

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS,
FARMACIA E INFORMÁTICA.**

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE *Flourensia polycephala* Dillon
(PHAUKA) Y ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA TOPICA
PARA SU EVALUACIÓN IN VIVO EN INFECCIONES DÉRMICAS POR
Staphylococcus aureus EN RATONES ALBINOS.**

**TESIS: PARA OPTAR AL TITULO
PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACEUTICO
PRESENTADO POR: VERÓNICA CASTRO SUMARIA
ASESORA: M.Cs. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ
CO ASESORES: M.Cs. YANET MENDOZA MUÑOZ
Mgt. CARLOS SERRANO FLORES**

AUSPICIADO POR EL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNSAAC

CUSCO – PERÚ

2011

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por todo lo bueno, y lo bello, por estar siempre conmigo en cada momento de mi vida, y por iluminar mi mente y alcanzar mi meta trazada.

A mis padres que los quiero mucho Teófilo y Celia por enseñarme todo lo que soy, por apoyarme en forma incondicional en todo momento de mi vida, Por darme consejos, buenos ejemplos y salir adelante en los momentos difíciles gracias y por todo el amor y cariño que me brindan.

A mi hermano Adilson Omar, por estar ahí y apoyarme en todo lo que pudo y Marleni mi amiga por apoyarme en este trabajo de investigación, por la amistad que tenemos y soportarme.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional San Antonio abad del Cusco, mi casa de estudios por haberme acogido en las aulas Universitarias.
- Al Instituto de Investigación de la Universidad Nacional San Antonio abad del Cusco, gracias por el apoyo y colaboración con el trabajo de investigación.
- A mi asesora en especial M.Cs. Carla del Carpio Jiménez, docente de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica de la universidad nacional San Antonio Abad del Cusco, por brindarme sus conocimientos, apoyo, ánimos, atención en todo momento en forma incondicional, durante y después del trabajo de investigación.
- A mi co- asesora M.Cs. Yanet Mendoza Muñoz, docente del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Antonio Abad del Cusco, por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.
- A mi co –asesor Mgt. Carlos Serrano Florez le agradezco por su confianza, tiempo y atención, y brindarme apoyo en este trabajo de investigación.
- Al Mgt. Nerio Góngora Amaut, jefe del área de farmacología, por brindarme apoyo con el laboratorio de farmacología de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica en el cual se pudo realizar el trabajo de investigación.
- Agradecer a todas las personas que estuvieron ahí para apoyarme en este trabajo de investigación gracias.

INDICE

Introducción	1
--------------	---

CAPITULO I

1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Formulación del problema.....	5
1.3. Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1. Objetivos generales.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Importancia y Justificación.....	5
1.5. Hipótesis.....	6
1.6. Limitaciones.....	8

CAPITULO II

MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. Antecedentes del Estudio.....	9
2.1.1. Antecedentes Etnobotánicos.....	9
2.1.2. Antecedentes Sobre Metodología.....	9
2.1.3. Antecedentes Sobre Genero <i>Flourensia</i>	14
2.2. Bases Teórico Científicas.....	17
2.2.1. Aspectos Botánicos de la Planta en estudio.....	17
2.2.1.1. Características de la familia Asteraceae.....	17
2.2.1.2. Nombre Científico.....	18
2.2.1.3. Clasificación taxonómica.....	19
2.2.1.4. Nombres vulgares en español.....	19
2.2.1.5. Descripción Botánica.....	19
2.2.1.6. Composición Fitoquímica.....	21

2.2.2.	Flora normal de la piel.....	21
2.2.3.	Infección	21
2.2.4.	Heridas y abscesos.....	22
2.2.5.	Patogenia de la infección bacteriana.....	22
2.2.6.	Infección bacteriana de la piel.....	22
2.2.7.	Bacteria en estudio <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.2.7.1.	Genero <i>Staphylococcus</i>	23
2.2.7.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.2.8.	Crecimiento microbiano.....	26
2.2.8.1.	Fisiología del crecimiento microbiano	26
2.2.8.2.	Nutrición microbiana.....	27
2.2.8.3.	Medios de cultivo.....	27
2.2.8.4.	Cultivo de microorganismos en laboratorio.....	27
2.2.8.5.	Medición de crecimiento microbiano.....	27
2.2.8.6.	Curva de crecimiento microbiano.....	28
2.2.9.	Actividad antimicrobiana.....	30
2.2.9.1.	Efectos de los agentes antimicrobianos.....	30
2.2.9.2.	Modo y mecanismo de acción de los antimicrobianos.....	31
2.2.9.3.	Medición de la actividad antimicrobiana.....	34
2.2.9.4.	Interpretación del antibiograma.....	35
2.2.9.5.	Criterios de Toda y Col.....	36
2.2.10.	Control microbiológico.....	36
2.2.11.	Fármacos patrones en el ensayo “in vitro e “in vivo”.....	38
2.3.	Forma Farmacéutica	42
2.3.1.	Clasificación	42
2.3.2.	Preparación de formas farmacéuticas semisólidas para aplicación cutánea.....	42

2.3.2.1.	Formulación de preparaciones semisólidas.....	43
2.3.2.2.	Tipos de emulsiones.....	45
2.3.3.	Preformulación	46
2.4.	Glosario.....	47

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.	Material biológico.....	49
3.1.1.	Muestra vegetal.....	49
3.1.2.	Muestra biológico.....	49
3.2.	Materiales e Instrumentos de Laboratorio.....	49
3.2.1.	Materiales de Campo.....	49
3.2.2.	Materiales de laboratorio.....	50
3.2.3.	Medios de cultivo.....	50
3.2.4.	Reactivos.....	50
3.2.5.	Equipos e instrumentos.....	51
3.2.6.	Materiales para el ensayo in vitro.....	51
3.2.7.	Materiales para el ensayo in vivo.....	52
3.2.8.	Otros materiales.....	52
3.2.9.	Recursos e infraestructura.....	53
3.3.	Metodología	53
3.3.1.	Tipo de investigación.....	53
3.3.2.	Diseño del experimento.....	53
3.4.	Identificación, definición y operacionalización de variables.....	56
3.4.1.	De la actividad antibacteriano in vitro y efecto antibacteriano in vivo.....	56
3.4.1.1	Variables independientes para el ensayo in vitro.....	56

3.4.1.2	Variables independientes para el ensayo in vivo	56
3.4.1.3	Variables dependientes.....	57
3.4.2.	Variables intervinientes	59
3.4.2.1.	De los ratones de experimentación.....	59
3.4.2.2.	De la muestra vegetal.....	59
3.4.3.	Criterios de selección.....	59
3.4.3.1.	De la muestra vegetal.....	59
3.4.3.2.	De las bacterias.....	59
3.4.3.3.	De los ratones.....	60
3.5.	Procedimiento experimental.....	61
3.5.1.	preparación de la planta en estudio.....	62
3.5.1.1.	Recolección de la planta en estudio.....	62
3.5.1.2.	Identificación botánica.....	62
3.5.1.3.	Selección y secado de la muestra.....	62
3.5.1.4.	Molienda.....	62
3.5.1.5.	Determinación del porcentaje de humedad	62
3.5.1.6.	Obtención de los extractos.....	63
3.5.1.7.	Pruebas de solubilidad.....	64
3.5.1.8.	Análisis fitoquímico cualitativo.....	64
3.5.2.	Control microbiológico.....	65
3.5.3.	Determinación de la actividad antibacteriana in vitro.....	70
3.5.4.	Estandarización de las concentraciones antibacterianas.....	74
3.5.5.	Ensayo con los fármacos patrón.....	76
3.5.6.	Método para el efecto antibacteriano in vivo.....	76

CAPITULO IV
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1.	preparación de la muestra.....	81
4.1.1	Determinación del porcentaje de humedad.....	81
4.2.	Obtención del extracto de las hojas de <i>Flourensia polycephala (Phauka)</i> Dillon	82
4.2.1	Determinación del porcentaje de extracción.....	82
4.2.2	Determinación de las pruebas de solubilidad.....	83
4.2.3	Determinación del análisis fitoquímico.....	86
4.3.	Del control microbiológico del extracto.....	88
4.4.	Determinación de la actividad antibacteriana.....	90
4.4.1	De la estandarización de la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
4.4.2	Del ensayo de la sensibilidad antibacteriana.....	92
4.4.2.1	De la prueba piloto.....	92
4.4.2.2	Análisis estadístico de la prueba piloto del ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico.....	93
4.4.2.3	Análisis estadístico de la prueba piloto del ensayo de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico.....	97
4.4.2.4	De la estandarización de las concentraciones antibacterianas.....	100
4.4.2.5	Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas.....	102
4.4.3	Del ensayo de la actividad antibacteriana con los fármaco patrón.....	104
4.4.4	Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas y los fármacos patrón.....	106

4.4.5 Evaluación del efecto antibacteriano “in vivo” del extracto etanólico de las hojas de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (<i>Phauka</i>) en las heridas infectadas con <i>Staphylococcus Aureus</i> en los ratones de experimentación.....	114
--	-----

CONCLUSIONES	118
---------------------------	-----

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES	120
--	-----

BIBLIOGRAFIA	121
---------------------------	-----

ANEXOS	131
---------------------	-----

ANEXO 01

IDENTIFICACION BOTANICA DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

ANEXO 02

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LA BACTERIA

ANEXO 03

CERTIFICADO SANITARIO DE LOS RATONES DE EXPERIMENTACION

ANEXO 04

PRUEBAS DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

ANEXO 05

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y CLOROFORMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*).

ANEXO 06

FICHA DE RECOPIACION DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION

ANEXO 07

FICHA DE RECOPIACION DE LOS DIAS DE CURACION DE LOS RATONES ALBINOS

ANEXO 08

ARCHIVO FOTOGRAFICO

RESUMEN

El presente trabajo tiene por finalidad demostrar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) y efecto antibacteriano in vivo elaborando una forma farmacéutica a partir del extracto que presentó mayor actividad antibacteriana in vitro, el extracto etanólico y clorofórmico de las de la hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), se ha obtenido por previa maceración con dichos solventes.

Estos fueron sometidos al control microbiológico, para los microorganismos de salmonella, Coliformes fecales, mesofilos viables, hongos y levaduras, en lo que se comprobó que los extractos no presentaron contaminación alguna, se realizó el análisis fitoquímico determinándose los siguientes compuestos, esteroides, ácidos fenólicos y flavonoides.

Mediante el método de Kirby Bawer o disco difusión en placa, se determinó la actividad antibacteriana in vitro, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Donde los diámetros de la prueba de disco difusión en placa para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, del extracto etanólico fue de 18.50 mm y del extracto clorofórmico fue de 14.00 mm a la concentración de 30.21 mg/disco para ambos extractos.

La determinación de la actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se pudo ver que a la concentración de 3.24 mg/disco, el extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana ligera con un halo de inhibición promedio de 8.1 mm, a la concentración de 30.21 mg/disco el extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana marcada con un halo de inhibición de 18.50 mm, mientras que el extracto clorofórmico a una concentración de 4.70 mg/disco presenta una actividad antibacteriana ligera con un halo de inhibición de 8.4 mm, a la concentración de 30.21 mg el extracto clorofórmico tiene una actividad moderada con un halo de inhibición de 14.00 mm. Con estos resultados se concluyen que el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) presenta mayor actividad antibacteriana.

Se realizó la elaboración de la forma farmacéutica donde se probó diferentes formulaciones, eligiéndose la formulación que presentó mejor homogeneidad, y mejores características, siendo esta una emulsión O/W a una concentración de 0.25 g de extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka). el que resultó más eficaz para curar la infección producida a los ratones de experimentación en menos días.

Se concluye que los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), presentan actividad antibacteriana in vitro frente las a la cepa en estudio en comparación a los fármaco patrón, mientras que para el efecto antibacteriano in vivo se concluye que la forma farmacéutica emulsión O/W elaborada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) a la concentración de 0.25 gr, curó la infección en menos días.

Palabras claves:

- *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)
- Actividad antibacteriana
- Efecto antibacteriano
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

ABSTRACT

This paper aims to demonstrate the in vitro antibacterial activity of ethanol and chloroform extract of the leaves of *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) and in vivo antibacterial pharmaceutical form developed from the extract showed higher antibacterial activity in vitro, the extract ethanol and chloroform from the leaves of *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) has been obtained by pre-soaking with these solvents.

These were submitted to microbiological monitoring for microorganisms of *Salmonella*, fecal coliforms, mesophilic viable fungi and yeasts, as it was found that the extracts did not show any contamination, phytochemical analysis was performed by determining the following compounds, steroids, phenolic acids and flavonoids.

By Kirby Bawer or disk diffusion assay, we investigated the in vitro antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Where the diameters of the test disk diffusion assay for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, the ethanol extract was 18.50 mm and the chloroform extract was 14.00 mm at a concentration of 30.21 mg / disc for both extracts.

Determination of antibacterial activity on strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was shown that the concentration of 3.24 mg / disc, the ethanol extract has a mild antibacterial activity with inhibition zone average of 8.1 mm, a concentration of 30.21 mg / disc ethanol extract has a strong antibacterial activity with inhibition zone of 18.50 mm, while the chloroform extract at a concentration of 4.70 mg / disc has a slight antibacterial activity with inhibition zone of 8.4 mm, the concentration 30.21 mg chloroform extract has a moderate activity with an inhibition zone of 14.00 mm. With these results we conclude that the ethanol extract of the leaves of *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) provides higher antibacterial activity.

It made the development of the pharmaceutical form which tested different formulations, on the earlier formulation showed a better uniformity, and better features, this being an emulsion O / W at a concentration of 0.25 g of ethanol

extract of the leaves of *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*). Which was more effective in curing the infection produced experimental mice within days.

It is concluded that ethanol and chloroform extracts from the leaves of *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) showed antibacterial activity in vitro against a strain in the study compared to the standard drug, whereas for the antibacterial effect in vivo is concluded that the pharmaceutical form O / W emulsion prepared with the ethanol extract of the leaves of *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) to the concentration of 0.25 grams, cured the infection within days.

Keywords:

- *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*)
- antibacterial activity
- antibacterial effect
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

INTRODUCCION

En las últimas décadas el auge por las plantas medicinales ha incrementado notablemente a nivel mundial. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentiva la obtención de los medicamentos a partir de los recursos naturales. En este marco, algunos estudios de farmacología se han abocado a la obtención de antimicrobianos a partir de recursos biológicos y de plantas medicinales. (33) A nivel internacional existen tendencias y hechos globales que muestran cómo el mundo está en búsqueda de un equilibrio, orientándose por una preferencia cada vez mayor por lo natural u orgánico, reflejada en el crecimiento sostenido de la demanda mundial y local por productos agrícolas de este tipo. (32) La OMS estima que alrededor del 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para sus necesidades básicas de salud, y que casi el 85% de la medicina tradicional involucra el uso de plantas medicinales, sus extractos vegetales y sus principios activos. Por ello, en 1978 se produjo un cambio importante en el empleo y estudio de la herbolaria en la mayor parte del mundo. (17)

Hoy en día se sigue utilizando una gran variedad de plantas medicinales cuyas propiedades terapéuticas aún no son establecidas experimentalmente. Su abundancia, gran variedad y fácil comercialización, hacen posible el acceso de estas plantas a la población con bajos recursos económicos (11)

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado (17)

Una amplia variedad de antimicrobianos naturales, han sido desarrollados a partir de los microorganismos, plantas y animales, muchos de los cuales, ya han sido empleados para la conservación de alimentos y otros están siendo investigados. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especies, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes, alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. A estos antioxidantes naturales, especialmente los flavonoides, catequinas,

antocianinas y poliflavonoides, se les reporta como responsables de los siguientes efectos biológicos; antibacterial, antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador (Cook y Samman, 1996)

Teniendo en cuenta que en nuestra región son recurrentes las enfermedades dérmicas, que las bacterias que causan estas enfermedades se están volviendo resistentes a los antibióticos tradicionales por el uso irracional de los mismos, en esta investigación se quiere determinar la posible actividad antibacteriana in vitro e in vivo que poseen las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*), las cuales son utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de afecciones de la piel y en la curación de llagas y heridas, por lo que consideramos es importante estudiar esta propiedad curativa para darle una base científica que garantice su uso, lo que nos permitirá tener una alternativa natural y de bajo costo en el tratamiento de infecciones dérmicas causadas por bacterias.

CAPITULO I

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la piel esté colonizada por un amplio número de bacterias, aquellos que actúan como patógenos cutáneos más habituales son los estafilococos. Se puede aislar hasta 12 especies de la piel humana, a las que se les denomina en forma general estafilococos (coagulasa negativos), entre los cuales los más abundantes son, el *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis*. Se encuentran raramente en la piel enferma, aunque se pueden aislar en las foliculitis mínimas a que son propensos algunos adultos. (13)

La piel es proclive a padecer enfermedades originadas tanto por causas internas como externas. La protección de la epidermis frente a la infección depende de la barrera mecánica proporcionada por el estrato córneo, ya que la propia epidermis carece de vasos sanguíneos. La rotura de esta barrera por quemaduras, mordeduras, abrasiones, cuerpos extraños, trastornos dermatológicos primarios (por ejm, herpes simple, varicela, ectima gangrenosa) permite la penetración de bacterias en las estructuras más profundas. Del mismo modo, el folículo piloso puede servir de entrada de la flora normal (por ejm *Staphylococcus*) o de bacterias extrañas (por ejm *Pseudomonas* en la foliculitis del baño caliente). (29)(45)

En los establecimientos de salud de la Dirección Regional de Salud Cusco (DIRESA Cusco) durante el año 2007 se encontró que entre las diez principales causas de morbilidad están; en segundo lugar ciertas enfermedades infecciosas parasitarias (con 15.04%); y en octavo lugar las enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo (con 3.57%) a nivel regional. En la provincia del Cusco con 07 grupos de patologías que explican el 80% de las consultas de morbilidad entre las cuales se encuentran; en tercer lugar ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (13.46%) y en sétimo lugar enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo (3.83%). Estas principales causas de morbilidad en los servicios de DIRESA Cusco, muestran en general que desde el punto de vista de morbilidad

tenemos un patrón de enfermedades infecciosas; ligado a las condiciones de pobreza, a prácticas de hábitos y estilos de vida no saludables, condiciones insuficientes de saneamiento ambiental, inadecuada manipulación de alimentos, problemas persistentes de inaccesibilidad a los servicios de salud, entre otros. (16) En cambio el *Staphylococcus aureus* se distingue de los anteriores estafilococos, por ser coagulasa-positivo, es el responsable de la mayoría de las infecciones agudas del folículo pilosebáceo, así como de otras afecciones cutáneas más graves, además pueden desencadenar infecciones sistémicas, colonizar de forma intermitente la nasofaringe, la piel, y la vagina en los distintos periodos de la vida. (13)

Actualmente se encuentran serios problemas de resistencia a los medicamentos antimicrobianos, la cual se presenta con diversos microorganismos dentro de los cuales cabe destacar *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, en especial en el ámbito hospitalario; mientras las infecciones por *Staphylococcus* no adquiridas en hospitales pueden tratarse con los antibióticos betalactámicos, las infecciones adquiridas en hospitales son, en su gran mayoría resistentes a estos antibióticos y requieren tratamientos alternativos mas costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad. La resistencia se extiende a antimicóticos, antimaláricos y antivirales, haciendo cada vez menos efectivos los viejos medicamentos. (63)

La búsqueda de nuevos antibióticos y que mejor a base de plantas medicinales es una alternativa nueva y promisoría, es así, que, la especie vegetal ***Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)** se presenta como una planta que podría tener propiedades antimicrobianas, sobre todo frente a estafilococos que causan infecciones dérmicas, por lo que es necesario investigar las propiedades medicinales de esta especie vegetal de manera científica, para que su conocimiento deje de ser sólo empírico, brindando nuevas alternativas al tratamiento antimicrobiano de las enfermedades dérmicas a través de una forma farmacéutica que presente un buen efecto.

1.2.- FORMULACION DEL PROBLEMA.

¿Presentarán los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de la especie vegetal ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*?

¿Presentará la forma farmacéutica elaborada con el extracto que presente mayor actividad in vitro, efecto antibacteriano in vivo en ratones albinos infectados con *Staphylococcus aureus*?

1.3.- OBJETIVOS.

1.3.1.- OBJETIVO GENERAL.

- Determinar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de la especie vegetal ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** frente a *Estafilococos aureus*.
- Determinar el efecto antibacteriano in vivo de la forma farmacéutica elaborada con el extracto de mayor actividad antibacteriana in vitro de la especie ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** en un modelo de infección por *Staphylococcus aureus* en ratones albinos machos

1.3.2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Obtener los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de la especie vegetal ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)***, determinar el porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento e identificar los metabolitos secundarios presentes.
- ❖ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de la especie vegetal ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** frente a cepas de ***Staphylococcus aureus ATCC 25923***.

- ❖ Determinar la susceptibilidad bacteriana de los extractos etanólico y clorofórmico de ***Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)** por el método de difusión en agar, frente a *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Comparar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de ***Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)** sobre cepas de ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** con dos medicamentos patrón (*neomicina* y *bacitracina*).
- ❖ Formular y elaborar una forma farmacéutica semisólida de aplicación epidérmica a partir del extracto que presente mayor efecto antibacteriano in vitro.
- ❖ Determinar el efecto antibacteriano “in vivo” de la forma farmacéutica elaborada con el extracto de mayor efecto in vitro de la especie vegetal ***Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)**, en un modelo de infecciones dérmicas producidas en ratones albinos machos, frente al fármaco patrón ungüento neomicina y bacitracina.

1.4.- IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION

El presente trabajo tiene por finalidad, brindar una alternativa al tratamiento de las infecciones dérmicas producidas por *Estafilococos aureus* que se presenten en nuestro medio.

Teniendo en cuenta que en el año 2004 dentro de los principales grupos de morbilidad registrados por consulta externa en la Dirección de Salud Cusco las infecciones de la piel y del tejido subcutáneo ocupa el décimo lugar, con 15645 pacientes que corresponde al 1.83% del total. Esto podría deberse a las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. (43)(45)

A causa de la constante emergencia de cepas de *S. aureus* resistentes a una gran variedad de agentes terapéuticos, surge la necesidad de investigar nuevas alternativas terapéuticas, dándole prioridad al estudio de extractos vegetales; puesto que la mayoría de éstos poseen propiedades medicinales que pueden ser aprovechados principalmente en los países en vías de desarrollo, en donde la utilización de plantas con finalidad terapéutica resulta más accesible a la población.

Considerando que el Perú, es un país que cuenta con una gran diversidad de plantas, cuya actividad terapéutica no ha sido estudiada en su totalidad, resulta importante realizar estudios acerca de los beneficios de las mismas y así puedan ser aprovechados dentro del campo médico. Por consiguiente, este estudio tiene como finalidad comprobar el efecto inhibitorio sobre la bacteria *S. aureus* de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) popularmente para tratar enfermedades de la piel en heridas y golpes y ser utilizadas como tratamiento alternativo para las infecciones causadas por esta bacteria, ampliando las opciones terapéuticas en nuestro país.

Por tal razón es necesario el conocimiento científico de las propiedades antibacterianas de *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) y difundir su uso terapéutico. Es importante estudiar dicha planta andina, ya que realizando el presente trabajo de investigación pueda demostrar el probable efecto antibacteriano frente a *Estafilococos aureus* microorganismo causante de infecciones dérmicas, y así de esta manera incentivar el desarrollo de nuevos estudios de dicha especie vegetal.

1.5.-HIPOTESIS.

- ❖ Los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de la especie vegetal ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** presentan diferente actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*.
- ❖ El extracto de la especie vegetal ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** que presenta mayor actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*; incorporado a una forma farmacéutica semisólida, presenta buen efecto antibacteriano in vivo en ratones albinos machos en un modelo de infecciones dérmicas.

1.6.- LIMITACIONES

- ❖ La poca información bibliográfica sobre la especie en estudio, pues sólo se pudo encontrar antecedentes de especies relacionadas y que pertenecen a la misma familia botánica.
- ❖ El laboratorio de microbiología de la Carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, no cuenta con el material suficiente para el desarrollo de la parte microbiológica de este trabajo de tesis, por lo que tuvo que realizarse en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina Humana.

CAPITULO II

MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.1.1. ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS

➤ **Mantilla Holguín Justo; Olazábal Castillo Oscar instituto de ecología y plantas medicinales “Pachamama Hampi Qhoranchiskuna” Perú 2008 (39).** Indican que esta planta es utilizada en Heridas, las hojas chancadas se pone encima de las heridas; en Golpes, las hojas secas se muelen y se mezcla con alcohol, para luego pasarse por la parte afectada; en Reumatismo, se realiza un emplasto con "chiri chiri", "yawarchonq'a" y "maich´a", se coloca cada dos días.

➤ **Delbón Natalia, Eynard Cecilia, Jardín Botánico Gaspar Xuárez S.J. Facultad de Ciencias Agropecuarias. *Flourensia oolepis* (Asteraceae). Universidad Católica de Córdoba Argentina 2006 (15).** *Flourensia oolepis* (Asteraceae, n.v. Chilca) es una especie endémica, resinosa, esta especie ha sido tradicionalmente utilizada como tintórea, aromática, medicinal y para leño Actualmente numerosas investigaciones enfocan la caracterización de los compuestos químicos de la resina, e indagan la acción biocida y otros usos.

2.1.2. ANTECEDENTES SOBRE METODOLOGIA

➤ **Martínez J., Sulbarán de Ferrer B., Ojeda de Rodríguez G., Ferrer a. y Nava r. Revista de la facultad de Agronomía “Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina” Venezuela 2003 (40).** Se estudió la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulada Blanco*) variedad Dancy. Las cortezas de las frutas fueron prensadas al frío para la obtención del aceite. Las cepas bacterianas que se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana fueron: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC

259923, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar utilizando las siguientes concentraciones de aceite: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. La CMI se determinó por el método de dilución en caldo utilizando 6 concentraciones. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana del tipo bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* a todas las concentraciones excepto al 1%. La CMI del aceite esencial de mandarina variedad Dancy para *B. subtilis* fue de 9%, para *S. aureus* y *L. monocytogenes* fue de 7%.

- **Valle Álvarez Gladys María, Déjalo Michelena Mercedes; McCook Noa Leysis, Piloto Fernández Marta, Sebazco Pernas Caridad; Ruiz Alcorta Vladimir instituto superior de medicina militar “Modelo de herida infectada” Cuba 2005 (59).** Se estableció un modelo biológico para reproducir una infección en heridas quirúrgicas por *Staphylococcus aureus* en 10 cobayos machos de la línea Hartley con un peso variable entre 269-320 g. Se realizaron colgajos curvos en la piel a cada lado de la línea media de aproximadamente 2 cm de diámetro y se aplicó con hisopo un cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* procedente de un aislamiento clínico a una concentración de 2×10^8 UFC. Seguidamente se suturó la piel en su posición normal y se evaluaron los signos de infección durante 72 h, al término de las cuales se realizó el sacrificio y la toma de muestra del tejido infectado para estudio histopatológico. Desde el punto de vista macroscópico se observó edema, rubor, exudación y absceso. Al estudio microscópico se encontró predominio de infiltrado agudo en toda la piel desde la epidermis y la dermis inferior que en el 30 % de los animales incluyó la muscular con presencia de fibrina. En el estudio microbiológico se recuperó *Staphylococcus aureus* con similar patrón anti biotipo al de la cepa inoculada. Estos resultados permiten concluir que bajo las condiciones de trabajo señaladas se logró la infección de heridas quirúrgicas, lo que coincide con lo reportado internacionalmente. Este modelo constituye una ayuda eficaz en estudios terapéuticos de las infecciones por este germen.

- **Avellaneda Saucedo Senovio, Rojas Hernández Nidia M., Cuéllar Armando y Fonseca Juárez Rosa María “Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose” México 2005 (3).** Se realizó un análisis fitoquímico y de la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de la corteza de *Diphysa minutifolia* Rose (*Leguminaceae*), colectada de la Región Tierra Caliente del Estado de Guerrero, México. El estudio químico cualitativo del extracto sugirió la presencia de compuestos reductores, flavonoides, fenoles y taninos. Para determinar su posible efecto antibacteriano, el extracto se enfrentó a 33 cepas bacterianas de la colección ATCC y de otros orígenes por el método de difusión radial en monocapa en medio con agar y con pocillos cilíndricos. La concentración máxima del extracto evaluado fue 100 mg/mL. Se determinó que el extracto alcohólico posee actividad inhibitoria frente al 84,3 % de las cepas bacterianas probadas incluyendo Gram positivas y Gram negativas y que su efecto es bacteriostático y bactericida. Para valores de concentración mínima inhibitoria de 100 mg/ mL, este extracto presentó baja actividad sobre el 37,0 % de las cepas probadas, con valores entre 25 y 50 mg/mL mostró mediana actividad sobre el 29,6 % de las cepas y para valores de concentración mínima inhibitoria inferiores a 12,5 mg/mL, tuvo elevada actividad sobre el 33,3 % de las cepas. El extracto presentó efecto bactericida sobre el 66,6 % de las cepas bacterianas inhibidas (54,4 % de total de cepas ensayadas). Se requieren estudios posteriores para dilucidar la naturaleza de los principios activos de la corteza del tronco de esta planta, responsables de las propiedades antibacterianas del extracto evaluado.
- **Ávila Liliana, Baquero Eduard, Viña Amparo, Murillo “Actividad Antibacteriana DE *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*”, universidad de Antioquia, Medellín Colombia 2006 (4).** Se presenta el estudio de la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (*Asteraceae*), colectada en el páramo del Nevado del Tolima, la cual ha tenido pocos estudios químicos y Farmacológicos, al igual que muchas otras especies de este ecosistema. A partir de un extracto etanólico crudo, y mediante partición biodirigida, se obtiene la fracción más simple de mayor actividad frente a

Staphylococcus aureus (ATCC 25923). Paralelamente se realizan análisis fitoquímicos a las porciones de mayor bioactividad obtenidas durante todo el proceso. Se observa que la acción antibacteriana se incrementa al aumentar la simplicidad química del extracto, y que terpenos y flavonoides parecen estar relacionados con la acción revelada. Se trata del primer reporte, hasta la fecha conocido, de actividad antibacteriana *in vitro* para *D. tolimense*.

- **Truyenque Ramos Ludwing. Realizo un estudio “efecto anti estafilocócico in vitro e in vivo de *Argemone Subfusiformes (cjarhuincho)*” para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Nacional San Antonio Abad Cusco Facultad de Ciencias, Químicas, Matemáticas, Farmacia e Informática Cusco- Perú 2005 (57).** realizó un estudio anti estafilocócica in vivo e in vitro del extracto hidroalcohólico al 90% de la especie vegetal *Argemone subfusiformes (cjarhuincho)* utilizando para este estudio cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Para la determinación de la actividad antibacteriana utilizo el método de difusión de disco en agar y el método espectrofotométrico, con las que pudo determinar la actividad anti estafilocócica de *Argemone subfusiformes (cjarhuincho)*.

- **López, H.F.L., Villagómez, I.J.R y Castro-Rosas J. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. “Efecto Antimicrobiano de *Flourensia resinosa*” (T.S. Brandeg) Blake. 2006 (31).** Se trabajó con *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*: no patógena, enteropatógena, enterotoxigénica y entero invasiva. Las plantas se separaron en tallo, flor y hojas; a partir de estos, se obtuvieron extractos con agua, etanol, hexano y acetato de etilo. Por separado, cada extracto se ensayó contra cada microorganismo. La actividad antimicrobiana se investigó con ayuda de discos de papel impregnados de los extractos y colocados sobre medio de cultivo inoculado con los microorganismos.

- **Ramírez a. Luís; Díaz b. Hilda, Universidad Tecnológica de Pereira Colombia “actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*) ruibarbo” Colombia 2007 (50).** Se realizó una investigación de los extractos y fracciones etanólicos de la raíces, hojas y espigas de *Rumex conglomeratus* donde presentaron actividad inhibitoria frente a *Estafilococos aureus* ATCC 25923. La fracción etérea de espigas fue efectiva contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Las contra placas de la bioautografía tratadas con fluorescencia y vapores de amoniaco sugieren la presencia de flavonoides y quinonas.

- **Sheeja E Edwin e, Toppo E, Tiwari V, Dutt Kr Department of Herbal Drug Research, b.r. Nahata College Pharmacy & Contract Research Center, Mandsaur “Efecto antimicrobiano de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra Choisy*)” Colombia 2007 (54).** Se realizó el presente estudio para examinar la actividad antimicrobiana mediante un método de difusión en disco con una concentración de 500 µg/disco de extracto, utilizando ofloxacina (5 µg/disco) como estándar. Los organismos utilizados fueron *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*, y se determinó la zona de inhibición. Los extractos de la planta mostraron una significativa actividad antimicrobiana en el presente estudio. Los resultados obtenidos corroboran lo sostenido por los profesionales de la medicina locales.

- **Pérez Jorge; Isaza Gustavo; Acosta Sandra “Actividad Antibacteriana de Extractos de *Phenax Rugosus* y *Tabebuia Chrysantha*” Chile 2007 (49).** Se evaluó la actividad antibacteriana de extractos metanólicos, clorofórmicos y de éter de petróleo de las hojas de *Phenax rugosus* y *Tabebuia Chrysantha* frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa*; en los resultados obtenidos se observa muy leve actividad antibacteriana con los extractos metanólicos de ambas plantas; los extractos clorofórmicos y los etéreos no presentaron actividad antimicrobiana. Estos hallazgos indican que posiblemente el uso empírico de estas plantas no se deba a un efecto

antibacteriano, pues las concentraciones de los extractos que inhiben el crecimiento bacteriano son demasiado altas para considerarlas antibacterianas.

➤ **Vega Conza Marilyn.** Realizó un estudio de la “**Actividad Antimicótica y Antibacteriana in vitro de las hojas de *Juglans neotropica* (nogal) sobre *Trychophyllum rubrum* y *Staphylococcus epidermidis*, Microorganismos Causantes de Infecciones Dérmicas**” para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la **Universidad Nacional San Antonio Abad Cusco Facultad de Ciencias, Físicas, Químicas, Matemáticas, Farmacia e Informática, Cusco - Perú 2009 (61).** realizó un estudio antimicótico y antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” sobre cepas de *Trychophyllum rubrum* y *Staphylococcus epidermidis*. Para la determinación de la actividad antimicótica utilizó el método de excavación en placa y para la determinación de la actividad antibacteriana utilizó el método de Kirby Bauer o disco difusión. Con las que pudo determinar la actividad antimicótica y antibacteriana de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.

2.1.3. ANTECEDENTES DE ESTUDIO DEL GENERO *FLOURENSIA*

➤ **Delbón, Natalia; Cosa, María Teresa; Dottori Nilda,** Laboratorio de Morfología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, e Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (I.M.B.I.V.). C.C. 495. 5000 Córdoba. Argentina. 2007(15). Se realizó un estudio comparativo de la fisiología de *Flourensia campestris* Griseb. Y *Flourensia oolepis* S. F. Blake, habiéndose comprobado que la anatomía de los órganos vegetativos; en ambas especies es similar, sólo se encontraron diferencias en la anatomía del pedúnculo de la inflorescencia. Con respecto a las estructuras secretoras se estudió la ontogenia y anatomía, su localización y patrón de distribución en el cuerpo de la planta. Se presentan en tallos y hojas de dos tipos: 1- tricomas glandulares, constan generalmente de 12 células, dispuestas en dos hileras, el pie es pequeño bicelular biseriado y una gran cabezuela pluricelular biseriada de contenido denso; son abundantes en los tallos y hojas jóvenes y responsables de la secreción resinosa y el brillo

de las hojas. 2- conductos secretores, se encuentran asociados al sistema vascular, se originan por procesos esquizógenos y están formados por un epitelio secretor uniestratificado, rodeado por una vaina parenquimática. Ayudarían a proteger a la planta de herbívoros y patógenos. Ambas especies han desarrollado una variedad de modificaciones estructurales en los tallos y hojas por lo que muestran estar bien adaptadas a su hábitat.

➤ **Guerrero Rodríguez Eugenio, Solís- Gaona Susana, Hernández Castillo Francisco Daniel, Sandoval López Víctor, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Depto., de Parasitología Agrícola, “Actividad biológica in vitro de *Flourensia cernua*. c.d en patógenos de cosecha *Alternaría alternata*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Penicillium digitatum*” Revista mexicana en Fitopatología. 2007 (22).** evaluó el extracto de hojas frescas de *Flourensia cernua* sobre la inhibición miscelar y esporulación de *Alternaría alternata*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Panicillium digitatum*, los extractos se obtuvieron con metanol y cloroformo 1:1, y con extracción sucesiva con hexano, éter di etílico, etanol, las concentraciones fueron de 500, 1000, 2000,4000 mg por litro en medio de cultivo papa-dextrosa- agar. Los análisis de espectro infrarrojo se realizaron en espectroscopio mediante la técnica de infrarrojos transformados de Fourier (FTIR). El mayor rendimiento de resina 19.1% se obtuvo con metanol: cloroformo. La inhibición del micelio en *Alternaría alternata* fue mejor con las fracciones de hexano (91.9%) y metanol y cloroformo (88,4% a 4000mg/L), mientras que *Colletotrichum gloesporioides* y *Panicillium digitatum* fueron inhibidos en 93.4 y 94%, respectivamente, a partir de 500mg/L de la fracción de etanol; en todos los casos el efecto fue fungistático, no se observaron conidios *Alternaría alternata* con los extractos de etanol a 4000mg/L y metanol y cloroformo a 2000 y 4000mg/L, el extracto etanólico desde 2000mg/L provocó la menor producción de conidios en *Colletotrichum gloesporioides* los 4 extractos provocaron disminución del número de conidios de *penicillium digitatum*, aunque no hubo diferencias estadísticas entre ellos. En general el extracto etanólico fue el más eficiente para inhibir el micelio y afectar la producción de conidios de *Colletotrichum gloesporioides* y *Panicillium*

digitatum. Los espectros de FTIR de los extractos mostraron que las fracciones tienen los mismos grupos funcionales pero en distinta proporción.

➤ **Cárdenas Ortega C, Pérez Gutiérrez, Zavala Sánchez Miguel A, Aguirre Rivera Juan R., Cuauhtémoc Pérez González Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Depto. de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana. “Actividad Anti fúngica de seis plantas sobre *Aspergillus. Avus Link*”. 2008 (12).** Se obtuvieron y evaluaron los extractos hexánico, clorofórmico y etanólico por percolación y por calentamiento a temperatura de ebullición; y los extractos de hexano, cloroformo, diclorometano, etanol y metanol por maceración de *Casimiroa pringlei*, *Decatropis bicolor*, *Chrysactinia mexicana*, *Heliopsis longipes*, ***Flourensia cernua***, y *Brickellia veronicaefolia*. Se probó la actividad antifúngica de cada uno de los extractos obtenidos sobre *Aspergillus avus Link*. Los resultados mostraron que los extractos hexánicos obtenidos por maceración de *D. bicolor* y *H. longipes*, así como los obtenidos por percolación de *C. pringlei* y *C. Mexicana*, inhibieron significativamente el crecimiento del microorganismo, sin embargo cuando se obtienen estos extractos por calentamiento, la actividad antifúngica disminuyó en forma apreciable. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos hexánicos obtenidos por maceración de *D. bicolor* y *H. longipes* y de los extractos obtenidos por percolación de *C. Pringlei* y *C. mexicana* fueron 12.5, 12.5, 56.2 y 18.7 µg/mL respectivamente.

➤ **Molina- Salinas Gloria María, Peña Rodríguez Luis Manuel, Mata-Cárdena Benito David, Escalante- Erosa Fabiola, Sait- Fernández Salvador. “Actividad Antituberculosa de hojas de *Flourensia cernua* hojase Comparación de Métodos de extracción y técnicas de fraccionamiento”. (5º Reunión nacional de investigación en Productos Naturales Universidad de Guadalajara 2008 (44).** Se evaluó distintos tipos de extracción, maceración estática, maceración dinámica, extracción asistida con onda de microondas extracción soxhlet y decocción, fueron utilizados para extraer los principios antituberculosos de hojas de *Flourensia cernua*. Los términos de extracción fueron comparados en términos de rendimiento de

(%) y actividad antituberculosa en concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes extractos en diferentes contra una cepa sensible y un fármaco resistente de *Mycobacterium tuberculosis*. Aun cuando la extracción Soxhlet y la extracción de maceración dinámica mostraron rendimientos ligeramente mayores. Todos los extractos crudos presentaron baja o moderada actividad contra las cepas fármaco-sensible, fármaco-resistente, de *Mycobacterium tuberculosis* respectivamente. El fraccionamiento preliminar de los distintos extractos crudos mediante partición líquido-líquido con disolventes de polaridad ascendente, condujo a la obtención de las correspondientes fracciones de baja, mediana, de alta polaridad; la bioevaluación de estas fracciones reveló que en las fracciones de baja polaridad (hexánica) se concentra la actividad antituberculosa. Con base a los resultados obtenidos, la extracción vía maceración dinámica etanol, seguida de una partición líquido - líquido con hexano, representa la estrategia más eficiente para concentrar los metabolitos antituberculosos presentes en las hojas de *Flourensia cernua*.

Los antecedentes en si no son de la misma planta en estudio sino de su familia relacionada a ella debido a que no se encontraron referencias bibliográficas de estudios en esta planta en los libros de medicina tradicional investigados en las bibliotecas de Biología, Farmacia y Bioquímica, Hemeroteca de la UNSAAC, UNMSM, que resalta su poco uso, al menos en el Perú, solo una referencia de su uso tradicional en el internet, siendo encontradas en su mayoría referencias de estudios de algunas especies cercanas que ya se mencionaron, que son muy similares a la planta de investigación.

2.2 BASES TEORICO CIENTIFICAS.

2.2.1 ASPECTOS BOTANICOS DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.

2.2.1.1 Características de la familia Asteraceae. (1)

Plantas herbáceas anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles. Se caracterizan por presentar las flores agrupadas en capítulos, inflorescencia que funcionalmente se comporta como una flor.

Hojas sin estípulas, generalmente alternas, en ocasiones en roseta basal; pueden presentar espinas.

La inflorescencia es un capítulo, que consiste en una estructura ensanchada (receptáculo) donde se sitúan desde una a cientos de flores, rodeadas por las brácteas del involucre. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores.

Flores hermafroditas, unisexuales o estériles. Sin cáliz o con éste reemplazado por vilano de pelos o escamas; los pelos pueden ser lisos, escábridos o plumosos. Corola formada por 5 pétalos soldados; puede ser tubulosa, con forma de tubo (flósculos o flores flosculosas) o de lengüeta con 3 o 5 dientes (lígulas o flores liguladas).

En un mismo capítulo todas las flores pueden ser flosculosas (*Cirsium*), todas liguladas (*Taraxacum*) o una combinación de flosculosas y liguladas (*Anthemis*). Androceo formado por 5 estambres epipétalos soldados por sus anteras (singénésicos). Son plantas entomógamas. El gineceo es ínfero y unilocular.

Fruto tipo aquenio o cipsela. Puede presentar en su extremo superior vilano, en ocasiones sobre una prolongación estrecha o pico.

Pueden almacenar inulina, un polisacárido, como sustancia de reserva en órganos subterráneos.

Distribución: cosmopolita; **diversidad:** es la familia más numerosa de las plantas con flores, con unos 1100 géneros y 20.000 especies.

2.2.1.2 Nombre científico (39)

❖ *Flourensia polycephala* Dillon

2.2.1.3 clasificación taxonómica (34)

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Filo	Magnoliophyta
Suborden	Euphyllophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Superorden	Asteranae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Flourensia
Epíteto específico	polycephala – Dillon
Nombre científico	Flourensia polycephala Dillon

Fuente: Herbario Vargas (CUZ). Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (Anexo N° 1)

2.2.1.4 Nombres vulgares en español: Phauka, Pauwka (39)

2.2.1.5 Descripción Botánica de la *Flourensia polycephala* (Phauka) (34)



FOTOGRAFIA N° 2.1

Planta (*Flourensia polycephala* Dillon) (Phauka)

Fuente: V.C.S (Oropesa-Cusco)

Plantas Anuales, bianuales, perennes, arbustos, o árboles. **Raíces** generalmente raíces primarias, a veces fibroso. **Tallos** erectos generalmente, a veces postrada a ascendente (tallos subterráneos caudices a veces leñosas o rizomas, a veces carnosos). **Hojas** generalmente alternas o opuestas, a veces en roseta basal, raramente en verticilos; rara vez se establecen, generalmente pecioladas, a veces sésiles, a veces con bases decurrentes en los tallos, las hojas generalmente sencillas (a veces los márgenes de 1, 2 + veces pinnadas, rara vez compuesto. **cabezas Inflorescencias** indeterminadas (también llamados capítulos); cada cabeza que generalmente incluye un *involucro* alrededor de *phyllaries* (brácteas envolventes), involucros a veces subtendido por, fuera o abaxial). **flores** bisexuales, pistiladas, funcionalmente masculinas, o neutro sépalos (cada ovario por lo general tiene un *vilano* de cerdas, las barbas, y / o escalas, a veces en combinación dentro de un vilano sola); pétalos con nados, corola (3) 5-rosos, ± actinomorfas o zigomorfas (uno o ambos tipos en una sola cabeza; estambres 4 a 5, se alternan con lóbulos de la corola, filamentos insertados en la corola, por lo general diferentes, anteras introverso, generalmente con nados y formación de tubos en torno a los estilos (raramente filamentos con nados y anteras distintas, por ejemplo, Heliantheae, Ambrosiinae); ovarios inferior, 2-carpellate, y 1-ocular con 1 basalmente adjunta, óvulo anátropo; estilos de 1 en cada bisexuales, funcionalmente estaminadas o pistiladas cada estilo generalmente rodeada en la base por un nectario, distalmente 2-ramificada con papilas estigmático tiene en la cara adaxial de cada rama en las líneas 2 separadas o contiguas o en 1 banda continua (estilos generalmente no ramificados en funcionalmente flores masculinas), las ramas de estilo ápice truncado o apéndices más allá de las bandas estigmatizante o líneas, normalmente apéndices papilados a hirsuto distal en la abaxial (o abaxial y adaxial) caras. **Frutas** (históricamente llamado aquenios) generalmente seco son relativamente gruesos, pericarpio duro, a veces pico (rostrata) y / o alado , a menudo dispersa . **Semillas** 1 por fruto, ex albuminosa; embriones recta.

2.2.1.6 Composición Fitoquímica. (39)(9)

Aceite esencial (mayor porcentaje terpenoides), las hojas contienen resinas, flavonoides (desoxiflavonoides), fitoalexinas, cumarinas, compuestos fenólicos, benzofuranos, ácido p-cumárico.

2.2.2 Flora Normal de la Piel (27)

Debido a su continua exposición y contacto en el ambiente, la piel es particularmente apta para alojar microorganismos transitorios. No obstante, hay una flora residente constante y bien definida, modificada en las diferentes partes anatómicas por secreciones.

Los microorganismos residentes predominantes de la piel son bacilos difteroides aerobios y anaerobios *Corynebacterium* y *propionibacterium*, *Estafilococo no hemolítico aerobio y anaerobio Estafilococos epidermidis*, y ocasionalmente *Estafilococo aureus*, entre los posibles factores importantes para la eliminación de microorganismos no residentes en la piel están: pH bajo, ácidos grasos en la secreción sebácea y presencia de lisozima. Ni el sudor profuso, el lavado o el baño pueden eliminar o modificar de manera significativa la flora residente normal.

Con frecuencia, las bacterias aerobias y anaerobias se unen y causan infecciones sinérgicas (gangrena, ascitis necrosante, celulitis) en piel y tejidos blandos.

2.2.3 Infección:(27)

Multiplicación de un agente infeccioso dentro del cuerpo. Por lo general, la multiplicación de bacterias de la flora normal del conducto gastrointestinal, piel, etc., no se considera infección; la multiplicación de las bacterias patógenas (por ejemplo de *Salmonella* – aun si la persona no presenta síntomas – si se considera infección.

2.2.4 Heridas y abscesos: (6)

Las infecciones asociadas con lesiones traumáticas ejm mordidas de animales o de humanos, quemaduras, cortes o por la penetración de objetos extraños. Frecuentemente son contaminadas con los miembros de la flora normal, varias patogenicias pueden estar asociadas con las infecciones de heridas, un patógeno asociado con descarga purulenta es *Staphylococcus aureus*. También se encuentran a menudo *Pseudomonas aeruginosa* y los anaerobios *Bacteroides* y *clostridium*.

2.2.5 Patogenia de la infección bacteriana. (13)

La patogenia bacteriana se inicia con el proceso infeccioso y los mecanismos que conducen al desarrollo de los signos y síntomas de la enfermedad. El resultado de la interacción entre las bacterias y el huésped determinan las características que favorecen el establecimiento de las bacterias dentro del huésped y su habilidad para lesionarlo, en oposición a los mecanismos de defensa de huésped.

2.2.6 Infección bacteriana de la piel. (27)(47)

Las infecciones de la piel pueden dividirse con fines clínicos en primarias y secundarias. Las infecciones primarias tienen características morfológicas y evolución de la enfermedad distintiva, se inicia con la infección causada por un solo tipo de microorganismo y por lo general surgen en la piel normal. Se relacionan con mayor frecuencia los *Estafilococos coagulasa* -positivos o *Streptococos Beta-hemolíticos*. Las infecciones secundarias se originan en áreas de la piel dañadas y las bacterias presentes se multiplican e invaden áreas cercanas para agravar y prolongar el trastorno subcutáneo adyacente.

2.2.7 BACTERIA EN ESTUDIO: ESTAFILOCOCOS AUREUS

2.2.7.1 Genero estafilococos: (23)

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos grampositivos que se agrupan en racimos. Son bacterias capaces de fermentar glucosa en medio anaerobio y pueden sobrevivir en muchas condiciones ambientales lo que permite que se hallen en múltiples superficies, tanto orgánicas como inanimadas. Su capacidad variable de coagular el plasma los subdivide en plasmacoagulasa positivos, característicamente *S. aureus* o Estafilococo dorado, y plasmacoagulasa negativos o *S. albus*, entre los que se distinguen varias especies.

2.2.7.2 Clasificación del genero estafilococos. (13)

Dentro de este género se puede distinguir las siguientes especies:

- Estafilococos aureus
- Estafilococos epidermidis
- Estafilococos saprophyticus.

A) Estafilococos aureus: (11)

Microorganismo gran positivo caracterizado por cocos con un diámetro de 0.7um a 1.2um aparecen aislados, en pares, cadenas cortas y tienen una fuerte tendencia a formar grupos.

Es la especie mas patógena, agente etiológico de muchas infecciones, también conocido como estafilococo dorado por el pigmento no difusible de color amarillo que forma bioquímicamente produce coagulasa y fermenta el manitol.

❖ Taxonomía (11, 13)

La Familia ***Micrococcaceae*** comprende cocos Gram positivos, no exigentes, catalasa positivos, con agrupación en racimos, aerobios o anaerobios facultativos. De los tres géneros que la integran, ***Micrococcus***, ***Planococcus*** y ***Staphylococcus***, este último es el único de importancia médica. Se caracteriza por ser aerobio anaerobio facultativo, capaz de fermentar la glucosa en anaerobiosis; poseer ácidos teicoicos en su pared, y ser sensible a la enzima lisostafina. Dentro del género ***Staphylococcus*** se conocen más de

20 especies, de las cuales *S. aureus* es la más importante. Otras especies como *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* son actualmente reconocidas como capaces de actuar como patógenos bajo determinadas circunstancias.

❖ **División taxonómica (6,13)**

Reino: procariota

División: bacterias

Sección: cocos gran positivos

Clase: escotobacteriales

Orden: eubacteriales

Familia: Micrococcaceae

Genero: estafilococos

Especie: aureus

❖ **Fisiología.(21)**

Son cocos gran positivos, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos habitualmente están dispuestos en racimos irregulares, no forman esporas y tienen un tamaño de 0.5um a 2um.

- a) Catalasa: Los diferencia de los estreptococos catalasa-negativos se basa en la descomposición catalítica de H_2O_2 en presencia de Fe^{+3} .
- b) Coagulasa: permite la diferenciación con *Estafilococos epidermidis* y se basa en la acción de una enzima bacteriana que actúa directamente sobre el fibrinógeno, para producir un coagulo de fibrina en ausencia de Ca^{+2} .
- c) Fermentación del manitol: para diferenciarlo de los *Estafilococos epidermidis*, ya que el *Estafilococos aureus* degrada el manitol poli hídrico a compuestos ácidos en condiciones anaerobias.
- d) Prueba de desoxirribonucleasa: se basa en la solubilización diferencial del DNA completo, o sus fragmentos en ácidos y lo diferencia de los *Estafilococos epidermidis*.

❖ **Acción patógena:**(48)

S. aureus es un microorganismo especialmente capacitado para producir infecciones supuradas locales y a distancia. Por contacto directo o a través del aire puede transmitirse de individuo a individuo. Particularmente importante es su predisposición a colonizar las fosas nasales desde donde puede distribuirse por la piel y causar infecciones. En la población normal se estima que entre un 20%-40% de individuos son portadores nasales de *S. aureus*.

Si los mecanismos defensivos locales no son eficaces, *S. aureus* alcanza los vasos linfáticos regionales y a partir de ellos el torrente sanguíneo, distribuyéndose por toda la economía. Esto puede dar lugar a la aparición de múltiples abscesos metastásicos de origen bacteriémico en cualquier parte del organismo, son frecuentes los cutáneos, la artritis y/u osteomielitis en el curso de una *Sepsis Estafilocócica*. Ciertas cepas de estafilococo dorado están capacitadas para liberar una serie de toxinas con efectos locales cutáneos, como rash, epidermólisis, etc., o bien generales, como el síndrome del shock tóxico.

Aunque *S. aureus* es una bacteria dotada de unos mecanismos patógenos muy importantes existen una serie de factores del hospedador que favorecen la aparición y desarrollo de la infección estafilocócica.

❖ **Clínica:**(21)(18)(46)

En la piel y mucosas pueden ser frecuentes procesos inflamatorios, forúnculos, infección de heridas y quemaduras, procesos supurativos y piógenos que cicatrizan con rapidez cuando estas drenan.

Las infecciones locales son particularmente importantes a nivel de la piel y de los anejos cutáneos. Son típicos diversos piodermas como las foliculitis, forúnculos, e impétigos que se caracterizan por ser lesiones supuradas, de un pus amarillo cremoso, y que puede cursar con o sin fiebre. La infección por *Estafilococos aureus* también puede Resultar de la contaminación directa de una herida, por Ejm, infección de las heridas pos-operatorias o infección Después de traumatismos (fracturas abiertas, meningitis Después de fractura de cráneo).

Si el *Staphylococcus* sobrevive puede producir bacteriemia, puede producir endocarditis, osteomielitis hematogena aguda, meningitis o infección pulmonar.

❖ **Tratamiento:(7)(13)**

Debido a la alta resistencia que ofrece el *Estafilococo* sobre todo a nivel intrahospitalario, se debe usar penicilinas resistentes a la penicilinas (meticilina, oxacilina, nafcilina, dicloxacilina), cefalosporinas (cefalotina, cefazolina, cefalexina, y de tercera generación), gentamicina, eritromicina, vancomicina, lincomicina, clindamicina debido a que la mayoría de las cepas son sensibles.

❖ **Epidemiología (27)**

Las principales fuentes de infección son las lesiones humanas que los diseminan, los fómites contaminados provenientes de estas lesiones, así como el aparato respiratorio y la piel de los humanos. La propagación de la infección adquiere importancia adicional en los hospitales.

2.2.8. CRECIMIENTO MICROBIANO (26)

2.2.8.1. Fisiología del crecimiento microbiano (36) (53)

Se entiende por crecimiento el incremento de materia viva, y por lo general, el incremento en el número de células y de la masa celular. En microbiología la palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células. El crecimiento es un componente esencial de la función microbiana, ya que en la naturaleza cualquier célula tiene un periodo de vida finito y la especie de *matiné* como resultado del crecimiento continuo de la población. La tasa de crecimiento es una medida de la modificación del número de células o de la masa celular en una unidad de tiempo.

2.2.8.2. Nutrición microbiana (36)

Las células están compuestas fundamentalmente de macromoléculas y de agua, y las macromoléculas se componen de unidades más pequeñas denominadas monómeros, en esencia, la nutrición microbiana consiste en suministrar a las células los ingredientes químicos que necesitan para hacer monómeros. Estos compuestos químicos son los nutrientes. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo son específicos.

2.2.8.3. Medios de cultivo (53)

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se usan en laboratorio para el cultivo de microorganismos. En microbiología se usan dos tipos generales de medios de cultivos; los químicamente definidos y los complejos o no definidos.

Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de *compuestos orgánicos o inorgánicos purificados a un volumen en agua destilada*. Por lo tanto se sabe la composición química exacta de un medio definido. Sin embargo en muchos casos la composición exacta de un medio no es importante.

2.2.8.4 Cultivo de microorganismos en el laboratorio. (56)

Una vez que ha sido preparado un medio de cultivo, puede ser inoculado (es decir, se le añaden organismos) y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. En general se tratara de un cultivo enéxico o puro, esto es, de un cultivo que contiene solo un único tipo de microorganismo. Para mantener un cultivo enéxico o puro es esencial evitar la entrada de otros organismos. Un método importante para obtener cultivos anéxicos o puros y para asegurar la pureza de un cultivo es el uso de medios sólidos en placas petri.

2.2.8.5. Medición del crecimiento microbiano (30)

El calculo del número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopia, número de colonias), masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular,

turbidimetria) o actividad celular (grado de actividad bioquímica con relación al tamaño de la población). Todos estos métodos se clasifican en dos apartados; métodos directos y métodos indirectos.

Métodos directos	Métodos indirectos
Recuento del numero de células en una cámara thoma.	Recuento de colonias en placa
Peso seco celular	Recuento sobre filtro de membrana
Determinación de nitrógeno o de proteínas totales	Consumo de oxígeno
Determinación de DNA	Liberación de dióxido de carbono
	Concentración de una enzima
	Incorporación de precursores radioactivos
	Medida de turbidez.

Fuente: Lastra Jorge; Arias Edison

([HTTP://MONOGRAFIAS.COM.TRABAJOS10/10CINCREC/10CINCREC.SHTM#DOS](http://monografias.com.trabajos10/10CINCREC/10CINCREC.SHTM#DOS)) (30)

2.2.8.6 Curva de Crecimiento Microbiano (25) (26) (30)

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una **suspensión** de células libres.

El crecimiento en un "sistema cerrado" de este tipo esta sometido a leyes que son validas para los organismos uní y pluricelulares. En la práctica la curva representa 4 fases:

FASES DE CRECIMIENTO

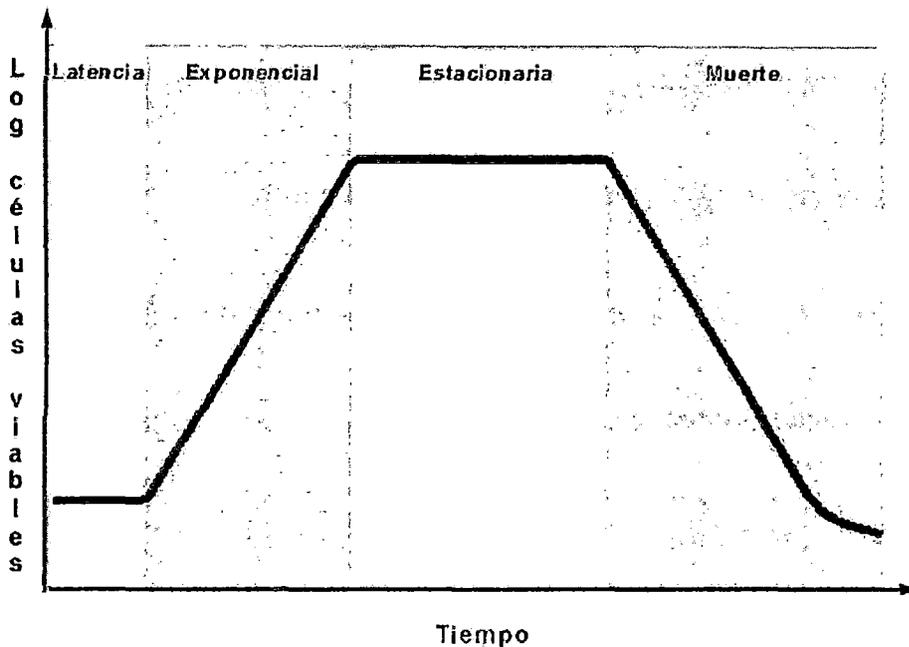


FIGURA N° 2.2

Curva de crecimiento microbiano en un cultivo discontinuo

Fuente: Gonzales cabeza (http://www.gonzalezcabeza.com/documentos/CRECIMIENTO_MICROBIANO.pdf) (25)

En el gráfico se pueden distinguir 4 fases en la curva de crecimiento.

1.- Fase lag o de adaptación:

Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

2.- Fase exponencial o logarítmica:

En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio. La evolución del número de células durante esta fase se explica con los modelos matemáticos que describiremos a continuación.

3.- Fase estacionaria:

En ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

4.-Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

2.2.9 Actividad Antimicrobiana

2.2.9.1 Efectos de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano (26) (37)

A) Agentes antimicrobianos.

Los antibióticos y los quimioterápicos son compuestos químicos capaces de inhibir el crecimiento e incluso destruir especies microbianas de forma específica a bajas concentraciones y sin toxicidad (o muy baja) para el organismo humano.

B) Quimioterápicos: son agentes químicos antibacterianos, producidos en forma sintética o semisintética, en el laboratorio bioquímico farmacológico.

C) Bacteriostático.

Aquello que en las concentraciones que alcanza en el plasma y tejidos solo son capaces de inhibir el desarrollo y la multiplicación bacteriana, las cuales se reanudan una vez que se suspende el tratamiento. Los antibióticos bacteriostáticos resultan ser eficaces por que las bacterias cuyo crecimiento se inhibe morirán con el tiempo o bien serán atacadas por los mecanismos de defensa del huésped.

D) Bactericida.

Aquellos que son capaces para destruir la bacteria, su acción terapéutica es, por tanto, irreversible. El prototipo de este grupo lo constituyen los fármacos que actúan sobre la pared o la membrana citoplasmática.

2.2.9.2 Modo y mecanismo de acción de los antimicrobianos. (29,37)

a) Inhibición de la síntesis de la pared celular

La pared celular rígida de todas las bacterias, salvo los mico plasma mantiene su integridad cuando infectan al hombre, ya que son microorganismos hiperosmolares con respecto a los tejidos y al liquido intersticial de los mamíferos, la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene por tanto consecuencias bactericidas. Además dado que no hay pared celular en células del ser humano, los antibacterianos que actúan mediante este mecanismo son de acción muy selectiva y, en principio, de escasa toxicidad para el enfermo.

El componente esencial de la pared es un mucopeptido (peptidoglucano) cuyo síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes, la droga se fija en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria aparecen efectos en dicha pared el microorganismo se hace osmóticamente sensible, penetra liquido en el interior, estalla y se lisa. las penicilinas, cefalosporinas, y vancomicina actúan así.

b) Lesión de la membrana celular(26)

El citoplasma de todo ser viviente esta limitado por la membrana citoplasmática, que sirve como barrera de permeabilidad selectiva y efectúa funciones de transporte activo, y por tanto, controla la composición interna de la célula. Si la integridad funcional de la membrana citoplasmática se altera, las macromoléculas y los iones escapan de la célula y sobreviene daño celular o muerte. La polimixina, nistatina, anfotericina B actúan de este modo.

c) inhibición de la síntesis proteica o de los ácidos nucleicos (26)

Los antibióticos pueden inhibir la síntesis proteica bacteriana, generalmente en forma reversible de las siguientes maneras: a) **por inhibición selectiva de la síntesis o replicación del DNA bacteriano:** así actúan el ácido nalidixico y sus análogos, la griseofulvina, el metronidazol y otros.; **b) inhibición del DNA polimerasa,** por ligadura específica afectando el metabolismo de los ácidos nucleicos e impidiendo la síntesis de todas las formas de RNA bacteriano. Así actúan básicamente las rifamicinas; **c) interferencia con la fusión de los ribosomas bacterianos:** estas estructuras bacterianas actúan como una línea de montaje en la síntesis proteica, por lo que la afectación de su función provoca una supresión de la síntesis proteica. Los antibióticos que interfieren con los ribosomas bacterianos actúan de las siguientes maneras diferentes: inhibición de la sub unidad 30S: así actúan los aminoglucosidos, las tetraciclinas y la espectinomicina. Inhibición de la subunidad ribosomal 50S: así actúan el cloranfenicol y derivados, los macrolidos, los azúcares complejos, la espiramicina y la virginiamicina entre otros, fijación a enzimas virales esenciales para la síntesis del DNA, impidiendo la replicación viral; así actúan el aciclovir, la vidaravina; d) inhibición de la síntesis del ácido fólico bacteriano. Los agentes que actúan por este mecanismo no son antibióticos sino quimioterápicos y son considerados aquí solamente para unificar los conceptos acerca de mecanismos de acción. Estos agentes compiten con el PAB interfiriendo con la síntesis de ácido fólico e inhibiendo secuencialmente la enzima dihidrofolico reductasa. Así actúan las sulfonamidas, la trimetropima, la tetroxoprima, la pirimetamina y las sulfonas. Los tetrahidrolatos que se

forman finalmente a partir del ácido fólico actúan como enzimas necesarias para la transferencia de unidades de un átomo de C, metilos, formilos, en la síntesis de purinas, pirimidinas, componentes esenciales del DNA y RNA bacterianos.

Existen antibióticos (cloranfenicol, aminoglicosidos, macrolidos, tetraciclinas, etc.) pueden inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias, actuando sobre los ribosomas y de esta forma la vida de la bacteria queda bloqueada.

BLANCOS DE ALGUNOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

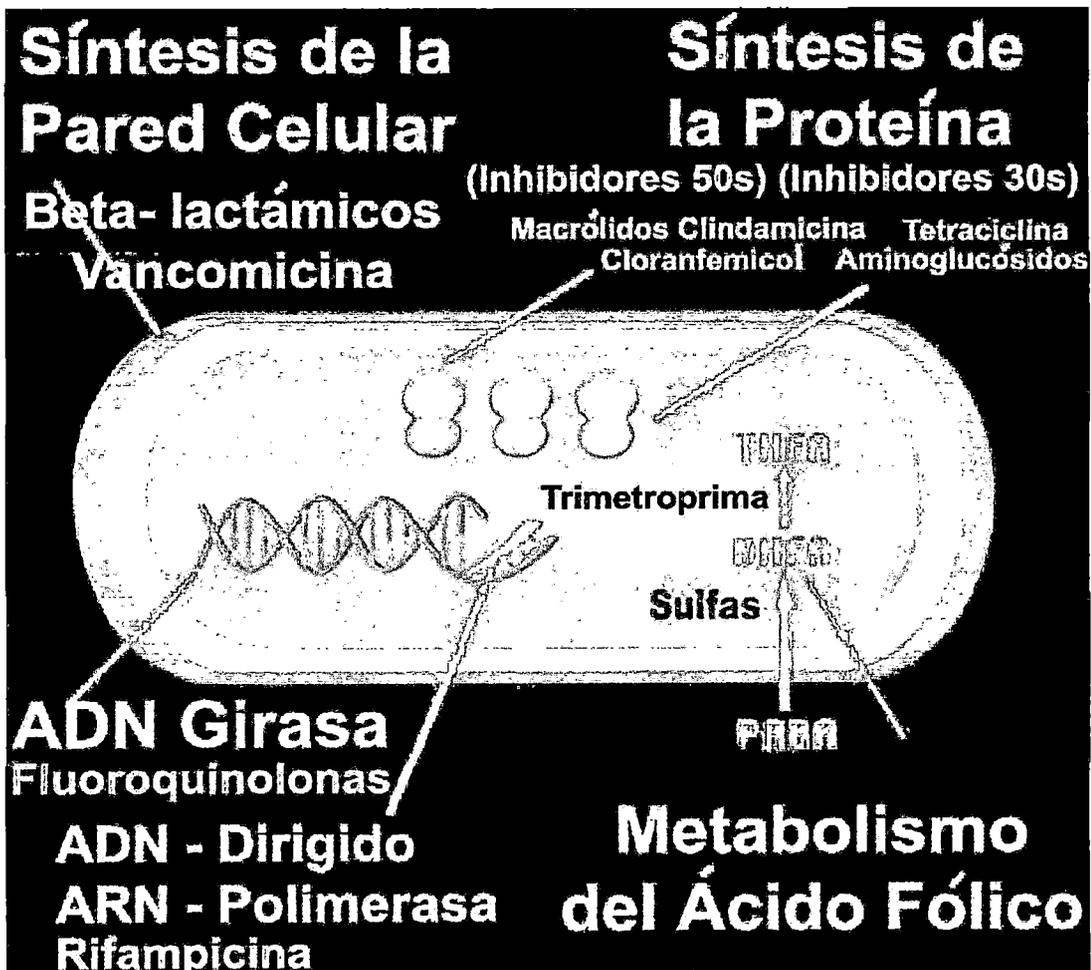


FIGURA Nº 2.3

Fuente:

VELASCO ALFONSO. FARMACOLOGÍA FUNDAMENTAL, 1º edición en español, Editorial San Marcos. Madrid. España. 2003 (60).

2.2.9.3 Medición de la actividad antimicrobiana (41) (46)

- 1) **Método de Difusión en agar.** Mediante este sistema se prueba la eficacia de varios antibióticos a partir de una siembra de superficie sobre un medio sólido de una suspensión bacteriana, depositando a continuación sobre ellos discos de papel impregnado de antimicrobianos. Los antimicrobianos se difunden en el agar húmedo y se crean así concentraciones progresivamente decrecientes a partir del disco. Es aquella zona donde la concentración de antibióticos es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria, aparece un halo de inhibición. Se valoran los halos por patrones obtenidos de tal forma que se hayan correlacionado la CMI y el halo de inhibición de un Nro. Amplio de cepas. Los resultados se representan en un sistema de coordenadas, se traza la recta de regresión que refleja la correspondencia existente entre el halo de inhibición y la CMI para un antibiótico determinado, de esta forma si conocemos el halo de inhibición de una cepa por el método disco-placa, trasladando este a la escala anterior puede conocerse su CMI.
- 2) **Dilución en agar.** Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego son incubadas. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el antibiótico.
- 3) **Dilución en caldo.** En este caso, tubos (macro dilución) o micro placas (micro dilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la micro placa y la CIM es determinada después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la dilución en agar.
- 4) **E- test.** Este método ha sido descrito más recientemente y representa una sofisticada combinación de métodos descritos anteriormente. El E – test es

más simple que otros métodos para obtener una CIM. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0.016 ug/ml esta tira se pone sobre una placa, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en el cual la concentración inhibitoria mínima puede ser leída directamente.

5) Métodos automatizados. En este método existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de la susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimetria o fluorometrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio liquido. La mayoría de ellos emplea el método de micro dilución y periodos de incubación menores que los habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de enterobacterias y otros gérmenes de crecimiento rápido, pero generalmente no son adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales.

2.2.9.4. Interpretación del Antibiograma (27) (46)

- a) Susceptible:** significa que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado.

- b) Sensibilidad intermedia:** esta categoría incluye organismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder probablemente a la terapia. Esta categoría, además, implica que ese antibiótico puede ser usada si la infección esta localizada en sitios donde el fármaco es fisiológicamente concentrado (quino lonas en vías urinarias), o cuando pueden ser usadas altas dosis (ejemplo penicilinas).

- c) Resistente.** significa que el organismo no seria inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico.

2.2.9.5 Criterios de Toda y Col (10)

Para definir el tipo de actividad antimicrobiana, se utilizan, generalmente, los criterios expuestos por Toda y Col. (1994)

TABLA N° 2.1

Criterios de actividad antimicrobiana atendiendo al halo de inhibición

ACTIVIDAD	HALO DE INHIBICION (mm)
Marcada	16
moderada	16 < halo < 12
ligera	12 < halo < 8
No actividad	< 8

Leyenda

mm: milímetros

Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos29/eficacia-cikron-v/eficacia-cikron-v-shtml>. (10)

2.2.10. CONTROL MICROBIOLOGICO

Los criterios para el control microbiológico recomendados por la Organización Mundial de Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) son los siguientes:

- ◇ Criterio imperativo
- ◇ Criterio indicativo de higiene
- ◇ Criterio de alerta o Límites críticos

CUADRO N° 2.1
CRITERIOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO

CRITERIOS	PESO EXTRACTO	BACTERIAS	CANTIDAD PERMISIBLE
Criterio imperativo: este microorganismo no debe presentarse. La presencia de este indica un riesgo elevado.	10g	Salmonella	Ausente
Criterio indicativo de higiene: la presencia excesiva de este indica que la higiene en el proceso ha sido deficiente. Por lo que el producto podría rechazarse.	10g	Coliformes Fecales (E. coli)	Ausente rango aceptado 10 – 10 ² UFC
Criterios alerta o límites críticos: significa que el producto no debe exceder los límites especificados en este rubro.	10g	<ul style="list-style-type: none"> • Aerobios mesofilos • Hongos y levaduras 	<ul style="list-style-type: none"> • 10⁴-10⁵ ufc/g • 10²-10³ ufc/g

Leyenda: UFC: unidades formadoras de colonia

Fuente: Normas Técnicas de Control de Calidad DIGESA 2004.

2.2.11 Fármacos utilizados como patrones en el ensayo in vitro:

2.2.11.1. BACITRACINA (24) (28)

Es un poli péptido que impide el reuso del lípido transportador de la membrana citoplasmática, por lo que inhibe el transporte del N-Acetil Muramico fuera de la célula.

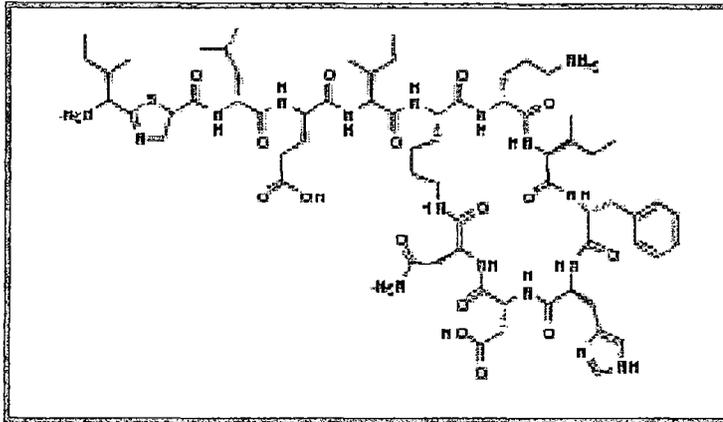


FIGURA N° 2.4

Estructura química de bacitracina

Fuente: Goodman & Gilman 11° edición (24)

Mecanismo de acción: Es un fármaco que inhibe la formación de la pared celular bacteriana. Actúa en el interior de la célula al unirse al lípido portador de fosfato de isoprenilo, al cual deja inservible, encargado de transportar precursores de la pared celular desde el citoplasma de la bacteria al exterior de la membrana celular. Por esto, la bacitracina carece del alto grado de toxicidad selectiva antibacteriana de la mayoría de los antibióticos clasificados como inhibidores de la pared celular y también tiene capacidad para causar daño a células susceptibles de mamífero.

Farmacocinética: Debido a un alto grado inaceptablemente alto de nefrotoxicidad cuando se administra por vía sistémica, el empleo de la bacitracina en la terapéutica anti infecciosa se limita a la aplicación tópica en forma de ungüentos oftálmicos o dermatológicos y como polvo para aplicaciones tópicas especiales, en sitios donde no se absorbe.

Indicaciones: La bacitracina inhibe varios cocos y bacilos grampositivos y algunas especies de *Neisseria* y *Haemophilus*. Debido a sus limitaciones cuando se emplea sola en el tratamiento de infecciones superficiales de la piel, se encuentra disponible para uso tópico mezclada con neomicina, polimixina o ambas. Su otro empleo clínico principal es en la erradicación de *S. aureus* alojado en la nariz.

Efectos adversos: Las reacciones de hipersensibilidad a la bacitracina son muy escasas. Es altamente neurotóxico, por este motivo es de uso tópico.

2.2.11.2 NEOMICINA (24) (28)

La neomicina es un fármaco de la familia de los aminoglucósidos, que se utiliza en clínica como antibiótico bactericida. Se obtiene del *Streptomyces fradiae*. Este compuesto de Neomicina A, B (la más usada) y C. es hidrosoluble y más activo a PH alcalino.

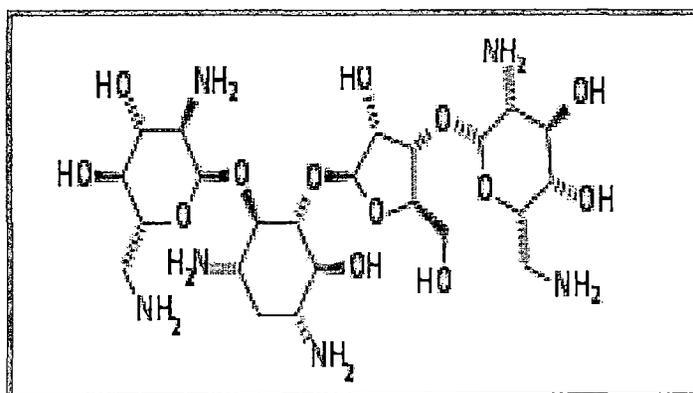


FIGURA N° 2.5

Estructura química de bacitracina

Fuente: Goodman & Gilman 11^o edición (24)

Mecanismo de acción: La neomicina es un fármaco anti infeccioso perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, los cuales inhiben la síntesis de proteínas celulares. Se unen firmemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e inhiben la síntesis de proteína e varios puntos, al bloquear la actividad normal del complejo de inicio, al interferir con la unión a ARN y al deformar el triplete codón de ARN de modo que el mensaje se lea de manera errónea y se formen proteínas defectuosas.

Indicaciones: Este fármaco puede emplearse por vía tópica en combinación con otros antibióticos (a fin de evitar el surgimiento de bacterias resistentes) contra infecciones superficiales por estafilococos o por gramnegativos. La neomicina oral también se emplea para reducir la cantidad de flora intestinal en pacientes con insuficiencia hepática. La irrigación de la vejiga con neomicina se emplea en la prevención o tratamiento de infecciones de vías urinarias en pacientes con catéter uretral permanente o en aquellos que acaban de sufrir un procedimiento urológico (por ej. Cistoscopia).

Efectos adversos: La neomicina es uno de los aminoglucósidos que tiene mayor probabilidad de causar ototoxicidad por toxicidad coclear, relacionada con la ablación de células pilosas. La toxicidad coclear con neomicina es tan grave que excluye su uso generalizado. Después de emplear una dosis terapéutica intramuscular diaria de tan sólo 0.5 a 1g durante una o dos semanas puede ocurrir sordera irreversible. La acumulación de los aminoglucósidos en los túbulos proximales de la corteza renal predispone al desarrollo de nefrotoxicidad.

2.2.11.3 Fármaco utilizado como patrón en el ensayo in vivo:

1) Bacitracina Neomicina ungüento (24) (28)

Es un medicamento destinado a uso dermatológico. Su empleo está indicado en los siguientes casos: Tratamiento de las infecciones cutáneas producidas por microorganismos sensibles a sus componentes. Piodermitis, impétigo, foliculitis, ectima. Infecciones en lesiones abiertas o quemaduras. Úlceras dérmicas infectadas. Tratamiento complementario en casos de forunculosis o ántrax.

Acción Farmacológica

El espectro antimicrobiano de la Bacitracina abarca especialmente bacterias grampositivos, tales como el género *Streptococcus* sobre todo el *Streptococcus pyogenes* o *Estreptococo hemolítico beta* y el *Streptococcus pneumoniae* o

neumococo, también actúa sobre el *Staphylococcus aureus*. Tiene efectividad contra cocos gramnegativos como los del género *Neisseria*-gonococo y meningococo. Además la asociación fusoespirilar de la infección de Vincent y otras espiroquetas como el *Treponema pallidum* son afectadas; lo mismo que el *Actynomices israelii* y la *Entamoeba hystolítica*. Su acción es predominantemente bactericida y es semejante a la de la penicilina, observándose sus efectos tanto in vitro como in vivo. La Neomicina es un antibiótico de amplio espectro. Los organismos susceptibles son usualmente inhibidos a concentraciones de 5 a 10 microgramos por mililitro, o menores. Las especies grampositivos sobre las que actúa son: el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis* y *Mycobacterium tuberculosis*. Algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosas* son resistentes a la Neomicina. Los gérmenes gramnegativos altamente sensibles a la Neomicina son: la *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y sobre el género *Shigella*. No actúa en cambio sobre la *Pseudomonas aeruginosas*, ni sobre *Rickettsias*, virus o protozoarios. Los efectos se observan tanto in vitro como in vivo, su acción es preferentemente bacteriana, con la peculiaridad de aumentar en intensidad en medio alcalino.

Contraindicaciones

El medicamento no se debe usar en pacientes con hipersensibilidad (alergia) a alguno de sus componentes.

Dosificación

Aplicar sobre la zona afectada 2 a 3 veces al día, o de acuerdo a criterio médico.

Formas de conservación

Conservar en lugar fresco y seco a temperatura no mayor a 35°C y lejos del alcance de los niños.

Vías de administración

Uso Tópico.

2.3 Forma Farmacéutica

Es la disposición individualizada a que se adaptan las sustancias medicinales (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) para constituir un medicamento (14).

Formas farmacéuticas son mezclas, soluciones, destilados, extractos u otros productos de sustancias en las cuales estas sustancias están contenidas parcial totalmente. (20)

Preparados farmacéuticos son productos obtenidos por medios manuales o mecánicos que pueden contener además de sustancias activas, también excipientes y que muestran una determinada concentración en sustancia activa. Su aspecto exterior puede ser líquido, sólido o en algunos casos también gaseoso.

Están contenidos en envases adecuados y rotulados de acuerdo con las normas vigentes. (20)

2.3.1 Clasificación

Formas líquidas.

Formas pulverulentas

Formas semisólidas

Formas sólidas

2.3.2 Preparación de Formas Farmacéuticas Semisólidas para Aplicación Cutánea

- **Definición**

Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea se formulan para conseguir una liberación local o transdérmica de los principios activos, o para su acción emoliente o protectora.

Tienen un aspecto homogéneo. Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea están constituidas por una base, simple o compuesta, en la cual habitualmente están disueltos o dispersos uno o más principios activos. La composición de esta base puede tener influencia sobre los efectos de la preparación. (51,20)

Las bases utilizadas pueden ser sustancias de origen natural o sintético y estar constituidas por un sistema de una o varias fases. De acuerdo con la naturaleza de la base, la preparación puede tener propiedades hidrófilas o hidrófobas; puede contener excipientes adecuados, como conservantes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulgentes, espesantes y agentes de penetración.

Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea destinadas a ser aplicadas en heridas abiertas importantes o en la piel gravemente dañada son estériles.

Se pueden distinguir varias categorías de preparaciones semisólidas para aplicación cutánea (14).

- pomadas,
- cremas,
- geles,
- pastas,
- cataplasmas,
- emplastos medicados.

Según su estructura, las pomadas, cremas y geles presentan normalmente un comportamiento visco elástico y propiedades de fluidos no newtonianos (el flujo no empieza hasta que la fuerza aplicada adquiere cierto valor)

2.3.2.1 Formulación preparaciones semisólidas

I._ Características generales

PH: neutro o débil mente ácido (similar a La piel)

Estabilidad física y química, compatibilidad con p.a. (51)

II._ Propiedades reológicas:

Viscosidad: es un parámetro que describe la resistencia que presenta un fluido a su desplazamiento. La podemos definir como una resistencia al flujo. Este parámetro está relacionado con las fuerzas existentes entre las moléculas del fluido, que se oponen al desplazamiento.

III._ Clasificación excipientes y base: Tres tipos sustancias: polvos, grasas y líquidos -Excipientes monofásicos: polvos, grasas, líquidos

-Excipientes bifásicos: cremas, pastas grasas, pastas secantes

-Excipientes trifásicos: pastas frías, pastas cremosas (51)

EMULSIONES

Una emulsión es un sistema bifásico en el cual un líquido se dispersa, en otro perfectamente, en forma de pequeñas gotitas. (56)

I. Emulsificación. la Emulsificación de dos fases inmiscibles se logra cuando se aplica energía al sistema (trituration u homogenización) para formar pequeñas gotas y producir una barrera física o electrostática, o de ambos tipos, en torno a estas, para impedir su coalescencia. El conjunto de gotitas dispersadas se denomina fase interna y el líquido en el que se dispersan, fase externa. (56)

a) **Agentes emulsificantes.** Son tensoactivos que se concentran en la interfase de dos fases inmiscibles y reducen la tensión interfacial entre ambas, generando una barrera en torno a las gotitas formadas y evitando la coalescencia de las mismas. (35)

b) **Formación de crema.** Es la migración de gotitas (fase interna) hacia la parte superior o inferior de la emulsión, ocasionada por diferencias de densidad entre las dos fases, el sentido del movimiento dependerá de si la fase interna es mas densa o menos que la externa. (35) (56)

c) **Coalescencia.** Es la fusión de pequeñas gotas para formar otras más grandes, con posterior separación total de fases, de modo que las gotitas no se reemulsifican por simple agitación del producto. (56)

2.3.2.2 Tipos de Emulsiones

a) **Aceite en agua (O/A)**

En este tipo de emulsión, el aceite se dispersa como gotitas en una solución acuosa. Es la clase más común y siempre se prefiere para productos orales. También se usa para productos externos, a los cuales se requiere eliminar fácilmente o se desea una preparación sin sensación grasosa. (56)

b) **Agua en aceite (A/O)**

En este tipo de emulsión, el agua se dispersa como gotas en un aceite o material oleaginoso, se usa para impartir propiedades emolientes, lubricantes o protectoras a los productos tópicos. (56)

Procedimiento para la elaboración de emulsiones:

1. Pesar los componentes de la fase oleosa.
2. Pesar los componentes de la fase acuosa y reunirlos en otro recipiente.
3. A) Si la totalidad de los componentes de la fórmula son fluidos a temperatura ambiente y, las características del sistema emulgente lo permiten, se puede proceder a la emulsificación a temperatura ambiente.
B) Si se precisa calentar, los componentes (principios activos y excipientes), tanto de la fase acuosa como de la oleosa, termolábiles o volátiles deberán adicionarse al final del proceso de enfriamiento.
4. Calentar la fase oleosa como mínimo a la temperatura de fusión del componente con punto de fusión más elevado, bajo agitación moderada para asegurar su homogeneidad.
5. Calentar la fase acuosa a la misma temperatura que la fase oleosa, bajo agitación moderada para garantizar su homogeneidad.
6. Emulsificar por adición de la fase acuosa sobre la oleosa. La velocidad de adición, duración, velocidad de agitación y tipo de agitación empleada, dependerá de las características de cada formulación.
7. En los procesos de emulsificación en caliente, proceder a estabilizar el sistema mediante agitación moderada durante toda la fase de enfriamiento.
8. Incorporación del principio activo:

- Principios activos termolábiles o insolubles en la fase externa: disolverlos o dispersarlos en el mínimo volumen posible de un solvente con la polaridad adecuada (glicerina, propilenglicol, vaselina líquida, etc.), incorporándolos cuando la temperatura de la emulsión haya descendido a unos 30°C – 35°C, en el caso de una emulsión en caliente.
 - Principios activos hidrosolubles no termolábiles: disolverlos en la fase acuosa.
 - Principios activos liposolubles no termolábiles: disolverlos en la fase grasa.
9. Proceder a la limpieza del material y equipo.
10. Medir el pH (20, 51,56)

2.3.3. Preformulación (20)

Los estudios de Preformulación consisten en la aplicación de los conceptos biofarmacéuticos a las características fisicoquímicas del principio activo con el objetivo de diseñar el sistema de liberación adecuado, es decir la forma farmacéutica. El desarrollo de una nueva formulación implica una selección de excipientes y la realización de un proceso tecnológico de complejidad variable. Entre las razones que justifican la formulación farmacéutica podemos destacar las siguientes:

- Mejorar las características organolépticas desagradables que presenten algunos principios activos.
- Proteger al fármaco de una degradación.
- Evitar la degradación por acción de agentes externos (luz, oxígeno) etc.
- Alcanzar una distribución selectiva del fármaco.

Las formas farmacéuticas con aplicación tópica presupone que no hay absorción del principio activo o bien que la velocidad de absorción es despreciable, de tal modo que nunca se alcanzan en sangre niveles suficientes para que aparezca cualquier tipo de respuesta farmacológica; en otras palabras, se persiguen efectos terapéuticos localizados cerca del punto de aplicación.

2.4 DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS (19)

- **Absceso:** colección localizada de pus en una cavidad formada por la desintegración de tejidos.
- **Ampolla:** vesícula flácida grande, por lo general 1 cm de diámetro.
- **Antibacteriano:** sustancia que destruye a las bacterias o les impide que crezcan y causen enfermedad.
- **Antimicrobiano:** que destruye los microorganismos o que impide su multiplicación o crecimiento. agente que tiene esa acción.
- **Bacteria:** en general cualquiera de los microorganismos procariontes unicelulares que se multiplican comúnmente por división celular, carecen de núcleo y orgánulos unidos a la membrana y poseen una pared celular.
- **Eccema:** proceso inflamatorio superficial que afecta principalmente a la epidermis, caracterizada por la aparición precoz de enrojecimiento, prurito, papulas, y vesículas diminutas, exudación, costras y mas tarde, por cicatrización liquenificación y, a menudo, pigmentación.
- **Eritema:** enrojecimiento de la piel producido por congestión de los capilares.
- **Foliculitis:** inflamación de un folículo.
- **Folículo:** saco, depresión o cavidad con forma de bolsa.
- **Gangrena:** muerte tisular, generalmente de volumen considerable, normalmente asociada a la pérdida de irrigación vascular y seguida de invasión bacteriana y putrefacción.
- **Infeción:** invasión o multiplicación de microorganismos en los tejidos corporales, en especial la que causa una lesión celular local por metabolismo competitiva, toxinas o replicación celular.
- **Impétigo:** infección cutánea estreptocócica o estafilocócica, caracterizadas por vesículas que se vuelven pustulosas, se rompen y forman costras amarillentas.
- **Microorganismo:** organismo microscópico; los de interés medico incluyen bacterias, hongos, virus, y protozoos.
- **Pápula:** pequeña lesión elevada y circunscrita de la piel.

- **Pus:** producto de la inflamación, líquido y rico en proteínas constituido por células (leucocitos), líquido y restos celulares.
- **Toxina:** proteína conjugada producida por algunas plantas, ciertos animales y bacterias patógenas, que son altamente tóxica para otros organismos vivos.
- **Vesícula:** pequeña elevación circunscrita de la epidermis que contiene un líquido claro; una ampolla pequeña.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 MUESTRA VEGETAL.

- ❖ Se utilizaron las hojas de la especie vegetal *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*), siendo la zona de recolección de la muestra vegetal la localidad de Oropesa (3350 m.s.n.m), ubicada al sur este de la ciudad de Cusco, Provincia de Quispicanchis, Departamento del Cusco.

3.1.2 MUESTRA BIOLÓGICA

- ❖ Para la determinación de la actividad antibacteriana in vitro se utilizó cepas estándar de *Estafilococos aureus* ATCC 25923. Microorganismo adquirido a través de laboratorios GENLAB del Perú, el cual esta autorizado por MICROBIOLOGICS con licencia de ATCC.
- ❖ Se utilizaron 24 ratones albinos machos de raza *Mus musculus* cepa Balb/c/ CNPB de 2 a 3 meses de edad con un peso promedio de de 25 gramos obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS). Lima.

3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

3.2.1 MATERIALES DE CAMPO.

- Bolsas de polietileno.
- Papel periódico.
- Tijeras podadoras.
- Papel kraf
- Cuaderno de campo.
- Lapiceros

- Cámara fotográfica

3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Tubos de ensayo 5 a 10 mL.
- Pipetas de 1ml 5ml y 10mL.
- Fiolas de 50 y 100 y mL.
- Matraz de 100mL.
- Baguetas.
- Gradillas.
- Vaso de precipitados de 100 y 200 mL.
- Placas de vidrio
- Goteros de 10 Y 20 mL
- Gradillas.
- Embudos.
- Micro pipetas de 100 μ L
- pizetas
- Papel filtro.
- Probetas de 10 y 100 mL.
- Lunas de reloj.

3.2.3 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Muller Hinton.
- Agar tripticasa soya.
- Caldo brain heart infusión (BHI)
- Agua peptonada
- Agar plate count

3.2.4 REACTIVOS

- Agua destilada
- Etanol 40°, 70° y 96° C
- N-hexano Q.P
- Éter etílico Q.P
- Éter de petróleo

- Cloroformo QP
- Acetato de etilo QP
- Acetona
- Metanol
- Cloruro ferrico al 1%
- Acido clorhidrico concentrado
- acido sulfurico concentrado
- Limaduras de magnesio
- Reactivo Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner

3.2.5 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Estufa de cultivo Fanem modelo 002CB. Cultivo entre 25°C Y 56°C
- Refrigeradora marca coldek
- Fotocolorímetro clinicon MANNHEIM – 6MBH (340 -620 nm)
- Horno Pasteur Memmert. T° max. 220°C
- Balanza analítica electrónica sensible al 0.001 g
- Cocinilla eléctrica
- Termómetros de laboratorio (rango de temperatura. 0°C – 100°C)
- Autoclave Modelo LS – B50I – 1. Pres. Max. 0.22 Mpa, T° max. 134°C

3.2.6 MATERIALES PARA EL ENSAYO IN (VITRO)

- Discos de sensibilidad neomicina
- Discos de sensibilidad bacitracina
- Asa de siembra
- Ligas
- Mechero de alcohol
- Guantes estériles
- Barbijo
- Jeringas de tuberculina
- Espátula de drigraski
- Frascos viales
- Jeringas de 10 mL.

- Placas petri.

3.2.7 MATERIALES PARA EL ENSAYO IN (VIVO)

- Neomicina sulfato + Bacitracina zinc 5mg/500UI/g (ungüento)
- Gasas
- Plástico estéril
- Crema depiladora opilca
- Bisturíes
- Vaselina
- Lanolina
- Acido esteárico
- Cera de abeja
- Trietanolamina
- Propilenglicol
- Agua purificada
- Tijera
- Soporte de madera para los ratones

3.2.8 OTROS MATERIALES

- Algodón
- Jaulas de metal
- Papel kraf
- Papel secante
- Papel de aluminio
- Plumón indeleble
- Pabilo
- Cinta maskin
- Hisopos de algodón
- Envase para la forma farmacéutica

➤ 3.2.9 RECURSOS E INFRAESTRUCTURA

- ✓ Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- ✓ Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- ✓ Laboratorio de Farmacología de la carrera de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

3.3 METODOLOGIA

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

3.3.1 TIPO DE INVESTIGACION

El presente trabajo de investigación es un estudio comparativo con diseño cuasi experimental, es cuasi experimental por que se manipula deliberadamente, al menos una variable independiente las dosis del los extractos secos etanólico y clorofórmico de *Flourensia polycephala Dillon* (Phauka).

El estudio es prospectivo por que permite la observación del efecto antibacteriano “in vitro” e “in vivo” según va ocurriendo el proceso de investigación.

- Por el análisis y alcance de los resultados: estudio cuasi experimental
- Por el tiempo de ocurrencia de los hechos. Prospectivo
- Por el periodo y secuencia del estudio transversal.

3.3.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

A) Diseño experimental para evaluar el ensayo de la Actividad Antibacteriana “In Vitro”.

Para determinar la CMI de la actividad antibacteriana del extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala Dillon* (Phauka) se siguió el diseño de post prueba y grupo control de la siguiente manera.

CUADRO 3.1

Diseño para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro

GRUPO	3G _I	3G _{II}	3G _{III}	3G _{IV}	-----	3G _{XIV}	3G _{XV}
TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	X _I	X _{II}	X _{III}	X _{IV}	-----	X _{XIV}	X _{XV}
MEDICION DE LA PRUEBA	O _I	O _{II}	O _{III}	O _{IV}	-----	O _{XIV}	O _{XV}

- ◇ **3G_I; 3G_{II}; 3G_{IV}; ----- 3G_{XIV}; 3G_{XV}:** cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que fueron sembradas en las placas petri por triplicado.
- ◇ **X_I; X_{II}; X_{III}; X_{IV}; ----- X_{XIII} X_{XIV}:** son las diferentes concentraciones del extracto etanólico y clorofórmico fueron 0.1 mg/disco, 0.3 mg/disco, 0.5 mg/disco, 0.8mg/disco, 1.0 mg/disco, 3.0 mg/disco, 4.0 mg/disco, 5.0 mg/disco, 10.0 mg/disco, 20.0 mg/disco, 30 mg/disco, 50 mg/disco
- ◇ **X_{XV}:** concentración del fármaco que fue utilizado como patrón, discos de sensibilidad Bacitracina 0.04U, y discos de sensibilidad de Neomicina de 30µg.
- ◇ **O_I; O_{II}; O_{III}; O_{IV}; --- O_{XIV}; O_{XV}:** observación y medición de los halos de inhibición formados por las diferentes concentraciones de los extractos y los fármacos patrón.

B) Diseño experimental para evaluar el Efecto Antibacteriano “In Vivo” de la forma farmacéutica semisólida elaborada a base del extracto que mayor efecto presente en el ensayo in vitro sea extracto etanólico o clorofórmico de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).

Después de obtener la concentración mínima efectiva antibacteriano del extracto que presente mayor actividad in vitro, se diseñó la forma farmacéutica.

G: Grupo de sujetos

X: Tratamientos, estímulo o condición experimental

O: Medición de las respuestas que darán los sujetos de experimentación.

CUADRO N° 3. 2

Diseño para el ensayo de la actividad antibacteriana "in vivo"

GRUPOS	DOSIS	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G1	X1	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3

Donde:

G1=grupo de 4 ratones albinos tratados vaselina (control).

G2=grupo de 4 ratones albinos tratados con la formulación (emulsión).

G3=grupo de 4 ratones albinos tratados con el fármaco patrón (bacitracina, neomicina ungüento).

X1=Aplicación de la vaselina (control)

X2=aplicación con la formulación (emulsión)

X3=Aplicación del fármaco patrón ungüento (Neomicina sulfato y Bacitracina zinc 5mg/500UI/g)

O1, O2, O3, O4 medición de los días de curación de los ratones inducidos a una infección bacteriana por *Staphylococcus aureus*.

3.4. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

3.4.1. DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO Y EL EFECTO ANTIBACTERIANO “IN VIVO”

VARIABLES INDEPENDIENTES						
DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXP FINAL
Extracto etanólico: es la cantidad de extracto producto solido obtenido por evaporación del etanol, previa maceración de las hojas de este. Disuelto en agua destilada. (62)	Cuantitativa	Directa	Razón	Balanza analítica 0.001g de sensibilidad	Se procedió a pesar el extracto seco (mg) luego se realizó su dilución en alcohol al 70%	mg/mL
Extracto clorofórmico: es la cantidad de extracto producto solido obtenido por evaporación del etanol, previa maceración de las hojas de este. Disuelto en agua destilada. (62)	Cuantitativa	Directa	Razón	Balanza analítica 0.001g de sensibilidad	Se procedió a pesar el extracto seco (mg) luego se realizó su dilución en tween 80	mg/mL

VARIABLES DEPENDIENTES						
DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	EXP FINAL
<p>Actividad antibacteriana “in vitro” sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923: capacidad de una sustancia que actuando sobre una etapa esencial y específica del metabolismo microbiano de inhibir el crecimiento a algunos microorganismos. (21)</p>	Cuantitativa	Directa	Razón	Regla milimetrada	Se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por las diferentes concentraciones de los extractos	mm
<p>INDICADOR Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.</p>	Cuantitativa	Directa	Razón	Regla milimetrada	Se midió los halos de inhibición.	mm

VARIABLES DEPENDIENTES						
DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	EXP FINAL
<p>Evaluación antibacteriano “in vivo” de la forma farmacéutica elaborada con el extracto etanólico de las hojas de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon “Phauka”: será el resultado de la acción de la forma farmacéutica elaborada con capacidad antimicrobiana que actuó en la curación de las heridas infectadas por <i>S.aureus</i>.</p> <p>INDICADOR Curación de la infección de los ratones de experimentación</p>	Cuantitativa	Directa	Razón	Observación visual	Se determinó los días de curación que tardó en curarse las heridas infectadas en los ratones de experimentación.	Ratones curados /Días
	Cuantitativa	Directa	Razón	Observación visual	Numero de días que tardó en curarse las heridas.	Días

3.4.2. VARIABLES INTERVINIENTES

3.4.2.1 DE LOS RATONES DE EXPERIMENTACIÓN

- **Raza:** población con diferente distribución de la secuencia de genes (2), se utilizó ratones de la cepa *Mus musculus*, Balb/c.
- **Sexo:** tiempo que ha vivido el ratón (55). Para el experimento se usaron ratones de 2 a 3 meses de edad.
- **Peso:** depende de la masa del cuerpo del ratón (5). Se utilizó ratones de 30 a 35 gramos.
- **Alimentación:** acción de dar sustancias nutritivas (2). A los ratones se les brindó una dieta balanceada a base de TOMASINO.

3.4.2.2 DE LA MUESTRA VEGETAL

- **Estadio de crecimiento:** se recolectaron las hojas durante la etapa de floración.
- **Altitud de recolección:** se recolectaron las hojas de la especie en estudio de la localidad de Oropesa a una altitud de 3350 msnm.

3.4.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.4.3.1. De la Muestra vegetal.

Criterios de inclusión:

- Se recolectaron hojas sanas, enteras, durante la floración libre de hongos, polvo, insectos.

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron las muestras vegetales las partes aéreas dañadas o contaminadas con hongos, bacterias, polvo, marchitas, así mismo secas estando en el terreno de crecimiento.

3.4.3.2. De las bacterias.

Criterios de inclusión

- Se trabajó con las bacterias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que se encontró en buenas condiciones de temperatura, humedad, y libres de contaminantes.

- Siembra y repique adecuado de las bacterias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que fueron certificados por el laboratorio GenLAB SAC.

Criterios de exclusión

- No se tomaron en cuenta aquellas cepas que pudieron presentar contaminación.

3.4.3.3. De los ratones

Criterios de inclusión

- Se utilizaron ratones albinos machos de la especie *Mus musculus* Bald/C/CNPB de 3 meses de edad.
- Condiciones de crecimiento y alimentación de la especie: se controló que el ambiente sea adecuado y limpio para el número total de ratones con una alimentación balanceada administrándoles ratonina y tomasino.

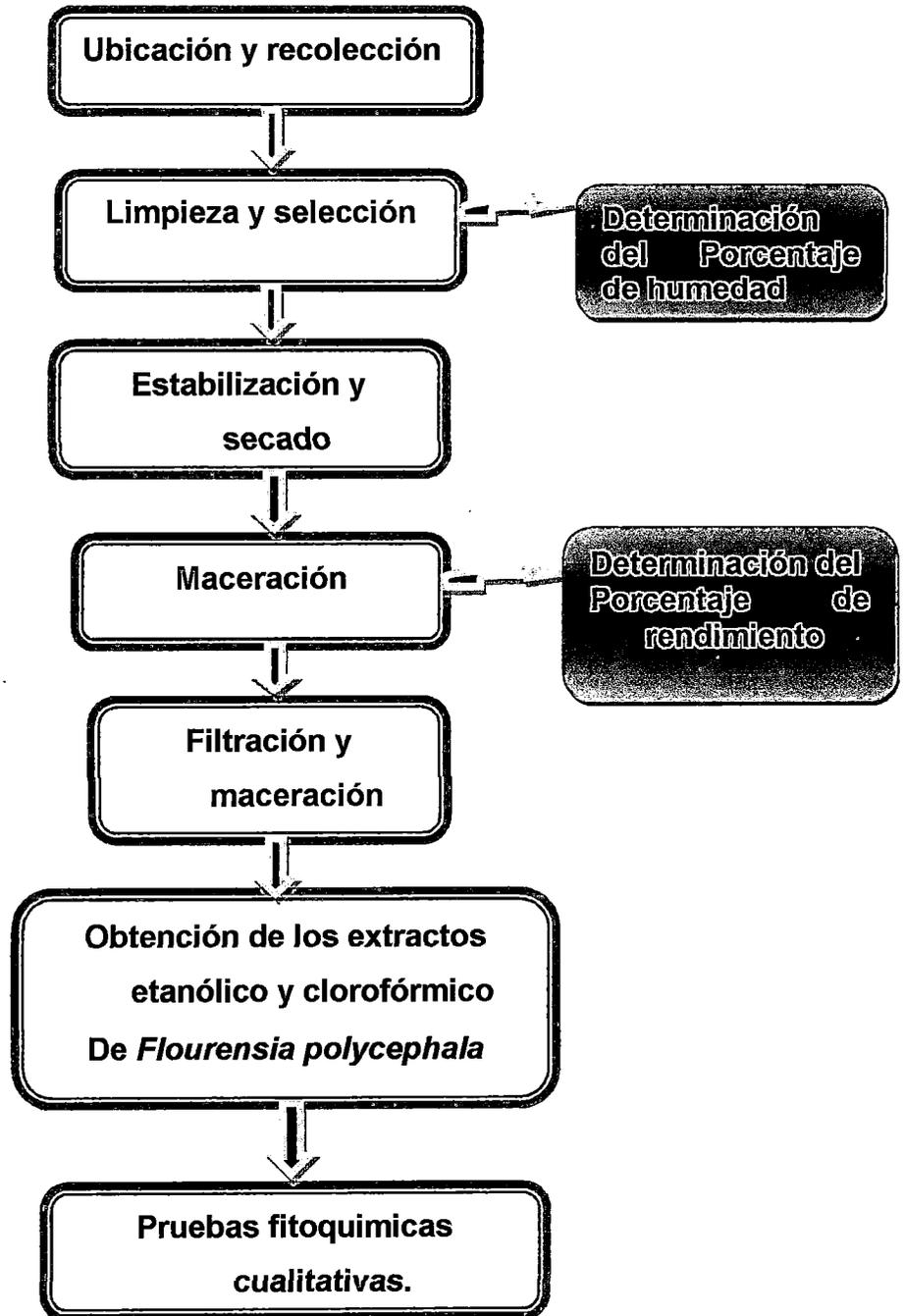
Criterios de exclusión

- Se excluyeron a los ratones albinos machos de raza *Mus musculus* Bald/C/CNPB que presentaron resistencia al desarrollo de la infección forzada que se practicó en estos.

3.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

FLUJOGRAMA Nº 3.1

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS SECOS ETANÓLICO y CLOROFÓRMICO ANÁLISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO.



Fuente: Elaboración propia

PROCEDIMIENTO

3.5.1. PREPARACION DE LA PLANTA EN ESTUDIO.

3.5.1.1 Recolección de la Planta en Estudio

Se recolectó la especie vegetal *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*), en el distrito de oropesa provincia de Quispicanchis departamento del cusco ubicado a 21 km al sur del la ciudad del cusco a 3350 m.s.n.m. Recolectándose las hojas sanas, frescas y libres de plagas empleándose como recipientes bolsas de polietileno.

3.5.1.2 Identificación Botánica: se realizó en el Herbario Vargas (CUZ) de la Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco.

3.5.1.3 Selección y secado de la Muestra

Una vez obtenida la muestra se procedió a la selección y limpieza de los mejores ejemplares de hojas de la planta, luego se extendieron las hojas seleccionadas en papel kraf para su secado el cual se realizó en un lugar fresco, limpio, ventilado, en sombra a temperatura ambiente.

3.5.1.4 Molienda

Una vez secas las hojas seleccionadas de procedieron a molerlas con un molino de cuchillas, previamente desinfectado, luego se tamizó la muestra para obtener un producto homogéneo el cual se envasó en un recipiente de vidrio oscuro y limpio con tapa hermética.

3.5.1.5 Determinación del porcentaje de humedad

A una parte de la muestra seleccionada (5g) se determinó el porcentaje de humedad de la siguiente manera: se colocó 5 gramos de la muestra fresca en una placa petri, previamente pesada, esta se llevó a una estufa con un rango

de temperatura de 40°C, se dejó secar hasta obtener un peso constante. Esta operación se realizó por triplicado.

Para la determinación del porcentaje de humedad se aplicó la siguiente fórmula.

$$\%H = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

Donde:

% H: Porcentaje de humedad

M_f: Peso de muestra fresca

M_s: Peso de muestra seca

3.5.1.6 Obtención de extractos

La parte molida y envasada se sometió a maceración con etanol al 70% y cloroformo durante 15 días, preferiblemente en un envase color caramelo. Pasado este tiempo se procedió a filtrar el macerado. El producto filtrado se puso en envases de boca ancha y se sometió a evaporación a una temperatura aproximada de 37°C.

Se realizó la extracción con etanol y cloroformo utilizando un sistema de agotamiento hasta la obtención del etanol de un color transparente y de igual forma se realizó con el clorofórmico.

El porcentaje de extracción se calculó con la siguiente relación para cada extracto utilizado.

$$\%E = \frac{p_f}{p_i} \times 100$$

Donde:

% E: Porcentaje de la extracción del extracto.

P_f: peso del extracto seco

P_i: peso de la muestra molida

3.5.1.7 Pruebas de Solubilidad

Para este ensayo se pesará aproximadamente 100 mg de los extractos secos en diferentes tubos de ensayo, luego se agregaron a cada uno de ellos 1 a 3 mililitros de un solvente de diferente polaridad, así como el agua, etanol a 40%, 70%,96%,cloroformo, acetato de etilo, éter etílico, hexano.

3.5.1.8 Análisis Fitoquímico Cualitativo

A unos cuantos gramos del extracto se le realizo un análisis Fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios. (ANEXO N° 3)

CUADRO N° 3.3
ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO

REACCIONES DE IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS	
REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO
Benedict	Azucares reductores y glucósidos
Ninhidrina	Aminoácidos
Shinoda	Flavonoides
Cloruro ferrico	Compuestos fenólicos
Dragendorff y Mayer	Alcaloides
Gelatina – sal	Taninos
Hidroxamato ferrico	Lactonas
Baljet	Cumarinas
Borntranger	Quinonas
Lieberman Burchard	Esteroides

Fuente: villar del fresno, Angel (1999)

3.5.2 Control Microbiológico

Las muestras vegetales no están libres de microorganismos y al momento de su recolección el riesgo de la contaminación aumenta. Para disminuir la carga microbiana se realiza el proceso de secado y esta carga también puede reducirse durante el proceso de maceración con etanol al 70% y cloroformo, pero esto no nos garantiza que los extractos obtenidos este libre de microorganismos, por lo cual es necesario realizar un control microbiológico a los extractos para evitar que durante el ensayo se produzcan posibles errores en los resultados.

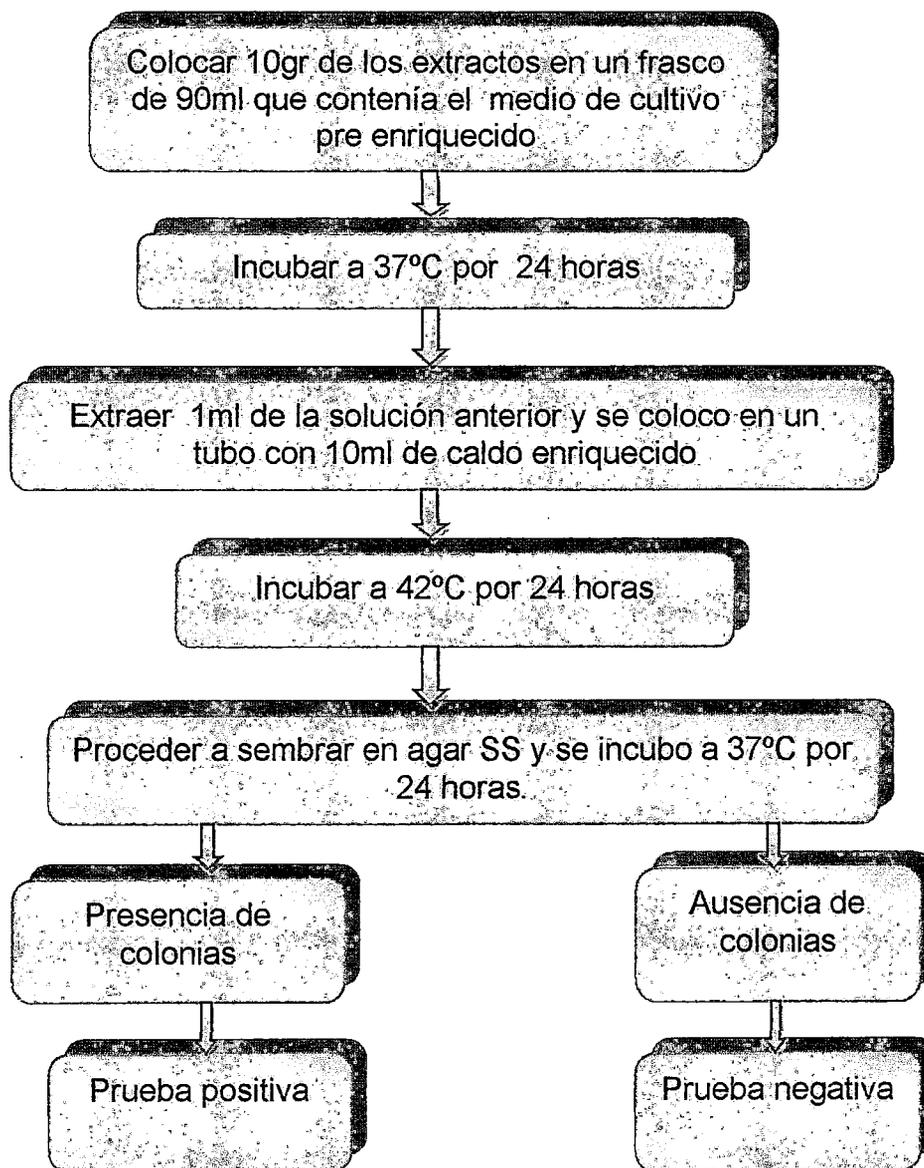
(Anexo N° 5)

Para la realización del control microbiológico se procedió según los flujogramas que se describen a continuación.

FLUJOGRAMA 3.2.

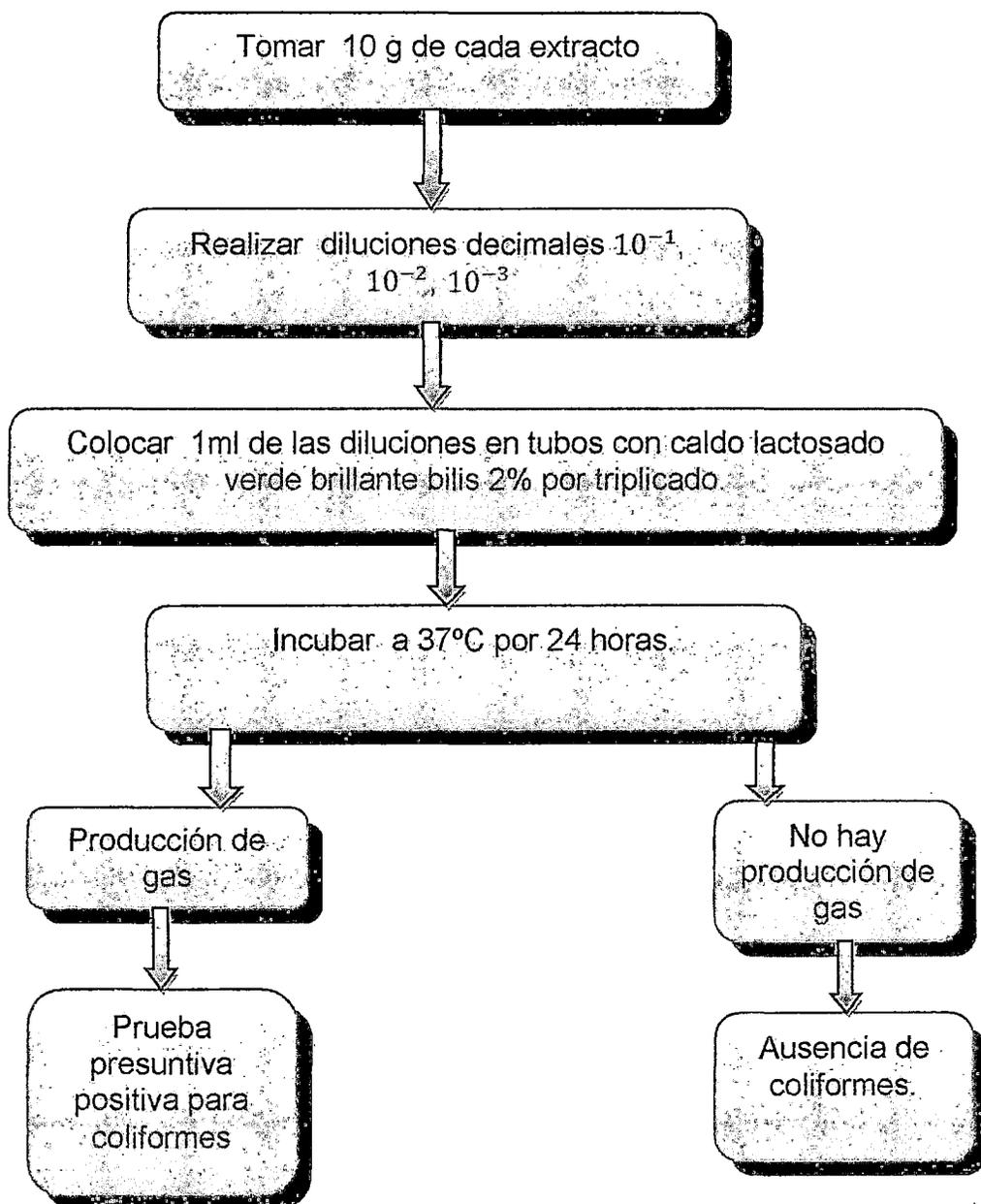
CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICO Y CLOROFORMICO DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) EN BASE AL CRITERIO IMPERATIVO.

(Salmonella)



Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA 3.3
CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICO Y
COLORFORMICO DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) EN BASE
AL CRITERIO IMPERATIVO.
(Coliformes fecales)

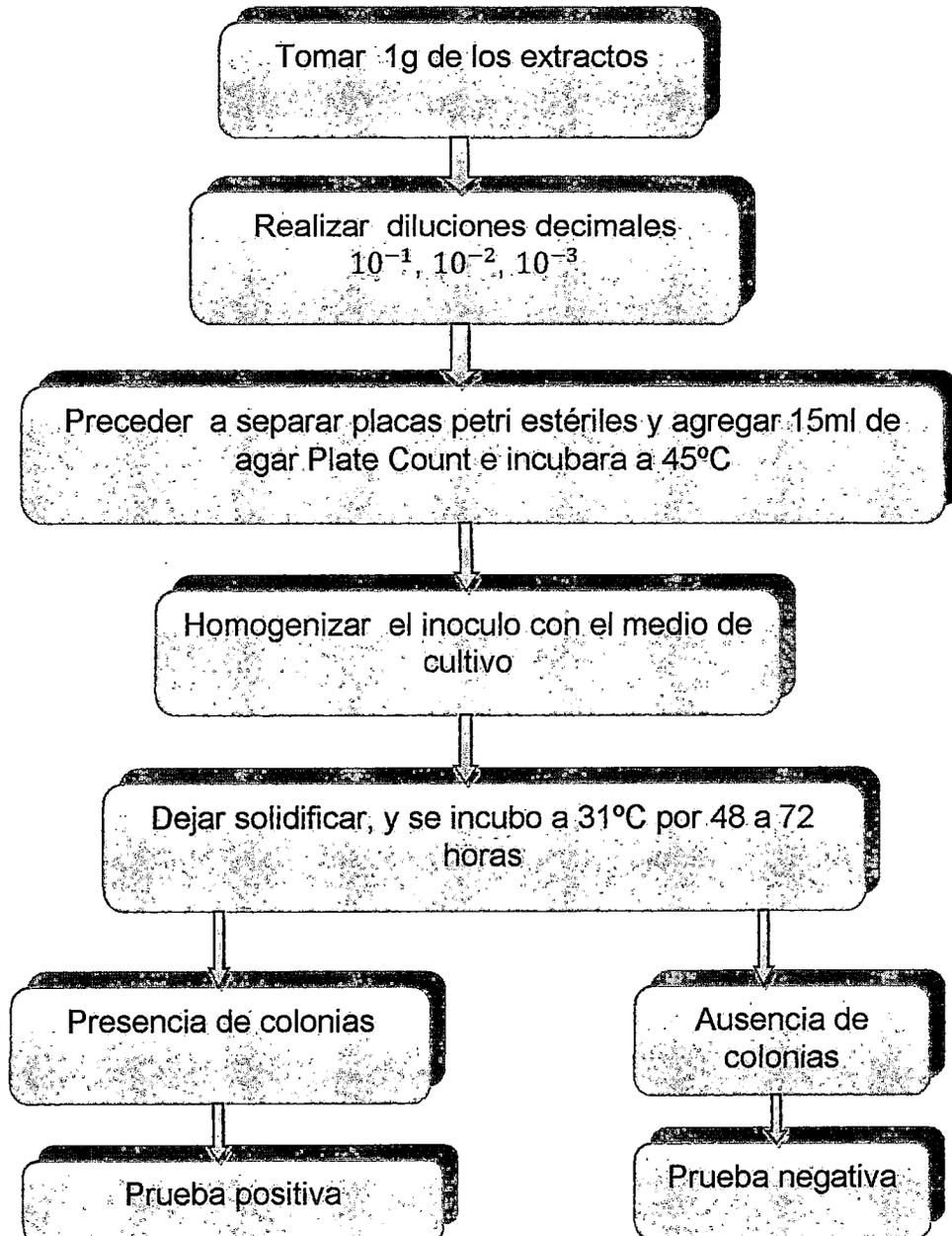


Fuente: Elaboración propia.

FLUJOGRAMA 3.4

CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICO Y CLOROFORMICO DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) EN BASE AL CRITERO DE ALERTA O LIMITES CRITICOS.

(Mesofilos viables)

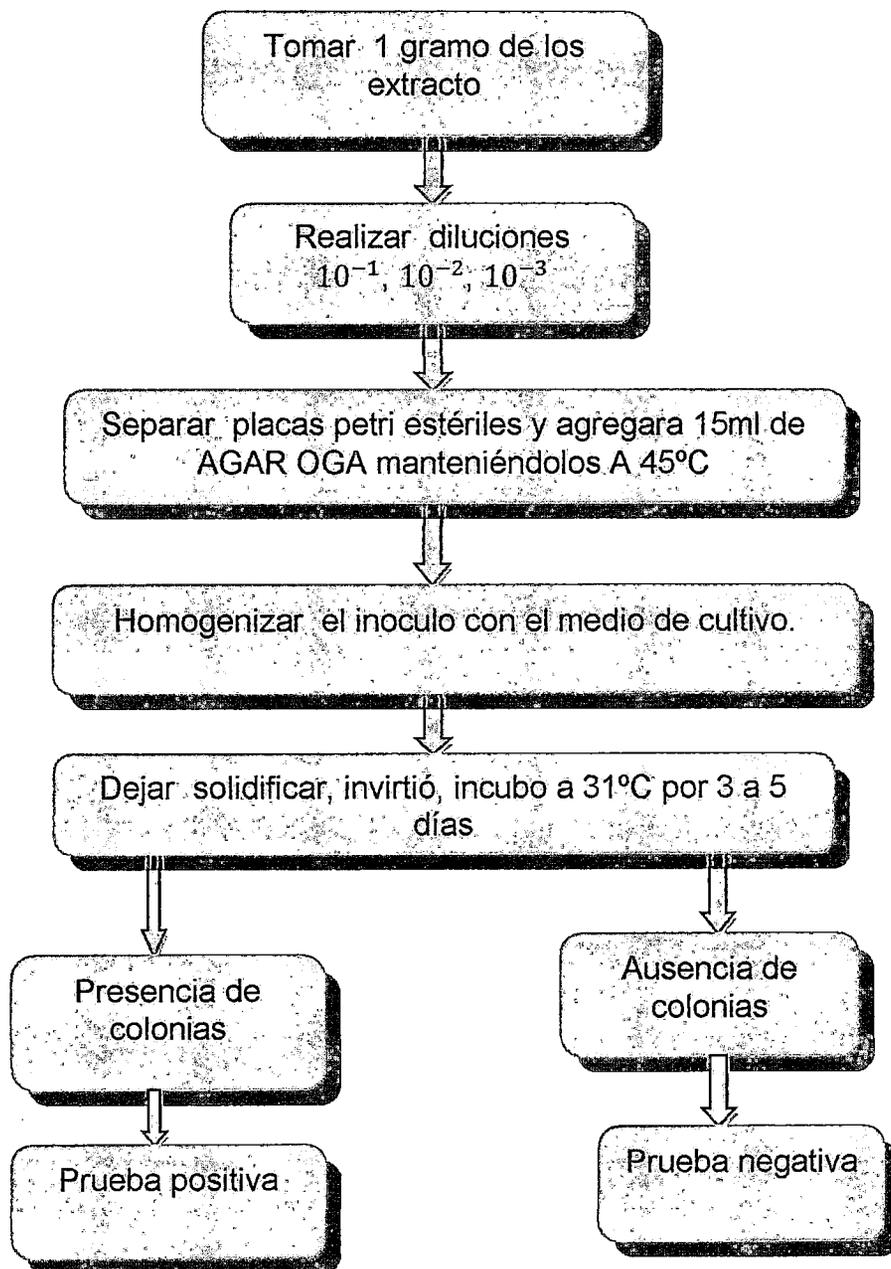


Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA 3.5

CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICO Y CLOROFORMICO DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) EN BASE AL CRITERO DE ALERTA O LIMITES CRITICOS.

(HONGOS Y LEVADURAS)



Fuente: Elaboración propia

3.5.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “IN VITRO”

A. ACTIVACION DE *Stafilococcus aureus* ATCC 25923

- Obtenida la cepa liofilizada de *Stafilococcus aureus* ATCC 25923, esta fue sembrada en agar tripticasa soya (TSA) e incubada a una temperatura de 35°C por 24 a 48 horas según las instrucciones.(anexo 3)
- Para conservar la cepa se repico las colonias y se pasaron a tubos de con agar TSA se incubaron por 18 y luego se refrigeró.

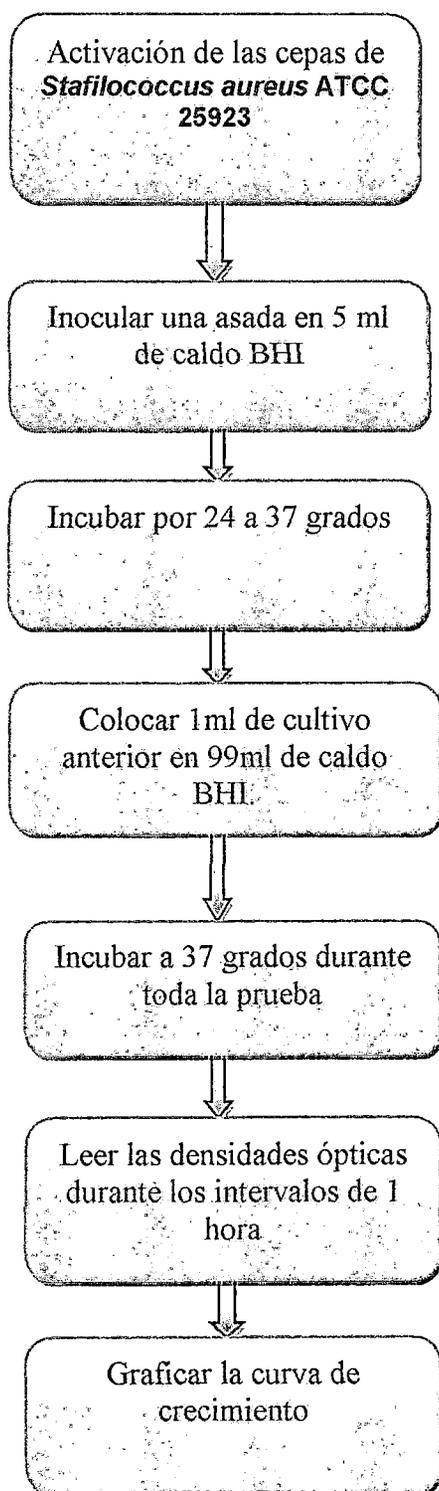
B. ESTANDARIZACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Stafilococcus aureus* ATCC 25923

- Una vez activada la cepa, se tomo una asada de esta la que fue inoculada en 5ml de caldo BHI (Brain Heart infusión) e incubada a 37°C por 24 horas.
- Transcurridos las 24 horas se tomo 1ml del caldo que contenía la bacteria el cual se paso a un matraz con 99ml de caldo BHI (Brain Heart infusión) (para obtener una dilución de 1:100) y luego se incubo a 37°C.
- Al cultivo anterior se le realizo una evaluación del crecimiento a través de la lectura de las densidades ópticas, primero al tiempo cero y luego a un intervalo de una hora. La lectura de las absorbancias se realizo a una longitud de onda de 623nm y se calibro con caldo BHI puro.
- Se obtuvo la curva de las fases de crecimiento de la bacteria en estudio realizando un grafico del tiempo vs absorbancia.

En el Flujograma N° 3.6 se resume la estandarización de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

FLUJOGRAMA N° 3.6

ESTANDARIZACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Stafilococcus aureus* ATCC 25923.



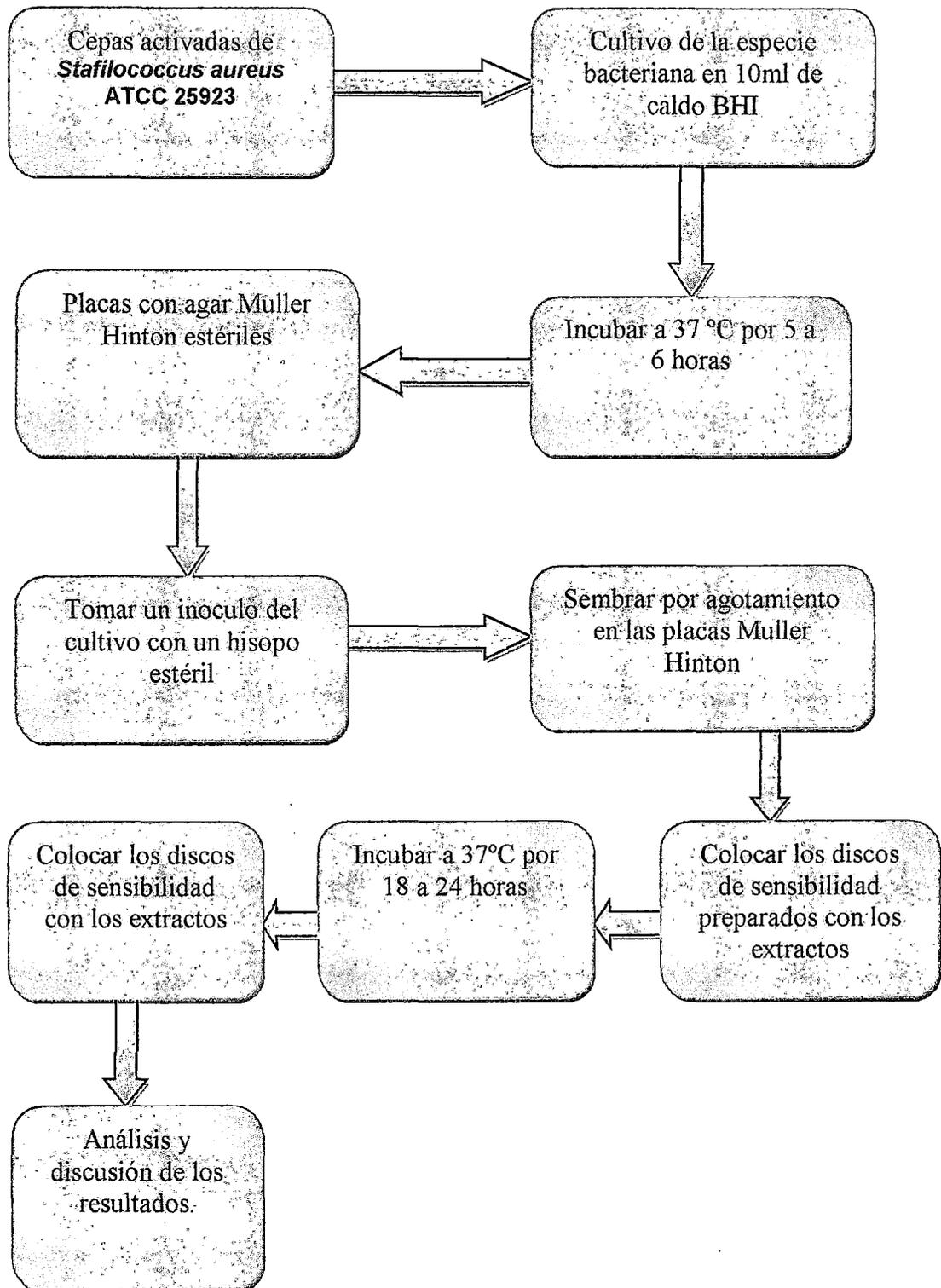
Fuente: elaboración propia

A. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO (Método de disco difusión en placa)

- Se prepararon las placas que contenían Agar Muller Hinton con una cantidad de 20ml aproximadamente. Luego se incubaron a 37°C por 24 horas para el respectivo control de esterilidad.
- Se elaboraron los discos de sensibilidad con cantidades crecientes de extracto de la siguiente manera: se preparó una solución saturada con una concentración conocida de los extractos, para el etanólico con etanol al 70% y para el clorofórmico con tween 80, se determinó la concentración en mg/mL de la solución saturada. sabiendo cual es la concentración en mg/mL que contiene la solución. Con ayuda de una micro pipeta se colocaron las cantidades necesarias en discos de sensibilidad de papel Whatman de 6mm de diámetro y se dejó secar.
- Se cultivo la especie bacteriana en estudio en 10ml de caldo BHI durante 5 a 6 horas (según la curva de crecimiento), con la finalidad de realizar a partir de este el sembrado en las placas.
- Una vez obtenida la suspensión bacteriana se procedió a la siembra por agotamiento en superficie, con la ayuda de un hisopo estéril, en las placas con agar Muller Hinton ya preparadas.
- A cada placa se le colocaron los discos de sensibilidad que contienen las diferentes concentraciones del extracto y los discos de control con ayuda de una pinza estéril.
- Se llevaron las placas a incubación por 18 a 24 horas a una temperatura de 37°C, transcurrido este tiempo se realizaron las lecturas de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano.

FLUJOGRAMA 3.7

PROCESO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO



Fuente: elaboración propia

3.5.4. ESTANDARIZACION DE LAS CONCENTRACIONES ANTIBACTERIANAS

A. PRUEBA PILOTO

Se realizó una prueba piloto para determinar la Concentración Mínima inhibitoria y la Concentración Máxima Inhibitoria para el ensayo de la actividad antibacteriana, esto con la finalidad de realizar una estandarización de las concentraciones antibacterianas. Para este ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos; los cuales se presentan a continuación.

CUADRO N° 3.4
CONCENTRACIONES USADAS EN LAS PRUEBAS PILOTO

CONCENTRACIONES PARA LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO	CONCENTRACIONES PARA LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO
Concentración del extracto (mg/disco)	Concentración del extracto (mg/disco)
0.1	0.1
0.3	0.3
0.5	0.5
0.8	0.8
1.0	1.0
3.0	3.0
4.0	4.0
5.0	5.0
10.0	10.0
20.0	20.0
30.0	30.0
50.0	50.0

Fuente: datos experimentales

B. ESTANDARIZACION DE LAS CONCENTRACIONES

Las concentraciones estandarizadas se obtuvieron a través de la formula de factor de incremento, teniendo en por referencia las concentraciones Mínima y Máxima inhibitoria obtenidas en la prueba piloto.

La formula es la siguiente:

$$F = \sqrt[r]{I}$$

Donde

F: factor de incremento

I: intervalo = $\frac{\text{concentracion máxima}}{\text{concentracion mínima}}$

r: N -1= Numero de dosis en la serie logarítmica

N: Número de concentraciones con las que las trabajo

Para determinar las concentraciones con las que se trabajo se procedió de la siguiente manera.

TABLA N° 3.1
DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS
PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO ETANOLICO Y CLOROFORMICO.

OPERACIÓN	Nº DE CONCENTRACION
Concentración Mínima	concentración 1
Concentración 1 x F	Concentración 2
Concentración 2 x F	Concentración 3
Concentración 3 x F	Concentración 4
Concentración 4 x F	Concentración 5
Concentración 5 x F	Concentración 6
Concentración 6 x F	Concentración 7
Concentración 7 x F	Concentración 8
Concentración 8 x F	Concentración 9
Concentración 9 x F	Concentración 10
Concentración 10 x F	Concentración 11
Concentración 11 x F	Concentración 12

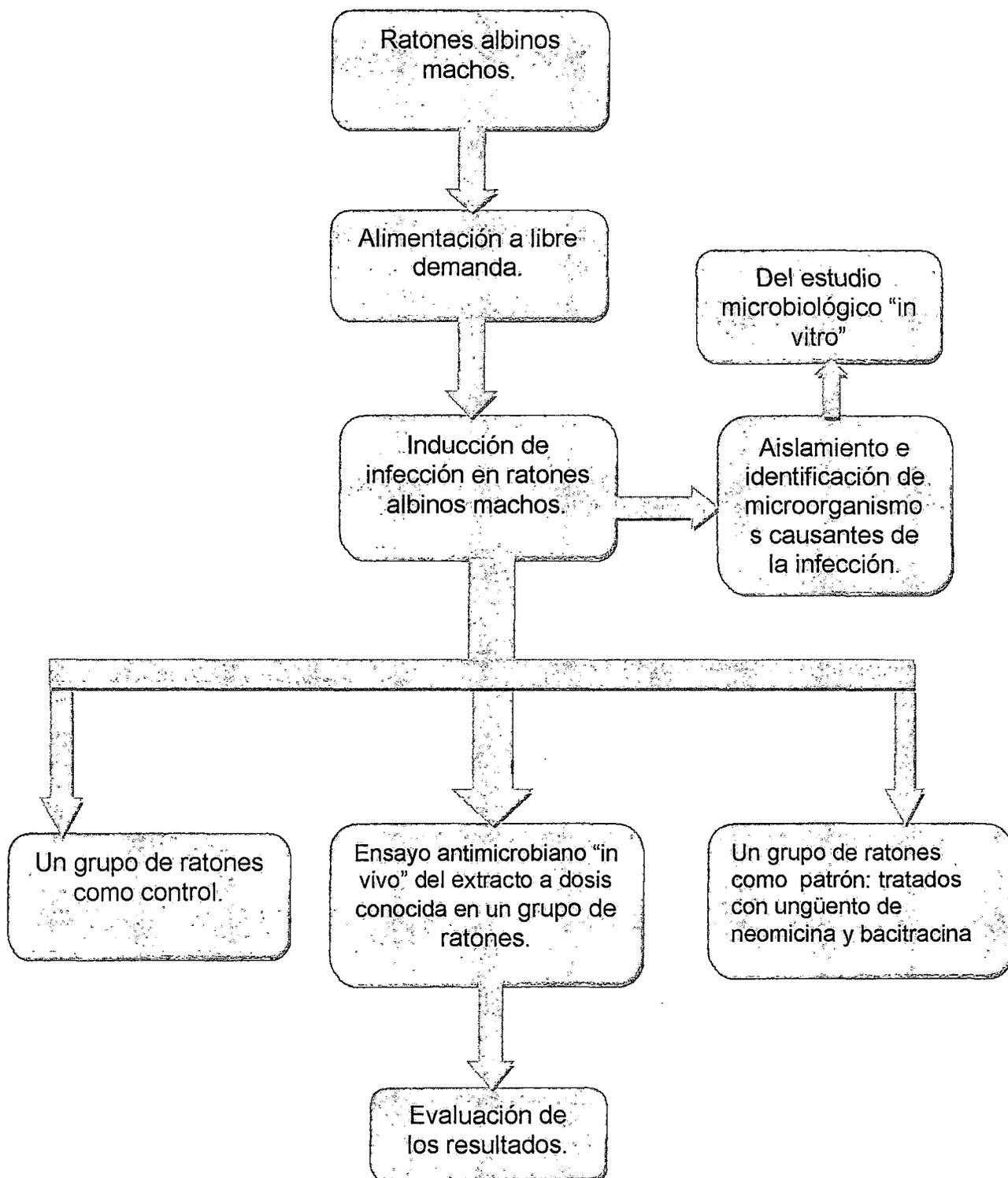
3.5.5 ENSAYO CON LOS FÁRMACOS PÁTRON

Para cada ensayo se utilizaron fármacos patrón de acuerdo al tipo de microorganismo. En este caso de la actividad antibacteriana se usaron discos de sensibilidad de Neomicina 30 μ y Bacitracina 0.04UI (fármacos que están contenidos en varias marcas de cremas indicadas en casos de infecciones de la piel por *Staphylococcus*). En este caso se precedió según el protocolo.

3.5.6 MÉTODO PARA EL EFECTO ANTIBACTERINO IN VIVO (21) INDUCCION DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS EN LOS RATONES ALBINOS MACHOS MUS MUSCULUS CEPA BALB/C.

Se utilizaron 24 ratones albinos aproximadamente 30 y 35 g de peso, suministrados por el Instituto Nacional de Salud (INS), los cuales se mantuvieron en cuarentena durante 7 días con suministro de agua y alimentos a libre demanda. En el momento del estudio se les rasuro las regiones lumbosacras, y se anestesiaran con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (i.p.) a 35 gr de peso corporal /1.4ml. Después de lavar la piel con agua y jabón, se realizo desinfección local con Hibitane-alcohólico y posteriormente el área quirúrgica se cubrió con paños estériles, y se procedió a realizar colgajos curvos de 1.0 cm de base en forma de media luna a ambos lados de la línea media con un bisturí. Produciéndole una herida en el cual se inocularon por hisopado de los bordes cruentos de la piel, tejido graso y superficie aponeurótica con un crecimiento en caldo Brain Heart infusión (BHI) de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1×10^8 UFC y los animales se colocaron en cajas individuales con viruta estéril. Las lesiones hísticas se observaran diariamente durante 72 h (tres días) para detectar la aparición de aumento de volumen, con formación de absceso y pus produciéndose una infección.

FLUJOGRAMA 3.8
MÉTODO PARA EL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VIVO.



Fuente: elaboración propia

PRE FORMULACION DE LAS FORMAS FARMACEUTICAS TOPICAS

POMADA

Formulación 1: Pomada conteniendo 0.25g de extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).

Extracto etanólico de las hojas <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Phauka)	
0.25 g	
Vaselina	7.00 g
Lanolina	3.00g
RESULTADO: Color verde opalescente, olor característico, buena consistencia, la curación de la infección con esta forma farmacéutica demoró 6 días. (4 Ratones).	

Formulación 2: Pomada conteniendo 0.5g de extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)

Extracto etanólico de las hojas de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Phauka)	
0.50 g	
Vaselina	7.00 g
Lanolina	3.00 g
RESULTADO: Color verde oscuro, olor característico, buena consistencia, la curación de la infección con esta forma farmacéutica demoró 8 días. (4 Ratones).	

EMULSION

Formulación 3: Emulsión O/W conteniendo 0.25g de extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)

Acido esteárico	7.50 g
Cera blanca	1.00 g
Vaselina amarillo	4.00 g
Trietanolamina	0.50 g
Propilenglicol	4.00 g
Agua purificada: csp	50.00g
Extracto etanólico	0.25 g
RESULTADO: Emulsión verdosa, presenta buena fluidez, de fácil aplicación, buena estabilidad, la curación de la infección con esta forma farmacéutica demoró 4 días. (4 Ratones).	

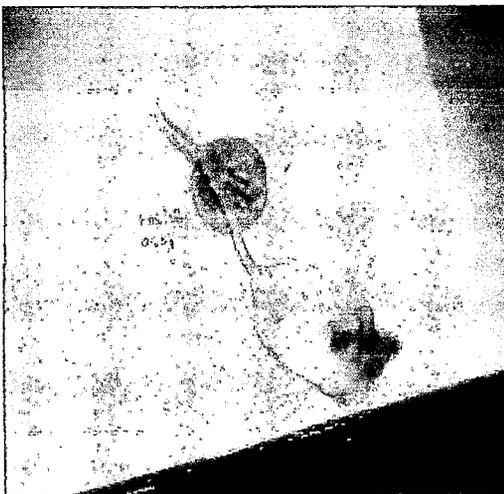
Formulación 4: Emulsión O/W conteniendo 0.5 g de extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka)

Acido esteárico	7.50 g
Cera blanca	1.00 g
Vaselina amarillo	4.00 g
Trietanolamina	0.50 g
Propilenglicol	4.00 g
Agua purificada: csp	50.00g
Extracto etanólico	0.50 g

RESULTADO: Emulsión verdosa, no presenta buena consistencia, tiende a secarse y perder fluidez, inestabilidad con el tiempo se separa en dos fases, la curación de la infección con esta forma farmacéutica demoró 9 días. (4 Ratones).

PRUEBA PILOTO PARA ELEGIR LA MEJOR FORMA FARMACEUTICA PARA EVALUAR EL EFECTO ANTIMICROBIANO (ANTIBACTERIANO) IN VIVO EN RATONES ALBINOS

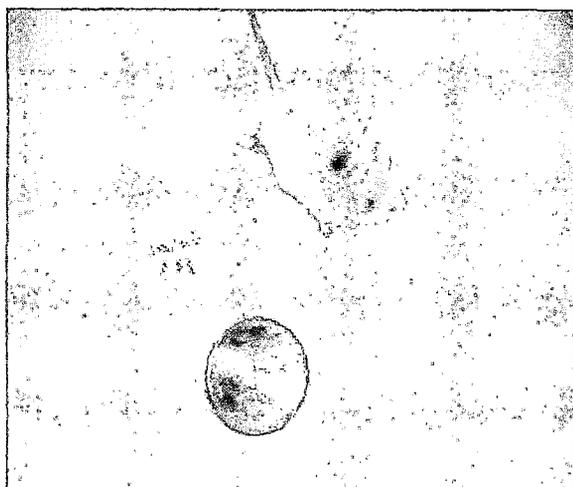
FOTOGRAFIA N° 3.1



En la fotografía N° 3.1 se observa la emulsión preparada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) a una concentración de 0.25 gr y al ratón de experimentación el cual fue curado, favorablemente en 4 días

Fuente: V.C.S

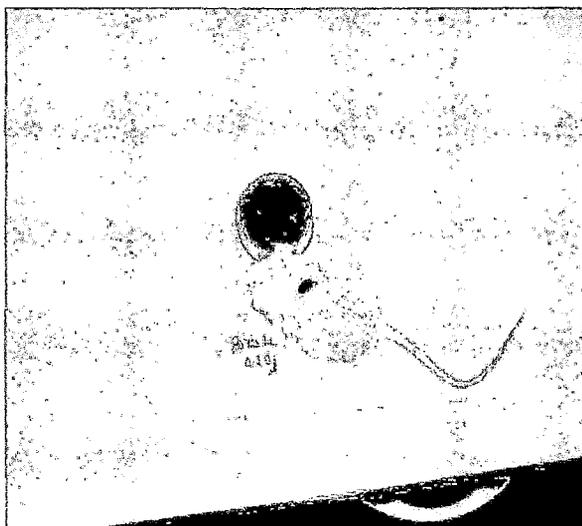
FOTOGRAFIA N° 3.2



En la fotografía N° 3.2 se observa la emulsión preparada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) a una concentración de 0.5 gr y al ratón de experimentación el cual fue curado en 9 días

Fuente: V.C.S

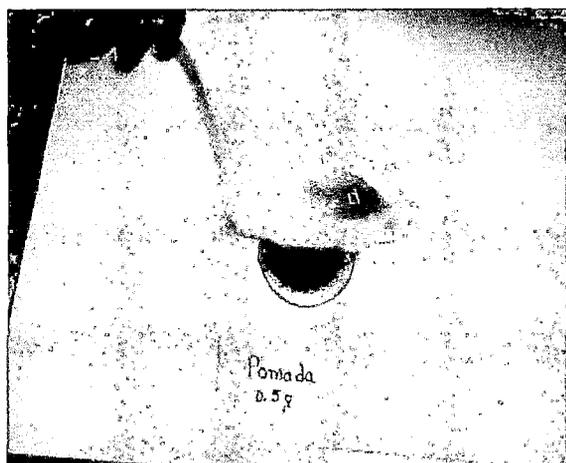
FOTOGRAFIA N° 3.3



En la fotografía N° 3.3 se observa la pomada preparada con el extracto etanólico de las hojas *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) a una concentración de 0.25 gr y al ratón de experimentación el cual fue curado en 6 días.

Fuente: V.C.S

FOTOGRAFIA N° 3.4



En la fotografía N° 3.4 se observa la pomada preparada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*) a una concentración de 0.5 gr y al ratón de experimentación el cual fue curado en 8 días.

Fuente: V.C.S

CAPITULO IV
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1.- DE LA DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA)

Esta se determinó mediante la siguiente fórmula.

$$\%H = \frac{Mf - Ms}{Mf} \times 100$$

Donde:

%H: Porcentaje de humedad

Mf: peso de la muestra fresca

Ms: peso de la muestra seca.

Se obtuvieron los siguientes resultados

CUADRO N° 4.1
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

NUMERO DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	PORCENTAJE DE HUMEDAD
1	5g	1.371g	72.58%
2	5g	1.374g	72.52%
3	5g	1.375g	72.50%
PROMEDIO			72.53%

ANALISIS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de humedad promedio obtenido para las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), fue de 72.53%. Como se puede observar, presentó un alto porcentaje de humedad lo que hace propensa a la muestra

vegetal de contaminación por bacterias y especialmente de hongos (los que se desarrollan bien en la humedad).

Gracias a este dato se pudo tomar las medidas necesarias para la realización del secado de la muestra, por el cual estas medidas nos permiten evitar el desarrollo de bacterias y además estabilizan los procesos enzimáticos e interrumpen la degradación de los metabolitos secundarios de la planta, con esto se pudo lograr obtener una muestra adecuada para el estudio.

Durante el proceso de secado al medio ambiente (lugar fresco y limpio) por el cual la planta en estudio no sufrió contaminación por bacterias u hongos.

4.2. DE LA OBTENCION DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA)

4.2.1. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE EXTRACCION DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*)

El porcentaje de extracción por maceración, se calculó con la siguiente

Formula:

$$\%E = \frac{pf}{pi} \times 100$$

Donde:

%E: porcentaje de extracción

Pi: peso inicial de la muestra molida

Pf: peso del extracto seco.

CUADRO N° 4.2
PORCENTAJE DE EXTRACCION DE LAS HOJAS DE *Flourensia*
***polycephala* Dillon (PHAUKA)**

PESO INICIAL	PESO FINAL	% DE EXTRACCION ETANOLICA	% DE EXTRACCION CLOROFORMICA
0.3158g	0.1644g	52.10%	
0.3079g	0.0721g		23.42%

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Estos datos nos permiten determinar la cantidad de muestra vegetal que necesitamos para la realización de los diferentes ensayos del trabajo de investigación además nos da información que permite saber si la planta es una buena materia prima o no.

El porcentaje de extracción obtenido por maceración con etanol al 70% de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA) fue de 52.10% como se puede observar esta planta posee un alto porcentaje de extracción con etanol lo cual nos indica que esta planta es una buena materia prima para la realización del trabajo de investigación.

Encabio el porcentaje de extracción obtenido por maceración con cloroformo de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA) fue de 23.42%. Como se puede observar esta planta posee un porcentaje de extracción no muy alto con este solvente clorofórmico, el cual nos indica que también es una buena materia prima para la realización del estudio.

**4.2.2. DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO DE LAS
HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA)**

Para las pruebas de solubilidad del extracto se utilizó diferentes solventes de diferente polaridad obteniéndose los siguientes resultados.

EXTRACTO ETANOLICO

CUADRO N° 4.3

SOLVENTE	GRADO DE SOLUBILIDAD
H ₂ O (Agua)	++
Etanol 40%	++
Etanol 70%	+++
Etanol 96%	++
Hexano	-
Cloroformo	+
Acetato de etilo	+
Éter etílico	+

Fuente: Curso teórico experimental Pontificia Universidad Católica del Perú

Donde:

- +++ : Totalmente soluble
- ++ : Parcialmente soluble
- + : Poco soluble
- : insoluble

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Como podemos apreciar en el cuadro N° 4.3, el extracto de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) obtenido por la maceración con etanol al 70% muestra poca solubilidad en los diferentes solventes polares y apolares.

El extracto es totalmente soluble en alcohol al 70% cumpliéndose que lo semejante disuelve a lo semejante como se puede observar parcialmente soluble en el agua, etanol al 40%, 96% y poco soluble, cloroformo, acetato de etilo, éter etílico e insoluble en el hexano, que es a polar.

Según estos resultados el extracto de las hojas *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) presenta naturaleza parcialmente polar.

EXTRACTO CLOROFORMICO

CUADRO N° 4.4

SOLVENTE	GRADO DE SOLUBILIDAD
H2O (Agua)	++
Etanol 40%	-
Etanol 70%	+
Etanol 96%	++
Hexano	-
Cloroformo	+++
Acetato de etilo	+++
Éter etílico	+++

Fuente: Curso teórico experimental Pontificia Universidad Católica del Perú

Donde:

- +++ : Totalmente soluble
- ++ : Parcialmente soluble
- + : Poco soluble
- : insoluble

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Como podemos apreciar en el cuadro N° 4.4 el extracto de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) obtenido por la maceración en clorofórmico es parcialmente soluble en agua y etanol al 96% y poco soluble en etanol al 70% en cambio en cloroformo, acetato de etilo, éter etílico que son solventes apolares es totalmente soluble y en etanol al 40% y hexano es insoluble, según estos resultados el extracto cloroformico de las hojas *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) presenta naturaleza no polar.

4.2.3. ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA)

Las pruebas del análisis fitoquímico cualitativo se realizaron en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. (Se procedió según el protocolo de la Pontificia Universidad Católica del Perú). Este ensayo se hizo con la finalidad de identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), en el cual se obtuvo los siguientes resultados.

CUADRO N° 4.5

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	RESUTADOS
Estéroides	Liebermann-Burchart	+++
Compuestos Fenólicos	Cloruro férrico	+++
Flavonoides	Shinoda	+++
Quinonas	Bomtranger	---
Taninos resinas	Gelatina -sal	---
Leucoantocianidinas	Rosenheim	---
Saponinas	Espuma	---
Alcaloides	Dragendorff	---
Alcaloides	Mayer	---

Fuente: Curso teórico experimental Pontificia Universidad Católica del Perú

Leyenda

- +++ : Abundante cantidad
- ++- : Moderada cantidad
- +-- : Escasa cantidad
- : Ausencia

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Para la detección de los metabolitos secundarios se utilizaron reactivos de identificación específicos para cada compuesto. Obteniéndose en algunas pruebas, coloraciones específicas y otras de precipitación.

En el cuadro 4.5 podemos evidenciar que el extracto presenta una abundante presencia de Esteroides, Compuestos Fenólicos, Flavonoides.

Y ausencia de quinonas, taninos, Leucoantocianidinas, Saponinas, Alcaloides.

Su actividad antibacteriana se debería a la presencia de Flavonoides y compuestos fenólicos. (8) (62)

4.2.4. ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA)

Las pruebas del análisis fitoquímico cualitativo se realizaron en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. (Se procedió según el protocolo de la pontificia universidad católica del Perú). Este ensayo se hizo con la finalidad de identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), en el cual se obtuvo los siguientes resultados.

CUADRO N° 4.6

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	RESUTADOS
Esteroides	Liebermann-Burchart	+++
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico	++-
Flavonoides	Shinoda	++-
Quinonas	Borntranger	---
Taninos resinas	Gelatina -sal	---
Leucoantocianidinas	Rosenheim	---
Saponinas	Espuma	---
Alcaloides	Dragendorff	---
Alcaloides	Mayer	---

Fuente: Curso teórico experimental Pontificia Universidad Católica del Perú

Leyenda

- +++ : Abundante cantidad
- ++- : Moderada cantidad
- +-- : Escasa cantidad
- : Ausencia.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Para la detección de los metabolitos secundarios se utilizaron reactivos de identificación específicos para cada compuesto. Obteniéndose en algunas pruebas, coloraciones específicas y otras de precipitación.

En el cuadro 4.6 podemos evidenciar que el extracto clorofórmico presenta una abundante presencia de Esteroides y moderada cantidad de compuestos Fenólicos, Flavonoides.

Y ausencia de quinonas, taninos, Leucoantocianidinas, Saponinas, Alcaloides.

Su actividad antibacteriana se debería a la presencia de Flavonoides y compuestos fenólicos. (8) (62)

4.3. DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA).

CUADRO N° 4.7

RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA)

CRITERIOS	BACTERIAS	CANTIDAD PERMISIBLE
CRITERIO IMPERATIVO: la presencia de este microorganismo indica riesgo elevado; la prueba debe resultar negativa.	salmonella	Negativo
CRITERIO INDICATIVO DE HIGIENE: su presencia indica la deficiente higiene del producto y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformes fecales (<i>Escherichia coli</i>)	Negativo
CRITERIOS DE ALERTA O LÍMITES CRÍTICOS: el producto no debe exceder los límites específicos	Aerobios mesófilos Hongos y levadura	Negativo

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.7 se observan los resultados del control microbiológico que se realizó a los extractos etanólico 70% y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).

Los resultados nos indican que los extractos están libres de contaminación por microorganismos, lo cual nos llevó a decir que los extractos estaban aptos para el ensayo de la actividad antibacteriana "in vitro" y el ensayo del efecto antibacteriano "in vivo". (Anexo N° 5).

RESULTADOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS

TIEMPO (HORAS)	ABSORBANCIA (A 623 nm)
0	0,215
1	0,291
2	0,342
3	0,783
4	1,054
5	1,453
6	1,468
7	1,497
8	1,324
9	1,320
10	1,319
11	1,288
12	1,221

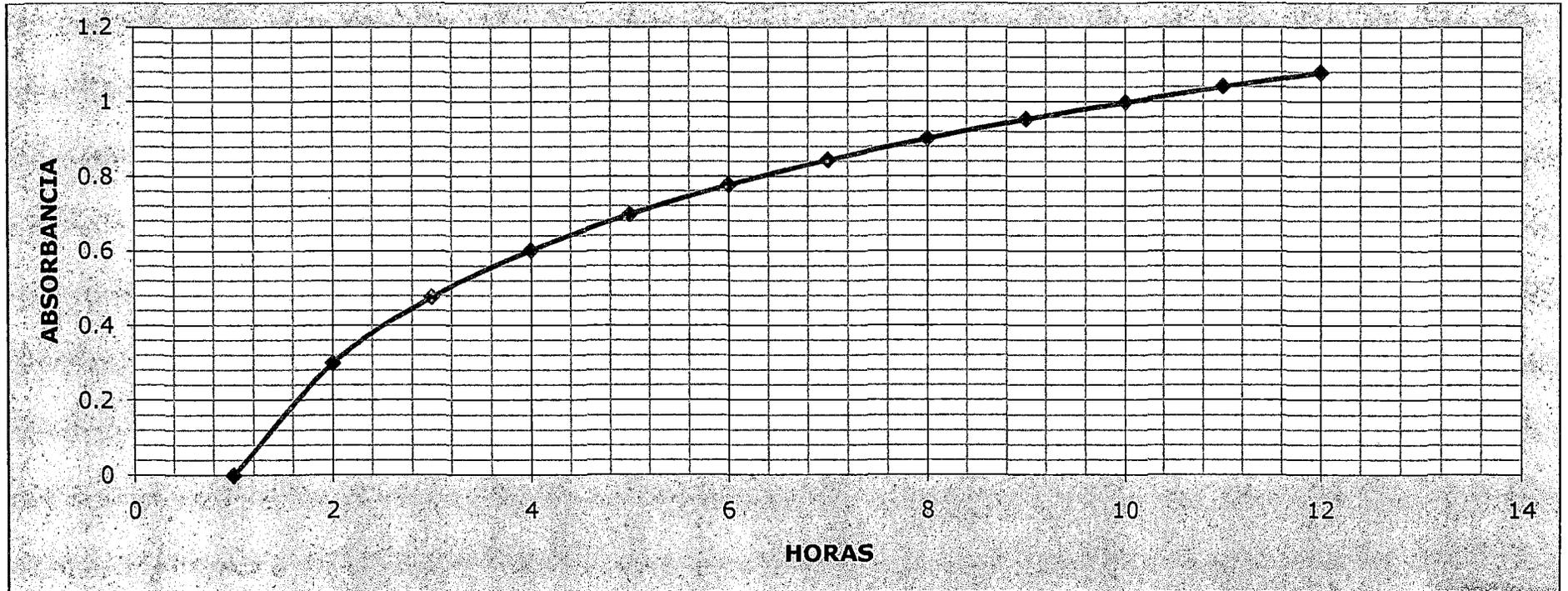
Fuente: datos experimentales

4.4. DE LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

4.4.1. DE LA ESTANDARIZACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

GRAFICO N° 4.1

CURVA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Fuente: datos experimentales

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el grafico N° 4.1 se puede observar claramente la curva de crecimiento bacteriano del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en este grafico se puede apreciar las 4 fases típicas del crecimiento bacteriano como son: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria, y fase muerte.

En la curva exponencial se observa que la fase de latencia o log dura aproximadamente 3 horas, lo cual nos indica que en esta fase la cepa de *S. aureus* se estuvo adaptando a su nuevo ambiente; la fase exponencial logarítmica del crecimiento esta entre la tercera y octava hora, en esta fase la bacteria ya se adaptó a su nuevo medio por lo que presenta un crecimiento exponencial, según Brokc un inocular tomado en el punto medio de esta fase son indicadas para la realización de diferentes estudios; a partir de la octava a la onceava la bacteria entra en la fase estacionaria; esto debido a que los nutrientes del medio de cultivo ya se estaban agotando y además a la acumulación de desechos metabólicos de la bacteria ; la fase de la muerte empieza aproximadamente a las 12 horas la que se evidencia por un descenso en las lecturas.

La curva de crecimiento bacteriano del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se obtuvo graficando la absorbancia vs tiempo con los datos que se obtuvieron en el ensayo.

4.4.2. DEL ENSAYO DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA

4.4.2.1. DE LA PRUEBA PILOTO

CUADRO N° 4.8

RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* (Phauka) OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO.

N° de disco	concentración del extracto (mg/disco)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.1	0	0	0	0
2	0.3	0	0	0	0
3	0.5	7.0	7.0	6.8	6.9
4	0.8	7.3	7.5	7.0	7.3
5	1.0	8.5	8.0	9.0	8.2
6	3.0	9.5	9.0	8.5	9.0
7	4.0	9.0	10.0	10.0	9.7
8	5.0	11.0	12.0	12.0	11.7
9	10.0	14.0	14.0	14.0	14.0
10	20.0	16.0	15.0	16.0	15.7
11	30.0	22.0	21.0	20.0	21.0
12	50.0	22.0	20.0	21.0	21.0

Fuente: Ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición (anexo N° 6)

Leyenda:

IG: primer grupo de placas

IIG: segundo grupo de placas

IIIG: tercer grupo de placas

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.8 se encuentran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto, se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) posee actividad antibacteriana in vitro sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En el cuadro podemos ver que el extracto presenta un halo mínimo de inhibición

de 6.9 mm en promedio a una concentración de 0.5 mg/disco con un halo de inhibición mínimo de 6.9 mm y un halo máximo de inhibición de 21.0 mm en promedio a una concentración de 30 mg/disco. Con estos dos datos se realizó la estandarización de las concentraciones antibacterianas del extracto etanólico.

4.4.2.2. ANALISIS ESTADISTICO DE LA PRUEBA PILOTO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

CUADRO N° 4.9
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

CONCENTRACIONES S PILOTO EXTRACTO ETANÓLICO	N	Desviación estándar	Diámetros de halos de inhibición media (mm)	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo (mm)	Máximo (mm)
				Limite inferior	Limite superior		
0.1mg/disco	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0.3mg/disco	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0.5mg/disco	3	0,1155	6,933	6,646	7,220	6,800	7,000
0.8mg/disco	3	0,2517	7,267	6,642	7,892	7,000	7,500
1.0mg/disco	3	0,2887	8,167	7,450	8,884	8,000	8,500
3.0mg/disco	3	0,5000	9,000	7,758	10,24	8,500	9,500
4.0mg/disco	3	0,5774	9,667	8,232	11,10	9,000	10,00
5.0mg/disco	3	0,5774	11,67	10,23	13,10	11,00	12,00
10.0mg/disco	3	0,2887	13,83	13,12	14,55	13,50	14,00
20mg/disco	3	0,5774	15,67	14,23	17,10	15,00	16,00
30mg/disco	3	0,5000	18,50	17,26	19,74	18,00	19,00
50mg/disco	3	0,5000	20,50	19,26	21,74	20,00	21,00

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el presente cuadro N° 4.9 se observan los resultados descriptivos de la prueba piloto, donde el promedio de las muestras obtenidas del extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), presentan halos de inhibición desde 0,0 mm a una concentración de 0.1 mg/disco, con un valor mínimo representativo se encuentra a una concentración de 50.0 mg/disco del mismo extracto con un halo de inhibición de 21.00 mm sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CUADRO N° 4.10

ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2143,836	14	153,131	492,912	0,000
Intra-grupos	9,320	30	0,311		
Total	2153,156	44			

Fuente: Datos estadísticos

Leyenda:

gl = grados de libertad

F = distribución Fisher

Sig = significancia

Sig = > 0.05, existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

Sig = ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Según los resultados del análisis de varianza (ANOVA), del cuadro 4.10 se observa que el valor de significancia es de 0.000, un valor que esta por debajo de 0.05 por lo que se puede afirmar que existe diferencia significativa entre los halos de inhibición formados por el extracto etanólico de las hojas de

Flourensia polycephala Dillon (Phauka) lo que significa que presentan diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

CUADRO N° 4.11

PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANOLICO.

CONCENTRACIONES PILOTO EXTRACTO ETANOLICO	N	Subconjunto para alfa = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1mg/disco	3	,0000										
3mg/disco	3	,0000										
5mg/disco	3		6,9333									
8mg/disco	3		7,2667	7,2667								
10mg/disco	3			8,1667	8,1667							
15mg/disco	3				9,0000	9,0000						
20mg/disco	3					9,6667						
30mg/disco	3						11,6667					
40mg/disco	3							13,8333				
50mg/disco	3								15,6667			
70mg/disco	3									18,5000		
100mg7disco	3										20,5000	
Sig.		1,000	0,470	0,057	0,077	0,153	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: datos estadísticos

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Finalmente, después de realizar las comparaciones de las diferentes concentraciones se realizó las pruebas de Duncan para determinar como se agrupan los 12 sub grupos de las diferentes concentraciones del extracto etanólico, donde se concluye que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), no es efectivo a menos de 0.5 mg/disco, mientras que al 30 mg/disco y 50 mg/disco de concentración los resultados son mas efectivos obteniéndose halos de inhibición superiores de 18.5 mm y 20.5 mm respectivamente sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CUADRO N° 4.12

RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* (PHAUKA) OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO.

N° de disco	concentración del extracto (mg/disco)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IIG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.1	0	0	0	0
2	0.3	0	0	0	0
3	0.5	6.0	6.0	6.5	6.2
4	0.8	6.3	6.5	7.0	6.6
5	1.0	8.5	7.5	7.5	7.8
6	3.0	9.5	9.0	8.5	9.0
7	4.0	10.5	10.0	9.5	10.0
8	5.0	11.0	11.0	10.0	10.7
9	10.0	12.0	13.0	12.0	12.3
10	20.0	13.0	13.0	14.0	13.3
11	30.0	18.0	20.0	19.0	19.0
12	50.0	20.0	19.0	18.0	19.0

Fuente: ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición (anexo N° 6)

Leyenda:

IIG: primer grupo de placas

IIIG: segundo grupo de placas

IIIIG: tercer grupo de placas

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.12 se encuentran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto se observa que el extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) posee actividad antibacteriana "in vitro" sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En el cuadro podemos ver que el extracto presenta un halo mínimo de inhibición de 6.2 mm en promedio a una concentración de 0.5 mg/disco y un halo máximo de inhibición de 19.0 mm en promedio a una concentración de 30

mg/disco y 50 mg /disco. Con estos resultados se realizó la estandarización de las concentraciones antibacterianas del extracto clorofórmico.

4.4.2.3 ANALISIS ESTADISTICO DEL ENSAYO ANTIBACTERIANO DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO.

CUADRO N° 4.13

RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE LA PRUEBA PILOTO.

CONCENTRACIONES PILOTO EXTRACTO CLOROFÓRMICO	N	Desviación estándar	Diámetros de halos de inhibición media (mm)	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo (mm)	Máximo (mm)
				Limite inferior	Limite superior		
0.1mg/disco	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0.3mg/disco	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0.5mg/disco	3	0,2887	6,167	5,450	6,884	6,000	6,500
0.8mg/disco	3	0,3606	6,600	5,704	7,496	6,300	7,000
1.0mg7disco	3	0,5774	7,833	6,399	9,268	7,500	8,500
3.0mg/disco	3	0,5000	9,000	7,758	10,24	8,500	9,500
4.0mg/disco	3	0,4041	9,933	8,929	10,94	9,500	10,30
5.0mg/disco	3	0,5774	10,67	9,232	12,10	10,00	11,00
10.0mg/disco	3	0,5774	12,33	10,90	13,77	12,00	13,00
20mg/disco	3	0,5774	13,33	11,90	14,77	13,00	14,00
30mg/disco	3	1,000	19,00	16,52	21,48	18,00	20,00
50mg/disco	3	1,000	19,00	16,52	21,48	18,00	20,00

Fuente: datos estadísticos

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el presente cuadro N° 4.13 se observan los resultados descriptivos de la prueba piloto, donde el promedio de las muestras obtenidas del extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*,

presentan halos de inhibición desde 6,5 mm a una concentración de 0.5 mg/disco, como un valor mínimo representativo y el mayor valor representativo se encuentra a una concentración de 30.0 mg/disco y 50 mg/disco del mismo extracto con un halo de inhibición de 19,0 mm sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CUADRO 4.14

ANALISIS DE LA VARIANZA PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE LA PRUEBA PILOTO.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1986,636	14	141,903	436,474	0,000
Intra-grupos	9,753	30	0,325		
Total	1996,390	44			

Fuente: datos estadísticos

Leyenda:

gl = grados de libertad

F = distribución Fisher

Sig = significancia

Sig = > 0.05, existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

Sig = ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Según los resultados del análisis de varianza (ANOVA), del cuadro 4.14 se observa que el valor de significancia es de 0.000, un valor que esta por debajo de 0.05 por lo que se puede afirmar que existe diferencia significativa entre los halos de inhibición formados por el extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) lo que significa en la practica que presentan diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

CUADRO N° 4.15

PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE LA PRUEBA
PILOTO.

CONCENTRACIONES PILOTO EXTRACTO CLOROFORMICO	N	Subconjunto para alfa = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.1mg/disco	3	,0000								
0.3mg/disco	3	,0000								
0.5mg/disco	3		6,1667							
0.8mg/disco	3		6,6000							
1.0mg/disco	3			7,8333						
3.0mg/disco	3				9,0000					
4.0mg/disco	3				9,9333	9,9333				
5.0mg/disco	3					10,6667				
10.0mg/disco	3						12,3333			
20.0mg/disco	3							13,3333		
30mg/disco	3								19,0000	
50mg7disco	3								19,0000	
Sig.		1,000	0,359	1,000	0,054	0,147	1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: datos estadísticos

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Finalmente, después de realizar las comparaciones de los diferentes concentraciones, se realizó las pruebas de Duncan para determinar como se agrupan los sub grupos de las diferentes concentraciones, donde se concluye que la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala Dillon* (Phauka), no es efectivo a menos de 0.5 mg/disco, mientras que al 30 mg /disco , 50 mg/disco de concentración los resultados son mas efectivos obteniéndose halos de inhibición 19,0 mm 19,0 mm respectivamente sobre cepas de *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.

4.4.2.4 DE LA ESTANDARIZACION DE LAS CONCENTRACIONES ANTIBACTERIANAS

Para la estandarización de las concentraciones antibacterianas se utilizó la siguiente formula.

$$F = \sqrt[r]{I}$$

Donde

F: factor de incremento

I: intervalo = $\frac{\text{concentracion maxima}}{\text{concentracion minima}}$

r: N-1= Numero de dosis en la serie logarítmica

N: numero de concentraciones con las que se trabajo

Reemplazando valores con los datos obtenidos en la prueba piloto se tiene:

$$I = \frac{30}{0.5} \quad r = 12 - 1 = 11$$

$$F = \sqrt[11]{60} = 1.4509$$

Como se observa en la formula el factor de incremento F obtenido es de 1.4509 con este dato se realizo a la estandarización de las concentraciones procediendo según la tabla N° 4.1.

TABLA N° 4.1
DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS
PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.
EXTRACTO ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO

OPERACIÓN	N° DE CONCENTRACIÓN	RESULTADO mg/disco
Concentración mínima	Concentración 1	0,50
Concentración 1 x F	Concentración 2	0.73
Concentración 2 x F	Concentración 3	1.06
Concentración 3 x F	Concentración 4	1.54
Concentración 4 x F	Concentración 5	2.23
Concentración 5 x F	Concentración 6	3.24
Concentración 6 x F	Concentración 7	4.70
Concentración 7 x F	Concentración 8	6.82
Concentración 8 x F	Concentración 9	9.89
Concentración 9 x F	Concentración 10	14.35
Concentración 10 x F	Concentración 11	20.82
Concentración 11 x F	Concentración 12	30.21

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En la tabla N° 4.1 se encuentran los valores de las concentraciones antibacterianas estandarizadas determinadas luego de hallar el factor de incremento, con los datos obtenidos en la prueba piloto. Con estas concentraciones se desarrolló un nuevo ensayo de la actividad antibacteriana.

4.4.2.5 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

CUADRO N° 4.16

RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (PHAUKA) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 OBTENIDOS CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

EXTRACTO ETANÓLICO

N° de disco	concentración del extracto (mg/disco)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IIG	IIIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.50	7.0	7.0	6.8	6.9
2	0.73	7.2	7.1	7.5	7.2
3	1.06	7.3	7.4	7.3	7.3
4	1.54	7.4	7.3	7.5	7.4
5	2.23	7.6	7.4	7.6	7.5
6					
7	4.70	8.5	8.3	9.0	8.6
8	6.82	9.0	9.5	9.8	9.4
9	9.89	11.5	10.2	10.0	10.7
10	14.35	14.5	14.5	14.0	14.3
11	20.82	16.0	15.0	15.5	15.5
12	30.21	18.0	19.0	18.5	18.5

Fuente: ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición (anexo 6)

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.16 podemos observar los diámetros de los halos de inhibición que resultaron con las concentraciones estandarizadas. Se observa que al incrementarse la concentración del extracto etanólico el diámetro del halo de inhibición se incrementa.

También al tomar en cuenta los criterios de Toda y Col (pagina 36) se puede apreciar que entre las concentraciones 3.24 – 4.70 mg/disco el extracto presenta una actividad antibacteriana ligera; entre las concentraciones 6.82 –

14.35 mg/disco el extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana moderada; y entre las concentraciones 20.82 - 30.21 mg/disco el extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana marcada. En este sentido se toma la CMI de la actividad antibacteriana para el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala Dillon (Phauka)* el valor de 3.24 mg/disco.

CUADRO 4.17
EXTRACTO CLOROFORMICO

Nº de disco	concentración del extracto (mg/disco)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.50	6.0	6.0	6.5	6.1
2	0.73	6.2	6.5	6.0	6.2
3	1.06	7.0	6.8	6.3	6.7
4	1.54	7.1	7.0	7.1	7.1
5	2.23	7.3	7.1	7.2	7.2
6	3.24	7.8	8.0	7.5	7.8
7	4.70	8.8	8.5	8.0	8.4
8	6.92	10.0	9.5	9.0	9.5
9	9.89	11.0	10.5	10.0	10.5
10	14.35	12.5	12.0	11.0	11.8
11	20.82	13.0	13.0	13.5	13.5
12	30.21	14.0	13.5	14.5	14.0

Fuente: ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición (anexo 6)

Leyenda

IG: primer grupo de placas

IIG: segundo grupo de placas

IIIG: tercer grupo de placas

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.17 podemos observar los diámetros de los halos de inhibición que resultaron con las concentraciones estandarizadas. Se observa que al incrementarse la concentración del extracto clorofórmico el diámetro del halo de inhibición se incrementa.

También al tomar en cuenta los criterios de Toda y Col (pág. N° 36) se puede apreciar que entre las concentraciones 4.70 – 6.82 mg/disco el extracto presenta una actividad antibacteriana ligera; entre las concentraciones 9.89 – 14.35 mg/disco el extracto clorofórmico presenta una actividad antibacteriana moderada; y entre las concentraciones 20.82 - 30.21 mg/disco el extracto clorofórmico presenta una actividad antibacteriana igual moderada. En este sentido se toma la CMI de la actividad antibacteriana para el extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) el valor de 4.70 mg/disco.

4.4.3. DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LOS FÁRMACOS PATRÓN

Cuadro N° 4.18

DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LOS FARMACOS PATRON Y EL BLANCO SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BACTERIA	DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm)								
	NEOMICINA			BACITRACINA			AGUA DESTILADA		
Staphylococcus aureus ATCC 25923.	IG	IIG	IIIG	IG	IIG	IIIG	IG	IIG	IIIG
	22.0	22.0	21.0	10.0	9.0	11.0	0	0	0
PROMEDIO	21.7			10.0			0		

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con los discos de sensibilidad de los fármacos utilizados como patrón; neomicina 30 µg y bacitracina 0.04 UI se observan en el cuadro N° 4.18.

En este cuadro podemos observar que la neomicina presenta un halo de inhibición promedio de 21.7 mm el cual es mayor al de la bacitracina con un halo de inhibición promedio de 10.0 mm.

Si se compara con los halos de inhibición formados por el extracto etanólico y clorofórmico con los fármacos patrón encontramos que: a la concentración de 6.82 mg/disco de extracto etanólico el halo de inhibición es 9.4 mm que es

menor al de la bacitracina que reportó un halo de inhibición 10 mm y a la concentración del extracto clorofórmico de 6.82 mg/disco el halo de inhibición fue de 9.5 mm que es menor que la bacitracina que presenta un halo de inhibición de 10 mm; y si comparamos con la neomicina que obtuvo un halo de inhibición de 21.7 mm se observa que este es ligeramente mayor que el extracto etanólico no así que el extracto clorofórmico; siendo la concentración de los extractos etanólico y clorofórmico de 30.21 mg/disco, que reportan halos de inhibición de el extracto etanólico 18.5 mm mientras que el extracto clorofórmico de 14 mm, por lo tanto el extracto etanólico es el que se aproxima mas al halo de inhibición de la neomicina.

4.4.4. ANALISIS ESTADISTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS Y LOS FARMACOS PATRÓN

**CUADRO 4.19
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.**

CONCENTRACIONES	N	Diámetros de halos de inhibición	Desviación estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Agua destilada	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0.5mg/disco	3	6,933	0,1155	6,646	7,220	6,800	7,000
0.73 mg/disco	3	7,267	0,2082	6,750	7,784	7,100	7,300
1.06 mg/disco	3	7,333	0,05773	7,190	7,477	7,300	7,400
1.54 mg/disco	3	7,400	0,1000	7,152	7,648	7,300	7,500
2.23 mg/disco	3	7,533	0,1155	7,246	7,820	7,400	7,600
3.24 mg/disco	3	8,067	0,1155	7,780	8,354	8,000	8,200
4.70 mg/disco	3	8,600	0,3606	7,704	9,496	8,300	9,000
6.82 mg/disco	3	9,433	0,4041	8,429	10,44	9,000	9,800
9.89 mg/disco	3	10,67	0,7638	8,769	12,56	10,00	11,50
14.35mg/disco	3	14,33	0,2887	13,62	15,05	14,00	14,50
20.82mg/disco	3	15,50	0,5000	14,26	16,74	15,00	16,00
30.21mg/disco	3	18,50	0,5000	17,26	19,74	18,00	19,00
NEOMICINA	3	21,67	0,5774	20,23	23,10	21,00	22,00
BACITRACINA	3	10,00	1,000	7,516	12,48	9,000	11,00

Fuente: datos estadísticos

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.19 se observan los resultados descriptivos de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka); así mismo los diámetros de los halos de inhibición formados con los fármacos patrón y el blanco, donde el promedio de las muestras obtenidas después de seleccionar las concentraciones presentaron halos de inhibición desde 6.9 mm a una concentración de 0.5 mg/disco, hasta un diámetro de halo de inhibición en promedio de 19.0 mm a una concentración de 30.21 mg/disco del mismo extracto sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, el cual se aproxima al fármaco patrón neomicina, logrando diámetros de halos de inhibición igual a 21.67 mm, superior a la actividad antibacteriana de la bacitracina con halos de inhibición de 11.0 mm sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

CUADRO N° 4.20

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1199,959	14	85,711	444,869	0,000
Intra-grupos	5,780	30	0,193		
Total	1205,739	44			

Fuente: datos estadísticos

Leyenda:

gl = grados de libertad

F = distribución Fisher

Sig = significancia

Sig = > 0.05, existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

Sig = ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según los resultados del análisis de varianza (ANOVA), se observa que existe diferencias significativas de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Flourensia Polycephala Dillon (Phauka)* en sus diferentes concentraciones, con un nivel de significancia de 0,000; sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, lo que significa en la practica que el extracto etanólico presenta diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

CUADRO N° 4.21

PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO CON LAS CONCENTRACIONES ESTANANDARIZADAS.

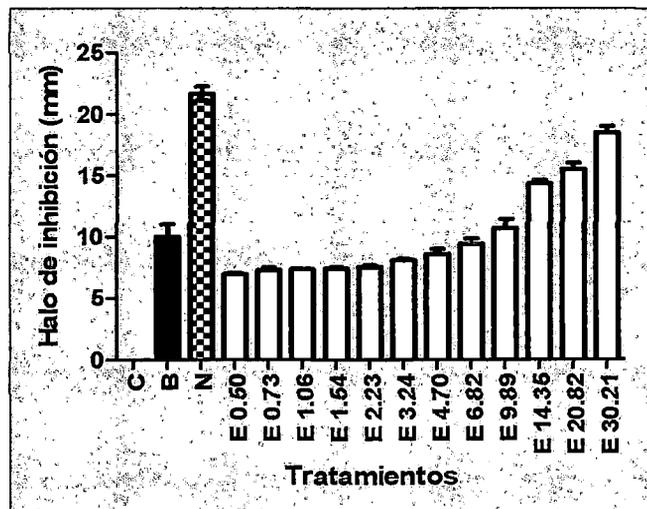
DUNCAN	N	Subconjunto para alfa = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AGUA DESTILADA	3	,0000										
0.50mg/disco	3		6,9333									
0.73mg/disco	3		7,2667	7,2667								
1.06mg/disco	3		7,3333	7,3333								
1.54mg/disco	3		7,4000	7,4000								
2.23mg/disco	3		7,5333	7,5333								
3.24mg/disco	3			8,0667	8,0667							
4.70mg/disco	3				8,6000							
6.82mg/disco	3					9,4333						
BACITRACINA	3					10,0000	10,0000					
9.89mg/disco	3						10,6667					
14.35mg/disco	3							14,3333				
20.82mg/disco	3								15,5000			
30.21mg/disco	3									18,5000		
NEOMICINA	3											21,6667
Sig.		1,000	0,144	0,053	0,147	0,124	0,073	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: datos estadísticos.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el análisis del post hoc, donde se realizó las pruebas de Duncan para determinar como se agrupan los sub grupos de concentraciones, se concluye que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), tiene una actividad menor al fármaco patrón, neomicina; obteniéndose una diferencia de 3.17 mm de diámetro de halos de inhibición en cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que la actividad antibacteriana del fármaco bacitracina es mayor a la concentración de 6.82 mg/disco, obteniéndose una diferencia de de 0.5 mm en cepas de *Staphylococcus aureus*.

GRAFICO N° 4.2 DIFERENCIA ENTRE EL CONTROL NEGATIVO Y LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANOLICO Y LOS FARMACO PATRON DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.



Leyenda:

C: control negativo (agua destilada)

B: bacitracina

N: neomicina

E: extracto etanólico a diferentes concentraciones.

El grafico N° 4.2 nos muestra la diferencia entre el blanco, las diferentes concentraciones del extracto etanólico con los fármacos patrón, se puede observar que entre la concentración de 30.21 mg/disco no hay una diferencia marcada entre el fármaco de neomicina, mientras con el fármaco de la

bacitracina si existe una diferencia mínima de 0.5 mm con la concentración de 6.82 mg/disco sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CUADRO 4.22

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

CONCENTRACIONES	N	Diámetros de halos de inhibición	Desviación estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	máximo
				Limite inferior	Limite superior		
Agua destilada	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0.5mg/disco	3	6,267	0,4619	5,119	7,414	6,000	6,800
0.73 mg/disco	3	6,233	0,2517	5,608	6,858	6,000	6,500
1.06 mg/disco	3	6,700	0,3606	5,804	7,596	6,300	7,000
1.54 mg/disco	3	7,067	0,05773	6,923	7,210	7,000	7,100
2.23 mg/disco	3	7,200	0,1000	6,952	7,448	7,100	7,300
3.24 mg/disco	3	7,767	0,2517	7,142	8,392	7,500	8,000
4.70 mg/disco	3	8,600	0,3606	7,704	9,496	8,300	9,000
6.82 mg/disco	3	9,500	0,5000	8,258	10,74	9,000	10,00
9.89 mg/disco	3	10,50	0,5000	9,258	11,74	10,00	11,00
14.35mg/disco	3	11,83	0,7638	9,936	13,73	11,00	12,50
20.82mg/disco	3	13,17	0,2887	12,45	13,88	13,00	13,50
30.21mg/disco	3	14,00	0,5000	12,76	15,24	13,50	14,50
NEOMICINA	3	21,67	0,5774	20,23	23,10	21,00	22,00
BACITRACINA	3	10,00	1,000	7,516	12,48	9,000	11,00

Fuente: datos estadísticos

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.22 se observan los resultados descriptivos de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka); así mismo los diámetros de los halos de inhibición formados con los fármacos patrón y el blanco, donde el promedio de las muestras obtenidas después de seleccionar las concentraciones presentaron halos de inhibición desde 6.2 mm a una concentración de 0.5 mg/disco, hasta un diámetro de halo de inhibición en promedio de 14.0 mm; a una concentración de 30.21 mg/disco del mismo extracto sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, el cual es menor a la actividad antibacteriana de la neomicina con un halo de inhibición de 21.67 mm por lo tanto hay una diferencia marcada, el cual es superior a la actividad antibacteriana de la bacitracina con halos de inhibición de 11.0 mm sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

CUADRO N° 4.23

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFORMICO CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	967,173	14	69,084	438,473	0,000
Intra-grupos	4,727	30	0,158		
Total	971,900	44			

Fuente: datos estadísticos

Leyenda:

gl = grados de libertad

F = distribución Fisher

Sig = significancia

Sig = > 0.05, existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

Sig = ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Según los resultados del análisis de varianza (ANOVA), se observa que existe diferencias significativas de la actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones del extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), con un nivel de significancia de 0,000; sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CUADRO N° 4.24

PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO CLOROFORMICO CON
LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

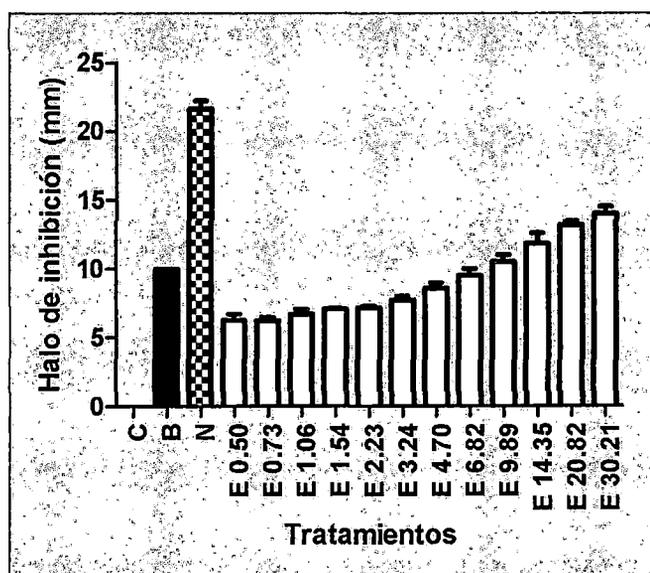
DUNCAN	N	Subconjunto para alfa = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
AGUA DESTILADA	3	,0000											
0.50mg/disco	3		6,2333										
0.73mg/disco	3		6,2667										
1.06mg/disco	3		6,7000	6,7000									
1.54mg/disco	3			7,0667									
2.23mg/disco	3			7,2000	7,2000								
3.24mg/disco	3				7,7667								
4.70mg/disco	3					8,6000							
6.82mg/disco	3						9,5000						
BACITRACINA	3						10,0000	10,0000					
9.89mg/disco	3							10,5000					
14.35mg/disco	3								11,8333				
20.82mg/disco	3									13,1667			
30.21mg/disco	3										14,0000		
NEOMICINA	3											21,6667	
Sig.		1,000	0,184	0,155	0,091	1,000	0,133	0,133	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: datos estadísticos

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el análisis del post hoc, donde se realizó las pruebas de Duncan para determinar como se agrupan los sub grupos de concentraciones, se concluye que la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*, tiene una actividad antibacteriana menor al fármaco patrón, neomicina; obteniéndose una diferencia de 8 mm de diámetro de halos de inhibición sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que la actividad antibacteriana del fármaco bacitracina es mayor a la concentración de 6.82 mg/disco, obteniéndose una diferencia de 0.5 mm en cepas de *Staphylococcus aureus*.

GRAFICO Nº 4.3 DIFERENCIA ENTRE EL CONTROL NEGATIVO Y LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO CLOROFORMICO Y LOS FARMACOS PATRON DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.



Leyenda:

C: control negativo (agua destilada)

B: bacitracina

N: neomicina

E: extractos a diferentes concentraciones

El gráfico N° 4.3 nos muestra la diferencia entre el blanco, las diferentes concentraciones del extracto y con los fármacos patrón, se puede apreciar que entre la concentración de 30.21 mg/disco hay una diferencia marcada entre el fármaco de neomicina mientras con el fármaco de la bacitracina existe una diferencia mínima de 0.5 mm con la concentración de 6.82 mg/disco sobre cepas de *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.

4.4.5. EVALUACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO "IN VIVO" DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* (Phauka) EN LAS HERIDAS INFECTADAS CON *Staphylococcus aureus* EN LOS RATONES DE EXPERIMENTACION.

CUADRO N° 4.25

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ANTIMICROBIANAS "IN VIVO" DE LAS INFECCIONES DERMICAS PRODUCIDAS POR *Staphylococcus aureus* EN RATONES CEPA Balb/C CON LA EMULSION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).

GRUPO DE RATONES	MUESTRA APLICADA	DIAS DE CURACION DE LOS RATONES														TOTAL DE RATONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	CONTROL											1	1		1	4
2	EMULSION EXTRACTO 0.25g/10g					1		1		1	1					4
3	PATRON UNGÜENTO NEOMICINA Y BACITRACINA					1		1	1	1						4
TOTAL DE RATONES CURADOS						2		2	1	2	1	1	1		1	12

Fuente: datos experimentales

Los números indican el número de ratones curados por día

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en el cuadro N° 4.25, se trabajó con 4 ratones por grupo; usando un total de 3 grupos de ratones. El primer grupo fue tratado con vaselina sin contener ninguna otra sustancia (control); el segundo grupo fue tomado como patrón ungüento neomicina y bacitracina; y el tercer grupo con la emulsión antibacteriana a base de 50 gramos de la mezcla: ácido esteárico (7.5g) + cera blanca (1g) + vaselina amarilla (4g) + Trietanolamina (0,5g) + propilenglicol (4g) + agua purificada (csp. 50 mL) que contenía una cantidad adecuada del extracto (0.25gr).

CUADRO N° 4.26

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL EFECTO ANTIBACTERIANO “IN VIVO” DE LA EMULSION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) EN LAS INFECCIONES DERMICAS PRODUCIDAS POR *Staphylococcus aureus* EN LOS RATONES CEPA Balb/C.

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	74,000	2	37,000	11,008	0,004
Intra-grupos	30,250	9	3,361		
Total	104,250	11			

Fuente: datos estadísticos

Leyenda:

gr = grados de libertad

F = distribución Fisher

Sig = significancia

Sig = > 0.05, existe diferencia significativa entre los días de curación.

Sig = ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre los días de curación.

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.26, se puede apreciar que la significancia alcanzada es de 0,004 (sig. < 0.05) lo que indica es que existe diferencia significativa entre los días de curación obtenido al utilizar la concentración adecuada del extracto etanólico 0.25 gr, con lo que existe influencia del extracto para manifestar la curación de la infección de los ratones.

CUADRO N° 4.27
PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ENSAYO DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO “IN VIVO” EN
RATONES ALBINOS.

DUNCAN	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Patrón ungüento Neomicina y Bacitracina	4	7,2500	
Emulsión extracto Etanólico	4	7,7500	
Control	4		12,7500
Sig.		0,709	1,000

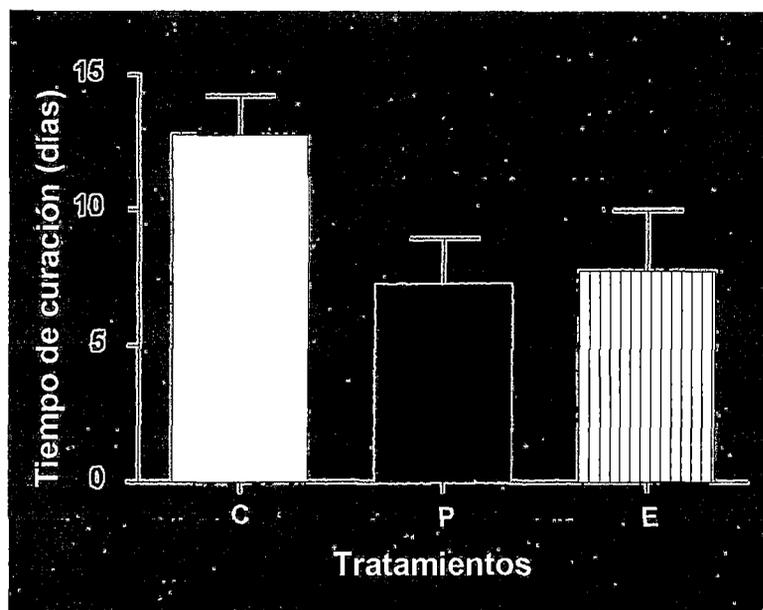
Fuente: datos estadísticos

ANALISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro N° 4.27 se observa un valor de significancia mayor a 0.05 por lo tanto no existe diferencia significativa entre la dosis usada del extracto y el patrón y los días que tardan en curarse los ratones, en un mismo subconjunto, es decir que estadísticamente da lo mismo utilizar la emulsión con extracto etanólico y el patrón ungüento neomicina y bacitracina. Por que presentan un promedio de días de curación próximos por lo que podemos afirmar que el promedio de días de curación del extracto etanólico es de 7,750 días y con el patrón ungüento neomicina y bacitracina presenta un promedio de días de curación de 7,250 días el cual se afirma que tienen efectos iguales sin embargo con el control negativo (vaselina) el promedio de días de curación fue de 12,75 días y forma parte del ultimo subconjunto en donde no se encuentra

ningún otro valor, lo que nos indica que el extracto etanólico incorporado a una forma farmacéutica (emulsión O/W agua en aceite) aplicado en los ratones de experimentación, posee efecto antibacteriano "in vivo".

GRAFICO N° 4.4 DIFERENCIA ENTRE EL CONTROL NEGATIVO Y LA EMULSION PREPARADA CON EL EXTRACTO ETANOLICO Y PATRON POSITIVO UNGÜENTO DE NEOMICINA Y BACITRACINA.



Leyenda:

C: Control negativo (vaselina)

P: Patrón (ungüento neomicina y bacitracina)

E: Emulsión (elaborado con el extracto etanólico)

ANALISIS E INTERPRETACION

Se puede observar en el grafico N° 4.4 que si hay una aproximación del efecto antibacteriano "in vivo" entre la emulsión o/w elaborada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) con el fármaco patrón ungüento neomicina y bacitracina pues se tuvo menos días de curación, mientras con el control negativo (vaselina) se obtuvo mas días de curación, Teniendo en cuenta que la elaboración de la forma farmacéutica se realizó con el extracto que presentó mayor actividad "in vitro".

CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 microorganismos causantes de infecciones dérmicas.
2. Se determinó el efecto antibacteriano "in vivo" de la forma farmacéutica elaborada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) que presentó mayor actividad antibacteriana "in vitro", en ratones a los que se indujo infecciones dérmicas con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 microorganismos causantes de infecciones dérmicas.
3. Se determinó el porcentaje de humedad de 72.53%; para las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka); se obtuvieron los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) hallando un porcentaje de rendimiento de 52.10% para el extracto etanólico y de 23.42% para el extracto clorofórmico; en las pruebas de solubilidad, el extracto etanólico demostró una naturaleza parcialmente polar, en cambio el extracto clorofórmico presentó una naturaleza no polar y en el análisis fitoquímico cualitativo ambos extractos presentaron en abundante cantidad flavonoides y compuestos fenólicos.
4. En el ensayo de la actividad antibacteriana "in vitro" los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) presentaron una CMI de 3.24 mg/disco y 4.70 mg/disco, respectivamente sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5. Se realizó la comparación de la actividad antibacteriana "in vitro" de los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)***, sobre cepas de ***Staphylococcus aureus ATCC 25923*** se obtuvo que el extracto etanólico presentó mayor actividad antibacteriana con un halo de inhibición de 20.5 mm superior al del extracto clorofórmico con un halo de inhibición de 14.0 mm utilizando el método de disco difusión en placa.

6. Se determinó la comparación de la actividad antibacteriana "in vitro" de los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** sobre cepas de ***Staphylococcus aureus ATCC 25923*** , con dos fármacos patrones (Neomicina y Bacitracina) , hallándose para la neomicina un halo de inhibición mayor al de los extractos etanólico y clorofórmico a una concentración de **30.21 mg/disco** el cual se aproxima a la neomicina es del extracto etanólico , en el caso de la bacitracina se obtuvo para esto un halo de inhibición similar al de los extractos etanólico y clorofórmico a una concentración de **6.82 mg/disco**.

7. Se formuló y elaboró una Forma Farmacéutica semisólida de fácil aplicación epidérmica a partir del extracto etanólico de las hojas de ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)*** que fue el extracto con mayor actividad in vitro frente ***Staphylococcus aureus ATCC 25923***.

8. Se determinó el efecto antibacteriano "in vivo" de la forma farmacéutica (emulsión) elaborado con el extracto etanólico de las hojas de ***Flourensia polycephala Dillon (Phauka)***, frente al fármaco patrón ungüento de neomicina y bacitracina, demostrándose estadísticamente que la emulsión que contiene 0.25g de extracto etanólico /10g presenta un efecto antibacteriano igual al fármaco patrón.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

- ◇ Realizar proyectos de investigación que involucren nuevas metodologías para ser realizados en nuestra casa de estudios.
- ◇ A los estudiantes de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica Realizar análisis fitoquímico más profundo para determinar la estructura de los activos responsables de la actividad y efecto antibacteriano.
- ◇ Realizar estudios sobre las otras propiedades farmacológicas de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).
- ◇ Realizar el estudio de toxicidad de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).
- ◇ Emplear la formulación diseñada en estudios clínicos posteriores para determinar su utilidad en el tratamiento de las infecciones dérmicas producidas por *Staphylococcus aureus*.

BIBLIOGRAFIA

1. **AIZPURO, CARRETERO, DEVESA,**

Catálogo florístico de Navarra. Informe técnico. Dpto. de Medio Ambiente, Gobierno de Navarra. Pamplona.1993, [Internet]. Consultado 2004.09/11/09
Disponible en: <http://www.unavarra.es/servicio/herbario/htm/compositae>.

2. **ANGUIANO RUEDA CRISTINO.**

Diccionario de ciencias Médicas, 9º edición Argentina; editorial el ateneo, 1992.

3. **AVELLANEDA SAUCEDO SENOVIO, ROJAS HERNÁNDEZ NIDIA M.,
CUÉLLAR ARMANDO Y FONSECA JUÁREZ ROSA MARÍA**

“Actividad antibacteriana de *Diphyssa minutifolia* Rose” facultad de ciencias, Universidad Autónoma de México 2005, Publicado en la revista cubana Plantas medicinales.

4. **ÁVILA LILIANA, BAQUERO EDUARD, VIÑA AMPARO, MURILLO**

“Actividad Antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*”, universidad de Antioquia, Medellín Colombia 2006, publicado en la revista de América latina, el Caribe, España y Portugal.

5. **BARCELO JONAS.**

Diccionario terminológico de Química, 2º edición, editorial Alambra, 1982.

6. **BROKT.D TOMAS; MADIGAN T. MICHAEL**

Microbiología. 7ª edición, editorial México –englewoth cliffs 1998.

7. **BREES, MARK .A Y BERKOW, ROBERT**

Manual de Merck de diagnostico y Tratamiento 10ª Edición, editorial harcourt, España 1999.

8. **BRUNETON JEAN**
Farmacognosia, Fitoquímica y plantas medicinales, tercera edición,
Editorial Acribia. Zaragoza. España. 2001.
9. **CANTERO GUTIÉRREZ, A. Y M. F. WEST**
Proyecto de Resolución N° 3540-D. Promover el incremento de la oferta de
especies vegetales no tradicionales productoras de aceites, con el fin de
atender la demanda creciente de la producción de biodiesel. Trámite
Parlamentario N° 92 (18/07/2007), H. Cámara Diputados de la Nación
Argentina. 2007. [internet].consultado 03/11/2010. Disponible en
<http://www.scribd.com/doc/15890229/maravillas-flourensia-sps>
10. **CONTINO Y., AGÜERO F**
Estudio de la eficacia del cikron v, fitofármaco obtenido de la corteza del
mangle rojo. La habana – cuba. [Internet].consultado 04/08/2009.
Disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos29/eficacia-cikron-v/eficaciaticron-v.shtml>
11. **CAPDEVILA MORELL J.A., B. ALMIRANTE GRAJERA, C. PIGRAU
SERRALLACH Y A. PAHISSA BERGA.**
Infecciones por *Stafilococcus aureus*, Servicio de Enfermedades
Infecciosas, Hospital Vall d'Hebrón, Universidad Autónoma de Barcelona.
Barcelona. 2005.
12. **CÁRDENAS ORTEGA C, PÉREZ GUTIÉRREZ, ZAVALA SÁNCHEZ
MIGUEL A, AGUIRRE RIVERA JUAN R., CUAUHTÉMOC PÉREZ
GONZÁLEZ**
Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí,
Depto. de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana.
"Actividad Anti fúngica de seis plantas sobre *Aspergillus. Avus Link*". 2008

13. **CARMONA OSWALDO, GÓMEZ, MAURICIO, JOSE OSCAR MONTES**
Microbiología Médica, 5ª edición, editorial megrew, Hill interamericana
Venezuela. 1997.
14. **DARRA ALFRED**
Elementos de tecnología farmacéutica, editorial Acribia, Zaragoza, España.
1979.
15. **DELBÓN NATALIA, EYNARD CECILIA, GASPAS XUÁREZ**
Facultad de Ciencias Agropecuarias. Flourensia oolepis (Asteraceae).
Jardín botánico, Universidad Católica de Córdoba Argentina 2006.
16. **DIRECCION REGIONAL DE SALUD CUSCO (DIRESA CUSCO)**
Análisis de la situación de Salud Cusco 2008. [Internet]. Consultado el
22/02/10. Disponible en:
<http://www.diresacusco.gob.pe>
17. **D. DOMINGO Y M. LÓPEZ BREA**
Servicio de microbiología, hospital universitario de princesa, Rev. Española
quimioterapicos. Madrid diciembre 2003
18. **DORANTES LUIS CAÑEDO**
Investigación clínica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos
interamericana. mc. graw – hill. 1998
19. **DORLAND**
Diccionario medico ilustrados de bolsillo. 26º edición. Editorial Mc Graw Hill.
Madrid – España 2003.
20. **FAULLI TRILLO C.**
Tratado de farmacia galénica, 1ª edición, editorial Madrid. España 2003

21. **FARRERAS ROTMAN.**

Medicina interna, editorial Mosvy – Doyma. Decimo cuarta edición CD ROM. Barcelona. España. 2005.

22. **GUERRERO RODRÍGUEZ EUGENIO, SOLÍS- GAONA SUSANA, HERNÁNDEZ CASTILLO FRANCISCO DANIEL, SANDOVAL LÓPEZ VÍCTOR.**

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) México, Depto., de Parasitología Agrícola, "Actividad biológica in vitro de *Flourensia cernua*. c.d en patógenos de cosecha *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Panicillium digitatum*" Revista mexicana en Fitopatología. 2007.

23. **GIL EJEJA JESÚS**

Servicio de Dermatología. Hospital del Mar Universidad Autónoma de Barcelona 2008. [Internet]. Consultado 02/07/09. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v47n5/28384.pdf>

24. **GOODMAN & GILMAN**

Las bases farmacéuticas de la terapéutica, onceava edición. Editorial McGraw- Hill, México 2006.

25. **GONZALES CABEZA JOSÉ**

Microbiología medica, universidad Antenor Orrego, Facultad de Medicina 2008. [Internet]. Consultado 20/07/10. Disponible en: http://www.gonzalezcabeza.com/documentos/CRECIMIENTO_MICROBIAN O.pdf

26. **HERNÁNDEZ MUÑOZ AURELIO**

Microbiología, editorial paraninfo, Madrid, España 1997

27. **JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG,**

Microbiología Medica 18 edición, editorial "el manual moderno" S.A de cv México 2005.

28. **KALANT HAROLD, ROSCHLAU WALTER H. E,**
Principios de Farmacología Médica, 6º Edición, editorial Oxford University Press. México. 2002
29. **KASPER DENNIS, BRAUNWLAD EUGENE, FAUCI ANTHONY S, HAUSER STEPHEN L., LONGO DAN L., Y ISSELBACHER KURTH J., EDC.**
Harrison, principios de medicina interna. 16º edición. Editorial Mc Graw Hill. 2005
30. **LASTRA JORGE; ARIAS EDISON** 08/09/2001. [Internet]. Consultado 08/07/10. Disponible en:
<http://monografias.com.trabajos10/10cincrec/10cincrec.shtm#dos>
31. **LÓPEZ, H.F.L., VILLAGÓMEZ, I.J.R Y CASTRO-ROSAS J.**
Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. "Efecto Antimicrobiano de Flourensia resinosa" (T.S. Brandeg) Blake. 2006.
32. **LI PEREYRA ELENA.**
Estado de arte del sector de plantas medicinales en Perú. Informe realizado como parte de la consultoría prestada para realizar un estudio sobre el estado situacional del sector de plantas medicinales en Perú dentro del proyecto. "el futuro de las plantas medicinales del altiplano y los valles centrales de los andes" Perú 2006
33. **LUJAN MARÍA CLAUDIA; PÉREZ CORRAL CRISTINA.**
"Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de argentina". Departamento de farmacia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina. 2008.

34. **“IN FLORA OF NORTH AMERICA” 2008.**

[Internet]. Consultado 10/04/2009. Disponible en:

[http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://zipcodezoo.com/Plants/F/Flourensia_polycephala/&ei=QP6TSrS9NsiQtgei0qhB&sa=X&oi=translate&resnum=6&ct=result&prev=/search%3Fq%3DFLOURENSIA%2BPOLYCEPHALA%26hl%3Des%26sa%3DG 2008](http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://zipcodezoo.com/Plants/F/Flourensia_polycephala/&ei=QP6TSrS9NsiQtgei0qhB&sa=X&oi=translate&resnum=6&ct=result&prev=/search%3Fq%3DFLOURENSIA%2BPOLYCEPHALA%26hl%3Des%26sa%3DG%202008)

35. **IRACHE JUAN MANUEL**

Tecnología farmacéutica destinadas de la vía percutánea, Universidad de Navarra 2008. [Internet]. Consultado 12/06/10. Disponible en:

www.unav.es/farmytec/galenica2/pag-web-20087ff2-8-topica-2008.pdf

36. **MADIGAN M., MARTINKO J; J.PARKER**

Brock – biología de los microorganismos 10º ed. Editorial pearson, México 2004.

37. **MALGOR L. A .ME. VALSECIA.** Farmacología médica.

[Internet]. Consultado 28/02/10. Disponible en:

http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma7indice...v1.,htm

38. **MANDELL GL, DOUGLAS RG, BENNETT JE**

Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone, Universidad Autónoma de Barcelona ,1990. [Internet].

Consultado 07/04/10. Disponible en:

<http://www.archive.org/texts/flipbook/flippy.php?id=systematicstudyo16dill>

39. **MANTILLA HOLGUÍN JUSTO, OLAZÁBAL CASTILLO OSCAR**

Cultivando Salud en los Andes, instituto de ecología y plantas medicinales IEPLAN, editorial moderna cusco- Perú. 2008

40. **MARTÍNEZ J., SULBARÁN DE FERRER B., OJEDA DE RODRÍGUEZ G., FERRER A. Y NAVA R.**
Revista de la facultad de Agronomía "Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina" Venezuela 2003.
41. **MENDO RUBIO MANUEL,**
Medios de cultivo en Microbiología, Manual de laboratorio 5ª edición, ediciones laboratoriales SRL. 2005
42. **MICROORGANISMOS KWIK – STIK**
Prospecto del producto pi.194, instrucciones de uso. [Internet].consultado 24/03/10. Disponible en:
<http://www.microbiologics.com/docs/p1194sspanishla2007oct01pdf>
Boletín de información técnica tib. 081.
<http://www.microbiologics.com/docs/tib081.pdf>.2008
43. **MINISTERIO DE SALUD CUSCO 2005.**
[Internet]. Consultado en 03/05/10. Disponible en:
<http://www.minsa.gob.pe/estadísticas/mapasdisa.asp?coddisa=11&nomdisa=cusco> (18/01/09)2005
44. **MOLINA- SALINAS GLORIA MARÍA, PEÑA RODRÍGUEZ LUIS MANUEL, MATA- CÁRDENA BENITO DAVID, ESCALANTE- EROSA FABIOLA, SAIT- FERNÁNDEZ SALVADOR.**

"Actividad Antituberculosa de hojas de *Flourensia cernua* hojase Comparación de Métodos de extracción y técnicas de fraccionamiento". (5º Reunión nacional de investigación en Productos Naturales Universidad de Guadalajara 2008.
45. **ORKIN MILTON, HOWART J. MAIBACH**
Dermatología. 2ªedición. Editorial el manual moderno S.A de cv. México 1994

46. PALAVECINO ROSALES ELIZABETH

Interpretación de los estudios de susceptibilidad antibacteriana. Boletín de la escuela de medicina. Pontificia Universitaria Católica de Chile vol.26 1997. [Internet]. Consultado 04/08/10. Disponible en:
[Http//escuela de med.puc.cl./pub//boletín/laboratorio/interpretacion.html](http://escuela de med.puc.cl./pub//boletín/laboratorio/interpretacion.html).

47. PAREJA BERTHA

Farmacéutico clínico, profesor emérito de la U.N.M.S.M folia dermatológica peruana. 1995. [Internet]. Consultado 08/03/2010. Disponible en:
<http://sisib.unmsm.edu.pe./bvrevistas/folia/vol6—n2/dermofarmacia.htm>

48. PELZCAR. JR MICHAEL J, ROGER D.REID, E.C.S CHAN

Microbiología, 4ª edición, editorial mc graw- Hill México. 1997.

49. PÉREZ JORGE; ISAZA GUSTABO; ACOSTA SANDRA

“Actividad Antibacteriana de Extractos de *Phenax Rugosus* y *Tabebuia Chrysantha*” chile 2007.

50. RAMÍREZ A. LUÍS; DÍAZ B. HILDA,

Universidad Tecnológica de Pereira Colombia “actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*) ruibarbo” Colombia 2007.

51. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

Segunda edición 2002. [Internet].consultado 02/06/09. Disponible en:
<http://www.urg.es./adolфина/asignaturas/formasfarmacéuticasRFE.pdf>

52. SEINFELD J., CUSQUEND G., FARGE G., ZALDIVAR S.

Introducción a la economía de los recursos naturales y del medio ambiente. 1ª edición, editorial Isabel, Lima. 2000.

53. **SCHLEGEL G HANS**

Microbiología general. Ediciones omega. Barcelona, España 1997

54. **SHEEJA E EDWIN E, TOPPO E, TIWARI V, DUTT KR DEPARTMENT OF HERBAL DRUG RESEARCH, B.R. NAHATA COLLEGE**

Pharmacy & Contract Research Center, Mandsaur “Efecto antimicrobiano de las hojas de *buganvilla* (*Bougainvillea glabra Choisy*)” Colombia 2007.

55. **SOPENA**

Enciclopedia Universal, diccionario ilustrado, España 1965.

56. **THOPSON JUDITH**

Practica contemporáneo en farmacia segunda edición mc graw- hill interamericana editores s.a de c.v 2006.

57. **TRUYENQUE RAMOS LUDWING.**

“efecto anti estafilocócico in vitro e in vivo de *Argemone Subfusiformes* (*cjarhuincho*)” para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Nacional San Antonio Abad Cusco Facultad de Ciencias, Químicas, Matemáticas, Farmacia e Informática Cusco- Perú 2005.

58. **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE**

[Internet]. Consultado 14/07/10. Disponible en:

http://Agronomía.uchile.cl/webcursos/microbiología/general/pagina20microbiologia/Word/guía_lab_11.documento.

59. **VALLE ÁLVAREZ GLADYS MARÍA, DÉJALO MICHELENA MERCEDES; MCCOOK NOA LEYSIS, PILOTO FERNÁNDEZ MARTA, SEBAZCO PERNAS CARIDAD; RUIZ ALCORTA VLADIMIR**

Instituto superior de medicina militar “Modelo de herida infectada” Cuba 2005.

60. VELASCO ALFONSO. FARMACOLOGÍA FUNDAMENTAL,

1º edición en español, editorial san marcos. Madrid. España. 2003

61. VEGA CONZA MARILYN.

“Actividad Antimicótica y Antibacteriana in vitro de las hojas de *Juglans neotropica* (nogal) sobre *Trychophytum rubrum* y *Staphylococcus epidermidis*, Microorganismos Causantes se Infecciones Dérmicas” para optar el título profesional de Químico Farmacéutico en la Universidad Nacional San Antonio Abad Cusco Facultad de Ciencias, Físicas, Químicas, Matemáticas, Farmacia e Informática, Cusco - Perú 2009.

62. VILLAR DE FRESNO ÁNGEL

Farmacognosia general. Editorial síntesis. Madrid. España. 1999.

63. VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Informe a la resistencia antimicrobiana en hospitales del Perú. Instituto nacional de salud (INS) Perú 2007. [Internet]. Consultado 05/04/10. Disponible en:

http://www.ins.gob.pe/vigilancia/documentos_tecnicos/informe_resistencia_2007.pdf

ANEXOS

ANEXO N° 1

CERTIFICADO DE IDENTIFICACION DE LA PLANTA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEO INKA
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICA

Que, la Bachiller: **CASTRO SUMARIA, VERÓNICA** de la Carrera Profesional de **Farmacia y Bioquímica** de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; ha presentado al Herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica herborizada para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario, de la que se desprende que el material analizado corresponde a la especie ***Flourensia polycephala***. Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Flourensia*
Especie : *Flourensia polycephala* Dillon
N. vulgar : Phauka.

Se le expide, la presente certificación de determinación de la especie para los fines que viera por conveniente

Cusco, Abril de 2010

Arch/HV CUZ

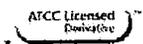


Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco
Herbario Vargas (CUZ)

Dr. Fructuosa De La Torre Mayorga
Directora

ANEXO N° 2
CERTIFICADO DE ANALISIS DE LA BACTERIA

MicroBioLogics®																																																																																									
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release																																																																																									
Specifications	Additional Information																																																																																								
<p>Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 36076 Reference Number: ATCC® 25923™** Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2011/04</p>	<p>Release Information: Quality Control Technologist: Kelly Ehnes Release Date: 2009-06-02 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.</p>																																																																																								
Performance																																																																																									
<p>Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic</p> <p>Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters</p>	<p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain</p>																																																																																								
<p>Vitek GP</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: left;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 1</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>POLYMXIN B RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td>-</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td>+</td></tr> <tr><td>PULLULAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RAFFINOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>+</td></tr> <tr><td>SALICIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 2</td><td>+</td></tr> <tr><td>.OPTOCHIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	D-AMYGDALIN	-	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	D-XYLOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE 1	+	BETA-GALACTOSIDASE	-	ALPHA-GLUCOSIDASE	+	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	CYCLODEXTRIN	-	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-	ALPHA-MANNOSIDASE	-	PHOSPHATASE	+	Leucine ARYLAMIDASE	-	L-Proline ARYLAMIDASE	-	BETA GLUCURONIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+	BETA-GLUCURONIDASE	-	Alanine ARYLAMIDASE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	D-SORBITOL	-	UREASE	-	POLYMXIN B RESISTANCE	+	D-GALACTOSE	-	D-RIBOSE	-	L-LACTATE alkalization	+	LACTOSE	-	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	D-MALTOSE	+	BACITRACIN RESISTANCE	+	NOVOBIOCIN RESISTANCE	-	GROWTH IN 6.5% NaCl	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+	PULLULAN	-	D-RAFFINOSE	-	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	SALICIN	-	SACCHAROSE/SUCROSE	+	D-TREHALOSE	+	ARGININE DIHYDROLASE 2	+	.OPTOCHIN RESISTANCE	+	<p>Other Features/Challenges: Results</p> <p>Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive Coagulase (rabbit plasma-tube): positive Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  AUTHORIZED SIGNATURE </div>
Phenotypic Features	Results																																																																																								
D-AMYGDALIN	-																																																																																								
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-																																																																																								
D-XYLOSE	-																																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 1	+																																																																																								
BETA-GALACTOSIDASE	-																																																																																								
ALPHA-GLUCOSIDASE	+																																																																																								
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																								
CYCLODEXTRIN	-																																																																																								
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-																																																																																								
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-																																																																																								
ALPHA-MANNOSIDASE	-																																																																																								
PHOSPHATASE	+																																																																																								
Leucine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																																								
BETA GLUCURONIDASE	-																																																																																								
ALPHA-GALACTOSIDASE	-																																																																																								
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+																																																																																								
BETA-GLUCURONIDASE	-																																																																																								
Alanine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																																								
D-SORBITOL	-																																																																																								
UREASE	-																																																																																								
POLYMXIN B RESISTANCE	+																																																																																								
D-GALACTOSE	-																																																																																								
D-RIBOSE	-																																																																																								
L-LACTATE alkalization	+																																																																																								
LACTOSE	-																																																																																								
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+																																																																																								
D-MALTOSE	+																																																																																								
BACITRACIN RESISTANCE	+																																																																																								
NOVOBIOCIN RESISTANCE	-																																																																																								
GROWTH IN 6.5% NaCl	+																																																																																								
D-MANNITOL	+																																																																																								
D-MANNOSE	+																																																																																								
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+																																																																																								
PULLULAN	-																																																																																								
D-RAFFINOSE	-																																																																																								
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+																																																																																								
SALICIN	-																																																																																								
SACCHAROSE/SUCROSE	+																																																																																								
D-TREHALOSE	+																																																																																								
ARGININE DIHYDROLASE 2	+																																																																																								
.OPTOCHIN RESISTANCE	+																																																																																								

MicroBioLogics® Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release	
<p style="text-align: center;">Specifications</p> Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 36076 Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2011/04	<p style="text-align: center;">Additional Information</p> Release Information: Quality Control Technologist: Kelly Ehnes Release Date: 2009-06-02 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.
<p>Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p>	
<div style="display: flex; align-items: center;">  <p>The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div>	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <p>© 2010 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303</p> <p>DOC.286 REVISION 2010.February.11 dt/ml</p> </div>	

ANEXO N° 3

CERTIFICADO SANITARIO DE LOS RATONES DE EXPERIMENTACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO N°

126-2010

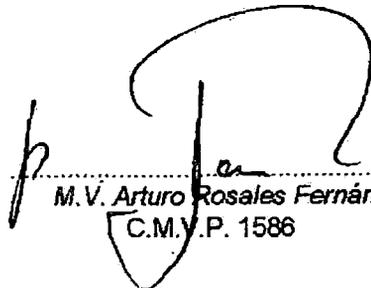
Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M - 22 - 2010
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 24
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 1 mes ½ a 2 meses
Peso	: Mayores a 25 gr.	Sexo	: Machos
B.V- N°	: 004-12665 G.R. 021577	Destino	: Veronica Castro Sumaria Univ. San Antonio Abad - Cuzco
Fecha	: 25-06-10		

El Médico Veterinario, que suscribe, **Arturo Rosales Fernández**, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 25 de Junio del 2010

NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.


M.V. Arturo Rosales Fernández
C.M.V.P. 1586

ANEXO N° 4

PRUEBAS DE ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (*Phauka*)

Los siguientes ensayos tienen por objeto obtener una visión general de los diferentes metabolitos secundarios que pueden estar presentes en el material en estudio. Se obtendrán extractos de diferentes polaridades.

Para ello se realizaron 4 tipos de extracciones.

1. **Clorofórmico:** compuestos de muy baja polaridad como. Esteroides , quinonas
2. **Etanólico:** compuestos de polaridad muy variada como esteroides, alcaloides, flavonoides ,taninos
3. **Acuosa:** compuestos de alta polaridad: Flavonoides, Leucoantocianidinas, Saponinas, Taninos.
4. **Acuosa acida:** compuestos básicos como alcaloides.

Lieberman- Burchard	esteroides
Espuma	saponinas
Gelatina	taninos
Cloruro férrico	Hidroxilos fenólicos en general
Shinoda	flavonoides
Borntranger	quinonas
Rosenheim	leucoantocianidinas
Dragendorff	alcaloides
Mayer	alcaloides

PROCEDIMIENTO

- Se peso 1 gramo de la planta en estudio
- Se agrego 10ml de solvente (para extractos 1,2,3,4)
- Se realizo los ensayos que correspondan según el extracto tenga.

REACTIVOS DE COLORACION Y/O PRECIPITACION

1. **Lieberman – Burchard:** se tomo 0.5 ml del extracto vegetal, se añadió 0.5 ml de ácido acético, 1 ml de anhídrido acético y luego una gota de ácido sulfúrico concentrado., se observo los cambios de coloración en el transcurso de los primeros 30 minutos.
2. **Prueba de espuma:** se puso 1 ml del extracto en un tubo de ensayo y se llevo a 5 ml con agua destilada, se agito vigorosamente por 30 segundos, se espero 15 minutos, y la persistencia de la espuma nos indica la presencia de saponinas.
3. **Gelatina:** se tomo 0.5 ml del extracto y se añadió una gota de solución de gelatina, se debe observar un precipitado blanco, que nos indica la presencia de taninos.
4. **Cloruro férrico:** se tomo 0.5 ml del extracto y se añadió una gota de solución férrica, donde se debe obtener una coloración azul o verde, que nos indica la presencia de OH fenólicos.
5. **Shinoda:** se tomo 0.5 ml del extracto, se agrego unos trocitos de magnesio metálico y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado., la coloración rojiza nos indica la presencia de flavonoides.
6. **Borntranger:** se tomo 0.5 ml del extracto y se llevo a sequedad, se agrego 0.5 ml de tolueno y luego 1 ml de NaOH al 5%, la aparición de una coloración roja, en la fase acuosa, nos indica la presencia de antraquinonas y naftoquinonas.
7. **Rosenheim:** se toma 0.5 ml del extracto y se agrega 0.5 ml de HCl 2N se hierve por 15 minutos, la aparición de una coloración roja nos indica la presencia de leucoantocianidinas.
8. **Dragendorff:** se tomo 0.5 ml del extracto disuelta en HCl al 1%, se agrega 2 a 3 gotas de reactivo el cual se debe observar un precipitado rojo o naranja.
9. **Mayer:** se tomo 0.5 ml del extracto (disuelto en ácido diluido), se agrego 2 a 4 gotas del reactivo, se debe observar un precipitado blanco.

ANEXO Nº 5

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka).

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE EXTRACTO ETANÓLICO Y CLOROFORMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* (Phauka).

SOLICITANTE: Br Verónica Castro Sumaria

PARA : Tesis de investigación

MUESTRA : Extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de *Flourensia polycephala* (Phauka).

FECHA : 15/04/2010

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS

Los indicadores microbiológicos tomados en cuenta para el análisis de la muestra en estudio son:

1. Recuento de microorganismos de salmonella (RST)
2. Recuento de microorganismos de Coliformes totales (RCT)
3. Recuento de microorganismos aerobios mesofilos viables (RMAMV)
4. Recuento de hongos y levaduras (RHL)

CUADRO: REPORTE DE RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO ETANOLICO Y CLOROFORMICO DE LAS HOJAS DE *Flourensia polycephala* (Phauka).

	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}
RST	Ausente	Ausente	Ausente
RCT	Ausente	Ausente	Ausente
RMAMV	Ausente	Ausente	Ausente
RHL	Ausente	Ausente	Ausente

METODOLOGÍA

Se siguió la metodología recomendada por el centro latinoamericano de enseñanza e investigación de bacteriología alimentaria (CLEIBA)

CONCLUSION

Por los resultados obtenidos, se tiene que la muestra cumple con los valores-guía de la OMS, sobre calidad microbiológica.

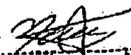
El extracto Etanólico y clorofórmico de la especie vegetal, esta libre de contaminación por gérmenes patógenos por lo que permite realizar las pruebas de toxicidad correspondiente, sin ningún tipo de alteración microbiológica en los animales de experimentación a ser administrados por vía tópica.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- a. Los microorganismos de salmonella, al no encontrarse en la presente muestra indica materias primas no contaminadas, limpieza y desinfección correcta.
- b. Los microorganismos de Coliformes totales, al no encontrarse en la presente muestra indica materias primas no contaminadas, limpieza y desinfección correcta.
- c. Los microorganismos aerobios mesofilos, al no encontrarse en la presente muestra indica materias primas no contaminadas, limpieza y desinfección correcta o condiciones adecuadas de tiempo y temperatura durante la producción o conservación.
- d. Al recuento de hongos y levaduras, indica que las condiciones de almacenamiento y conservación así como la sanitización de equipos y la calidad higiénica sanitaria del producto en estudio es buena.

BIBLIOGRAFIA

(Centro latinoamericano de enseñanza e investigación bacteriología alimentaria – 1984) (Ratto Alina y garrido tula UNMSM – LIMA 1983, DIGESA – LIMA 1996, instituto nacional de salud 1998 y centro de alimentación y nutrición lima – 1998, OMS 1992).


Mgt. Yanet Mendoza Muñoz
CBP N° 2617
ESPECIALIDADES ANALISIS BIOLÓGICOS
EDUCACIÓN UNIVERSITARIA E INVESTIGACIÓN
UNSAAC "34" FAC. MEDICINA HUMANA

ANEXO N° 6

FICHA DE RECOPIACION DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION.

N° de disco	concentración del extracto (mg/disco)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
FÁRMACO PATRON					

Leyenda:

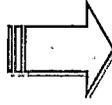
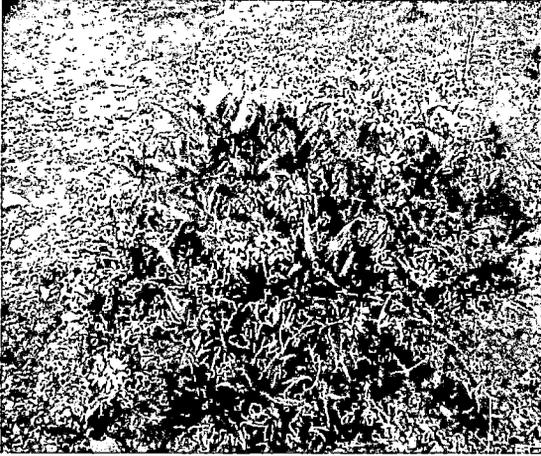
IG: primer grupo de placas

IIG: segundo grupo de placas

IIIG: tercer grupo de placas

ANEXO N° 8

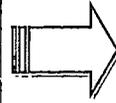
**ARCHIVO
FOTOGRAFICO**



Fotografía N° 1 de la planta de
"Phauka"

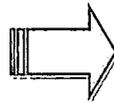
Esta fotografía nos muestra la
planta de "Phauka" en el
habitat natural en la localidad
del Distrito de Oropesa - Cusco

Fuente: V.C.S



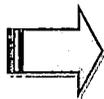
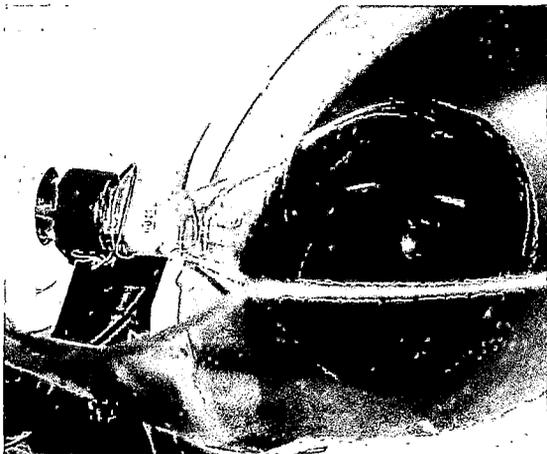
Fotografía N° 2 esta fotografía
muestra el proceso de secado
de las hojas de Phauka que
fueron antes seleccionadas.

Fuente: V.C.S



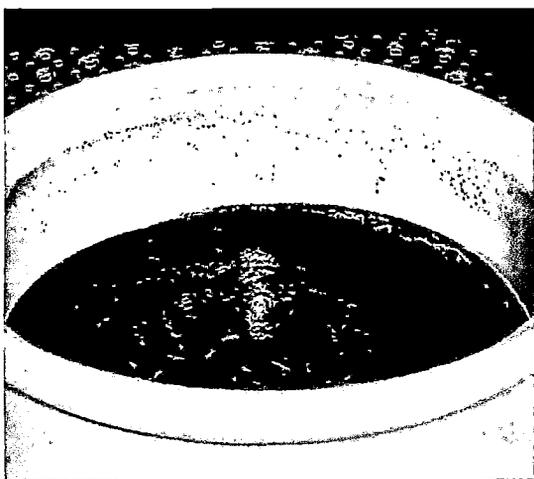
Fotografía N° 3 en esta
fotografía se observa el
proceso de macerado de las
hojas de Phauka.

Fuente: V.C.S



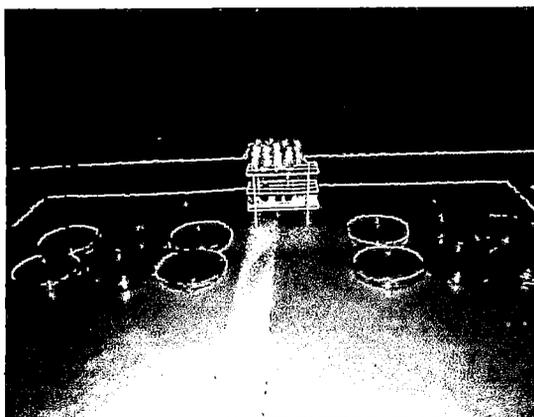
Fotografía nº 4 nos muestra el rota vapor realizando el proceso de evaporación del extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de Phauka.

Fuente: V.C.S



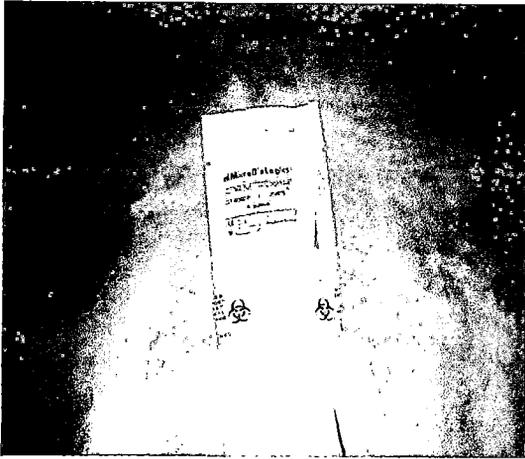
Fotografía nº 5
Se aprecia la etapa de evaporación del extracto etanólico de las hojas de Phauka en un envase blanco libre de contaminación.

Fuente: V.C.S



Fotografía nº 6 se observa el control microbiológico de los extractos etanólico y clorofórmico. Utilizando diferentes medios de cultivo.

Fuente: V.C.S



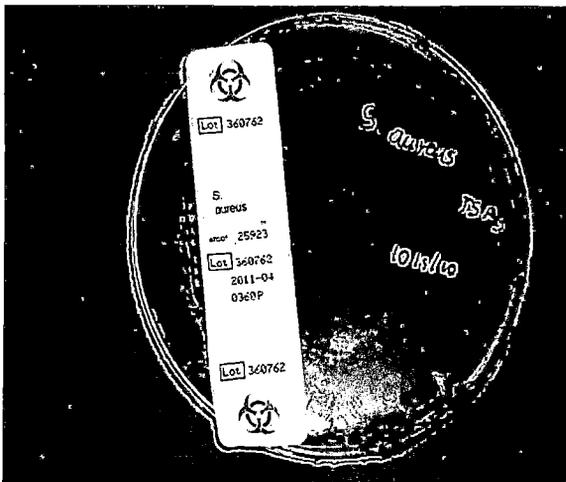
Fotografía n° 7 se observa la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que fue adquirido del laboratorio Gen Lab del Perú

Fuente: V.C.S



Fotografía n° 8 se observa la activación del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en un medio de agar ATS (agar tripticasa soya)

Fuente: V.C.S



Fotografía n° 9 se observa la cepa de *Staphylococcus aureus* luego de 24 horas de su activación.

Fuente: V.C.S



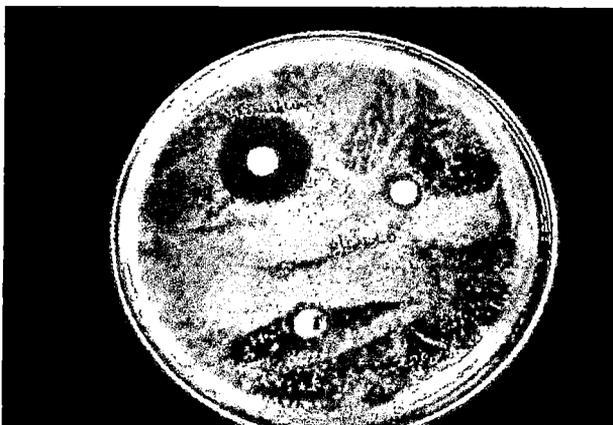
Fotografía nº 10 en esta imagen se aprecia los diferentes halos de inhibición producidos por los discos de sensibilidad preparados con las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico de las hojas de Phauka

Fuente: V.C.S



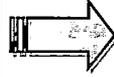
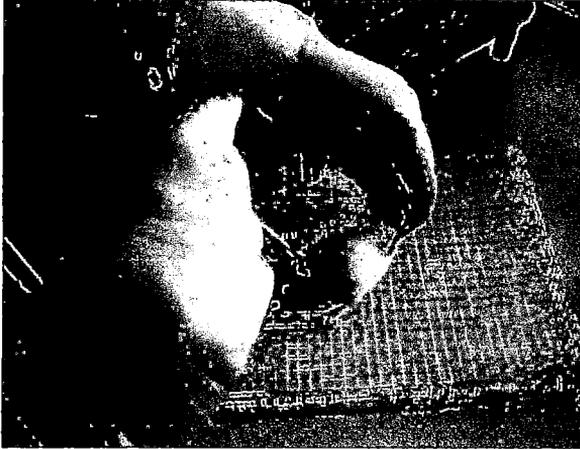
Fotografía nº 11 en esta imagen se aprecia los diferentes halos de inhibición producidos por los discos de sensibilidad preparados con las concentraciones estandarizadas del extracto clorofórmico de las hojas de Phauka

Fuente: V.C.S



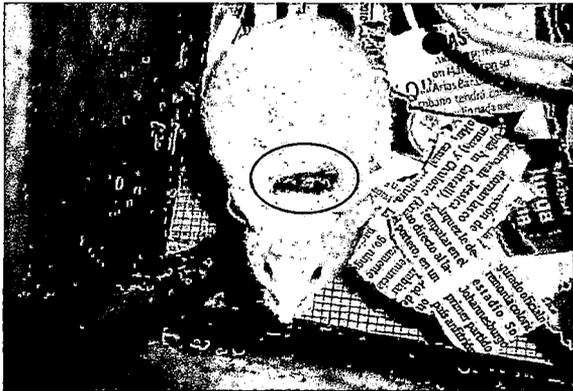
Fotografía nº 12 se observa los halos de inhibición producidos por los fármacos patrón neomicina y bacitracina.

Fuente: V.C.S



Fotografía nº 13 se observa la inoculación de las bacterias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un hisopo estéril al ratón de experimentación para inducir la infección y realizar el ensayo "in vivo"

Fuente: V.C.S



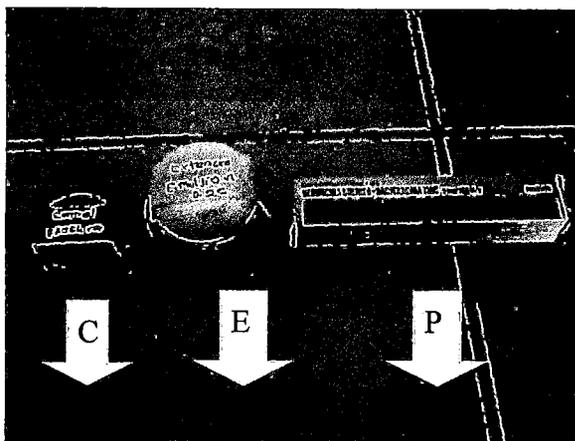
Fotografía nº 14 podemos observar la infección producida al ratón de experimentación después de las 72 horas, listo para su tratamiento.

Fuente: V.C.S



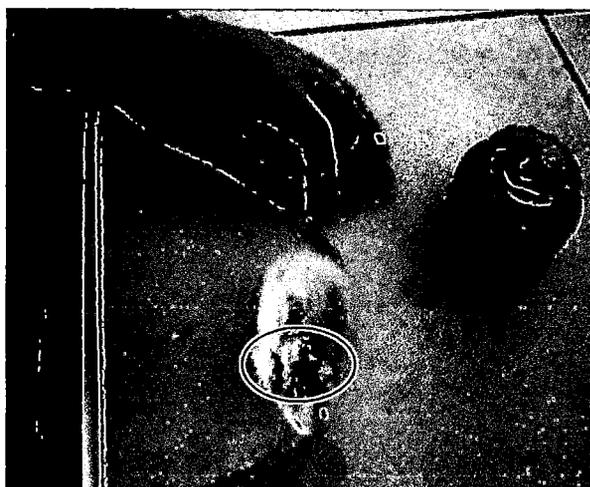
Fotografía nº 15 se observa la mezcla de los diferentes excipientes con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* "Phauka" para obtener la emulsión o/w a utilizar en el experimento.

Fuente: V.C.S



Fotografía nº 16 se observa al control negativo (vaselina), emulsión elaborada con las hojas de Phauka del extracto etanólico y al fármaco patrón ungüento neomicina y bacitracina. El cual se utilizó en el tratamiento de los ratones de experimentación.

Fuente: V.C.S



Fotografía nº 17 se observa el tratamiento de la infección con la emulsión elaborada a base del extracto etanólico de las hojas de Flourensia polycephala "Phauka".

Fuente: V.C.S



Fotografía nº 18 se observa a los ratones de experimentación ya curados con la emulsión elaborada a base del extracto etanólico de las hojas de Flourensia polycephala "Phauka" el cual dio resultados óptimos.

Fuente: V.C.S