5 ANTIBIÓTICOS

1. VANCOMICINA



FIGURA N° 12: Vancomicina
Fuente: cdn_noticiaaldia ⁽²¹⁾

La vancomicina es un antibiótico glicopeptídico que fue aislado en 1956 del *Streptomyces orientalis*. Fue introducido en la práctica clínica en 1958 para tratamientos de infecciones causadas por estafilococos en las que otros antibióticos se mostraban ineficaces. Se empezó a utilizar de forma significativa a partir de los años setenta, pero fue a partir de los ochenta cuando aumentó considerablemente su prescripción debido a la aparición en los hospitales de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. ⁽²⁸⁾

2. GENTAMICINA



FIGURA N° 13: Gentamicina
Fuente: Elemparazo.net ⁽²²⁾

La gentamicina, al igual que la netilmicina, es un antibiótico obtenido de especies del actinomiceto *Micromonospora*. La gentamicina fue estudiada y descrita en 1963 y aislada, purificada y caracterizada en 1964. Aminoglucósido de administración parenteral, tópica y uso oftálmico. Tiene efecto concentración dependiente, efecto post-antibiótico prolongado y acción sinérgica con

antibióticos betalactámicos. Posee un espectro antimicrobiano principalmente frente a bacterias Gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus*, *Serratia*) y tiene actividad frente a ciertas bacterias Grampositivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*). En combinación con antibióticos betalactámicos es eficaz en infecciones producidas por *E. fecalis* y *Streptococcus sp.* ⁽²⁹⁾

3. MEROPENEM



FIGURA N° 14: Meropenem
Fuente: disdany.com ⁽²³⁾

Los carbapenems son sustancias de estructura β -lactámica que se caracterizan por tener condensado con el anillo principal β -lactámico otro no saturado de cinco átomos (doble enlace entre 2 y 3) y que en la posición 1 tiene un átomo de carbono. Fueron descubiertos casi simultáneamente por investigadores de Beecham Research y Merck Sharp and Dohme. Los primeros identificaron tres compuestos, MM4550, MM13902 y MM17880, a partir de un cultivo de *Streptomyces olivaceus*; tales compuestos y sus derivados se llaman ácidos olivánicos. De otro lado, Merck Sharp and Dohme aisló la tienamicina, procedente de *Streptomyces cattleya*. ^(30 y 31)

El Meropenem es un compuesto químicamente similar a imipenem, con un grupo metilo en C1 y un grupo dimetilcarbamoilpirrolidintio en C2 que sustituye a la cadena lateral tioalquímica del imipenem. Es precisamente esta sustitución la que incrementa la actividad del meropenem respecto a imipenem, tanto frente a *Pseudomonas spp.* como frente a otros bacilos Gramnegativos. Otra ventaja de meropenem radica en una de sus propiedades farmacocinéticas: alcanza concentraciones terapéuticas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (4,5) sin producir convulsiones y se tolera muy bien cuando se administra en bolo

intravenoso (1 g en cinco minutos), al contrario que imipenem/cilastatina, cuya administración rápida se asocia con náuseas y vómitos. (30 y 31)

4. CIPROFLOXACINO



FIGURA N° 15: Ciprofloxacin
Fuente: Laboratorio chile (24)

La ciprofloxacina (ciprofloxacín) es un antibiótico que suele administrarse a las personas que han estado en contacto estrecho con una persona que ha contraído una infección meningocócica. Dicho antibiótico tiene por objeto eliminar todo germen meningocócico que se pueda "portar" en la garganta de las personas que han estado en contacto con un enfermo, de modo que no puedan ocasionar infecciones a los demás.

El antibiótico no sirve para tratar a la persona que ya ha contraído la infección; por ello las personas que han estado en contacto con un enfermo deberán mantenerse alerta para detectar la aparición de síntomas y signos de enfermedad meningocócica. (32)

2.1.3 HIPOTESIS

El extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* presentara actividad antibacteriana *in vitro* frente a bacterias por los métodos de difusión en agar y macrodilución.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación es descriptivo, experimental, y prospectivo.

- Es **descriptivo**, porque el análisis es estadístico univariado porque solo describe o estima parámetros en la población de estudio a partir de una muestra.
- Es **experimental**, porque es de tipo longitudinal, analítico y de nivel investigativo “explicativo” (considera una relación de causa - efecto).

Se refiere a la manipulación deliberada de una o más variables independientes para analizar las consecuencias de esa manipulación sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador.

- Es **prospectivo**, porque los datos necesarios para el estudio son recogidos a propósito de la investigación (primarios). Por lo que, posee control del sesgo de medición.

3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Obtener el extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* para posteriormente determinar la actividad antibacteriana frente a las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando los métodos de difusión en agar y de macrodilución.
2. Evaluar de la actividad antibacteriana frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando los métodos de difusión en agar y de macrodilución.

3.1.3 ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Planta Piloto (Laboratorio de Ingeniería y Laboratorio de Microbiología de Alimentos) de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, de la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, región Loreto, de mayo a diciembre de 2017.

3.1.4 DISEÑO MUESTRAL

3.1.4.1 POBLACIÓN VEGETAL

Las muestras de hojas de *Chamaesyce thymifolia* fueron recolectadas en el Caserío Nina Rumi – Río Nanay, Carretera Zungarococha – San Juan Bautista– Iquitos, Perú, realizado en el mes de Julio de 2017.

3.1.4.2 POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA

Las muestras microbiológicas estuvieron constituidas por las bacterias:

- Aisladas: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*;
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27833).

3.1.4.3 CONTROLES POSITIVOS:

Se utilizaron los discos antibióticos de gentamicina, vancomicina, meropenem y ciprofloxacino, del Laboratorio BIODISC.

3.1.4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✚ Se utilizaron hojas jóvenes de *Chamaesyce thymifolia*, identificadas por un profesional botánico.
- ✚ Las bacterias que se utilizaron en la investigación fueron morfológicamente iguales (verificadas mediante tinción Gram, por un profesional biólogo), y solo se utilizaron bacterias jóvenes en fase logarítmica.

3.1.4.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✚ Se excluyeron las hojas amarillas, y podridas.
- ✚ No se utilizaron las cepas, después de la fase logarítmica.

3.1.5 DEFINICION OPERACIONALES DE LAS VARIABLES

3.1.5.1 VARIABLE INDEPENDIENTE:

Extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*.

3.1.5.2 INDICADORES DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE

Concentración del extracto etanólico:

Concentración baja	:	15 mg/mL
Concentración alta	:	20 mg/mL
Concentración muy alta	:	25 mg/mL

3.1.5.3 VARIABLE DEPENDIENTE:

Actividad Antibacteriana

3.1.5.4 INDICADORES DE LA VARIABLE DEPENDIENTE:

Grado de sensibilidad de las bacterias según el diámetro del halo de inhibición frente a las diferentes concentraciones del extracto etanólico ⁽²³⁾:

Sensible	(S)	:	Inhibición al 100%
Sensibilidad intermedia	(I)	:	Inhibición al 50%
Resistente	(R)	:	Inhibición 0

3.1.5.5 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

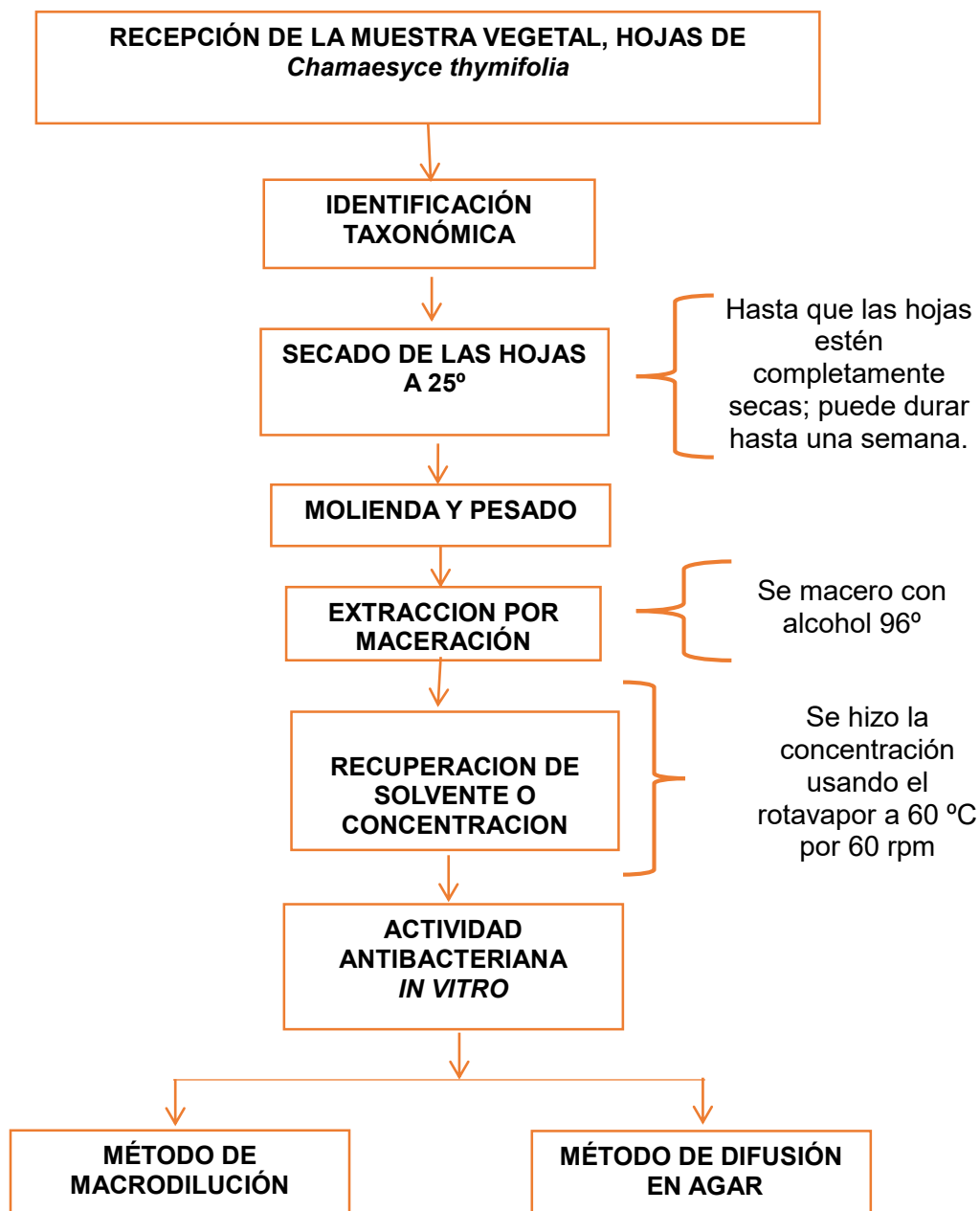
TABLA N° 10: Operacionalización de variables

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .	Un extracto es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. En este caso se utilizará etanol.	Obtención del extracto de hojas de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .	<ul style="list-style-type: none"> + Concentración: <ul style="list-style-type: none"> - Baja 2.5mg/ML, - Media 5.0mg/mL, - Alta 10.0 mg/mL, - Muy alta 20.0 mg/ML. 	Nominal	Cuantitativo
			Metabolitos secundarios	<ul style="list-style-type: none"> + Presencia de metabolitos secundarios 		Ensayos: Drangendorff Burchardart Bontrager Baljet Fehling Espuma Cloruro férrico Ninhidrina Shinoda Kedde

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Actividad antibacteriana	Capacidad de matar /destruir/inactivar bacterias, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.	Consiste en cuantificar la inhibición del crecimiento bacteriano producido en el extracto etanólico en estudio, utilizando discos de sensibilidad con antibacterianos. CMI	Halo de inhibición que se produce en los cultivos inoculados con <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , utilizando discos de sensibilidad con antibacterianos.	Sensible: Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada con la dosis de extracto recomendado para el tipo de infección y la especie infectante.	S	Cuantitativa
				Intermedia: Esta categoría incluye cepas que puedan ser inhibidas por concentraciones de extracto más elevado.	I	
				Resistente: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales.	R	

3.1.6 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1.6.1 FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Chamaesyce thymifolia*



FUENTE: MANUAL DE FITOQUIMICA. (33)

3.1.7 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1.7.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN

Para la obtención del extracto etanólico por este método, se realizó el siguiente procedimiento:

- 1) Recolección de la muestra.
- 2) Pretratamiento: Limpieza y secado de la muestra
- 3) Reducción de tamaño: se tomó la muestra seca y se molió en molidor manual.
- 4) Extracción: se pesó 625 gramos de muestra y se depositó en un recipiente de vidrio, se adicionó el solvente etanol 96% hasta cubrir completamente el material vegetal, se agitó y tapó.
- 5) Reposo: se dejó reposar por un período de 10 días a temperatura ambiente, agitando esporádicamente el contenido.
- 6) Obtención del extracto: se filtró el producto y se recuperó el solvente con ayuda de un rotavapor.
- 7) Se pesó, envasó y almacenó el producto a una temperatura ambiente.

3.1.7.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó siguiendo los procedimientos establecidos en el Protocolo M38-P, elaborado por la National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y modificado por Espinoza *et al* (2005). En el ensayo se utilizó como *control negativo* el solvente (etanol/agua 1:1) utilizado en la disolución de los extractos y como *control positivo* se utilizó gentamicina, vancomicina, ciprofloxacino y meropenem.

3.1.7.2.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN DE AGAR

A) DILUCIÓN DE EXTRACTOS

- ✚ Se pesaron 0.45g, 0.6 g y 0.75g del extracto etanólico en microtubos de tipo Sppendorf estériles, diluidos en 0.6 ml de una mezcla 1:1 de etanol/agua

estéril para alcanzar una concentración de prueba de 750, 1000 y 1250 mg/ml.

- ✚ Los extractos diluidos fueron homogenizados en el vórtex hasta estar homogenizados completamente.
- ✚ Los extractos que no se disolvieron por agitación estuvieron mantenidos por varios minutos a baño maría (temperatura de 40°C) y colocados nuevamente en el vórtex.
- ✚ Después de seleccionados los extractos más promisoros, se puso a prueba en discos de papel Whatman conteniendo 20 µg de cada extracto seleccionado llegando a concentraciones de prueba de 15 mg/ml, 20 mg/ml y 25 mg/ml, respectivamente, del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia*.⁽²⁷⁾

B) DE CONTROLES

- ✚ Para los controles positivos se utilizaron discos antibióticos de gentamicina, vancomicina, ciprofloxacino, y meropenem, a las concentraciones de 10 y 30 µg, respectivamente.
- ✚ Como control negativo se utilizó una mezcla 1:1 de etanol/agua⁽²⁷⁾.

C) CULTIVOS EN AGAR

- ✚ Con un asa de siembra estéril, se procedió a activar las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, tomando una asada de cada bacteria conservada, para sembrar en caldo nutritivo.
- ✚ Se Incubó a una temperatura entre 35 a 37°C durante 18 – 24 hrs, y antes de utilizarlos realizamos previamente otro subcultivo obteniendo colonias aisladas.
- ✚ Pasado el proceso de activación de las cepas, se aíslan los tubos de caldo nutritivo en Agar Müller Hinton.⁽²⁷⁾

D) PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- ✚ De un cultivo se seleccionan y aíslan de cuatro a cinco colonias del mismo tipo morfológico.
- ✚ Se toca la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfiere a un tubo que contiene de 4 a 5 mL de cloruro de sodio al 0,9%.
- ✚ Se incuba el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas), por comparación visual con el estándar.
- ✚ La suspensión preparada contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.⁽²⁷⁾

E) INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

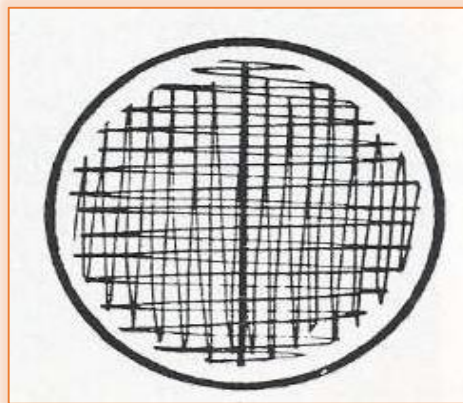


FIGURA N° 16: Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar
Fuente: Microbiologia_equipos⁽²⁵⁾

- ✚ Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se utilizan micropipetas graduadas, inoculando con 100 micras de cultivos y esparciendo por toda la placa con ayuda de una espátula de Drigalsky⁽²⁷⁾.
- ✚ Se inocula la superficie seca de la placa de Agar Mueller Hinton, estriando con la espátula de Drigalsky para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura N°16). Antes de colocar los discos se deja secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.⁽²⁷⁾

F) APLICACIÓN DE LOS DISCOS

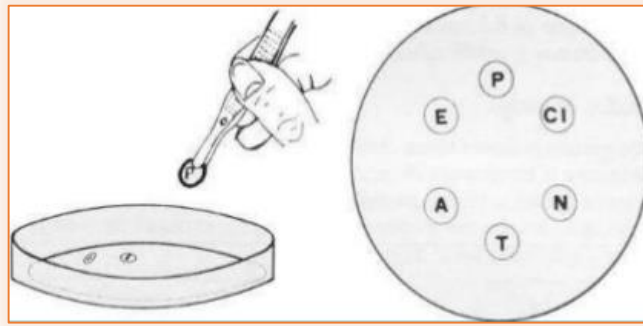


FIGURA N° 17: Aplicación de discos

Fuente: slideshare ⁽²⁶⁾

- ✚ Se colocan los discos individuales o multidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- ✚ Se distribuyen los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición.

El disco antibiótico no debe ser removido una vez que toma contacto con la superficie del agar debido a que los antibióticos se difunden rápidamente ⁽²⁷⁾.

G) INCUBACIÓN

- ✚ Se incuban las placas en posición invertida a 35°C durante 18 a 24 horas, dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos. ⁽²⁷⁾

H) LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- ✚ Después del tiempo de incubación se examina cada placa y con la ayuda de una regla vernier se miden los diámetros de los halos de inhibición de cada disco.
- ✚ La parte posterior de la placa Petri se mantuvo iluminada con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.

- ✚ Al momento de observar la placa se tuvo la precaución de seguir una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.

I) VALORES CRÍTICOS PARA LA MEDIDA DE SENSIBILIDAD EN DISCO

- ✚ Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de los halos de inhibición para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados *In Vitro* y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados. ⁽²⁷⁾

J) PROCEDIMIENTOS DE RECATEGORIZACIÓN

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

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

Fuente: Instituto Nacional de Salud. (2012)

- ✚ La lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiofenotipos de sensibilidad y resistencia, permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo de fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma. ⁽²⁷⁾

3.1.7.2.2 METODO DE MACRODILUCIÓN

A) PREPARACION DEL INÓCULO BACTERIANO

- ✚ El inóculo estándar, para macrodilución en caldo, se obtiene 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. Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de McFarland, se diluye en caldo para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada pocillo o tubo contenga aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml. La inoculación con la suspensión estandarizada se realizó dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La concentración del inóculo ajustado puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo que se debe calcular para cada situación.
- ✚ Se realizó una dilución 1:100 del inóculo, disolviendo 0,1 mL del inóculo en 9,9 mL de medio Muller Hinton. ⁽²⁶⁾

B) PREPARACION DEL INÓCULO DEL EXTRACTO

- ✚ Se pesan 0.32 g del extracto en viales tipo Sendorff estériles, diluidos en 0.5 ml de disolución etanol/agua (1:1) para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/ml (Solución madre o Stock).
- ✚ De la solución madre se obtiene 0.1 ml y se añade al tubo N° 01 que contiene 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.
- ✚ Del tubo N° 01 se obtiene 0.5 ml y se añade al Tubo N° 02 (que contiene 0.5 ml de caldo Muller Hinton); y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 08.
- ✚ Del tubo N° 08 se obtiene 0.5 ml, que se desecha.
- ✚ Después de este proceso se añade a todos los tubos, 0.5 ml de la suspensión bacteriana.
- ✚ El volumen final mínimo, en cada tubo, contendrá 1 ml.
- ✚ Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml.

- ✚ Los extractos que no se disolvieron por agitación se mantuvieron por algunos minutos en baño maría a temperatura de 40°C y colocados nuevamente en el vórtex. ⁽²⁶⁾

C) PREPARACIÓN DE CONTROLES

- ✚ El control positivo empleado en la prueba fueron los antibióticos gentamicina 160 mg/2 ml, vancomicina 500 mg/10 ml, ciprofloxacino 200 mg/100 ml, y meropenem 500 mg/10 ml, los cuales se prepararon diluyéndolos con agua estéril hasta llegar a una concentración madre o stock de 10240 µg/ml, a excepción del antibiótico ciprofloxacino a una concentración de 200 mg/100 ml y que será la Solución madre o Stock.
- ✚ Para la dilución de Vancomicina y meropenem, se realizó la reconstitución de las ampollas en polvo agregando 10 ml de agua estéril, obteniendo de esta manera una concentración de 500mg en 10 ml, para llegar a la concentración madre o stock de 10240ug/ml, se sustrajo de la ampolla reconstituida 1ml (50mg/ml) y se añadió a un matraz, luego se agregó 4.88 ml de agua estéril llegando de esta forma a nuestra solución stock; para el antibiótico gentamicina, de la ampolla que contiene 160mg/2ml se sustrajo 0.64ml y se agregó a 4.36ml de agua estéril que se encuentra en un matraz de Erlenmeyer, llegando a nuestra concentración madre o stock. ⁽²⁷⁾
- ✚ De la Solución madre o stock de los antibióticos gentamicina, vancomicina y meropenem se obtiene 0.1 ml, y se añadió al tubo N° 01 que contiene 0.9 ml de caldo Mueller Hinton; del antibiótico ciprofloxacino se sacó 0.512 ml y se añadió al tubo N° 01 que contiene 0.488 ml de caldo Mueller Hinton.
- ✚ Del tubo N° 01 se obtiene 0.5 ml para ser añadido al Tubo N° 02 (que contiene 0.5 ml de caldo Muller Hinton); y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09.
- ✚ Del tubo N° 09 se obtiene 0.5 ml que fue desechado.
- ✚ Después de este proceso se añadirá a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana.
- ✚ Las concentraciones estarán comprendidas entre los rangos de 512 µg/ml a 2 µg/ml.

D) COLOCACIÓN DEL INÓCULO EN LOS TUBOS CON CALDOS

Se agrega 1 ml. del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de muestra y al tubo control de crecimiento y se homogeniza la mezcla. No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo.

E) INCUBACIÓN

Se procedió a incubar los tubos de pruebas con nuestro inóculo bacteriano y del extracto, al mismo tiempo nuestro control positivo, para la mayoría de los microorganismos el tiempo de incubación es de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución.

F) LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LA CMI

✚ La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en $\mu\text{g/ml}$.⁽²⁶⁾

3.2 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 REACTIVOS

- ✚ Agua destilada – MEDIFARMA.
- ✚ Ácido sulfúrico – SPECTRUM.
- ✚ Cloruro de Bario.
- ✚ Etanol 96% - ALKOFARMA.
- ✚ Cloruro de Sodio.
- ✚ Caldo Muller Hinton – MERCK.
- ✚ Agar Nutritivo – MERCK.
- ✚ Agar Muller Hinton – Merck.
- ✚ Caldo Nutritivo – DIFCO.
- ✚ Discos de Gentamicina – BIODISC.
- ✚ Discos de Vancomicina – BIODISC.
- ✚ Discos de Meropenen – BIODISC.
- ✚ Discos de Ciprofloxacino – BIODISC.
- ✚ Ampolla de Gentamicina.
- ✚ Ampolla en Polvo de Vancomicina.
- ✚ Ampolla en polvo de Meropenem.
- ✚ Envase de Ciprofloxacino.

3.2.2 MATERIALES

3.2.2.1 MATERIAL DE VIDRIO, PLASTICO Y OTROS

- ✚ Probetas de 10, 100 y 250 ml.
- ✚ Pipetas de 1 ml.
- ✚ Embudos.
- ✚ Buretas de 50 ml.
- ✚ Matraz de Erlenmeyer de 5, 10, 100 y 250 ml.
- ✚ Mortero y pilon.
- ✚ Pipeta Graduada de 50 ml.
- ✚ Placas Petri.
- ✚ Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- ✚ Espátulas de drigalsky.

- ✚ Microtubos de 2ml – Alemania.
- ✚ Tips para micropipetas de 100 y 500 μ l.
- ✚ Micropipetas de 10, 100 y 500 μ l. – EE.UU.
- ✚ Gradillas para Microtubos.
- ✚ Gradilla Metalica.
- ✚ Pinza esteril.
- ✚ Cuchillo Mediano.
- ✚ Asa de Kolle.
- ✚ Mandiles – MEDIC.
- ✚ Mascarilla N°78.
- ✚ Lentes de protección.
- ✚ Guantes Quirúrgicos Estériles descartables.
- ✚ Escobilla lava tubos.
- ✚ Algodón.
- ✚ Detergente.
- ✚ Lejía.
- ✚ Guantes para lavar.
- ✚ Papel de Aluminio, despacho y toalla.
- ✚ Para film, Marcador.

3.2.3 EQUIPOS

- ✚ Balanza Analítica – Sartorius.
- ✚ Vortex – MCR.
- ✚ Campana extractora C4
- ✚ Rotavapor – BÜCHI
- ✚ Estufa de aire caliente – HOT AIR OVEN.
- ✚ Autoclave – GEMMY.
- ✚ Cabina de Bioseguridad – NUARE.
- ✚ Cocina Eléctrica. – FINEZZA.
- ✚ Incubadora – MEMMERT.
- ✚ Regla vernier – PRETUL.
- ✚ Refrigerador – MABE.
- ✚ Bomba de Vacío – THERMO SCIENTIFIC.

CAPÍTULO IV

4.1.1 RESULTADOS

4.1.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.

4.1.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE *Chamaesyce thymifolia*

TABLA N° 11: Rendimiento del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia*

PARTE DE LA PLANTA	CANTIDAD DE MUESTRA VEGETAL	CANTIDAD DE MUESTRA SECA PARA MACERACIÓN	CANTIDAD OBTENIDA DE EXTRACTO ETANÓLICO	PORCENTAJE DE RENDIMIENTO
HOJA	850 g	625 g	25 g	4 %

En la Tabla N°11 puede apreciarse que la cantidad de muestra vegetal utilizada para obtener el extracto etanólico fue de 850 gramos; asimismo, de 625 gramos de muestra seca macerada en alcohol 96%, se obtuvo con rotavapor 25 gramos de extracto etanólico, obteniéndose un rendimiento del 4%.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS: TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

TABLA N° 12: Tamizaje Fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*

METABOLITOS	ENSAYOS	EXTRACTO ETANÓLICO
ALCALOIDES	Drangendorff	++
AMINOÁCIDOS Y AMINAS	Ninhidrina	0
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	0
FENOLES Y TANINOS	Cloruro férrico	+++
FLAVONOIDES	Shinoda	+
LACTONAS Y CUMARINAS	Baljet	++
QUINONAS	Borntrager	0
SAPONINAS	Espuma	0
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann – Burchard	+++

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

En la Tabla N° 12 se muestra que mediante el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia*, se obtuvo fenoles y taninos más triterpenos y esteroides en cantidad Abundante; alcaloides más lactonas y cumarinas, en cantidad Moderada; flavonoides, en cantidad Leve.

4.1.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Chamaesyce thymifolia*

4.1.1.2.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

TABLA N° 13: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

BACTERIA	EXTRACTO (15 mg/ml)		EXTRACTO (20 mg/ml)		EXTRACTO (25 mg/ml)	
	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13.0 ± 0.0	INTERMEDIO	13.7 ± 0.6	INTERMEDIO	16.3 ± 0.6	SENSIBLE
<i>Proteus vulgaris</i>	13.0 ± 0.0	INTERMEDIO	18.7 ± 0.6	SENSIBLE	21.3 ± 1.2	SENSIBLE
<i>Bacillus cereus</i>	12.0 ± 1.0	RESISTENTE	15.3 ± 0.6	INTERMEDIO	17.7 ± 0.6	SENSIBLE
<i>Bacillus subtilis</i>	11.7 ± 0.6	RESISTENTE	14.0 ± 0.6	INTERMEDIO	17.3 ± 0.6	SENSIBLE
<i>Salmonella sp.</i>	8.7 ± 0.6	RESISTENTE	12.3 ± 0.6	RESISTENTE	20.0 ± 0.0	SENSIBLE
<i>Escherichia coli</i>	17.7 ± 0.6	SENSIBLE	19.3 ± 0.6	SENSIBLE	21.7 ± 0.6	SENSIBLE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16.7 ± 0.6	SENSIBLE	21.0 ± 1.0	SENSIBLE	24.3 ± 0.6	SENSIBLE
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.3 ± 0.6	SENSIBLE	19.0 ± 0.6	SENSIBLE	23.3 ± 0.6	SENSIBLE

* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición:

Resistente: < 12 mm

Intermedio: 13 a 14 mm

Sensible: > 15 mm

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. 2002. “Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Por el método de disco difusión”

En la TABLA N° 13 puede observarse que el extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* a concentración de 15 mg/ml frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*, tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia. Frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, y *Salmonella sp.*, tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Resistente. Frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Sensible.

A concentración de 20 mg/ml frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia. Frente a *Salmonella sp.* tuvo diámetro de inhibición con actividad antibacteriana Resistente. Frente a *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*, tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Sensible.

A la concentración de 25 mg/ml frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Sensible.

TABLA N° 14: Actividad antibacteriana de los controles positivos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

BACTERIA	MEROPENEM 10 µg		CIPROFLOXACINO 5 µg		GENTAMICINA 10 µg		VANCOMICINA 30 µg	
	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14.0 ± 0.0	INTERMEDIO	24.0 ± 0.0	SENSIBLE	23.0 ± 0.0	SENSIBLE	14.7 ± 0.6	INTERMEDIO
<i>Proteus vulgaris</i>	24.0 ± 0.0	SENSIBLE	15.3 ± 0.6	INTERMEDIO	15.0 ± 0.0	INTERMEDIO	0	RESISTENTE
<i>Bacillus cereus</i>	25.7 ± 0.6	SENSIBLE	26.0 ± 0.0	SENSIBLE	18.7 ± 0.6	SENSIBLE	14.0 ± 0.0	INTERMEDIO
<i>Bacillus subtilis</i>	30.7 ± 0.6	SENSIBLE	30.0 ± 0.0	SENSIBLE	26.0 ± 0.0	SENSIBLE	17.0 ± 0.0	SENSIBLE
<i>Salmonella sp.</i>	23.3 ± 0.6	SENSIBLE	27.7 ± 0.6	SENSIBLE	22.3 ± 0.6	SENSIBLE	0	RESISTENTE
<i>Escherichia coli</i>	26.0 ± 0.0	SENSIBLE	25.7 ± 0.6	SENSIBLE	22.3 ± 0.6	SENSIBLE	0	RESISTENTE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26.3 ± 0.6	SENSIBLE	28.7 ± 0.6	SENSIBLE	16.3 ± 0.6	SENSIBLE	0	RESISTENTE
<i>Staphylococcus aureus</i>	26.3 ± 0.6	SENSIBLE	28.7 ± 0.6	SENSIBLE	16.7 ± 0.6	SENSIBLE	23.7 ± 0.6	SENSIBLE

* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición:

Resistente: < 12 mm
 Intermedio: 13 a 14 mm
 Sensible: > 15 mm

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. 2002. "Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Por el método de disco difusión

En la TABLA N° 14 puede observarse que el control positivo **meropenem 10 µg** frente a *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvo halos de inhibición con actividad antibacteriana Sensible, a excepción de *Klebsiella pneumoniae* que tuvo halo de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia.

El control positivo **ciprofloxacino 5 µg** frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvo halos de inhibición con actividad antibacteriana Sensible, mientras que con *Proteus vulgaris* tuvo halo de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia.

El control positivo **gentamicina 10 µg** frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvo halos de inhibición con actividad antibacteriana Sensible, mientras que con *Proteus vulgaris* tuvo un halo de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia.

El control positivo **vancomicina 30 µg** frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, tuvo halo de inhibición con actividad antibacteriana Sensible; frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus cereus*, tuvo halos de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia; mientras que frente a *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, no presentó halos de inhibición, por lo que es Resistente a la actividad antibacteriana.

✚ En los siguientes gráficos puede observarse la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* y de los controles positivos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg, frente a las cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*:

GRÁFICO N° 1: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Klebsiella pneumoniae* según diámetro de la zona de inhibición.

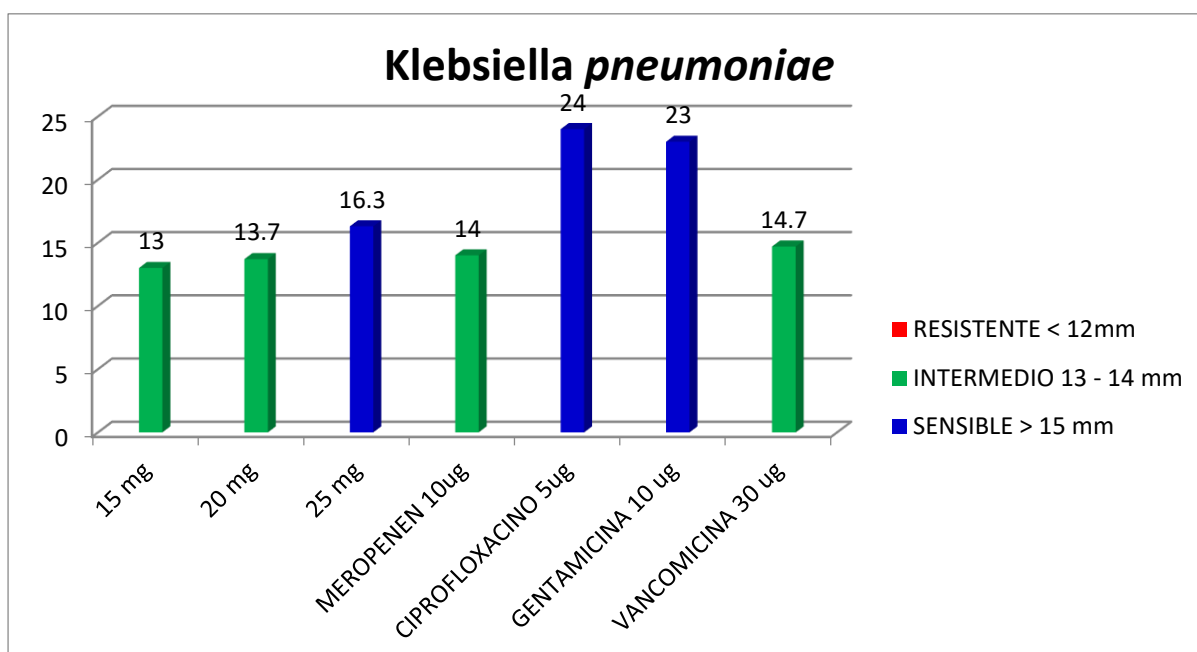


GRÁFICO N° 2: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Proteus vulgaris* según diámetro de la zona de inhibición.

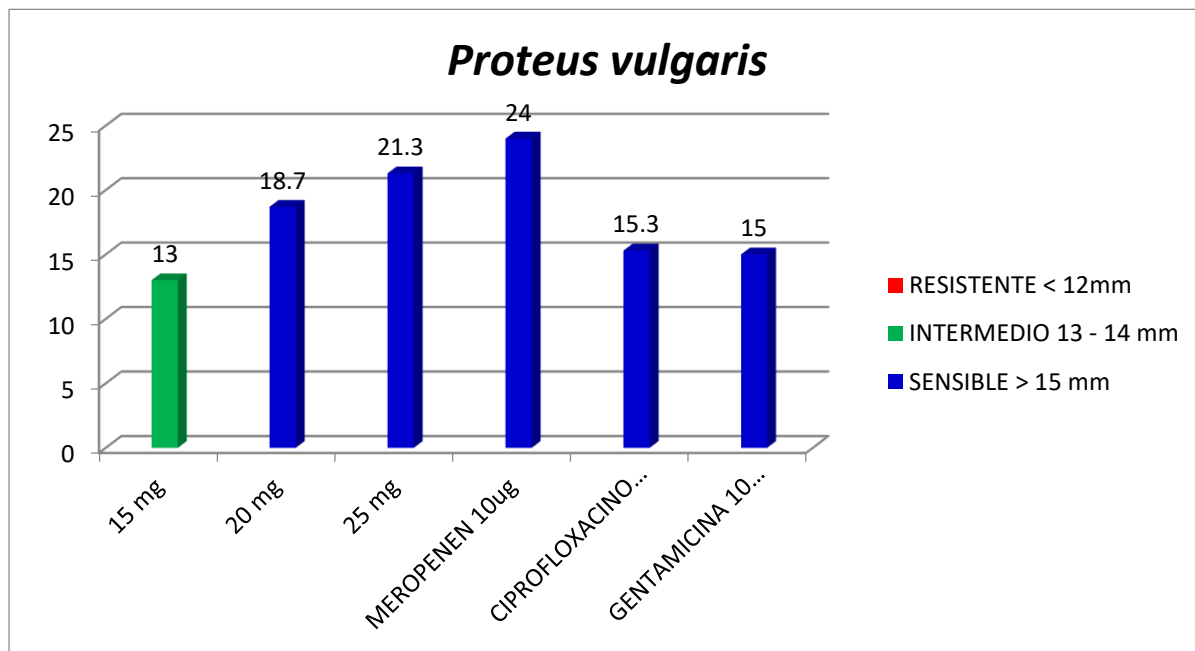


GRÁFICO N° 3: Actividad antibacteriana y Categorización del Extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Salmonella sp.* según diámetro de la zona de inhibición.

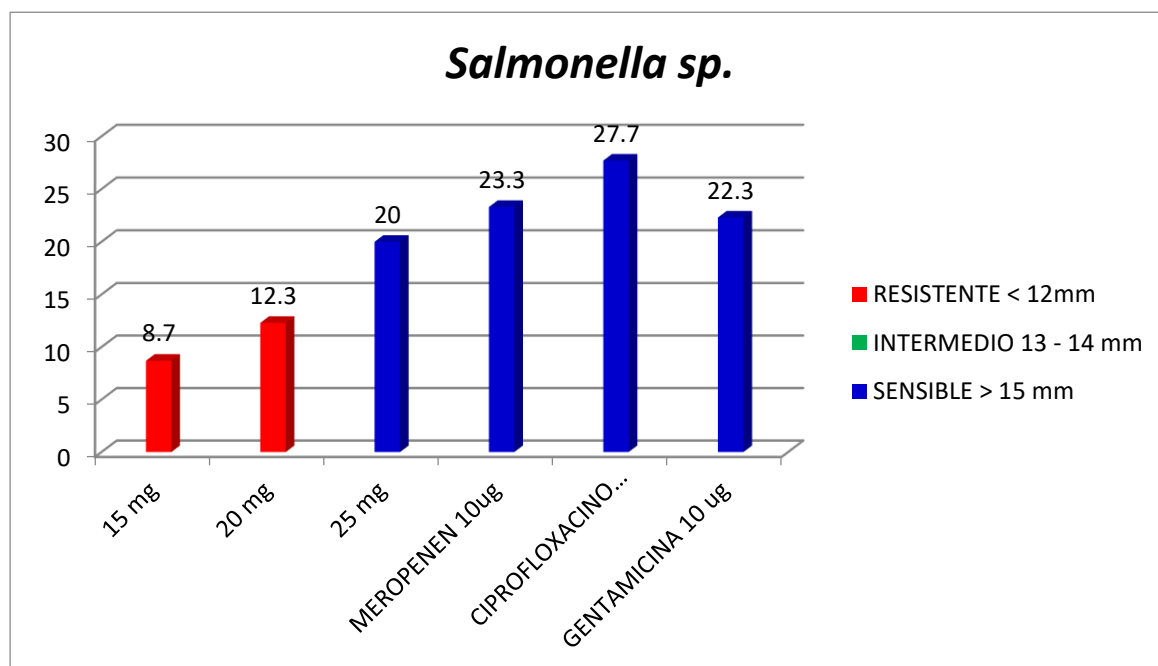


GRÁFICO N° 4: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Bacillus cereus* según diámetro de la zona de inhibición.

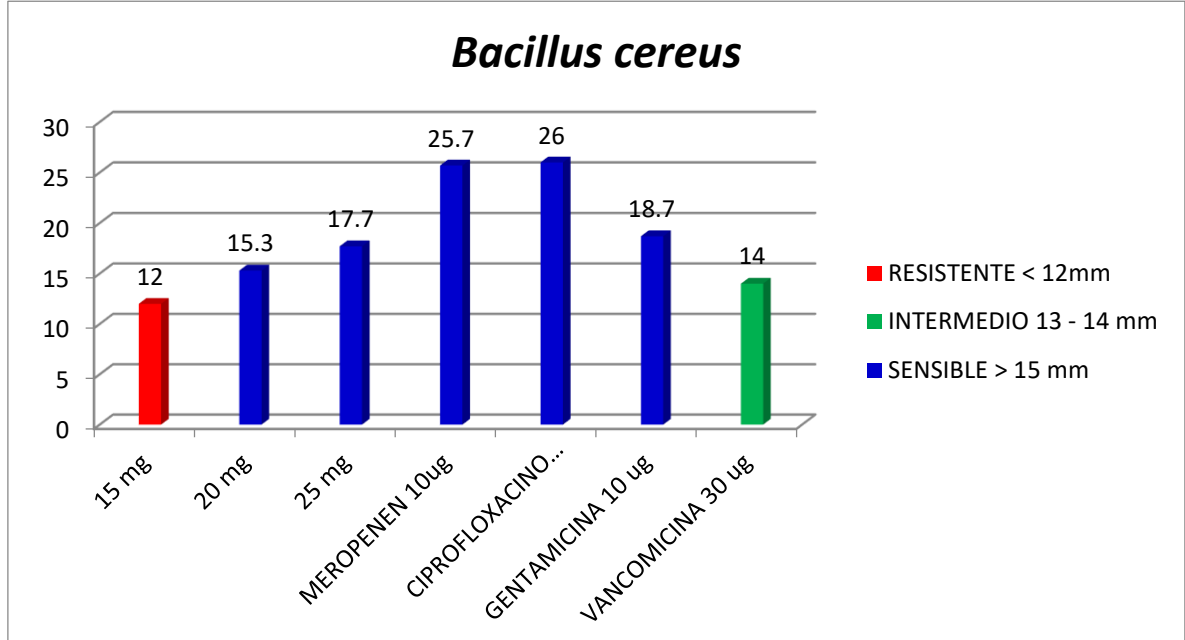


GRÁFICO N° 5: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Bacillus subtilis* según diámetro de la zona de inhibición.

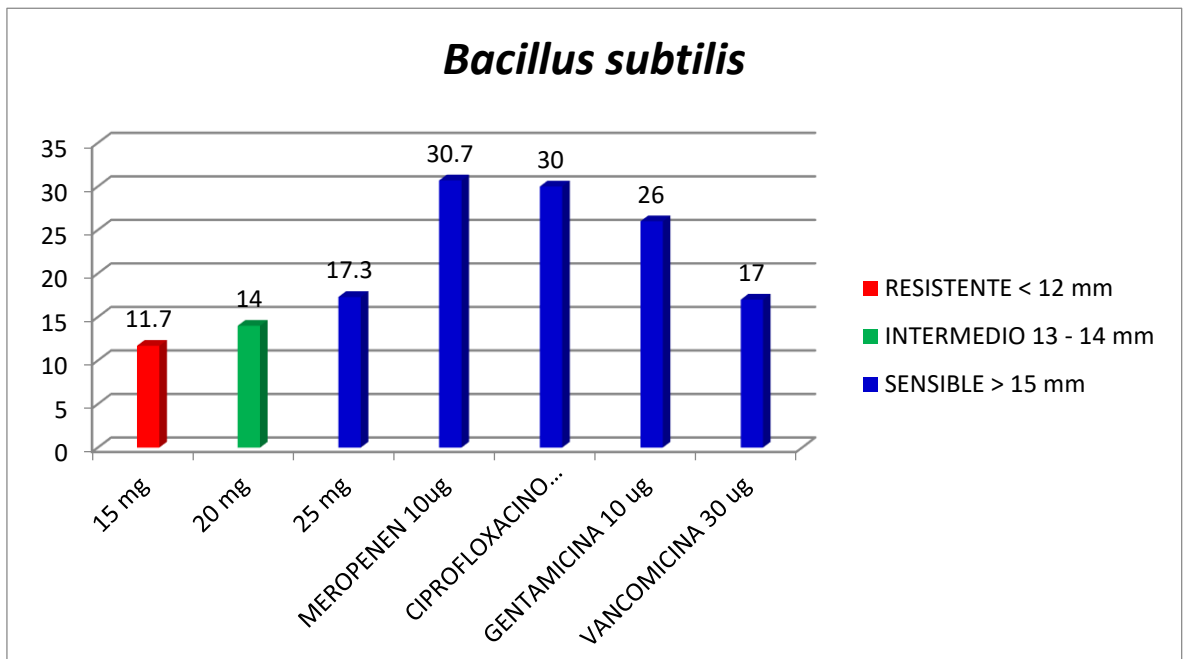


GRÁFICO N° 6: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus* según diámetro de la zona de inhibición.

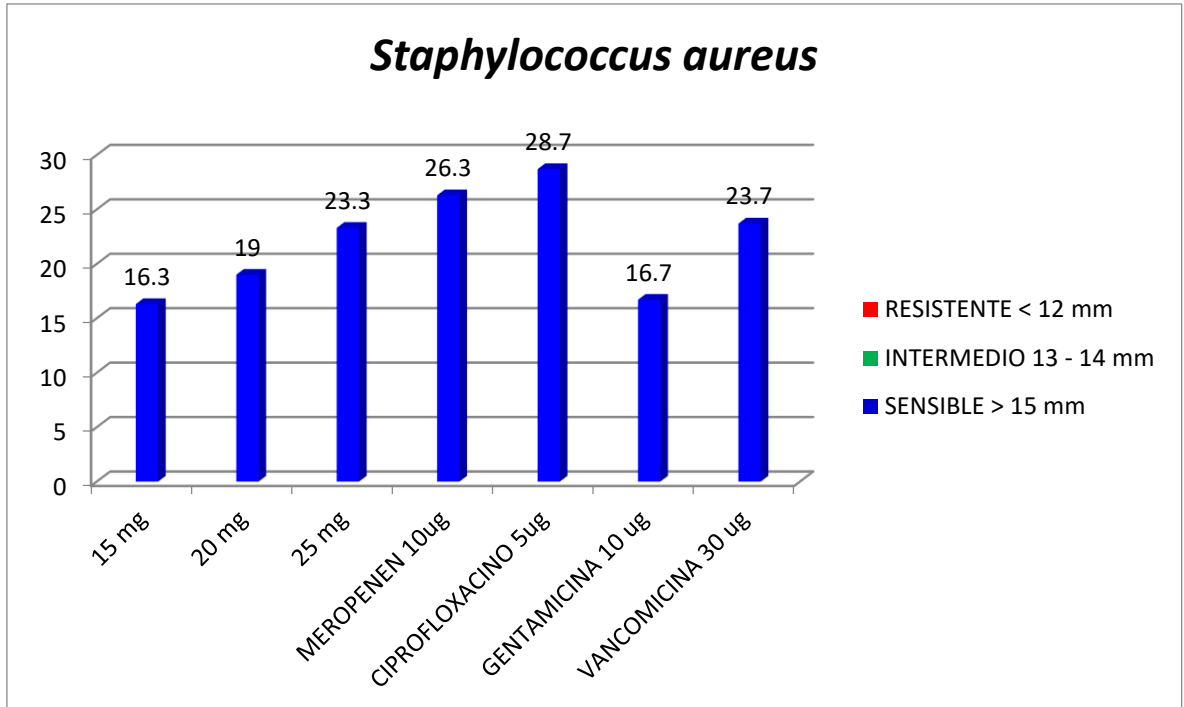


GRÁFICO N° 7: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Escherichia coli* según diámetro de la zona de inhibición.

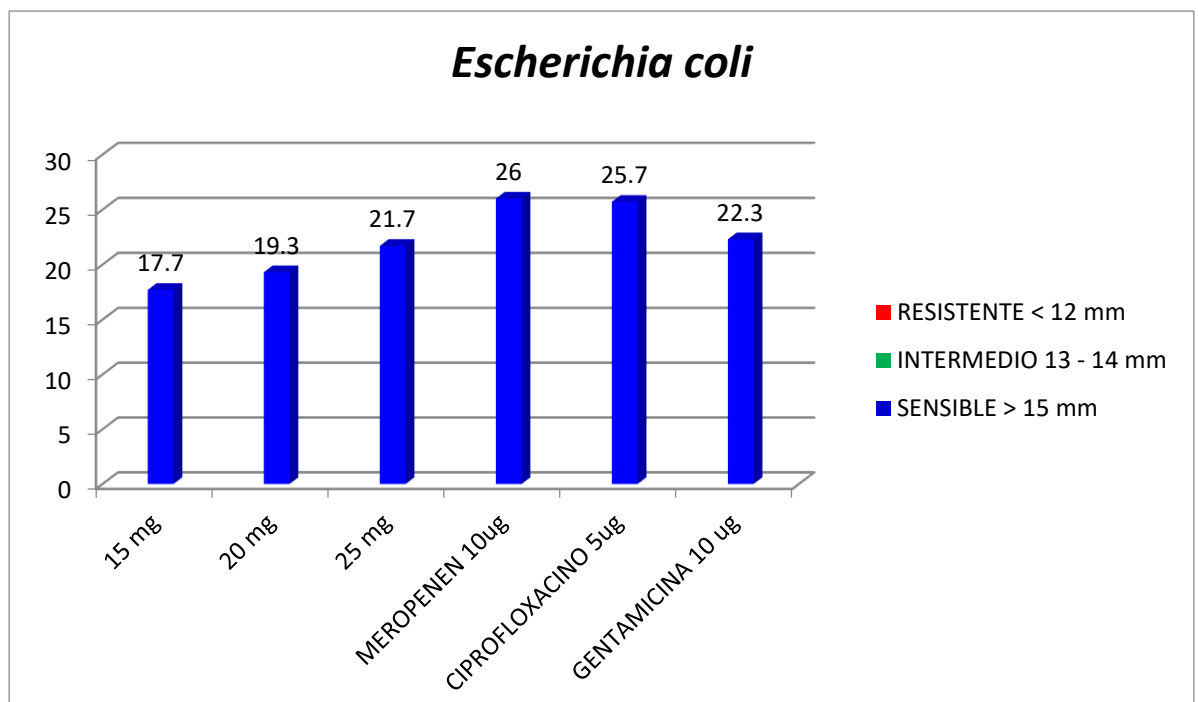
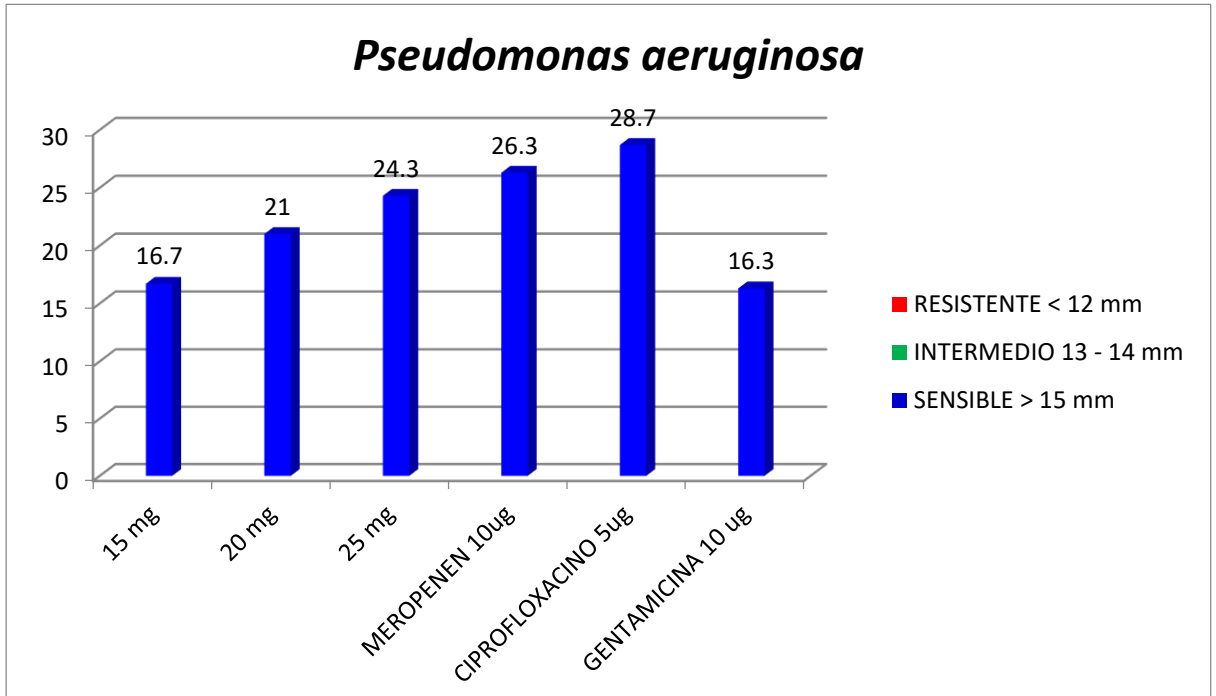


GRÁFICO N° 8: Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Pseudomonas aeruginosa* según diámetro de la zona de inhibición.



4.1.1.2.2 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

4.1.1.2.2.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

TABLA N° 15: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* según Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*.

BACTERIA EN ESTUDIO	DILUCIÓN POR TUBO	CMI	RESULTADO (*)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO
<i>Proteus vulgaris</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO
<i>Salmonella sp.</i>	C2	16 mg/ml	INACTIVO
<i>Bacillus cereus</i>	C4	4 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Bacillus subtilis</i>	C4	4 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i>	C4	4 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderadamente activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

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

En la **Tabla N° 15**, se muestran los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia*, en la que frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 8 mg/ml (C3), dando como resultado **Poco activo**.

Mientras que, frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, tuvo una CMI de 4 mg/ml (C4), dando como resultado **Moderadamente activo**.

Finalmente, frente a *Salmonella sp.*, tuvo una CMI de 16 mg/ml (C4), dando como resultado **Inactivo**.

4.1.1.2.2.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).

TABLA N° 16: Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella sp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

BACTERIA EN ESTUDIO	CMB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Salmonella sp.</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	32 mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	32 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	32 mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32 mg/ml

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) -concentración menor del extracto que mata a las bacterias- del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* según rango de lectura frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, fue de 32 mg/ml, concentración a la que se considera Activa.

La CMB del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* según rango de lectura frente a *Staphylococcus aureus*, fue de 16 mg/ml, concentración mucho menor que también se considera Activa.

Mientras que, en *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella sp.*, no se encontró CMB, por lo que se considera como Inactiva.

4.1.2 DISCUSIÓN

- ✚ La investigación realizada por **Ríos M y Flores J** determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* mediante el método de difusión en agar, solamente frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, también utilizadas en el presente trabajo. Utilizaron como control positivo el antibiótico gentamicina, mientras que en el presente trabajo se trabajó con meropenem, gentamicina, ciprofloxacino y vancomicina. Encontraron actividad antibacteriana significativa a las concentraciones de 12 y 6 mg/ml -concentraciones no consideradas en el presente trabajo de investigación-, con diámetros en la zona de inhibición de 28 y 22.7 mm, frente a *Staphylococcus aureus*, diámetros en la zona de inhibición de 19.7mm. y 15.7mm frente *Escherichia coli*, y 19.3 mm. y 14.7 mm frente a *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

- ✚ En el trabajo de investigación de **Ríos M y Flores J**, también realizado por el método de macrodilución, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue de 2 mg/ml para *Escherichia coli*; mientras que en el presente trabajo la concentración fue de 8 mg/ml. También encontraron una CMI de 4 mg/ml para *Staphylococcus aureus*, lo que coincidió con el presente trabajo.

- ✚ Amaral A, Kuster R, Gonçalves J y Wigg M, en su trabajo de investigación realizado en hojas de *Chamaesyce thymifolia*, encontraron una elevada citotoxicidad sobre células HEp-2 y moderada actividad inhibitoria sobre los virus HSV-1 y BVDV. El presente trabajo de investigación refrendó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y taninos, metabolitos que determinarían la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la planta en estudio.

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

- ✚ Utilizando el método de kirby *bauer* se determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* a concentración de 15 mg/ml frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* tuvo diámetros de inhibición con actividad antibacteriana Intermedia; frente a *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Salmonella sp*, tuvo actividad antibacteriana Resistente, y frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*, tuvo actividad antibacteriana Sensible, respectivamente. A concentración de 20 mg/ml frente a *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, tuvo actividad antibacteriana Intermedia; mientras que *Salmonella sp.* tuvo actividad antibacteriana Resistente; frente a *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*, tuvo actividad antibacteriana Sensible. A una concentración de 25 mg/ml de extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvo actividad antibacteriana Sensible.
- ✚ Se determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* según la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), encontrándose en el ensayo de macrodilución una concentración de 16 mg/ml, demostrándose que el extracto etanólico fue INACTIVO frente a *Salmonella sp.*; frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* y *Pseudomonass aureginosa*, la CMI fue en la concentración 8 mg/ml, por lo que el extracto etanólico demostró fue POCO ACTIVO ante estas cepas. En cuanto a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, la CMI se encontró a la concentración 4 mg/ml, siendo el extracto etanólico MODERADAMENTE ACTIVO frente a estas cepas.
- ✚ En la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se encontró una concentración de 32 mg/ml, considerada como Activa. La CMB del extracto etanólico de las hojas

de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus*, fue de 16 mg/ml, concentración mucho menor pero que también se considera Activa.

Mientras que, en *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella sp.*, no se encontró CMB, por lo que se considera como Inactiva.

- ✚ Mediante el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* se determinó la presencia de metabolitos secundarios como: fenoles y taninos más triterpenos y esteroides en cantidad Abundante (+++); alcaloides más lactonas y cumarinas, en cantidad Moderada (++); flavonoides, en cantidad Leve (+).

5.2. RECOMENDACIONES

- ✚ Que, se fraccionen, purifiquen y aíslen los metabolitos más abundantes que existen en las hojas de *Chamaesyce thymifolia*, con el objetivo de verificar cuál de éstos o la asociación de algunos de éstos determina su actividad antibacteriana.
- ✚ Que, se realicen ensayos utilizando métodos diferentes a lo realizado en este trabajo de investigación, con el objetivo de corroborar la actividad antibacteriana.
- ✚ Que, se realicen otros estudios en los órganos de la planta en estudio, con otros tipos de solventes.
- ✚ Que, se utilicen como control positivo otros tipos de medicamentos o de marca.

CAPÍTULO VI

6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1.2 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos; Nota de prensa, 27 de Febrero, 2016.
- 2) Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos, Nota descriptiva, Setiembre 2016.
- 3) García Lujan Concepción, tesis titulada “Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple”; Diciembre 2016, Mexico.
- 4) Cemat - Farmaya S.A.: Fichas populares sobre plantas medicinales. 2.ª ed. cemat. 1990, Guatemala.
- 5) Ríos Macedo, Marcos y Flores Hernández, Jhon. Tesis titulada “Actividad Antibacteriana De *Chamaesyce Thymifolia* Frente A *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* Y *Escherichia Coli*; Por El Método De Macrodilución Y Difusión En Agar”. 2016, Iquitos – Perú
- 6) Amaral A, Kuster R, Gonçalves J, Wigg M. Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia* 1999; 70(3):293-295.
- 7) Loizeau, P.; Spichiger, R.: Moraceae. Contribución a la Flora de la Amazonía Peruana. Génova, IT, p. 17-85. IIAP-PUB.033. (1990).
- 8) Dugdihika. AyurvedaHerbs/Medicinal-Plant-thymifolia. AspX. (2012)
- 9) Reynel, C; Pennington, T; Pennington, R; Flores, C; Daza, A.: Árboles útiles de la Amazonia Peruana y sus usos, un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Ilustraciones. (2003).
- 10) Madigan M., Martinko, J., y Parker, J., (1999) *Block biología de los Microorganismos* Madrid: Prentice Hall Iberia
- 11) Martínez G, Alpuche C, Anaya C, Alcántara D, Gayosso C, Daza C et al. Outbreak of nosocomial sepsis and pneumonia in a Newborn Intensive Care Unit by multiresistant extended-spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: High impact on mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22:725-728
- 12) Taroco R., Seija V., Vignoli R.: Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica; pag.669-670.

- 13) Ortega Verdecia, Dres. Bruno, Macola Olano, Silvia. Microbiología, Guía de estudio, 1981.
- 14) López G y Díaz, R.(2005) Manual práctico de Microbiología. Barcelona: Editorial MASSON S.A
- 15) International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1996) *Bacillus cereus*. In *Micro-Organisms in Foods. 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Roberts, T.A., Baird Parker, A.C. and Tompkins, R.B. eds. Published by Blackie Academic & Professional, London p. 20-35
- 16) EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. 2005
- 17) EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. 2005
- 18) Kramer, J. M., P. C. B. Turnbull, Munshi, G., and Gilbert, R.J. (1982) Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. In J. E. L. Corry, D. Roberts, and F. A. Skinner (ed.), *Isolation and identification methods for food poisoning organisms*. Academic Press, London, pp. 261-286.
- 19) Chen, h., Wang, L., Su, CX., Gong, GH., Wang, P., Yu, AL. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 47, 180-186. 2008.
- 20) Estrella Cervantes-García,* Rafael García-González,* Paz María Salazar-Schettino. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*; 61 (1): 28-40, 2014.
- 21) Richardson, AR; Libby SJ, Fang FC. «A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity» (en inglés). *Science* 319 (5870): pp. 1672-6. PMID: . Marzo, 2008.
- 22) Guadalupe Rodríguez-Angeles. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *464 salud pública de México / vol.44, no.5, septiembre-octubre de 2002*.
- 23) Madigan M., Martinko, J., y Parker, J., (1999) *Block biología de los Microorganismos* Madrid: Prentice Hall Iberia
- 24) EFSA, European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food borne Outbreaks in 2009 and 2010 specifically

for the data on Salmonella, Campylobacter, verotoxigenic Escherichiacoli, Listeria monocytogenes and foodborne outbreaks.

- 25) Merino, L. A. (2007), "Pseudomonas aeruginosa: una bacteria con personalidades múltiples". Rev. argent. microbiol., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 39, n. 3, sept. Disponible en <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000300004&lng=es&nrm=iso>. accedido en 21 abr. 2015.
- 26) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova. (1997).
- 27) Instituto Nacional de Salud, Ministerio de salud del Perú. manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de normas técnicas n° 30, pp 1:67. Lima – Perú. (2002).
- 28) Ena J, Dick R W, Jones R N, Wenzel R P. *The epidemiology of intravenous vancomycin usage in a university hospital*. JAMA 1993; 269: 598-602.
- 29) Ficha técnica, Gentamicina. Ministerio de salud del Perú. Centro de atención farmacéutica/digemid.
- 30) Fujii R y Nishimura T: *Pharmacokinetic and clinical evaluation of meropenem en paediatric field*. Abstracts of meropenem poster presentations. 8th Mediterranean Congress of Chemotherapy. May 24-29, 1992.
- 31) Donnelly J P, Sauerwein R, Horrevorts A y De Pauw B E: *Meropenem and tobramycin as treatment for Pseudomonas aeruginosa meningitis in a patient with lymphoblastic lymphoma*. Abstracts of meropenem poster presentations. 8th Mediterranean Congress of Chemotherapy. May 24-29, 1992.
- 32) Ficha técnica, Ciprofloxacino. Ministerio de salud del Perú. Centro de atención farmacéutica/digemid.
- 33) Parekh J., Jadeja D., Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. Turk J Biol 2005; 29: 203-210.

- 34) Kane S, Mohite S, Shete J. Antihelmintic activity of aqueous and Methanolic extracts of *Euphorbia thymifolia* Linn. Int.J. PharmTech Res. 2009; 1(3): 666 – 669.

6.1.3 WEBGRAFÍA

- 1) http://131.230.176.4/users/pelserpb/7_31_11/31Jul11/Chamaesycethymifolia.jp
- 2) https://es.wikipedia.org/wiki/Chamaesyc_thymifolia
- 3) <https://image.slidesharecdn.com/klebsiella-141120084435-conversion-gate02/95/klebsiella-2-638.jpg?cb=1416473097>
- 4) https://es.wikipedia.org/wiki/Klebsiella_pneumoniae
- 5) <https://render.fineartamerica.com>
- 6) https://es.wikipedia.org/wiki/Proteus_vulgaris
- 7) <http://www.diamantedegould.com/media/wysiwyg/infortis/ultimo/custom/salmonelosis.jpg>
- 8) <https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella>
- 9) https://verdeporquetequieroverde.files.wordpress.com/2010/06/3620194368_78061ca0e4.jpg
- 10) https://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_cereus
- 11) <https://static1.squarespace.com/static/54e0ac47e4b0541797890fbd/t/55608fdb4b0767a7f09e409/1432391658523/?format=750w>
- 12) https://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis
- 13) https://sites.google.com/site/ecologiaysaluddocencia/_/rsrc/1468889982801/home/unidad-iv/4-1-generalidades-bacterias/4-1-1-bacterias-de-transmision-respiratoria/4-1-1-1-staphylococcus-aureus/Diapositiva1.JPG
- 14) https://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
- 15) https://st2.depositphotos.com/4184747/7821/v/450/depositphotos_78210262-stock-illustration-the-structure-of-escherichia-coli.jpg
- 16) https://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
- 17) <http://www.ehagroup.com/assets/img/site/pathogens/pathogen-Pseudomonas-aeruginosa.jpg>
- 18) https://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa

- 19) http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/Lab_Micro/Antibiograma.html
- 20) <http://www.apcontinuada.com/es/el-antibioigrama-interpretacion-del-antibiograma/articulo/80000504/>
- 21) http://cdn.noticiaaldia.com.s3.amazonaws.com/wpcontent/uploads/2017/07/17495317_1304918852878812_8641073955844653056_n.jpg
- 22) <http://elembarazo.net/wp-content/uploads/2015/07/gentamicina-en-mujeres-embarazadas.jpg>
- 23) http://disdany.com/dany/components/com_jshopping/files/img_products/MEROPENEM0.5g.png
- 24) https://www.laboratoriochile.cl/wpcontent/uploads/2016/04/Ciprofloxacino_500MG_6C.jpg
- 25) <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>
- 26) <https://es.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no4-antibiograma-7723708>

ANEXOS

ANEXO N° 2: *Chamaesyce thymifolia*



ANEXO N° 1: Hojas de *Chamaesyce thymifolia* después de la molienda



ANEXO N° 3: Hojas de *Chamaesyce thymifolia* en el proceso de maceración en etanol



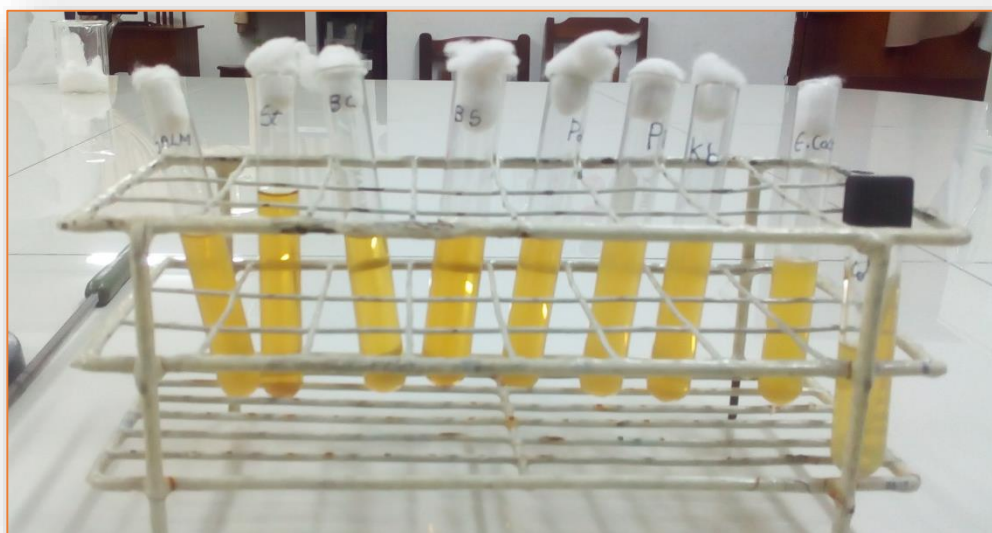
ANEXO N° 5: Concentración del extracto etanólico de las Hojas de *Chamaesyce thymifolia* utilizando el rotavapor



ANEXO N° 4: Extracto etanólico de las Hojas de *Chamaesyce thymifolia*



ANEXO N° 6: Cepas bacterianas



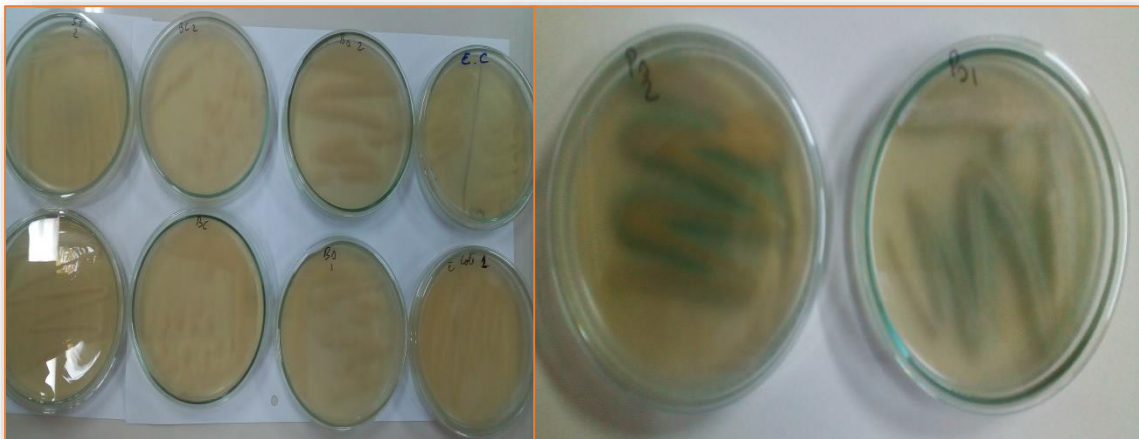
ANEXO N° 8: Materiales listos para esterilizar



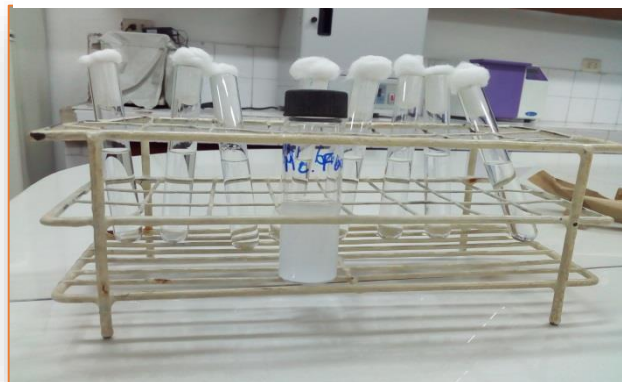
ANEXO N° 7: Sembrado de las bacterias en placas de agar Muller Hinton



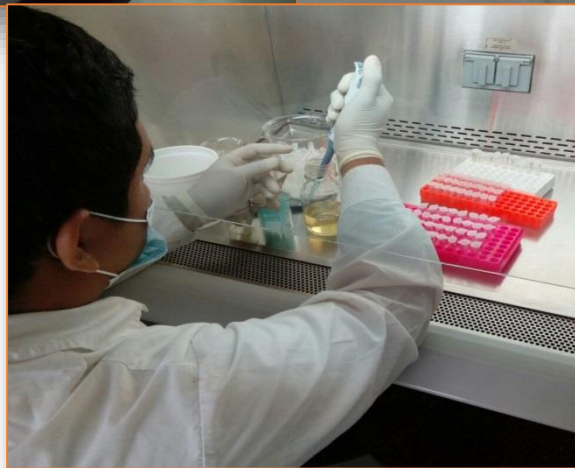
ANEXO N° 9: Bacterias que utilizaron en los ensayos



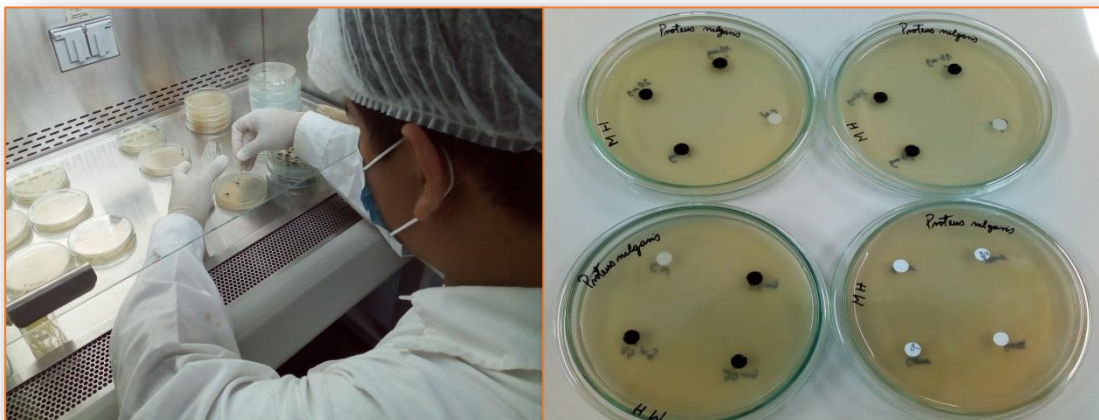
ANEXO N° 10: Inóculo bacteriano en tubos de NaCl comparados con el Estándar de McFarland



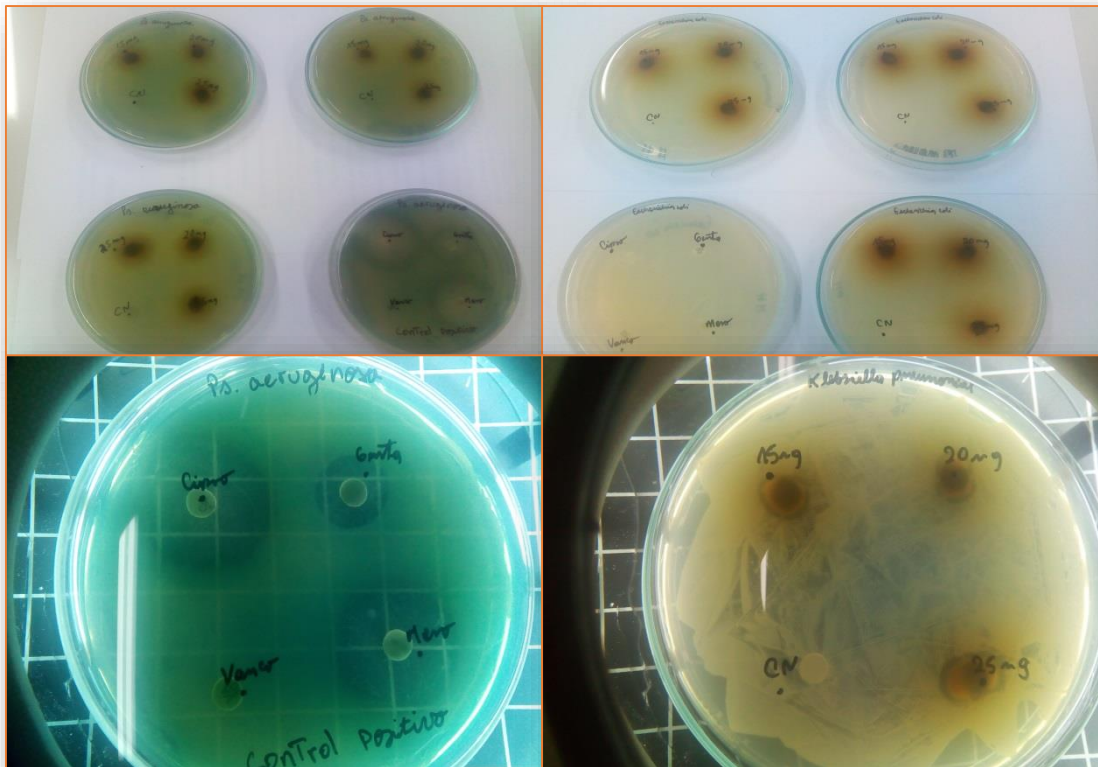
ANEXO N° 11: Preparación de discos impregnados con el extracto etanólico y preparación de los microtubos con caldo Muller Hinton



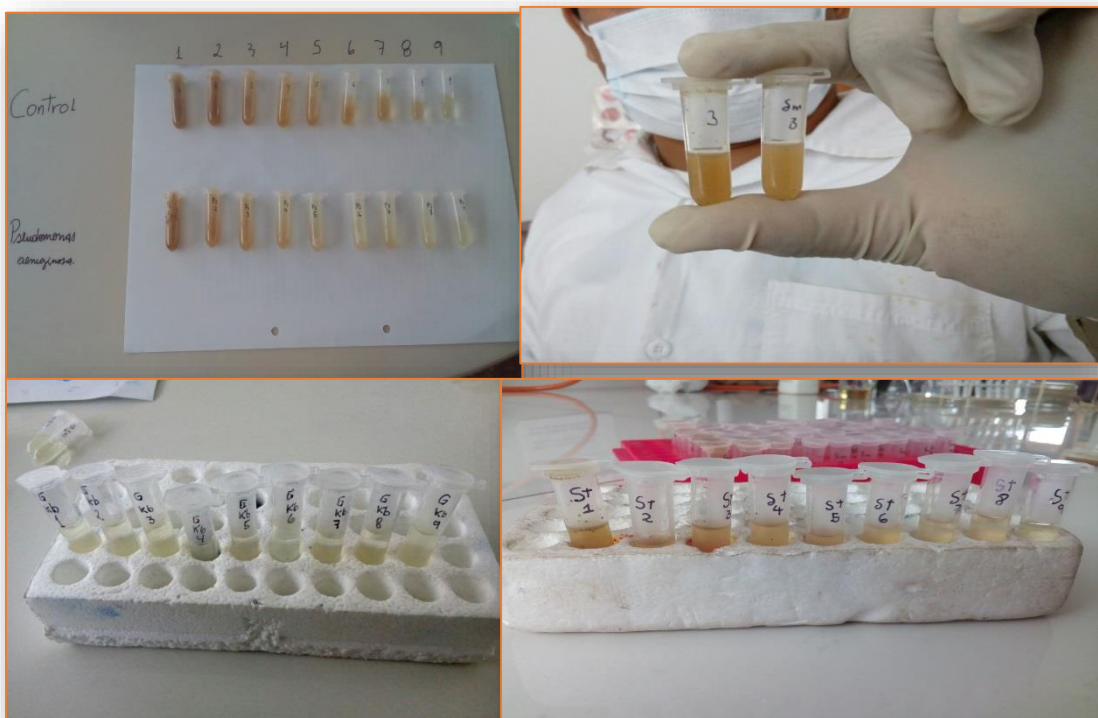
ANEXO N° 12: Aplicación de los discos impregnados con el extracto



ANEXO N° 13: Resultados de los ensayos realizados por el método de difusión en Agar



ANEXO N° 14: Resultados de los ensayos realizados, por el método de Macrodilución



ANEXO N° 15: Constancia del Herbarium Amazonenses



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación
de Recursos Naturales

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN N° AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA N° 003-2018-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del Centro de Investigación de Recursos Naturales, de La Universidad Nacional De La Amazonia Peruana:

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por **Javier Felipe Zagaceta García**, Bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis de pre grado titulada: “**Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a las cepas bacterianas por los métodos de difusión en agar y microdilución. Iquitos, 2017**”; la cual fue verificada y determinada en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP como sigue:

N°	FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO
1	EUPHORBIACEAE	<i>Chamaesyce thymifolia</i> (L.) Millsp.

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

Iquitos 17 de abril de 2018

Atentamente,


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

