

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

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO
SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Caioophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"
SOBRE CEPAS ATCC Y CEPAS AISLADAS DE *Staphylococcus aureus***

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE:**

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Br. ALEJANDRA LIDA ESPINOZA MORMONTOY

ASESOR:

DR. NERIO GÓNGORA AMAUT

CO-ASESORA:

DRA. YANET MENDOZA MUÑOZ

CUSCO – PERU

2018

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, darme las fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres, Leoncio y Benigna las personas a las que les debo todo y por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi hermano Harol por ser una de las personas más importantes en mi vida y a pesar de la distancia y las diferencias siempre lo llevo en mi corazón, en mis pensamientos y quiero siempre todo lo mejor para él.

A mi hermana Melany porque estuvo presente en todo momento, siempre muy cerca de mi ofreciéndome su apoyo absoluto compartiendo los buenos y malos momentos.

A mis niños hermosos mis Sobrinos: Leo, Luana y Haziél porque desde que vinieron a este mundo se han convertido en los seres más especiales de mi vida.

A cada miembro de mi familia: Mi abuelita, mis tíos, tías, primos y primas por su incondicional paciencia y apoyo.

Alejandra

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por acogernos este tiempo en sus aulas y por habernos ayudado en la realización de este trabajo de investigación.

A nuestra Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por brindarnos una educación de calidad al servicio de la población.

Al Dr. Nerio Góngora Amaut, quien con su experiencia y conocimiento facilitó el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

Con gratitud a la Dra. Yanet Mendoza Muñoz, por sus consejos, sugerencias y apoyo del trabajo de investigación.

Al Convenio ARES-UNSAAC, por el apoyo, paciencia y comprensión que permitieron la realización del trabajo de investigación con el fin de mejorar la calidad de la enseñanza y fomentar las capacidades de investigación de la Universidad

Alejandra

INDICE

Resumen	
Abstract	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: GENERALIDADES	3
1.1 Planteamiento del Problema	3
1.2 Formulación del Problema	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Justificación	5
1.5 Hipótesis	7
1.6 Limitaciones	7
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1 Visión Histórica	8
2.2 Antecedentes	8
2.2.1 Antecedentes Etnobotánicos	8
2.2.2 Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos del Género <i>Caiophora</i>	10
2.2.3 Antecedentes del Método	14
2.2.4 Estado de la Cuestión	18
2.3 Bases Teórico Científicas	19
2.3.1 Aspectos Botánicos de la Especie <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl "Ccori kisa	19
2.4 Antioxidantes	20
2.4.1 Clasificación de los Antioxidantes	21
2.4.2 Especies Vegetales como Antioxidantes	27
2.5 Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno	28
2.5.1 Radicales Libres	28
2.5.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	28
2.5.3 Formación de los Radicales Libres y Especies Reactivas	29
2.5.4 Factores que predisponen la formación de radicales Libres	31
2.5.5 Metabolismo de los Radicales Libres y las Especies Reactivas	31
2.5.6 Principales Especies Reactivas de Oxígeno	33
2.5.7 Radicales Libres en Fisiopatología	34
2.6 Métodos de la Evaluación de la Actividad Antioxidante	35
2.6.1 Método ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	36
2.6.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	36
2.6.3 Método DMPD	36

2.7 Antibacterianos.....	37
2.7.1 Características Generales de los Antibacterianos	37
2.7.2 Efectos de los Agentes Antimicrobianos sobre el Crecimiento Bacteriano ..	37
2.7.3 Modo y Mecanismo de Acción de los Antimicrobianos	38
2.7.4 Medición de la Actividad Antimicrobiana	40
2.7.5 Interpretación del Antibiograma	41
2.7.6 Control Microbiológico.....	42
2.8 Bacteria en estudio: <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.8.1 Género Estafilococos	42
2.8.2 Clasificación del Género Estafilococos	43
2.8.3 Crecimiento Microbiano	46
2.9 Descripción de los Fármacos usados como Patrones Comparativos en el presente Estudio	49
2.9.1 Penicilina G.....	49
2.9.2 Doxiciclina.....	52
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1 Materiales Biológicos.....	54
3.2 Materiales e Instrumentos de Laboratorio.....	54
3.2.1 Material de Campo.....	54
3.2.2 Materiales de Vidrio	54
3.2.3 Instrumentos	54
3.2.4 Equipos de Laboratorio.....	55
3.2.5 Reactivos y Solventes.....	55
3.2.6 Medios de cultivo para activación de <i>Staphylococcus aureus</i> y su Respectivo Antibiograma.	56
3.2.7 Reactivos para la Determinación de la Actividad Antioxidante	56
3.2.8 Fármacos empleados como Patrón.....	56
3.2.9 Otros Materiales.....	56
3.3 Diseño Metodológico	57
3.3.1 Tipo de Estudio	57
3.3.2 Diseño de la Investigación	57
3.3.3 Ensayo de la Actividad Antioxidante	57
3.3.4 Ensayo de la Actividad Antibacteriana	58
3.3.5 Identificación, Definición y Operacionalización de Variables	60
3.4 Procedimiento	66
3.4.1 Preparación de la Muestra	67
3.4.2 Determinación de la Actividad Antioxidante	71
3.4.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana	71

3.4.4 Técnicas para el Análisis y Procesamiento de Datos	75
CAPITULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
4.1 Porcentaje de Humedad	76
4.2 Porcentaje de Rendimiento de Extracción	77
4.3 Pruebas de Solubilidad.....	77
4.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo	78
4.5 Control Microbiológico	80
4.6 Determinación de la Actividad Antioxidante	81
4.6.1 Valor de concentración de inhibición 50 (IC50)	83
4.7 Determinación de la Actividad Antibacteriana.....	88
4.7.1 De la estandarización de la Curva de Crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	88
4.7.2 De la Estandarización de la Curva de Crecimiento para Cepas Aisladas <i>Staphylococcus aureus</i>	90
4.7.3 Del Ensayo de la Sensibilidad Bacteriana de la Prueba Piloto sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	92
4.8 Del Ensayo de la actividad Antibacteriana con las concentraciones estandarizadas sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	99
4.8.1 Resultados de los diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del Extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl "Ccori kisa" sobre Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC obtenidos con las Concentraciones Estandarizadas.....	99
4.9 Determinación de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana in vitro de las cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a fármacos antimicrobianos.	105
CONCLUSIONES	106
SUGERENCIAS.....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	109
ANEXOS.....	117

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación Taxonómica de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	19
Tabla 2: Criterios de Actividad Antimicrobiana atendiendo al halo de inhibición.....	41
Tabla 3: Métodos de Medición del Crecimiento Microbiano	47
Tabla 4: Análisis Fitoquímico del extracto seco hidroalcohólico de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl. “Ccori kisa”	69
Tabla 5: Resultado del Porcentaje de Humedad de las partes aéreas de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	76
Tabla 6: Porcentaje de Rendimiento de Extracción de las partes aéreas de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	77
Tabla 7: Pruebas de Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	77
Tabla 8: Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto seco hidroalcohólico de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”.....	78
Tabla 9: Resultados del Control Microbiológico del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	80
Tabla 10: Resultados de la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	82
Tabla 11: Resultados Descriptivos de la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	84
Tabla 12: Análisis de la Varianza (ANOVA) para la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	84
Tabla 13: Prueba de Scheffé para la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	85
Tabla 14: Absorbancias para la Estandarización de la Curva de Crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	88
Tabla 15: Absorbancias para la Estandarización de la Curva de Crecimiento para cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
Tabla N°16: Resultados de la Prueba Piloto del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	92
Tabla 17: Resultados Descriptivos para la Prueba Piloto de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” sobre la cepa bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	94
Tabla 18: Análisis de Varianza (Anova) para la Prueba Piloto de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” sobre la Cepa Bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	95
Tabla 19: Prueba POST HOC de Scheffé para la Prueba Piloto de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” sobre la Cepa Bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	96
Tabla 20: Resultados de la Prueba Piloto del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre Cepas Aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>	97
Tabla 21: Concentraciones Estandarizadas del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	98
Tabla 22: Halos de Inhibición del extracto Seco hidroalcohólico al 70% sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 con las Concentraciones Estandarizadas.....	99
Tabla 23: Halos de Inhibición de los Fármacos Patrón para cepa ATCC 25923 de <i>Staphylococcus aureus</i>	101

Tabla 24: Resultados Descriptivos para la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” con las Concentraciones Estandarizadas sobre la Cepa Bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> 25923.....	102
Tabla 25: Análisis de Varianza (ANOVA) para la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” con las Concentraciones Estandarizadas sobre la Cepa Bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> 25923.....	103
Tabla 26: Prueba POST HOC HDS DE TUKEY para la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” con las Concentraciones Estandarizadas sobre la Cepa Bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	104
Tabla 27: Resultados de los halos de inhibición de los patrones sobre cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>	105

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efecto del porcentaje de Actividad de Captación del Radical DPPH del Patrón Ácido Ascórbico	81
Gráfico 2: Concentración de Inhibición 50 del extracto seco hidroalcohólico al 70% de	83
Gráfico 3: Porcentaje de Actividad de Captación del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	86
Gráfico 4: Comparación del porcentaje de actividad de captación de radicales libres entre el Ácido Ascórbico y el extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	87
Gráfico 5: Curva de Crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	89
Gráfico 6: Curva de Crecimiento para Cepas Aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de los isómeros del ácido ascórbico (isómero L y D)	24
Figura 2: Química de las especies reactivas de Oxígeno (ERO).....	29
Figura 3: Blancos de algunos Agentes Antimicrobianos	39
Figura 4: Colonias de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figura 5: Curva de Crecimiento Microbiano en un cultivo discontinuo.....	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Especies Vegetales con Actividades Antioxidante	27
Cuadro 2: Criterios de Control Microbiológico	42
Cuadro 3: Resumen de Variables de la Actividad Antioxidante	63
Cuadro 4: Resumen de Variables de la Actividad Antibacteriana.....	64
Cuadro 5: Resumen de Variables Intervinientes	65
Cuadro 6: Análisis Microbiológico	70

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1: <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	19
Fotografía 2: Especie <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” tomado en la localidad de Lullucha, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis – Cusco	130
Fotografía 3: Recolección de la especie <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa” ...	130
Fotografía 4: Selección y secado a temperatura ambiente de la especie <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	131
Fotografía 5: Maceración después de la molienda y tamizado en alcohol al 70% de la especie <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	131

Fotografía 6: Extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiothora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	132
Fotografía 7: Pruebas de solubilidad para el extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiothora cirsiifolia</i> C. Presl “Ccori kisa”	132
Fotografía 8: Identificación fitoquímica cualitativa del extracto seco hidroalcohólico al 70%	133
Fotografía 9: Preparación del Reactivo DPPH y el Patrón Ácido ascórbico para evaluar la actividad antioxidante.....	133
Fotografía 10: Tubos con las diferentes concentraciones de extracto + DPPH después de 30 minutos en oscuridad para luego ser leídos en el espectrofotómetro	134
Fotografía 11: Sachet y dispositivo KwikStick de Microbiologics INC que contiene a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	134
Fotografía 12: Obtención de la Cepa activada de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, después de haber sido sembrado del dispositivo e incubado de acuerdo a la técnica del fabricante.....	135
Fotografía 13: Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	135
Fotografía 14: Cepa aislada de <i>Staphylococcus aureus</i> sembrado en agar Trypticasa soya.....	135
Fotografía 15: Resultados de las Pruebas de Identificación de las cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>	136
Fotografía 16: Cepas ATCC y cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i> en baño maría para realizar la estandarización y lectura en el espectrofotómetro	137
Fotografía 17: Se observan los halos de inhibición formados para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 después de su incubación por triplicado, donde el mayor promedio de diámetro de inhibición fue de 20.23mm a una concentración de 18.63mg/25µL ..	137
Fotografía 18: Se aprecia la medida de uno de los diámetros de inhibición del extracto a una concentración de 18.63mg/25µL	138

ABREVIATURAS

ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Infusión Cerebro Corazón
°C	: Grados Centígrados
CMI	: Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
DO	: Densidad Óptica
DPPH	: 2,2-difenil-1-picrihidrazilo
g	: Gramos
IM	: Intramuscular
IV	: Intravenosa
LCR	: Líquido Cefalorraquídeo
µg	: Microgramos
µL	: Microlitros
mg	: Miligramos
mm	: Milímetros
mL	: Mililitros
msnm	: Metros Sobre el Nivel del Mar
nm	: Nanómetros
OH	: Radical Hidroxilo
OMS	: Organización Mundial de la Salud
pH	: Potencial de Hidrogeniones
QP	: Químicamente Puro
RNA	: Ácido Ribonucleico
ROS	: Especies Reactivas al Oxígeno
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a la Meticilina
TSA	: Agar Tripticasa Soya
UFC	: Unidades Formadoras de Colonias
UV	: Ultravioleta
UV-Vis	: Ultravioleta-Visible
ZI	: Zona de Inhibición

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del Extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*, para lo cual se obtuvo el extracto de la especie *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" y luego fue concentrado a evaporación. El Extracto seco hidroalcohólico al 70% fue usado para la determinación de la actividad antioxidante (Método Brand-Williams) y antibacteriana (Métodos de pozos excavados).

Este extracto fue sometido al control microbiológico, para los microorganismos de salmonella, coliformes fecales, mesófilos viables, hongos y levaduras, en el que se comprobó que el extracto no presentó contaminación alguna. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta: porcentaje de humedad: 43,69%, porcentaje de rendimiento: 34.19%, es de naturaleza parcialmente polar y en el análisis fitoquímico cualitativo el extracto presenta abundante cantidad de azúcares reductores, flavonoides, lactonas, quinonas, taninos y aminoácidos.

Mediante el método Brand-Williams se determinó la actividad antioxidante in vitro donde el extracto presenta alta actividad antioxidante in vitro con 90.69% de porcentaje de captación de radicales libres a una concentración de 100 µg/mL.

Mediante el método de pozos excavados se determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*, donde el extracto presenta actividad antibacteriana sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* con un halo máximo de inhibición de 20.23 mm a 18.630 mg/25µL de extracto, el extracto no presenta actividad antibacteriana sobre las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*"; la concentración mínima inhibitoria del extracto sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* fue de 0.30mg/25µL, en cepas aisladas no presenta concentración mínima inhibitoria y en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* muestran resistencia a Penicilina con un halo de inhibición de 0.00 mm y muestran sensibilidad intermedia frente a Doxiciclina con un halo de inhibición de 18.33 mm.

Con los resultados obtenidos en porcentaje de captación del radical libre DPPH, obtención de CMI y medida de los halos de inhibición se realizó la prueba de ANOVA para valorar las diferencias significativas y se halló que existen diferencias

estadísticamente significativas entre las medias de cada una de las concentraciones del extracto.

Entonces se concluye que el Extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta alta actividad antioxidante in vitro, una actividad antibacteriana marcada sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, actividad nula sobre cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* y las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* son resistentes a Penicilina y de sensibilidad intermedia a Doxiciclina.

PALABRAS CLAVE: *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa", *Staphylococcus aureus*, ATCC, cepas aisladas, extracto seco hidroalcohólico al 70%, Antioxidante, Antibacteriano, susceptibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work was developed with the objective of determining the antioxidant and antibacterial in vitro activity from the 70% hydroalcoholic dry extract of *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" over the strain ATCC and the isolated strains of the *Staphylococcus aureus*, for which the extract of the species *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" was obtained and later was concentrated until evaporated. The 70% hydroalcoholic dry extract was used to determine the active antioxidant (Brand-Williams method) and antibacterial (dug wells method).

This extract was subjected to microbiological control, so the organisms of salmonella, fecal coliforms, viable mesophiles, fungus and yeasts, which keep it in check did not contaminate at all. The 70% hydroalcoholic dry extract of *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presents: 43.69% humidity, 34.19% yield, in nature it is partially polar and in qualitative phytochemical analysis the extract presents a high quantity of reducing sugars, flavonoids, lactones, quinones, tanins and amino acids.

Following the Brand-Williams method it was determined the antioxidant in vitro activity where the extract presents high antioxidant activity with 90.69% catchment of free radicals in a concentration of 100µg/mL.

Following the dug wells method it was determined the antibacterial in vitro activity of the ATCC strains extract and isolated strains of *Staphylococcus aureus*, where the extract presents antibacterial activity on ATCC strains of *Staphylococcus aureus* with a maximum bacterial inhibiting halo of 20.23mm to 18.630mg/25µL of the extract. The extract does not present antibacterial activity over the isolated strains of *Staphylococcus aureus*, The minimum inhibitory concentration of the extract over strains the *Staphylococcus aureus* of ATCC was 0.30mg/25µL, in isolated strains no minimum inhibitory concentrate was present and in the susceptible antimicrobial test *Staphylococcus aureus* show strains show resistance to Penicillin with a halo of 0.00mm inhibitor and show intermediate sensibility to Doxycycline with a halo of 18.33mm.

With these results the catchment percentage of the free radical DPPH, obtaining CMI and the measurement of the inhibiting halos the ANOVA test has been made to assess the significant differences and discovered that there exist significant statistical differences between the measurements of each one of the extract concentrates.

Therefore, in conclusion the 70% hydroalcoholic dry extract of *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presents a high antioxidant in vitro activity, a marked antibacterial in vitro activity over strains of *Staphylococcus aureus* ATCC, null activity over isolated

strains of *Staphylococcus aureus* and isolated strains of *Staphylococcus aureus* which are resistant to penicillin and intermediate sensitivity to Doxycycline.

KEYWORDS: *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa", *Staphylococcus aureus*, ATCC, isolated strains, 70% hydroalcoholic dry extract, Antioxidant, Antibacterial, Antimicrobial Susceptibility.

INTRODUCCIÓN

El uso de fitomedicamentos constituye una nueva categoría terapéutica que sin duda revolucionó el esquema de tratamiento medicinal de fines del siglo XX y marca un aporte ascendente en el siglo XXI. La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades. (1)

Las plantas han sido usadas como fuente de medicina a través de la historia y continúan siendo la base de muchos fármacos empleados actualmente. A inicios de los años noventa, la Organización Mundial de la Salud identificó que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para asistir problemas de salud. (2)

Con frecuencia, las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento clásico, lo que da lugar a un padecimiento prolongado y a mayor riesgo de defunción, existiendo el peligro de que muchas enfermedades infecciosas se vuelvan intratables e incontrolables (3), es por esto que la investigación en plantas medicinales y nuevas fuentes de antimicrobianos es trascendente.

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. (4)

La investigación y búsqueda de nuevos componentes activos, como son los antioxidantes naturales de las plantas medicinales utilizados en la Medicina Tradicional contribuirá a una mejora de la calidad de la vida, así como la prevención de las patologías crónicas y degenerativas por acción de los radicales libres (5). Por otro lado, la importancia de los antioxidantes es crucial para la salud, debido a su capacidad de neutralizar radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados, siendo responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular, cáncer y aceleración del envejecimiento. (6)

Por lo tanto, es urgente el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación de sustancias antioxidantes y antibacterianas que combatan de forma más efectiva a los radicales libres y microorganismos. Para esto las plantas han demostrado ser un enorme reservorio a partir del cual se ha encontrado una gran diversidad de sustancias antioxidantes y antibacterianas que pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos (7). La finalidad de este trabajo es determinar la posible actividad antioxidante y antibacteriana que posee la especie vegetal *Caiphora cirsiifolia* C. Presl

que es utilizada tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades pulmonares, urinarias, vaginales, para fortalecer la matriz materna y para purificar la sangre, por el cual permitirá tener una alternativa natural en la prevención de enfermedades provocadas por los radicales libres y una alternativa natural en el tratamiento antibacteriano.

CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del Problema

El organismo realiza procesos fisiológicos como el metabolismo de los alimentos produciendo radicales libres (RL), los cuales son altamente reactivos y provocan daños que inducen a una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular. El estrés oxidativo, contribuye al envejecimiento celular y al desarrollo de enfermedades degenerativas como cataratas, artritis, problemas del sistema inmune y cáncer. (8)

El problema surge cuando los radicales libres provienen de fuentes exógenas como el aire contaminado, luz solar, ejercicio extenuante, dieta baja en antioxidantes, consumo de alimentos con alto contenido de grasa, alimentos procesados, fritos o asados y con conservadores, el consumo excesivo de alcohol, el consumo de drogas, cigarro, la exposición a pinturas, pegamentos o contaminantes del medio ambiente, radiaciones ionizantes y la exposición prolongada a temperaturas elevadas. (9) (10)

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han promovido la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como potenciales agentes terapéuticos, unido a la creciente preocupación por los efectos tóxicos producidos por los antioxidantes sintéticos utilizados en la preservación de alimentos; esto refuerza la urgencia de obtener sustancias antioxidantes menos tóxicas y de amplia utilidad en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, siendo los vegetales una potencial fuente de obtención debido a que sintetizan y acumulan en sus órganos gran variedad de metabolitos secundarios como respuesta a estímulos o condiciones ambientales, entre ellos, sustancias con capacidad captadora de radicales libres tales como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y compuestos nitrogenados. (11)

Caiophora cirsiifolia C. Presl se distribuye geográficamente en los andes desde el norte de Perú hasta el norte de Chile. El poblador andino usa las hojas en infusión como antitusígeno para la tos y neumonía, en maceración para el acné y forúnculos, en decocción para heridas, en frotación para dolores reumáticos, los cuales sugieren un efecto antimicrobiano el cual en investigaciones anteriores se han comprobado usando como cepa al *Staphylococcus aureus* brindando la base científica para su uso. (12) (13)

Las infecciones de la piel y los tejidos blandos constituyen un conjunto de cuadros clínicos de distinta expresividad y gravedad que afectan la piel, el tejido celular subcutáneo y el músculo. Son las infecciones más prevalentes en nuestro medio, por tanto, uno de los primeros motivos de prescripción de antibióticos. (14)

Las enfermedades dermatológicas varían ampliamente con la situación geográfica y probablemente son influenciadas por factores étnicos y ambientales. Además, son causa importante de morbilidad, pérdida económica y exclusión social. En los países en desarrollo, las enfermedades dermatológicas constituyen un importante de salud pública, principalmente las de causa infecciosa. (15)

El estudio de los productos naturales ha sido importante desde hace mucho antes, en las que los productos de origen vegetal y animal eran utilizados con fines medicinales, su uso empírico ha perdurado hasta nuestros días y se ha convertido en la fuente principal de información para la producción de nuevos medicamentos en la industria farmacéutica. (16)

Debido a ello se busca nuevos antioxidantes y antimicrobianos de especies vegetales cuyas propiedades medicinales no han sido estudiadas por completo, y con el fin de generar conocimiento en cuanto a las posibles propiedades farmacológicas se ha seleccionado la especie *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" a la que se le atribuye propiedades antioxidantes y antibacterianas, teniendo en cuenta que estudios de especies de su misma familia y género presentan actividad bacteriana y antioxidante. (13) (17)

1.2 Formulación del Problema

¿Presentará el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" actividad antioxidante y antibacteriana in vitro sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora Cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar los ensayos preliminares del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" tales como: porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento, pruebas de solubilidad y análisis fitoquímico cualitativo.

2. Determinar la actividad antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” por el método Brand-Williams captación del radical libre DDPH
3. Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
5. Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* con dos fármacos patrón (Penicilina y Doxiciclina).
6. Realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana in vitro de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* frente a fármacos antimicrobianos tales como Penicilina y Doxiciclina.

1.4 Justificación

Justificación Teórica-Científica

El presente estudio demuestra el probable efecto antioxidante y antibacteriano para así difundir su uso de forma segura y adecuada e incentivar el desarrollo de nuevos estudios de dicha especie vegetal.

Es necesario el conocimiento de las propiedades antibacterianas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” y difundir su uso terapéutico, es importante estudiarla para poder demostrar el probable efecto frente a *Staphylococcus aureus* microorganismo causante de diversas infecciones y así de esta manera incentivar el desarrollo de nuevos estudios de dicha especie vegetal.

Por otro lado, los principios activos antioxidantes presentes en la especie vegetal, pueden cumplir un importante papel en las patologías relacionadas a radicales libres y se pueden continuar los estudios posteriores y llegar a ser aplicados en el campo clínico.

De Aplicabilidad

La presente investigación sobre la actividad antioxidante y antibacteriana busca aportar alternativas de tratamiento antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* que

es una de las causas principales de enfermedades de la piel (acné) en nuestra región, así como para el tratamiento de las enfermedades relacionadas a los radicales libres; puesto que la especie vegetal ***Caiphora cirsiifolia C. Presl*** “**Ccori kisa**” se utiliza en infusión como antitusígeno para la tos y neumonía, en maceración para el acné y furúnculos, en decocción para heridas (18) (19) (20), por lo que se evaluaron las actividades antioxidante y antibacteriana de esta especie.

En Prioridad

Debido a que en los últimos años se ve un incremento de la resistencia bacteriana y enfermedades relacionadas a los radicales libres conllevando a un problema de salud pública que va en incremento y de gran complejidad, pues que son causas de enfermedades registradas en nuestro país, por lo que nos vemos motivados a realizar la búsqueda de nuevas alternativas de sustancias antioxidantes y antimicrobianas de origen vegetal.

En aporte al Conocimiento

Durante mucho tiempo el uso de plantas medicinales se ha basado en conocimientos empíricos, utilizándose las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos en forma de preparados tradicionales. Muchos fármacos que actualmente son utilizados provienen de principios activos de plantas medicinales, estos fármacos deben de tener estudios previos antes de ser aplicados en el ser humano por lo que se requiere contar con información científica verídica sobre las propiedades y utilidades de las plantas medicinales; así la presente investigación ayudará al conocimiento científico de la especie ***Caiphora cirsiifolia C. Presl*** “**Ccori kisa**” en cuanto a la actividad antioxidante y antibacteriana.

La presente investigación sobre la actividad antioxidante y antibacteriana busca revalorar los recursos naturales que se encuentran en nuestro medio; aportando bases científicas de la actividad antioxidante y antibacteriana de la especie vegetal en estudio.

Social

Este estudio sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de la especie vegetal en estudio busca promover el uso tradicional y revalorar nuestros recursos naturales que se encuentran al alcance de la población. Aportando bases científicas de la especie vegetal en estudio, que corroboren el uso en enfermedades de la piel y

patologías causadas por los radicales libres con lo cual se logrará un aporte en la prevención y mejora de la calidad de la vida de las personas.

1.5 Hipótesis

El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” presenta actividad antibacteriana in Vitro sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* y presenta capacidad antioxidante.

1.6 Limitaciones

- La poca información bibliográfica sobre la especie en estudio, pues solo se pudo encontrar antecedentes relacionados que pertenecen al mismo género.
- La escasa información en el ámbito local y nacional respecto a la actividad antibacteriana y antioxidante de la especie *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Visión Histórica

En el altiplano americano se usa a la ccori kisa como remedio para curar las afecciones reumáticas, dolores musculares y de huesos y principalmente para curar las infecciones vaginales y uterinas. Se aplica localmente por frotación o flagelación para aliviar los dolores de las articulaciones, para los bronquios, calmar los nervios, como anticonceptivo, para fiebre, diarreas, tos convulsiva, pulmones, purgante, dolores menstruales, cólicos. (13)

Como medicina se utilizaban las flores en infusión o mate para aminorar el dolor de muela y dolor de estómago, junto a otras plantas sirve para calmar dolores menstruales. (20)

2.2 Antecedentes

2.2.1 Antecedentes Etnobotánicos

- **Tello C. Gladys. (Perú, 2015) Etnobotánica de plantas con uso medicinal en la Comunidad de Quero, Jauja, Región Junín. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.**

Se realizó un estudio etnobotánico llevado a cabo en la comunidad de Quero, ubicada en el distrito de Molinos, Provincia de Jauja en la región Junín, dicha investigación busca rescatar y revalorar las prácticas ancestrales con respecto al uso de plantas medicinales, como también inventariar las muestras recolectadas y sistematizar la información, utilizando para ello investigación del tipo descriptivo. Indica el uso de *Caiphora cirsiifolia C. Presl* conocida como ortiga colorada que se usa para la gripe, mal de bronquios, resfrío, tos, quitar el frío, parte utilizada las hojas, uso acompañado con borraja y escorzonera, preparación y uso popular: Para la gripe, bronquios o frío tomar el macerado de las hojas en caña y quemado en azúcar, para la tos se realiza el cocimiento de la hojas durante 15 minutos, luego tomar el preparado hasta desaparecer el malestar. (18)

- **Fernández P. Favio. (Bolivia, 2014) La flora local como estrategia para reducir riesgos climáticos desde un enfoque etnoecológico; caso comunidad Challoma (prov. Tapacarí) del departamento de Cochabamba. (Tesis de Pregrado). Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba.**

El objetivo general fue estudiar las prácticas y conocimientos sobre el manejo de flora local, como una estrategia de reducción de riesgos climáticos en la

comunidad de Challoma, Provincia Tapacarí. Departamento de Cochabamba; en el que se destaca los usos y/o funciones de la flora local; indica el uso de dos especies vegetales del género *Caiophora*: ***Caiophora canarinoides***; Como medicina, se usan las flores en Infusión o mate ayuda a aminorar el dolor de muela y dolor de estómago. Junto a otras plantas sirve para calmar dolores menstruales. ***Caiophora horrida***: como alimento, se usa la flor, se chupa el néctar como energizante y dulce para los niños; como medicina, se utiliza toda la planta, en mate se utiliza para regular la circulación de la sangre, hemorragias fuertes y para el dolor de estómago después de un parto. (20)

- **Rado J. Edmundo. (Perú, 2011) Etnobotánica del Distrito de Ocongate – Quispicanchi-Cusco. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.**

El objetivo general fue valorar las diferentes especies etnobotánicas existentes en comunidades de Ocongate; esto fue posible a través de tres objetivos específicos: determinar las zonas de mayor diversidad alfa en relación a su lejanía o proximidad al corredor vial interoceánico sur, determinar las especies de importancia etnobotánica en base a exploraciones guiadas por lugareños y revalorar las utilidades etnobotánicas, a través, de la elaboración de Fichas Etnobotánicas. Se registró 171 taxones que se agrupan en 44 familias, siendo las más importantes las asteráceas (46 especies) y poáceas (10 especies). De este total 127 especies tienen alguna utilidad etnobotánica, registrándose hasta 11 diferentes usos, siendo los más importantes los: medicinales, forrajeros, domésticos y tintóreos, indicando que la cocción de la raíz y la infusión de toda la planta ***Caiophora cirsiifolia C. Presl*** Ccori kisa es buena para acelerar el parto y fortalecer la matriz materna después del parto, además de purificar la sangre, esta infusión también es buena para curar afecciones pulmonares, también se hace reposar hojas, tallos y flores para hacer baños calientes para combatir el frío. (19)

- **Puelles G. María et al. (España, 2010) Las Plantas Medicinales de Perú. Madrid**

Ortiga Colorada (***Caiophora circifolia, Caiophora spp.***) crece en asociación con otras plantas sobre rocas al lado del camino, entremezclada con otras ortigas y con plantas herbáceas. En la zona ya no se encuentra con mucha frecuencia. Se toma en infusión para los resfriados, enfermedades bronquiales y gripe.

Planta de la familia Loasaceae, de las cuales se tienen registradas más de 30 especies en Perú, tres de ellas para fines medicinales. Están distribuidas

principalmente en la sierra, en forma silvestre. Se usa para la epistaxis (cataplasma con vinagre en la frente); como antiinflamatorio, para la neumonía y tos persistente (infusión de la planta entera). (12)

2.2.2 Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos del Género *Caiophora*

- Aquino A. Edwin. (Perú, 2017) **Actividad Antimicrobiana de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias Gram Negativas, *Staphylococcus aureus* y su toxicidad en *Artemia salina*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional del Altiplano, Puno.**

Los objetivos fueron determinar la actividad antimicrobiana de cuatro dosis del aceite esencial de las plantas paico (*Chenopodium ambrosioides*), ajeno (*Artemisia absinthium*), ortiga (***Caiophora cirsiifolia***) en el crecimiento in vitro de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella sp.*, observar las reacciones de análisis preliminar de metabolitos secundarios de las plantas en estudio con principios activos y evaluar la toxicidad del aceite esencial mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*. La metodología utilizada fue efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de las plantas a concentraciones de 5µL, 10µL, 20µL y 1mL, utilizando el método de difusión en agar. Los resultados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las plantas, *Chenopodium ambrosioides L.* presento mayor actividad sobre *Escherichia coli* a 20µl con un porcentaje de inhibición al doble del control positivo que presento 10mm donde (F = 18.80; GL = 4; P = 0.0001) se determinó que es alta mente significativo y *Artemisia absinthium L.* mostró mayor sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* a 1mL con 81.25 % de inhibición con respecto al control positivo, (F = 28.96; GL = 4; P = 0.0001) siendo altamente significativo, mientras que ***Caiophora cirsiifolia*** no mostró actividad antimicrobiana para ninguna bacteria en estudio. Para las reacciones de análisis preliminar de los metabolitos secundarios se observaron alcaloides, fenoles y carbohidratos en las tres plantas y la letalidad en *Artemia salina* demostró toxicidad en los extractos de *Chenopodium ambrosioides L.*, *Artemisia absinthium L.* y ***Caiophora cirsiifolia*** mostraron DL 50 de 30.08 µg/mL, 51.62 µg/mL y 64.92 µg/mL respectivamente. (21)

- **Tenorio R., Mollinedo P. (Bolivia 2016) Capacidad inhibitoria de filtrados de *Trichoderma inhamatum* y *Caiophora andina* sobre fitopatógenos de *Theobroma cacao*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.**

Se trabajó con extractos de filtrados de cultivos de *Trichoderma inhamatum* y extractos hidro-etanólicos de *Caiophora andina* sobre cepas patógenas de cacao *Theobroma cacao*. Los porcentajes de inhibición obtenidos luego de la determinación del crecimiento hifal in vitro bajo el efecto del filtrado fúngico de cepa *Trichoderma inhamatum* fueron: para *Moniliophthora spp.* 11 % (en el día 4), para *Colletotrichum spp.* 20 % (día 11) y para *Phytophthora spp.*, 46 % (día 9). Mientras que, los porcentajes de inhibición del crecimiento bajo el efecto de los extractos hidroetanólicos vegetales, extracto 1 (tallo-hojas) y extracto 2 (flores) fueron: para el patógeno *Moniliophthora spp.* 36% y 27 % respectivamente (a los 4 días), para *Colletotrichum spp.* 20 y 24 % respectivamente (a los 7 días) y finalmente para *Phytophthora spp.* 31% y 38 % respectivamente (ambos al día 9). Por ende, los extractos de filtrados de cultivos de *Trichoderma inhamatum* y extractos hidro-etanólicos de *Caiophora andina* son útiles para el control de hongos fitopatógenos en *Theobroma cacao*. (22)

- **Franco C. et al (Perú, 2015) Características fitoquímicas y capacidad antioxidante in vitro de *Aloe vera*, *Plukenetia volubilis*, *Caiophora carduifolia*, *Cecropia membranacea*. Universidad Nacional mayor de San Marcos, Lima.**

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características fitoquímicas y capacidad antioxidante in vitro mediante el método DPPH y ABTS de las hojas de *Aloe vera*, semillas de *Plukenetia volubilis*, hojas-tallos de *Caiophora carduifolia*, hojas de *Cecropia membranacea*, en el que se realizó un análisis fitoquímico identificando que *Cecropia membranacea* posee mayor presencia de metabolitos secundarios, *Caiophora carduifolia* presenta aminoácidos libres y saponinas; todas las plantas presentaron compuestos fenólicos y flavonoides a excepción de *Plukenetia volubilis*, que solo mostró triterpenos y esteroides; asimismo, *Aloe vera* presentó antronas y naftoquinonas. En la captación de radicales DPPH, requirió menor dosis para alcanzar la capacidad antioxidante (CE =0,159 mg/mL); mediante el método ABTS (5,834 uM trolox/g), *Caiophora carduifolia* (0,87 mg/mL – 0,44 mg/mL) tuvo efectos similares al trolox (p>0,05), *Aloe vera* y *Plukenetia volubilis* también tuvieron capacidad antioxidante dependiente de la dosis. Se ha demostrado capacidad antioxidante in vitro a

concentración dependiente, siendo mayor la de *Cecropia membranacea* y *Caiophora carduiifolia* y menor la de Aloe vera y *Plukenetia volubilis*. (23)

- **Gutierrez G. Isabel.; Mamani H. Luz (Perú, 2011) Actividad Inhibitoria de los extractos secos etanólicos al 70% de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de Gota y Determinación de Metabolitos Secundarios. (Tesis de Pregrado), Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.**

Este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, de los extractos secos metabólicos al 70% de diez especies vegetales, usadas tradicionalmente para el tratamiento de la gota: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (Chillca), *Taraxacum officina/e* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (Pinco-pinco), *Ambrosía arborescens* Mili. (Marcju), *Urtica urens* L. (Ortiga), ***Caiophora rosulata (Weddel) Urban & Gilg***. (Madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (Alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (Trébol); para lo cual se realizó un ensayo in vitro, así como también, determinar los metabolitos secundarios presentes en la planta con mayor actividad. Utilizando un diseño metodológico: descriptivo, cuasiexperimental y transaccional descriptivo. La actividad enzimática fue medida por medio de un espectrofotómetro, de acuerdo a los valores de absorbancia que mostró a 290nm cada especie vegetal. Fue el extracto etanólico de *Medicago lupulina* L. (trébol) quien presentó un mayor porcentaje de inhibición de 61.03 % a una concentración de .100 l-µg/mL, sin embargo; fue menor al que presentó el patrón alopurinol. Para la determinación de los metabolitos secundarios de *Medicago lupulina* L. (trébol), se realizó un proceso de extracción con solventes de diferente polaridad: hexano, diclorometano, cloroformo, cloroformo-metanol (4:1), metanol y agua. Se concluye que, de las diez especies estudiadas, *Medicago lúpulina* L. (trébol) posee mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa. Además, por las características que presentaron los espectros y cromatogramas obtenidos por HPLC, los metabolitos secundarios presentes en esta planta y posiblemente responsables de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa podrían ser flavonoides: Apigenina. (24)

- **Matta L. María. (Chile, 2009) Screening Fitoquímico, Antimicrobiano y Antioxidante de plantas pre-andinas y del altiplano chileno. (Tesis de Pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile.**

En este trabajo se investigaron siete plantas de cuatro géneros diferentes: *Caiophora*, *Senecio*, *Parastrephia* y *Myrica*, con el objetivo de dar un respaldo científico a las propiedades que la medicina folclórica les atribuye, así como dar a conocer estas especies desde un punto de vista fitoquímico y farmacológico, para lo cual se realizó un screening fitoquímico, antimicrobiano y antioxidante de estas plantas pre-andinas y del altiplano chileno. Para ello se debió obtener los diferentes extractos, infusos y aceite esencial de las distintas plantas a estudiar, para su análisis fitoquímico y evaluación farmacológica, y determinar la actividad antimicrobiana por medio del bioensayo de bioautografía, siembra en superficie de agar y concentración mínima inhibitoria. La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos se realizó frente a la enzima xantina oxidasa (XO). Las dos especies del género *Caiophora* (*Caiophora sepiaria* y *Caiophora rahmeri*) presentaron actividad contra bacterias Gram (+). Con la bacteria Gram (-) *E. coli*, mostraron actividad los aceites esenciales de ambas especies. Además *C. rahmeri* presentó también efecto con los extractos apolares y polares frente a *E. coli*. No se determinó la actividad antioxidante de *Caiophora sepiaria* y *Caiophora rahmeri* debido a la falta de muestra. (13)

- **Weigend M. et al (Alemania, 2004) Seed Oil Fatty acids of Loasaceae-A New Source of γ -Linolenic and Stearidonic Acids (Ácidos Grasos de semillas de Loasaceae-Una nueva fuente de los ácidos γ -linolénico y estearidónico. Freie Universität Berlin, Berlin.**

En este trabajo se realizó la identificación de 2 ácidos grasos (ácido γ -linolénico y ácido estearidónico) presentes en las semillas de plantas de diferentes géneros de la Familia Loasaceae (*Nasa*, *Caiophora*, *Gronovia*, and *Blumenbachia*); para la obtención de estos ácidos grasos se realizó la molienda de las semillas, la extracción fue con heptano y se obtuvo los extractos en un evaporador rotativo; dichos extractos fueron preparados por transesterificación con metóxido de sodio en metanol por utilizando el método de Schulte y Weber. Mediante la Cromatografía Gas-Líquido (GLC) se identificaron al ácido γ -linolénico y ácido estearidónico exclusivamente en especies del género *Nasa* a niveles de significancia de entre 3 y 10% respectivamente; en los demás géneros de Loasaceae (*Caiophora*, *Gronovia*, and *Blumenbachia*) no se encontró niveles significativos de estos 2 ácidos grasos. (25)

- **Weigend M. et al (Alemania, 2000) Phytochemistry and the Systematics and Ecology of Loasaceae and Gronoviaceae (Loasales) (Fitoquímica y la Sistemática y Ecología de Loasaceae y Gronoviaceae (Loasales)). Ludwig Maximilians University, Munich.**

Se realizó una selección de compuestos iridoides de 78 de 315 especies de todos los grupos principales en Gronoviaceae y Loasaceae. Los resultados se compararon con los conceptos sistemáticos en la familia y la distribución y ecología de los taxones. Los iridoides están presentes en al menos algunas especies de todos los géneros seleccionados. Algunos compuestos monoméricos simples (por ejemplo, loganina, sweroside) se encuentran en todos los grupos principales de las dos familias y representan el inventario básico de iridoides. Otros compuestos están restringidos a ciertos grupos taxonómicos: los iridoides de nueve carbonos (p. Ej., Deutziosido) están restringidos a *Mentzelia* (Loasaceae subfam. Mentzelioideae), los iridoides heterooligoméricos (por ejemplo, metiléster de tricolorosida, acerifoliosido) están restringidos a dos pequeños grupos en *Loasa* (*Loasa* ser. *Macrospermae* y ser. *Floribundae*, Loasaceae subfam. *Loasoideae*) y oleósidos (por ejemplo, 10-hidroxioléosido dimetil éster) están restringidos al gran género ***Caiophora***. La distribución de ciertos compuestos iridoides confirma algunos de los límites genéricos. La fitoquímica iridoide no se correlaciona con entidades sistemáticas por encima del nivel genérico ni se correlaciona de ninguna manera con la evolución morfológica de los taxones. Por el contrario, la cantidad y complejidad de los compuestos iridoides presentes en los taxones se correlaciona positivamente con la aridez de su hábitat y la extensión de la presión herbívora de los mamíferos. (26)

2.2.3 Antecedentes del Método

- **Achauanco, M., Aragón, P. (2015). Actividad antibacteriana in vitro de los extractos Etanólicos y Glicólicos de las hojas de la especie vegetal *Flourenzia polycephala* M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *propinobacterium acnes* y su relación con la actividad antioxidante. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.**

El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y glicólicos de las hojas de la especie vegetal *Flourenzia polycephala* M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *propinobacterium acnés* y su relación con la actividad antioxidante el método empleado fue experimental utilizándose la técnica del método de pozos

excavados, procediendo primero con la prueba piloto y luego con la estandarización de las concentraciones para determinar la concentración mínima inhibitoria de los extracto sobre cada bacteria, donde se obtuvieron los siguientes resultados para todos los casos con valores de $p=0.000$ que indica que existe diferencia significativa entre las concentraciones de los extracto y los halos formados. La concentración mínima inhibitoria de extracto etanólico sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *propionobacterium acnés*, fue de 0.368 mg/25uL y 0.34 mg/25uL respectivamente. Y el CMI del extracto del extracto glicólico sobre *Staphylococcus aureus* y *propionobacterium acnés*, fue de 0.13 mg/25uL y 0.84 mg/25uL respectivamente. Se determinó también la capacidad antioxidante por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DDPH) con el patrón ácido ascórbico mediante la correlación lineal de Pearson, llegando a la conclusión de que el extracto etanólico y glicólico *Flouencia polycephala* M.O. Dillon presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *propionobacterium acnés* y posee actividad antioxidante. (27)

- **Rosell, G. (Perú,2014). Determinación del contenido total de polifenoles-flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico de *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.**

El objetivo fue determinar el contenido total de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepas ATCC 25923, el método fue cuasiexperimental, la determinación cuantitativa de polifenoles se realizó por el Método Folin-Ciocalteau, para flavonoides por el método de Woosky y Salatino y la determinación de sus actividades antioxidante fue por el método de Brand Williams y la actividades antibacteriana por la técnica de prueba de diluciones en caldo y difusión en agar. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: La marcha fitoquímica revelo la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, quinonas, saponinas y cumarinas. El contenido de polifenoles fue de 24.70 ug de ácido láctico/100 ug de extracto, el contenido de flavonoides fue de 50.82 ug de quercetina dihidratada/500ug, el valor de CMI frente a *Staphylococcus aureus* fue de 11.78 mg/ug y el mayor halo de inhibición fue de 39.42 mm a 44.96 mm/25uL. En conclusión, los coeficientes de correlación de Pearson muestran la directa proporcionalidad entre la cantidad de polifenoles y flavonoides con actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto. (28)

- **Talkuder E. et al (Bangladesh, 2013) In Vitro Antioxidant Potential of *Momordica charantia* Fruit Extracts. (Potencial Antioxidante In Vitro de extractos de la fruta *Momordica charantia*). Universidad de Chittagong**

Este estudio investiga el potencial antioxidante de los extractos de las frutas de *Momordica charantia* en etanol y acetato de etilo. Los extractos fueron probados con el ensayo de captación libre de DPPH, reducción del cloruro férrico y captación de radical superóxido. En el método de IC50 de DPPH, los valores de ácido ascórbico y extractos etanólicos y de acetato de etilo tuvieron como resultado 2.19 µg/mL, 111.87 µg/mL y 157.03 µg/mL respectivamente. Los resultados de los ensayos demostraron que *M. charantia* posee una actividad antioxidante relativamente moderada comparada a los estándares. (29)

- **Quispe, J., Quiroga, D. (2012). Determinación de la Actividad Antibacteriana sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aureginosa* y determinación de la toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Spidium guajava* "sahuinto". (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.**

El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aureginosa* y determinación de la toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Spidium guajava* "sahuinto". Donde la metodología empleada para la actividad antibacteriana se determinó por el método de pozos excavados empleando como antibiótico patrón la Amikacina a una concentración de 30ug/100uL para la toxicidad subaguda se utilizó 20 ratas macho holtzman empleando el protocolo estándar 28 días procediendo finalmente a su sacrificio, análisis sanguíneo e histopatológico de corazón, riñón e hígado. Obteniéndose los siguientes resultados: con respecto a las cepas de *Escherichia coli* el fármaco patrón presentó un halo de inhibición de 28 mm mientras que el extracto hidroalcohólico presentó un halo de inhibición mayor de 15 mm a una concentración de 284,4 mg/100ul y en cuento a las cepas aisladas se obtuvo un halo de inhibición de 29.9 mm a una concentración de 276 mg/100ul. Respecto a y *Pseudomona aureginosa* se obtuvo un halo de inhibición de 26 mm con respecto al patrón mientras que el extracto hidroalcohólico presentó un halo de inhibición mayor de 28 mm a una concentración de 219.2 mg/100uL. En cuanto a la cepa aislada se obtuvo un halo de inhibición de 11.6 mm a una concentración de 54.8 mg/100uL. De la determinación de la toxicidad subaguda del extracto,

se observó necrosis renal media y un proceso de regeneración celular a nivel de los hepatocitos en los animales de experimentación tratados con una dosis de 200 mg/kg de extracto. Conclusión: se determinó la actividad antibacteriana sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aureginosa* y no se encontró toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal de *Spidium guajava* "sahuinto". (30)

- **Rahman A. et al (Sudáfrica. 2012). Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* extracts. (Efectos Antioxidante, Antimicrobiano y citotóxicos de los extractos fenólicos de las hojas *Leea indica*).**

Este estudio investigó los efectos citotóxicos, antioxidantes y antimicrobianos del extracto etanólico de las hojas de *Leea indica*. Los valores fitoquímicos hallados fueron para la cantidad total de polifenoles y flavonoides, así como para el efecto captador del radical DPPH. Los ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica fueron realizados con el método de difusión en disco. Los resultados mostraron que el contenido total de polifenoles fue de 24.00 EqAG/100g, el contenido total de flavonoides fue de 194.68 g de quercetina/100g y la capacidad antioxidante fue de 106.61 AA/100g. En el ensayo antibacteriano mostró zonas de inhibición significantes frente a *Bacillus subtilis*, *bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Staphylococcus aureus*; *Salmonella typhi*, *Pseudomona aureginosa*, *Shigella dysebteriae*, *Vibrio cholerae* y para hongos mostro actividad contra *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y *Fusarium equisetii*. (31)

- **Inocente C., Miguel A. (Perú, 2009) Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.**

Este trabajo investigó la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. se comprobó la presencia de carbohidratos, heterósidos, compuestos fenólicos: taninos condensados (proantocianidinas) y flavonoides; la presencia de grupos fenólicos (grupo hidroxilo, grupo aromático) el cual se realizó mediante espectroscopía infrarrojo y espectroscopía UV-visible. La cuantificación del extracto hidroalcohólico dió como resultado: para compuestos fenólicos totales: 13.5158 ± 0.1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; para taninos: 11.8590 ± 0.5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; y la determinación de taninos condensados:

1.62368 ± 0.0784 g de ácido tánico/100 g de corteza. Dicho extracto posee actividad antioxidante con IC50 de 19.5337 µg/mL, y 0.241 mg/mL equivalentes trolox; asimismo presenta actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. (32)

2.2.4 Estado de la Cuestión

Sobre la siguiente investigación se tiene información escasa con respecto a la actividad antioxidante y antibacteriana de la *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” por ello se consultaron trabajos científicos a nivel internacional, nacional y local del género *Caiophora* y con el tema de investigación. Matta realizó el estudio sobre el “Screening Fitoquímico, Antimicrobiano y Antioxidante de plantas pre-andinas y del altiplano chileno” en el que determinaron la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de 2 especies del género *Caiophora* (*Caiophora sepiaria* y *Caiophora rahmeri*) sobre bacterias Gram positivas en el que dichas especies vegetales presentaron actividad contra dichas bacterias (13). En la Universidad Mayor de San Andrés La Paz-Bolivia, Tenorio y Mollinedo determinaron la “Capacidad inhibitoria de los extractos hidro-etanólicos de *Caiophora andina* sobre fitopatógenos de *Theobroma cacao* “Cacao” mostrando que los filtrados son útiles para el control de hongos fitopatógenos (*Moniliophthora* spp, *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp.) en *Theobroma cacao*. (22). A nivel Nacional en la Universidad Nacional del Altiplano Puno se encontró el estudio de la “Actividad Antimicrobiana del aceite esencial de *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias Gram negativas y *Staphylococcus aureus*” en el que *Caiophora cirsiifolia* no mostró actividad antimicrobiana para ninguna bacteria utilizada en la investigación (21), en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Franco et. al. determinaron las “Características fitoquímicas y capacidad antioxidante in vitro de *Aloe vera*, *Plukenetia volubilis*, *Caiophora carduiifolia*, *Cecropia membranacea*” demostrando que la especie posee *Caiophora carduiifolia* capacidad antioxidante in vitro a 0,420 mg/mL. (17)

En nuestra escuela profesional de Farmacia y Bioquímica solo se encontró un trabajo de investigación con una especie del género *Caiophora* en el que determinaron la “Actividad inhibitoria de xantina oxidasa de los extractos secos etanólicos al 70% de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de Gota y Determinación de Metabolitos Secundarios”, donde la especie *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa) no presentó dicha capacidad inhibitoria. (24)

2.3 Bases Teórico Científicas

2.3.1 Aspectos Botánicos de la Especie *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa

2.3.1.1 Identificación Botánica

La clasificación e identificación botánica fue realizada por el biólogo M.Cs. Dr. Washington Galiano Sánchez, profesor investigador asociado al Herbario Vargas se la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, de acuerdo a la Clasificación APG III (Angiosperm Phylogenetic Group).

Tabla 1: Clasificación Taxonómica de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

TAXONOMIA	
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novak ex Takht
Superorden	Asteraneae Takht
Orden	Cornales Link
Familia	Loasaceae Juss
Genero	<i>Caiophora</i> C. Presl
Especie	<i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl

Fuente: Herbario Vargas CUZ

(Anexo 01)

Nombre científico:

Caiophora cirsiifolia C. Presl

Nombres comunes:

Ccori kisa, quisa, pucca kisa, kisa, puka tika kisa, ortiga colorada, puca-shinua, puca hitana, llungo-llundo, atapilla, ortiga hembra. (13) (19)

Fotografía 1: *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”



Fuente: Espinoza A. Ocongate-Quispicanchis – Cusco, 2017

2.3.1.2 Localización

La especie es parte de un complejo de varios taxones estrechamente relacionado sobre todo en la vertiente occidental de los Andes que va desde el norte de Perú (Dpto. Cajamarca) hasta el norte de Chile (Región I). Las colecciones de *Caiophora* de la parte meridional suelen tener flores más pequeñas y más profundamente disectadas que los del centro del Perú, pero estas diferencias desaparecen en gran medida en el cultivo, lo que indica que reflejan simplemente las condiciones generalmente más secas para las plantas que crecen en el sur de Perú y Chile. *Caiophora cirsiifolia* oscila entre elevaciones de 2400 a 3700 m.s.n.m. Habita en laderas de cerros, matorrales secos, bordes de caminos y paredes de piedra, protegida por otros arbustos. (13)

2.3.1.3 Descripción

Hierba perenne, postrada o creciendo a modo de enredadera, tallo de hasta 60 cm; raíz típica. Hojas pinnatipartidas, pecioladas, margen lacerado y filamentoso, superficie ampollosa, cubierta de pelos rígidos urticantes. Flores axilares, hermafroditas, de color anaranjado fuerte; cáliz gamosépalo, pentadentado; corola con 5 pétalos libres, cóncavos, nectarios de color blanco, petaloides. Androceo con estambres largos y numerosos, anteras ditésicas y basifijas; gineceo con ovario ínfero, pentacarpelar, unilocular y multiovular, de estilo apical y estigma simple. Fruto, una cápsula con dehiscencia longitudinal. Florece en cualquier época del año (19).

2.3.1.4 Hábitat

Caiophora es un género con 95 especies de plantas de flores pertenecientes a la familia Loasaceae, está ampliamente distribuido en los Andes, desde Argentina-Chile en el Sur, hasta el centro de Ecuador en el Norte, las características más comunes de este género son: hierbas perennes en forma de cojines, o hierbas rosuladas acaules, e hierbas trepadoras. (13)

2.3.1.5 Propiedades Medicinales

Se aplica localmente por frotación o flagelación para aliviar los dolores de las articulaciones; al simple contacto produce irritaciones cutáneas, para los bronquios, calmar los nervios, como anticonceptivo, para fiebre, diarreas, tos convulsiva, pulmones, purgante, dolores menstruales, cólicos (19) (6).

2.4 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical

libre débil no tóxico. Los antioxidantes naturales pueden tener una o más de las siguientes propiedades: secuestro de radicales libres, actuar como agentes reductores, formar complejos potenciales de metales peroxidantes y erradicar los singletes de oxígeno. Estas propiedades redundan en su capacidad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, modificadora de la permeabilidad capilar e inhibidora de la agregación plaquetaria. (33)

Los antioxidantes juegan un rol muy importante en el sistema de defensa del cuerpo humano, porque protegen contra el daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), bioproductos dañinos, generados durante la respiración de las células aeróbicas que pueden oxidar biomoléculas, hasta llegar a la muerte de la célula y causar daño tisular. (33)

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. (33)

2.4.1 Clasificación de los Antioxidantes

De acuerdo con el mecanismo de acción se pueden considerar dos tipos de antioxidantes (34):

- **Antioxidantes preventivos:** Estos actúan al inicio de una cadena de oxidación, para reducir o impedir el comienzo de una cadena de oxidorreducción. Como ejemplos se pueden considerar los reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos (enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa).
- **Antioxidantes secundarios:** Son interruptores que actúan bloqueando en alguna etapa de la cadena de oxidación ya iniciada al captar radicales libres y al acortar la longitud de la cadena de oxidación y sus consecuencias. (Vitamina E y C y la enzima superóxido dismutasa)

Otra manera de clasificar a los antioxidantes es considerando su estructura química y su función biológica en ese sentido estos se pueden clasificar en (35):

- **Antioxidantes enzimáticos:** Como glutatión peroxidasa, catalasa y la superóxido dismutasa.
- **Antioxidantes no enzimáticos:** Como la vitamina C y E, el β -caroteno, ácido úrico y la bilirrubina.

En las dos anteriores clasificaciones indicadas hay superposiciones en la acción de los radicales libres, por lo cual es más conveniente clasificarlos de acuerdo al sitio de acción, clasificándose en (36):

- Antioxidantes extracelulares
- Antioxidantes intracelulares

2.4.1.1 Antioxidantes Extracelulares

a. Vitamina E

Comprende varios compuestos de los cuales el alfa tocoferol es el más abundante y el delta tocoferol el oxidante más potente. La vitamina E funciona la rompiendo la cadena oxidativa de los radicales libres (37).

Se encuentra en el plasma vinculado con los lípidos circulantes como en todas las membranas celulares (34). Siendo liposoluble su acción es especialmente importante en las membranas celulares donde interfiere la propagación de la peroxidación de los lípidos (36):



Cuando se forma el radical de vitamina E, éste es insuficiente reactivo para sustraer H de los lípidos de la membrana. Posteriormente el radical vitamina E es reducido a vitamina E por la vitamina C, formándose semidehidroascorbato. La vitamina E es también un potente eliminador del oxígeno atómico (36).

Debido a su carácter lipófilo se acumula en las lipoproteínas circulantes, membranas celulares y depósitos de grasas, donde reacciona muy fácilmente con el oxígeno molecular y los radicales libres, actúa como limpiador de estos productos protegiendo los ácidos grasos insaturados (especialmente los que se encuentran en las membranas celulares) de reacciones de peroxidación. Uno de los principales papeles de la vitamina E en el organismo humano es impedir la oxidación de LDL, dado que la forma aterogénica de las LDL es la oxidada (38).

Los toc{oferoles se encuentran principalmente en las membranas de la mayoría de las células protegiéndolas de la liperoxidación. Normalmente funciona reaccionando con radicales libres peroxilo (ROO), donándoles un hidrogeno y transformándolos en hidroperóxidos lipídicos que luego pueden ser retirados por las glutatión peroxidasas (39).

La fuente principal de vitamina E son los aceites vegetales y alimentos elaborados a partir de ellos (por ejemplo, las margarinas). El germen de trigo y las nueces también contiene elevadas cantidades de vitamina E (40).

La vitamina E participa en la estabilización de las membranas, la agregación plaquetaria (41).

Su deficiencia produce una oxidación en cadena de los ácidos grasos poliinsaturados, produciendo daños celulares que se evidencian a nivel neurológico, aunque también se producen degeneraciones del epitelio seminífero y lentificación del desarrollo uterino (40).

b. Vitamina C

Es una molécula hidrosoluble, la cual interacciona prácticamente con los mismos oxidoradicales que la vitamina E, pero con la ventaja adicional de su capacidad para regenerar la variante reducida (antioxidante) de la vitamina E al interactuar con el radical tocoperóxido para regenerar al α -tocoferol a su estado activo (34).

El ácido ascórbico es un compuesto con los seis átomos de carbono estrechamente relacionado con la glucosa. Su papel biológico principal parece ser el agente reductor en diversas reacciones importantes de hidroxilación que tiene lugar en el organismo. El ácido ascórbico es necesario para la hidroxilación de la lisina y prolina en el colágeno. Sin la hidroxilación de estos aminoácidos el colágeno es incapaz de formar los enlaces cruzados normales necesarios para formar las fibrillas de colágeno. Así la vitamina C es obviamente importante para el mantenimiento del tejido conjuntivo normal y para la curación de las heridas, ya que el tejido conjuntivo es el primero en repararse. En su condición de agente reductor posee otras propiedades importantes, que parecen ser no enzimáticas. Por ejemplo, ayuda a la absorción del hierro al reducirlo al estado ferroso en el estómago, protege a la vitamina A, vitamina E y algunas vitaminas B de la oxidación, también favorece la utilización del ácido fólico ayudando a la conversión de folato en tetrahidrofolato. El National Research Council ha llegado recientemente a la conclusión de que cantidades adecuadas de antioxidantes como la vitamina C, previenen el cáncer (38).

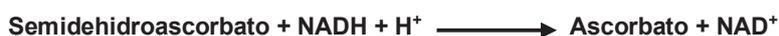
También actúa en la conversión de dopamina a norepinefrina y de triptófano a 5-hidroxitriptófano, así mismo interviene en el metabolismo de otras sustancias como corticosteroides, histamina, péptidos neuroendocrinos y ácidos biliares. Pueden afectar también a la función de los leucocitos y macrófagos, respuesta inmune y reacciones alérgicas. En cuanto a su metabolismo el ácido L-ascórbico se absorbe en el intestino mediante un proceso dependiente de sodio. El ácido ascórbico absorbido se encuentra como anión en el plasma sanguíneo sin unirse a ningún tipo de proteína, aumentando su concentración si lo hace la ingesta. El ácido ascórbico y sus principales metabolitos son excretados principalmente por orina siendo el principal producto el oxalato. Sin embargo, si la ingesta es alta el principal producto excretado es el propio ácido ascórbico (40).

La vitamina C además de regenerar el radical vitamina E es un antioxidante capaz de reaccionar con los radicales libres de oxígeno (O_2^-), superóxido (HO_2^-), hidroperóxido y

el radical hidroxilo (OH^\cdot) para formar semihidroascorbato, del cual se forma dehidroascorbato que es reducido de nuevo a ascorbato por la dehidroascorbato reductasa reacción que requiere glutatión reducido (36).

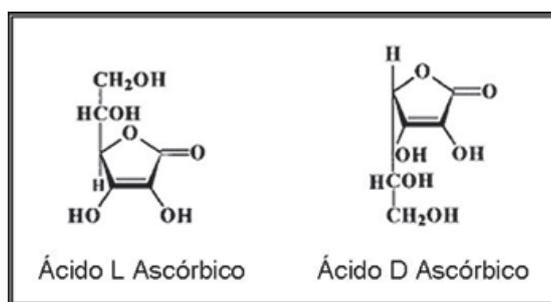


Alternativamente el semidehidroascorbato puede ser reducido a ascorbato, directamente por la NADH semidehidroascorbato reductasa:



La vitamina C se encuentra en los vegetales y frutas, principalmente en el kiwi, brócoli, espinacas, tomates, patatas frescas y naranjas incluyendo otros cítricos. Los compuestos con actividad de vitamina C son: el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico (en ambas sólo la forma L) (40).

Figura 1: Estructura química de los isómeros del ácido ascórbico (isómero L y D)



Fuente: Researchgate, 2011 (42)

c. Carotenoides

El β -caroteno un pigmento presente prácticamente en todas las plantas y el cual constituye el precursor más importante de la vitamina A, presenta actividad antioxidante. Es la molécula que reacciona más eficazmente con el singulete de oxígeno. Sin embargo la vitamina A no interacciona con el singulete de oxígeno y carece de actividad para la depuración de los radicales libres (34).

El β -caroteno atrapa el radical oxígeno y otros radicales libres por las reacciones fotoquímicas; pueden tener un papel biológico en la protección contra radicales libres independiente de su función como provitamina A. parte del β -caroteno se absorbe intacto por el intestino. El β -caroteno, el licopeno y el α -caroteno son potentes atrapadores del radical libre de oxígeno y peróxidos lipídicos de allí el posible papel de los carotenoides en la prevención del cáncer (36).

d. Ácido Úrico

Se ha sugerido que el ácido úrico es un eliminador efectivo del radical OH^\cdot , puede tener también un papel quelante de los iones y actuar rompiendo la cadena de oxidación o como antioxidante preventivo. Su concentración en plasma es de $300 \mu\text{M/L}$, mucho mayor que la del ácido ascórbico ($50 \mu\text{M/L}$). Se sostiene que es el antioxidante más importante en el hombre, el nivel plasmático de ácido úrico tiende a incrementar con la edad, lo que puede compensar la menos contribución de otros antioxidantes extracelulares (36).

e. Proteínas Plasmáticas

Quelantes metálicos: Los metales de libre transición como el Fe (III) son capaces de promover la peroxidación lipídica por lo cual el secuestro de metales libres es un importante mecanismo que protege contra la peroxidación. En el plasma sanguíneo, la mayor parte de esta acción protectora se debe a la ceruloplasmina y la transferrina, cada uno de ellos puede unirse a dos moles de Fe (III) por mol de proteína. El nivel de transferrina del plasma disminuye constantemente a lo largo de la vida tanto en el hombre como en la mujer, también disminuye en la infección y en la inflamación. El anciano con enfermedades crónicas tiene niveles más bajos de transferrina que sujetos sanos.

La ceruloplasmina reacciona con el radical superóxido (36).



Tiene también actividad ferroxidásica catalizando la oxidación:



f. Albúminas

Las proteínas plasmáticas y en particular las albúminas; responden del 10-50% de la actividad antioxidante del plasma humano; esta acción se cree es debida a los grupos sulfidrilos de las proteínas. A concentraciones fisiológicas, la albúmina es capaz de unirse al cobre e inhibir el radical hidroxilo formando H_2O_2 . En los ancianos, con buena salud, las concentraciones plasmáticas de albúmina son similares que en jóvenes. Las enfermedades crónicas producen caída de las albúminas plasmáticas, la que es más marcada en ancianos con enfermedades crónicas (36).

2.4.1.2 Antioxidantes Intracelulares

a. Glutación Peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es una enzima citosólica y mitocondrial que requiere de selenio para su actividad, cataliza la reacción (36):



El GSSG se transforma en 2GSH por la glutación peroxidasa, no dependiente del selenio, para actuar sobre hidroperóxidos orgánicos pero no sobre H_2O_2 .

El contenido de selenio en los tejidos animales incrementa con la edad. En el hombre la gran mayoría de los investigadores han observado la declinación con la edad, de los niveles de selenio en el plasma y los eritrocitos, la ingestión de selenio y sus niveles sanguíneos dependen de la distribución geográfica debido al variable contenido de selenio en la corteza terrestre (36).

b. Glutación

El glutación protege contra los radicales libres y es también un eliminador del radical hidroxilo y el oxígeno atómico. Es capaz de reactivar algunas enzimas que han sido inhibidas por exposición a altas concentraciones de oxígeno.

La incapacidad de sintetizar glutación trae varias consecuencias en las células humanas, entre ellas anemia hemolítica y alteraciones neurológicas. El glutación tiene también acciones prooxidantes reduce Fe (III) a Fe (II) y forma en presencia de oxígeno, oxígeno atómico. Parece que el glutación no es determinante importante de la longevidad, ya que hay una correlación negativa entre los niveles de glutación tisular y el tiempo de vida potencial (36).

c. Catalasa

La actividad de la catalasa está localizada principalmente en los peroxisomas donde catalizan la reacción:



Su contribución a la actividad antioxidante del plasma es pequeña, ya que su actividad en el plasma es 3000 veces menor que los eritrocitos. Se ha reportado resultados variables de la actividad de la catalasa en los tejidos en relación con la edad (36).

d. Superóxido Dismutasa

Es la principal enzima encargada en la desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno. Estas proteínas secuestran O_2^- y catalizan la reacción de dismutación de este radical libre para producir H_2O_2 y O_2 (39).



La actividad de la superóxido dismutasa en eritrocitos y plasma humanos, disminuye ligeramente, pero no en forma significativa con la edad pero no cambia en los fibroblastos de la piel (36).

2.4.2 Especies Vegetales como Antioxidantes

Diversas plantas conteniendo compuestos que presentan capacidad antioxidante se encuentran reportadas en la literatura desde hace ya varios años. Todas estas plantas presentan compuestos fenólicos, alcaloides u otros por su facilidad de estabilizar o inhibir la propagación de especies radicalarias, o actuar como filtros de las radiaciones ultravioleta es que justamente ejercen su actividad antioxidante (43).

La presencia y proporción de ellos en los extractos naturales, dependerá principalmente de la planta utilizada como materia prima y del solvente utilizado como materia prima y del solvente utilizado para su extracción (44). Algunos ejemplos son mencionados en el cuadro N° 1:

Cuadro 1: Especies Vegetales con Actividades Antioxidante

Nombre	Actividad antioxidante encontrada en:
<i>Apium graveolens</i> L. (APIACEAE) Apio	Semillas
<i>Camellia sinensis</i> L. (THEACEAE) Te	Tallos y hojas
<i>Cinnamomum verum</i> (LAURACEAE) Canela	Corteza
<i>Larrea tridentata</i> (ZYGOPHYLLACEAE) Chaparral	Flor, tallos y hojas
<i>Lycopersicon esculentum</i> (SOLANACEAE) Tomate	Frutos
<i>Medicago sativa</i> (FABACEAE) Alfalfa	Tallos y hojas
<i>Panax ginseng</i> (ARALIACEAE) Ginseng chino	Raíces
<i>Perilla frutescens</i> (LAMIACEAE) Perilla	Tallos y hojas
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (LAMIACEAE) Romero	Tallos y hojas

Fuente: Gormaz J., 2005 (44)

2.5 Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno

2.5.1 Radicales Libres

Los radicales libres son átomos no metálicos y moléculas en las cuales uno de los átomos presenta una valencia no ocupada. Es decir, una molécula en que uno de los átomos presenta una valencia de una unidad menor que la normal. En un radical libre el carbono aparece como trivalente en vez de tetravalente, el nitrógeno como divalente en vez de trivalente, el oxígeno como monovalente en vez de divalente.

La mayoría de las moléculas tiene un número par de electrones: el enlace químico o valencia, que mantiene unidos dos átomos consiste en un par de electrones compartidos por los dos átomos; la valencia libre; de los radicales libres, consiste de un electrón no compartido y se presenta por un punto en la fórmula (O_2^- , $(C_6H_5)_3C^\bullet$).

La presencia de uno o más electrones no apareados confiere a la especie química una alta reactividad. Los radicales libres se pueden producir por factores endógenos y exógenos, pero en el organismo vivo, las fuentes más importantes son las reacciones bioquímicas de óxido reducción univalentes en las que interviene el oxígeno.

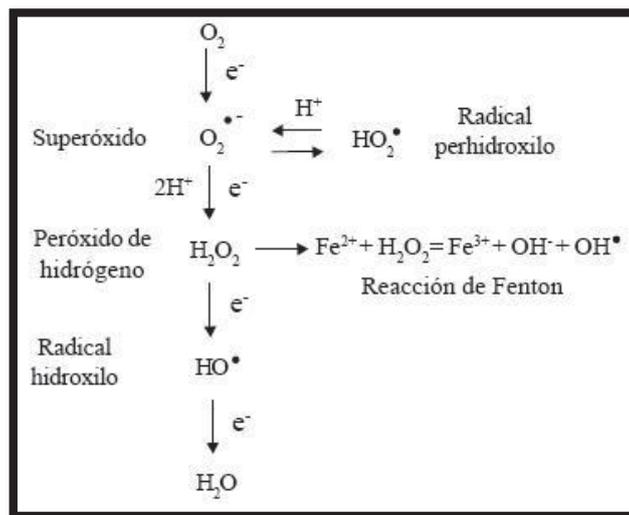
Los organismos aeróbicos están constantemente expuestos a los radicales de oxígeno y oxidantes relacionados. Los compuestos antioxidantes y enzimas de defensa remueven la mayor parte de los radicales oxidantes dañinos, sin embargo puede ocurrir daño a las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos de la célula en condiciones fisiológicas. Los radicales libres pueden inducir enlaces cruzados en el DNA que pueden generar mutaciones somáticas, productos defectuosos de los genes y cambios malignos. La peroxidación de los lípidos de las membranas puede conducir a una pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de los organelos intracelulares. La oxidación de proteínas y carbohidratos puede producir enlaces cruzados y fragmentaciones con detrimento en las funciones. Para algunas biomoléculas puede ser importante la reparación por el proceso de reducción de los compuestos celulares (reparación directa); sin embargo, en la mayoría de los casos los elementos alterados son sometidos a la degradación enzimática por proteasas, lipasas y nucleasas para su eliminación y se conservan los elementos no dañados para su reutilización. (Reparación indirecta) (36).

2.5.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Se denominan especies reactivas de oxígeno a moléculas más complejas que pueden tener oxígeno o no en la parte reactiva y en ocasiones pueden resultar aún más reactivas que los mismos radicales libres del oxígeno (34).

Las especies reactivas de oxígeno se están produciendo continuamente en los sistemas biológicos. Muchas de ellos son productos intermedios en diferentes reacciones enzimáticas y algunas resultan beneficiosas para el organismo. Por ejemplo, la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa están implicadas en la destrucción fagocítica de bacterias mediante la producción de O_2^- , OH y oxígeno singlete. La reducción del oxígeno molecular en agua es un proceso permanente en nuestro organismo que generan radicales libres, el oxígeno al tener en su molécula dos electrones no apareados es un radical libre. La captación de un electrón por el oxígeno lo transforma en superóxido, la unión de dos moléculas de superóxido junto a dos protones permite la transformación de estos en peróxido de hidrógeno y oxígeno. La captación de dos electrones y dos protones por el oxígeno lo transforma en peróxido de hidrogeno. Por último, la captación de cuatro electrones y cuatro protones permite la transformación del oxígeno en dos moléculas de H_2O (39) (45).

Figura 2: Química de las especies reactivas de Oxígeno (ERO)



Fuente: Desikan et al, 2005 (46)

2.5.3 Formación de los Radicales Libres y Especies Reactivas

Los radicales libres pueden formarse a partir de moléculas estables mediante los procesos de fisión homolítica y reacciones de transferencia de electrones.

Dichas reacciones se generan mediante:

1. Absorción de energía ionizante de contenido energético diverso, como son los casos de la radiación ionizante, ultravioleta, visible y térmica.

2. Reacciones Redox como la transferencia no enzimática de electrones en el caso de reacciones catalizadas por metales de transición.
3. Reacciones catalizadas por enzimas de manera destacada las que conllevan la formación de algunas especies reactivas del oxígeno como en el caso de la formación de peróxido de hidrógeno como es el caso de la formación de peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa.
4. Las radiaciones ionizantes pueden generar gran variedad de radicales libres al interactuar con la materia orgánica entre ellos el hidrógeno atómico $H\cdot$, el radical hidroxilo $\cdot OH$ y los electrones. Por otra parte, la emisión de radiación ultravioleta de longitud de onda de alrededor de 300 nm posee suficiente energía para dar lugar a la homólisis del enlace C-C y generar radicales libres. Además, la radiación ultravioleta de relativamente baja energía puede generar radicales libres por la intervención de determinadas moléculas sensibilizantes.
5. La energía térmica puede generar radicales libres, es así que la materia orgánica al ser expuesta a altas temperaturas e incrementar la energía cinética de las moléculas produce mezclas complejas de radicales (34).

En diversos organismos se han demostrado ampliamente el contenido de radicales libres, así como la inducción de su producción, por los plaguicidas, varios solventes orgánicos, el humo del cigarrillo y por la atmósfera contaminada con hidrocarburos, ozono, bióxido de nitrógeno, etc.

Otras importantes fuentes de producción de radicales libres se originan en el catabolismo de diversos compuestos como fármacos y metabolitos. Tal es el caso del radical triclorometilo, un catabolito del tetracloruro de carbono considerado como fármacos y metabolitos. Tal es el caso del radical triclorometilo, un metabolito del tetracloruro de carbono considerado como la molécula que produce la hepatotoxicidad de este.

Como se mencionó, los radicales libres pueden formarse también a partir de reacciones de oxidorreducción. De hecho, el oxígeno utilizado por los organismos aerobios se reduce hasta agua mediante diversos sistemas de transporte de electrones, los cuales incluyen el sistema de coenzimas y citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial que no tiene una eficiencia total y permite que parte de oxígeno escape sin formar agua para dar lugar a la formación de anión superóxido (O_2^-) (34).

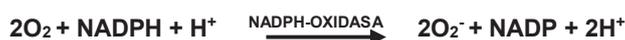
2.5.4 Factores que predisponen la formación de radicales Libres

Entre estos se encuentran (34):

1. La radiación ionizante (ultravioleta, visible y térmica)
2. Excesiva disponibilidad de metales de transición.
3. Efectos adversos de fármacos y de compuestos químicos tóxicos.
4. Exceso de oxígeno o aumento de su concentración (isquemia-reperusión)
5. El estrés oxidativo (causado por diversos estados patológicos o deficiencia de concentración de antioxidantes).
6. Excesiva leucocitosis o incremento de la fagocitosis en el sitio del daño.
7. Activación de metabolismo de ácido araquidónico.
8. Rotura o liberación del grupo hem (eritrocitos), con liberación de hierro (hemólisis).
9. Disminución de la capacidad antioxidante enzimática (desnutrición).

2.5.5 Metabolismo de los Radicales Libres y las Especies Reactivas

En la membrana de las células fagocíticas se localiza un complejo enzimático denominado sistema NADPH-oxidasa que cataliza una serie de reacciones destinadas a la producción de especies moleculares del oxígeno, las cuales poseen poder germicida (hace tiempo se denominó a esta capacidad “estallido respiratorio” debido a que los leucocitos incrementan el contenido de oxígeno en respuesta a diversos estímulos). Éstas también constituyen reacciones de oxidorreducción en las que se generan radicales libres (34):



En el citoplasma del fagocito también existe la enzima inducible superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la depuración de la reactividad de este radical libre al producir peróxido de hidrógeno, lo cual se ejemplifica en la siguiente reacción:

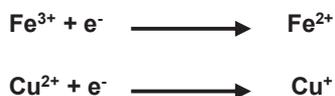


Debido a la presencia de una tercera enzima vinculada con estos procesos, la mieloperoxidasa del fagocito, se llevan a cabo las siguientes reacciones:



Es importante hacer notar cómo la mieloperoxidasa utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrogeno para transformar los halogenuros en hipohalogenuros; éstos a su vez pueden formar singlete de oxígeno (1O_2), otra especie sumamente reactiva del oxígeno.

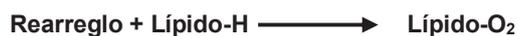
Varios metales de transición como el hierro en sus estados de oxidorreducción férrico y ferroso (3^+ y 2^+), así como el cobre en sus estados cuproso y cúprico (1^+ y 2^+) son capaces de cambiar sus estados de oxidación al intervenir en reacciones de transferencia electrónica univalente (34).



La lipoperoxidación es un proceso metabólico celular que comienza con el ataque de una molécula reactiva, a los dobles enlaces de los ácidos grasos no saturados con la consiguiente sustracción de un átomo de hidrógeno:



El átomo de carbono transformado en un radical dentro del ácido graso tiende a estabilizarse mediante un rearrreglo molecular para producir un dieno conjugado. Este tiende a reaccionar rápidamente con el O_2 , para dar lugar el radical peroxilo (Lípido- O_2) (34).



Los radicales peroxilo también pueden extraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos y con esto producir la reacción en cadena de la peroxidación lipídica; al hacerlo se forma a su vez un hidroperóxido (Lípido-OOH):



En el caso de la oxidación de las proteínas se ha observado que las células expuestas a la acción de los radicales oxidantes experimentan una violenta proteólisis. Las proteínas purificadas expuestas a los radicales libres de oxígeno experimentan una gran variedad de cambios: cambios en el punto isoeléctrico por modificaciones de los grupos R de los aminoácidos, incremento del peso molecular por formación de asociaciones intermoleculares covalentes o hidrofóbicas; también puede ocurrir disminución del peso molecular por ruptura del esqueleto peptídico (36).

El daño oxidativo también afecta a las moléculas de los ácidos ribo y desoxirribonucleicos ya que estos son susceptibles al daño oxidativo, es así que en el DNA los daños que ocurren son la ruptura de la cadena (simple o doble), entrecruzamiento de enlaces DNA-DNA y DNA-proteína y modificaciones en la bases (36).

Finalmente, la oxidación de los carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas modificando su carga y su estructura (34).

2.5.6 Principales Especies Reactivas de Oxígeno

a. Oxígeno Singlete (1O_2)

La molécula de oxígeno puede ser calificada biradical puesto que tiene un electrón desapareado y cada uno de sus orbitales externos antienlazantes π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es baja porque los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el oxígeno molecular aumente su reactividad ha de invertirse el espín de unos de los electrones de sus orbitales externos o bien ha de sufrir una reacción secuencial y univalente para producir radicales libres de oxígeno. Mediante un impulso de energía se puede producir la inversión de los electrones de los orbitales externos del oxígeno molecular y se originan el oxígeno singlete (39).

Existen dos tipos de oxígeno: el oxígeno singlete ($^1\Delta_g O_2$) que, debido a su larga semivida, es el de mayor importancia biológica y el oxígeno singlete sigma ($1\Sigma_g^+$), más reactivo que la anterior, pero de corta vida media porque rápidamente decae al estado delta (39).

b. Anión Superóxido (O_2^-)

Se forma cuando electrón reduce la molécula de oxígeno (47). La teoría del superóxido de la toxicidad del oxígeno propone que la formación del superóxido (O_2^-) por reducción univalente del O_2 es el factor más importante de la toxicidad del oxígeno. El superóxido se genera como producto de un proceso metabólico normal de las siguientes fuentes (36):

1. Cadena mitocondrial de transporte de electrones escape de electrones a nivel del complejo NADH-coenzima Q reductasa y la coenzima Q:



2. Autoxidación de la hemoglobina:



3. Retículo endoplasmático: formación de O_2^- por oxidación de sustratos endógenos y exógenos.
4. Autoxidación de pequeñas moléculas como la adrenalina, tetra-hidrobiopterina, tioles, FMN y FAD

5. Acción enzimática como por ejemplo la xantina oxidasa:



6. Eclosión respiratoria de fagocitos:



c. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno H_2O_2 se forma en soluciones acuosas por reacciones de dismutación en la cual hay una reducción divalente del oxígeno, la reacción es lenta y es catalizada in vivo por la superóxido dismutasa (34).

Esta especie química es muy reactiva, el superóxido (O_2^-) es muy inestable en soluciones acuosas y reacciona consigo mismo para producir (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) mediante una reacción de dismutación:



d. Radical Hidroxilo (OH^\cdot)

Este radical se origina cuando el H_2O_2 no es removido por la catalasa o la glutatión peroxidasa y reacciona con el O_2^- en un proceso de reducción trivalente en presencia de iones metálicos, el radical es latamente dañino (36).



Una fuente importante de radicales hidroxilos es la reacción de Haber-Weiss que es a su vez el balance de dos reacciones, la segunda de las cuales es la de Fenton. Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular con cuatro protones origina dos moléculas de agua (39).



2.5.7 Radicales Libres en Fisiopatología

Las afecciones vinculadas con el daño debido a los radicales libres se interaccionan estrechamente con la naturaleza de las reacciones en las que intervienen tales radicales libres y moléculas con las cuales interaccionan éstos. Esta constituye la razón de que

se encuentren involucrados en la causa de numerosos padecimientos. Algunos estados clínicos y padecimientos vinculados con la intervención de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno se presentan a continuación (34):

1. Inflamación y padecimientos inmunitarios: glomerulonefritis (idiopática, membranosa), vasculitis (hepatitis B, drogas), enfermedades autoinmunes y artritis reumatoide.
2. Estados de isquemia y reperfusión: embolia-infarto de miocardio, arritmias, rechazo de transplantes, inflamación de las articulaciones, daño por congelación.
3. Reacciones inducidas por fármacos y toxinas: sobrecarga de hierro, talasemia y otras anemias crónicas, deficiencias nutricionales y alcoholismo.
4. Daño por radiación, exposición nuclear y accidental, radioterapia y sensibilización celular a hipoxia.
5. Cambios vinculados con los eritrocitos: intoxicación por plomo, paludismo, hemólisis de cualquier origen, anemia hemolítica del prematuro.
6. Envejecimiento: trastornos propios del envejecimiento prematuro.
7. Trastornos neurológicos: efectos del humo del cigarrillo, enfisema pulmonar, oxidaciones derivadas de la contaminación, algunas variantes del síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva tipo adulto.
8. Anomalías del sistema vascular y corazón: cardiopatía alcohólica, arterioesclerosis.
9. Trastornos nefrológicos: síndrome nefrótico autoinmunitario, nefrotoxicidad de los aminoglucósidos y nefrotoxicidad de los metales pesados (Plomo, Cadmio, Mercurio).
10. Alteraciones de las vías gastrointestinales: lesión endotóxica del hígado. Lesión hepática por hidrocarburos halogenados (p. ej. Bromobenceno, tetracloruro de carbono, halotano), pancreatitis, lesiones gastrointestinales inducidas por antiinflamatorios no esteroideos.
11. Trastornos cerebrales del sistema nervioso y neuromusculares: Oxígeno hiperbárico, deficiencia de vitamina E, neurotoxinas, enfermedad de Párkinson, lesión cerebrovascular hipertensiva.
12. Padecimientos oftalmológicos: cataratas, daño degenerativo de la retina.
13. Trastornos tegumentarios: lesiones por radiación solar, lesiones por calor, dermatitis por contacto.

2.6 Métodos de la Evaluación de la Actividad Antioxidante

Consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de la naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (2,2-azinobis (ácido

3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o ABTS, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo o DPPH), son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (48).

2.6.1 Método ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

El método ABTS es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante de un material biológico, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica. Es el más indicado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos coloreados, como en el caso de las antocianinas, por presentar una absorbancia máxima próxima a la región infrarroja (754nm), reduciendo así, las posibilidades de interferencias de compuestos colorados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de reacciones secundarias (48).

2.6.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Willams DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre durante la molécula como un todo, de modo que las moléculas no dimerisen, como sería el caso con la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a que el color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol centrada en aproximadamente 517 nm (48).

2.6.3 Método DMPD

Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por FOGLIANO. Este se basa en añadir 1 mL de la disolución de DMPDb100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD•). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ($\pm 0,1$), a 506 nm. Se añade 50 μ L de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o μ M) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g). (48)

2.7 Antibacterianos

Los antibacterianos son compuestos químicos capaces de inhibir microorganismos sensibles o causarles la muerte. Originalmente, se consideraron antibióticos los antimicrobianos producidos por organismos vivos, mientras que los obtenidos mediante síntesis química se consideraban quimioterápicos. Sin embargo, hoy en día estos dos términos se consideran sinónimos y se utilizan en forma intercambiable (49).

2.7.1 Características Generales de los Antibacterianos

Un agente antibacteriano debe tener toxicidad selectiva: debe destruir o inhibir al patógeno microbiano causando el menor daño posible al huésped, el espectro de eficacia de los fármacos varía considerablemente: muchos son fármacos de espectro reducido, es decir, tan solo son eficaces contra una gama limitada de patógenos, otros son fármacos de amplio espectro que atacan muchos tipos distintos de patógenos. Los fármacos también pueden clasificarse en función del grupo microbiano general sobre el que actúan: antibacterianos, antifúngicos, anti protozoarios y antivíricos (49)

2.7.2 Efectos de los Agentes Antimicrobianos sobre el Crecimiento Bacteriano

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. (49) (50)

b. Quimioterápicos

Son agentes químicos antibacterianos, producidos en forma sintética o semisintética en el laboratorio bioquímico farmacológico. (49) (50)

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 porque las bacterias cuyo crecimiento se inhibe morirán con el tiempo o bien serán atacadas por los mecanismos de defensa del huésped. (49) (50)

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. (49) (50)

2.7.3 Modo y Mecanismo de Acción de los Antimicrobianos

a. Inhibición de la síntesis de la pared celular

La pared celular rígida de todas las bacterias, salvo los mico plasmas mantiene su integridad cuando infectan al hombre, ya que son microorganismos hiperosmolares con respecto a los tejidos y al líquido 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 celular es un mucopéptido (peptidoglucano) cuya 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 líquido en el interior, estalla y se lisa. Las penicilinas, cefalosporinas y vancomicina actúan así. (49) (51)

b. Lesión de la pared celular

El citoplasma de todo ser viviente está 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. (50)

c. Inhibición de la síntesis proteica o de los ácidos nucleicos

Los antibióticos pueden inhibir la síntesis proteica bacteriana, generalmente en forma reversible de las siguientes maneras:

- **Por inhibición selectiva de la síntesis o replicación del DNA bacteriano:** Así actúan el ácido nalidíxico y sus análogos, la griseofulvina, el metronidazol y otros
- **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 rifampicinas.
- **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:

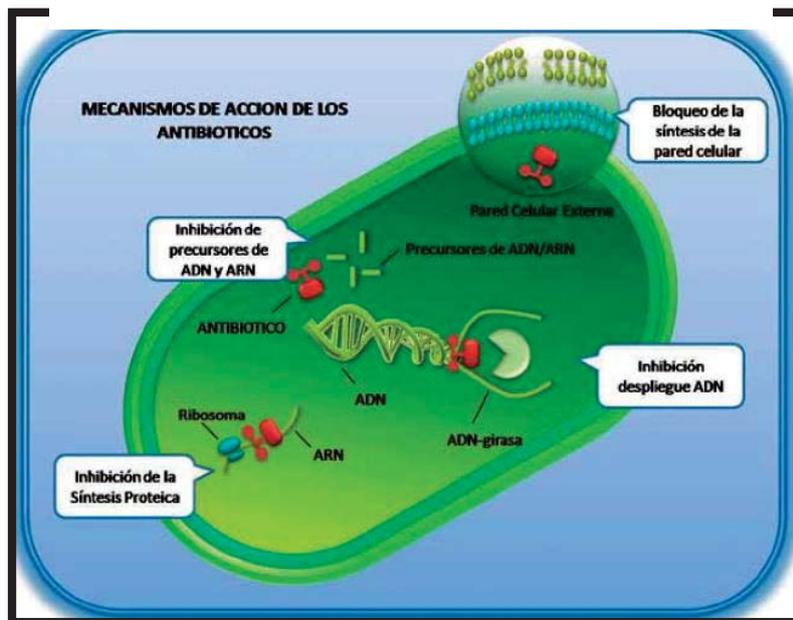
Inhibición de la subunidad 30S: Así actúan los aminoglucósidos, las tetraciclinas y la espectinomicina.

Inhibición de la subunidad ribosomal 50S: Así actúan el cloranfenicol y derivados, los macrólidos, los azúcares complejos, la espiramicina y la virginiamicina entre otros, fijación a enzimas virales esenciales para a síntesis del DNA impidiendo la replicación viral, así actúan el aciclovir, la vidaravina.

Inhibición de la síntesis del ácido fólico bacteriano: Los agentes que actúan por este mecanismo no son antibióticos no son antibióticos si no 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 tetroxoprima, la pirimetamina y las sulfonas. Los tetrahidrofolatos que se forman finalmente a partir de 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, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, etc.) pueden inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias actuando sobre ribosomas y de esta forma la vida de la bacteria queda bloqueada. (50)

Figura 3: Blancos de algunos Agentes Antimicrobianos



Fuente: Pinilla G., 2012 (52)

2.7.4 Medición de la Actividad Antimicrobiana

1. Método de Difusión en Agar

Mediante este sistema se prueba la eficacia de varios antibióticos a partir de una siembra de una 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 crea así las 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 valora los halos por patrones obtenidos de tal forma que se hayan correlacionado la CMI y el halo de inhibición de un número amplio de cepas, los resultados se representan en un sistema de coordenadas, se traza la recta 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. (53)

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. (54)

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 difusión en agar. (53)

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 CIM utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0.016 µg/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. (53)

5. Métodos automatizados

En este método existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de la susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. 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. (54)

2.7.5 Interpretación del Antibiograma

- a. **Susceptible:** Significa que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado. (53)
- 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 está localizada en sitios donde el fármaco es fisiológicamente concentrado (quinolonas en vías urinarias) o cuando pueden ser usadas altas dosis (ejemplo Penicilinas). (53)
- c. **Resistente:** Significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico. (53)

2.7.5.1 Criterios de Toda y Col

Para definir el tipo de actividad antimicrobiana, se utilizan generalmente, los criterios expuestos por Toda y Col (1994). (55)

Tabla 2: Criterios de Actividad Antimicrobiana atendiendo al halo de inhibición

Actividad	Halo de Inhibición (mm)
Marcada	≥ 16
Moderada	$16 < \text{halo} < 12$
Ligera	$12 < \text{halo} < 8$
No actividad	< 8

Fuente: Toda y Col (1994) (55)

2.7.6 Control Microbiológico

Los criterios para el control microbiológico recomendados por la Organización Mundial de la salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) son los siguientes. (56)

- Criterio Imperativo
- Criterio Indicativo de Higiene
- Criterio de Alerta o Límites Críticos

Cuadro 2: Criterios de Control Microbiológico

Criterios	Peso Exacto	Bacterias	Cantidad Permissible
Criterio Imperativo: Este microorganismo no debe presentarse. La presencia de este indica un riesgo elevado.	10 g	Salmonella	Ausente
Criterio Indicativo de Higiene: La presencia 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 mesófilos • Hongos y levaduras 	<ul style="list-style-type: none"> • 10⁴-10⁵ ufc/g • 10²-10³ ufc/g

Legenda: UFC: Unidades Formadoras de Colonia

Fuente: Vallenas J., 2010 (57)

2.8 Bacteria en estudio: *Staphylococcus aureus*

2.8.1 Género Estafilococos

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos gram positivos 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 plasmacoagula positivos, característicamente *S. aureus* o Estafilococo dorado, y plasmacoagula negativos o *S. Albus*, entre los que se distinguen varias especies. (58)

2.8.2 Clasificación del Género Estafilococos

Dentro de este género se puede distinguir las siguientes especies: (59)

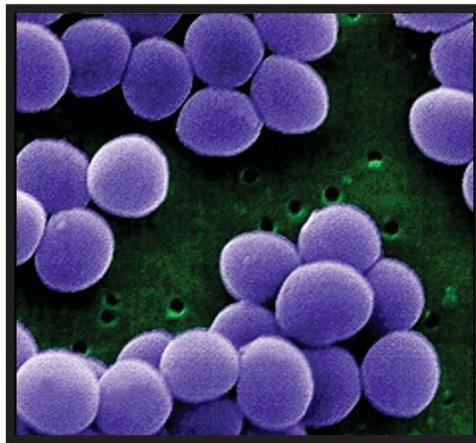
- Estafilococos aureus
- Estafilococos epidermidis
- Estafilococos saprophyticus

a. Estafilococos aureus

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

Es la especie más 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. (60)

Figura 4: Colonias de *Staphylococcus aureus*



Fuente: Public Health Image Library, 2012 (61)

- **Taxonomía**

La familia ***Micrococcaceae*** comprende cocos Gram positivos, no exigentes catalasa positivos, con agrupación, con agrupación en racimos, aerobios o anaerobios facultativos. De los tres géneros que la integran ***Miccrococcus*, *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. (60)

- **División Taxonómica** (59) (62)

Reino: Procariota

División: Bacterias

Sección: Cocos gram positivos

Clase: Escotobacterias

Orden: Eubacteriales

Familia: Micrococcaceae

Género: Estafilococos

Especie: aureus

- **Fisiología**

Son cocos gram positivos, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos habitualmente están dispuestos en pares irregulares, no forman esporas y tienen un tamaño de 0.5 µm a 2 µm. (63)

- a. Catalasa: La diferencia de los estreptococos catalasa-negativos se basa en la descomposición catalítica de H₂O₂ en presencia de Fe³⁺
- 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 coágulo de fibrina en ausencia de Ca²⁺.
- 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**

S. aureus es un microorganismo especialmente capacitado para producir infecciones supuradas locales 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*. (64)

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 de Shock tóxico. (64)

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. (64)

- **Clínica**

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. (63)

Las infecciones locales son particularmente importantes a nivel de la piel y de los anejos cutáneos. Son típicos diversos piodermas como la 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 *Estafilococcus aureus* también puede resultar de la contaminación directa de una herida, por ejm. Infección de las heridas post operatorias o infección después de traumatismos (fracturas abiertas, meningitis después de la fractura de cráneo). (65)

Si el *Estafilococcus* sobrevive puede producir bacteremia, puede producir endocarditis, osteomielitis hematógena aguda, meningitis o infección pulmonar. (54)

- **Tratamiento**

Debido a la alta resistencia que ofrece el *Estafilococo* sobre todo a nivel intrahospitalario, se debe usar penicilinas resistentes a las penicilinas (metecilina, axaciclina, nafcilina, dicloxacilina), cefaslosporinas (cefalotina, cefazolina, cefalexina y de tercera

generación), gentamicina, eritromicina, vancomicina, lincomicina, clindamicina debido a que la mayoría de las cepas son sensibles. (59) (66)

- **Epidemiología**

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. (67)

2.8.3 Crecimiento Microbiano

2.8.3.1 Fisiología del Crecimiento Microbiano

Se entiende por crecimiento al 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 el resultado del crecimiento continuo de la población. La tasa de crecimiento es una medida de la modificación de los números de células o de la masa celular en una unidad de tiempo. (68) (69)

2.8.3.2 Nutrición Microbiana

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. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo son específicos. (68)

2.8.3.3 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se usan en el 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 exacta de un medio nos es importante. (69)

2.8.3.4 Cultivo de Microorganismos en el Laboratorio

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 tratará de un cultivo enéxico o puro, esto es, de un cultivo que contiene sólo un púnico tipo de microorganismo. Para mantener un cultivo enéxico o puro es esencial evitar la entrada de otros microorganismos. 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. (70)

2.8.3.5 Medición del Crecimiento Microbiano

El cálculo del número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopía, número de colonias), masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular, turbidimetría) 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. (62)

Tabla 3: Métodos de Medición del Crecimiento Microbiano

Métodos Directos	Métodos Indirectos
Recuento del número de células en una cámara de toma	Recuento de colonias en placa
Peso seco celular	Recuento sobre el 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

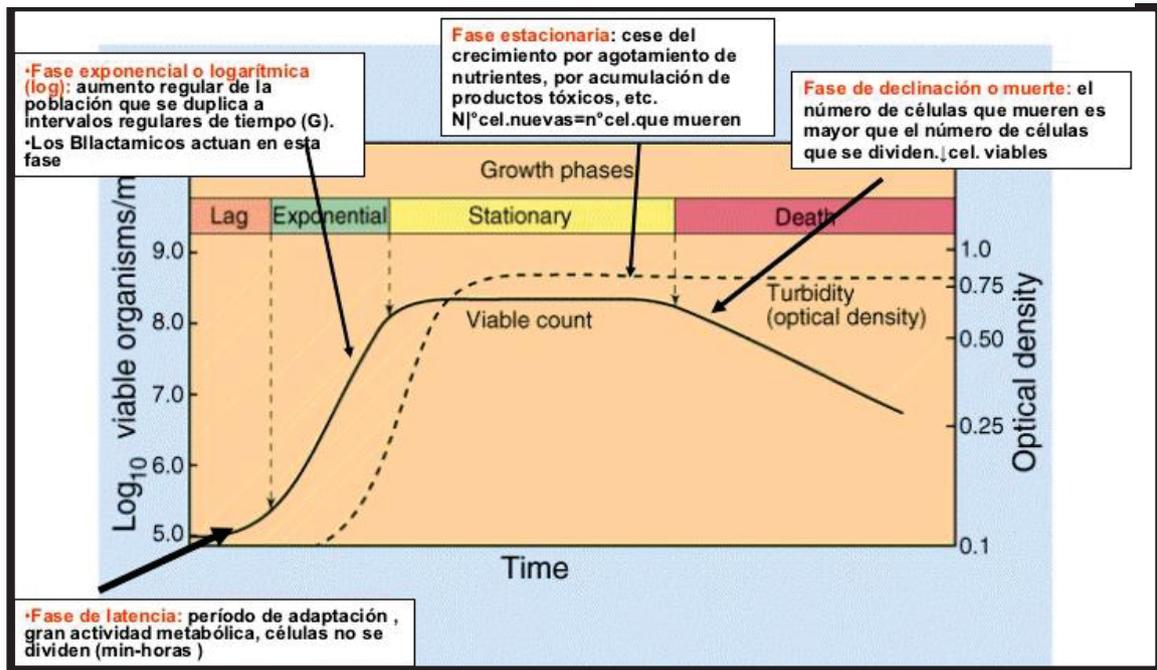
Fuente: Lastra J. et al, 2009 (71)

2.8.3.6 Curva de Crecimiento Microbiano

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 es un “sistema cerrado” de este tipo está sometido a las leyes que son válidas para los organismos uni y pluricelulares. En la práctica la curva representa 4 fases: (50)

Figura 5: Curva de Crecimiento Microbiano en un cultivo discontinuo



Fuente: Sanchez I., 2012 (72)

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 fase de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante la 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 esta 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 es 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.

2.9 Descripción de los Fármacos usados como Patrones Comparativos en el presente Estudio

2.9.1 Penicilina G

Es un antibiótico para uso parenteral producido por el *Penicillium chrysogenum*. La penicilina G es un agente de elección para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus*, *S. pneumoniae* o enterococo, aunque están aumentando en todo el mundo las cepas resistentes. Muchos organismos son susceptibles a la penicilina G entre los gérmenes aerobios Gram-positivos se encuentran la mayoría de los estreptococos incluyendo los enterococos, muchas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Bacillus anthracis*; *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus epidermidis* son resistentes a la penicilina G así como las bacterias Gram-negativas. (73)

A. Mecanismo de Acción

Es un antibiótico beta-lactámico de acción principalmente bactericida inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión a determinadas proteínas de la pared celular. Estas proteínas de unión son responsables de varios pasos diferentes en la síntesis de la pared de la célula y poder formar estas proteínas. Como todos los antibióticos beta-lactámicos, la capacidad de la penicilina G para interferir con la síntesis de la pared es la que conduce en última instancia a la lisis celular, lisis que está mediada por enzimas autolíticas de la pared celular (es decir autolisinas). (73)

B. Farmacocinética

Penicilina G potásica o sódica: Las farmacocinéticas de la penicilina G sódica y penicilina G potásica por vía parenteral son iguales. Las concentraciones máximas se producen a los 15-30 minutos después de una dosis intramuscular. La administración

de una dosis única IM de 600.000 o 1 millón de unidades se produce un pico de concentración en suero de 6-8 mg/mL, respectivamente. Después de infusiones intravenosas intermitentes de 2 millones de unidades cada 2 horas o 3 millones de unidades cada 3 horas, las concentraciones séricas de penicilina G alcanzan un valor de 20 mg/mL.

Aproximadamente el 46-65% del fármaco circulante está unido a proteínas del plasma, principalmente a la albúmina. La penicilina G se distribuye en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, incluyendo pulmón, hígado, hueso, riñón muscular, esputo, bilis, orina y líquido peritoneal, pleural y sinovial. También penetra en las meninges inflamadas y alcanza niveles terapéuticos en el LCR.

La penicilina G potásica o sódica penetra en la cavidad peritoneal después de la instilación local.

Entre el 15-30% de una dosis IM de penicilina G se metaboliza a derivados inactivados. El fármaco se excreta en la orina principalmente a través de la secreción tubular. Un pequeño porcentaje se excreta en las heces, bilis y la leche materna. En pacientes con función renal normal, la semi-vida de eliminación de la penicilina G es 20-30 minutos, aumentando a medida que disminuye la función renal. Las dosis deben ajustarse en consecuencia. La penicilina G se elimina por hemodiálisis. (73)

C. Indicaciones

Para el tratamiento de infecciones graves causadas por microorganismos sensibles como la pericarditis, la listeriosis, infecciones de las vías respiratorias bajas (por ejemplo, neumonía), infecciones de piel y estructura de la piel, gangrena gaseosa, erisipela, ántrax, bacteriemia o septicemia e infecciones intraabdominales.

Tratamiento de infecciones del tracto respiratorio producidas por anaerobios (por ejemplo, neumonía, absceso pulmonar) tratamiento de la endocarditis por *S. viridians* y *Streptococcus bovis* (CIM < 0.1 g/mL susceptibles a la penicilina). (73)

D. Contraindicaciones

Pacientes con enfermedad o insuficiencia renal, pacientes con hipersensibilidad a cefalosporinas e imipenem. (73)

E. Reacciones Secundarias y Adversas

Como con otras penicilinas, son probables reacciones alérgicas, particularmente en individuos que han previamente demostrado hipersensibilidad a las penicilinas o en aquellos con antecedentes de alergia, asma, rinitis alérgica o urticaria. (73)

Los siguientes efectos adversos han sido reportados con penicilina parenteral G:

Generales: reacciones de hipersensibilidad, incluyendo los siguientes:

Erupciones de piel (rash macopapular a dermatitis exfoliativa), urticaria, edema laríngeo, fiebre, eosinofilia, reacciones del tipo enfermedad del suero (incluyendo escalofríos, fiebre, edema, artralgias y postración); y anafilaxis y muerte

Gastrointestinales: Colitis Pseudomenbranosa, los síntomas de colitis pseudomenbranosa pueden ocurrir durante o después del tratamiento antibacterial.

Neurológica: Neuropatía

Urogenital: Nefropatía

F. Precauciones

Precaución en pacientes con enfermedad gastrointestinal, la penicilina G benzatina y G procaína deben ser administradas solo por vía IM. (73)

G. Interacciones

El probenecid inhibe la secreción tubular renal de la penicilina G, causando niveles séricos más altos y prolongados del antibiótico. En general interacción farmacocinética no es perjudicial y el probenecid a menudo se administra en combinación con penicilina G para aumentar su actividad.

El uso concomitante de la penicilina G con aminoglucósidos proporciona una actividad sinérgica frente a enterococos. Sin embargo estos antibióticos no deben ser mezclados entre sí, debido a que son química y físicamente incompatibles y se desactivan cuando se mezclan. También es posible que la formación de complejos in vivo, si se administran grandes dosis de penicilina a pacientes con insuficiencia renal.

La penicilina G en grandes dosis inhibe la secreción tubular renal de metotrexato, causando niveles séricos de metotrexato más altos y prolongados.

El uso concomitante de la penicilina parenteral G potásica con diuréticos ahorradores de potasio, medicamentos que contengan potasio o sales de potasio puede provocar hiperpotasemia. (73)

H. Dosis y Vía de Administración

En adultos: 2-24 millones de unidades/día IV en 4-12 dosis divididas, dependiendo de la infección.

La vía IM no se recomienda (muy dolorosa); usar la forma de sal benzatina o procaina.

En niños: Mayores de 1 mes 100.000-300.000 unidades/Kg/día vía IV (preferiblemente) o IM en 4-6 dosis divididas. (73)

2.9.2 Doxiciclina

La doxiciclina es un antibiótico tetraciclínico de larga duración derivado de la oxitetraciclina, siendo posible su administración en forma de una sola dosis al día. En la práctica diaria, la doxiciclina se utiliza para tratar las uretritis gonocócicas, cervicitis, infecciones bronquiales en pacientes con enfermedades obstructivas respiratorias crónicas y otras infecciones. La doxiciclina es considerada como la tetraciclina de elección en los pacientes con una disfunción renal deteriorada.

- **Mecanismo de Acción**

La doxiciclina es bacteriostática frente a una gran variedad de microorganismos tanto gram-positivos como gram-negativos. En las bacterias gram-negativas, el transporte del fármaco al interior de la célula tiene lugar por difusión pasiva pero también mediante un sistema de transporte activo ATP-dependiente. Se cree que este sistema también está presente en las bacterias gram-positivas. Al ser la doxiciclina y la minociclina más lipófilas que otras tetraciclinas, el paso al interior de las bacterias es más fácil. Una vez dentro de la célula, estos antibióticos se fijan a las subunidades ribosómicas 30S, con lo que se bloquea la unión del aminoacil-RNA de transferencia al RNA mensajero. De esta manera, las tetraciclinas bloquean la síntesis de proteínas impidiendo en definitiva el desarrollo bacteriano. En dosis muy elevadas, las tetraciclinas también pueden bloquear la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos, pero estas carecen de los sistemas de transporte activo de las bacterias. La resistencia se produce cuando las bacterias experimentan mutaciones que hacen que su pared celular sea menos permeable. La resistencia bacteriana es cruzada para todas las tetraciclinas con la excepción de la minociclina. (49)

- **Indicaciones Terapéuticas**

ORL, dental, respiratoria, gastrointestinal, genitourinaria, de piel y tejido blando, brucelosis (con estreptomomicina), psitacosis, pre y postoperatorio de intervenciones con alto riesgo de infección, uretritis, cervicitis y proctitis no gonocócicas no complicadas, linfogranuloma venéreo, granuloma inguinal, EPI, sífilis en alérgicos a penicilina: estadio 1ario y 2ario, tardía y latente, orquiepididimitis aguda, tracoma, conjuntivitis de inclusión, neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, infección por rickettsias, cólera, estadios 1 y 2 de enfermedad de Lyme, fiebre recurrente por piojos y

garrapatas, Tratamiento de Malaria por *P. falciparum* resistente a cloroquina. tratamiento alternativo en: carbunco, tularemia, listeriosis, bartonelosis, actinomicosis, profilaxis de malaria por *P. falciparum* en áreas con resistencia a mefloquina o cloroquina; post-exposición a *B. anthracis* (alternativo a quinolonas), acné vulgar, tratamiento. coadyuvante de acné vulgar grave y de la rosácea. (49)

- **Reacciones Adversas**

Nasofaringitis, sinusitis, infección fúngica; ansiedad; cefalea sinusoidal; hipertensión; diarrea, dolor abdominal superior, boca seca; dolor de espalda; dolor en el lugar de inyectable; ASAT, presión sanguínea, LDH en sangre y glucosa en sangre elevadas. (49)

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales Biológicos

Material Botánico:

- Especie Vegetal: *Caioophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”: partes aéreas (tallos, hojas y flores)

Cepas de Experimentación:

- Cepas ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*
- Cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*

3.2 Materiales e Instrumentos de Laboratorio

3.2.1 Material de Campo

- Cúter.
- Bolsas herméticas de polietileno.
- Bolsas de papel.
- Guantes de cuero.
- Cámara fotográfica.
- Papel Kraft.
- Marcadores

3.2.2 Materiales de Vidrio

- Tubos de ensayo 5, 10 y 20 mL.
- Tubos de ensayo de 20 mL con tapa rosca.
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 200 mL.
- Frascos termo resistentes de 250 y 500 mL.
- Placas Petri.
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Baguetas.
- Probetas de 10 y 100 mL.
- Botella de vidrio color caramelo de 3 litros de capacidad.
- Embudo.
- Matraces de 250 mL.
- Goteros.

3.2.3 Instrumentos

- Mechero.

- Gradilla.
- Pissetas.
- Mortero.
- Soporte universal.
- Papel filtro.
- Aguja y asa de siembra.
- Pinzas.
- Micropipeta de 100-100 μL .
- Micropipeta de 5-50 μL .
- Calibrador digital.

3.2.4 Equipos de Laboratorio

- Autoclave Modelo LS - BSOI - 1. Pres. Max. 0.22 Mpa, T0 max. 134°C.
- Balanza analítica con una capacidad de 210 g, resolución de 0,1 mg y sensibilidad de 1 mg.
- Espectrofotómetro visible JASUGO V-630 BIO con un rango de medición de 325 nm a 1100 nm.
- Estufa Fisherbrand
- Incubadora MERD, con un rango de temperatura desde 5°C temperatura ambiente) hasta 60°C.
- Refrigeradora Coldex hasta -20°C.
- Baño María.

3.2.5 Reactivos y Solventes

- Alcohol etílico.
- Acetato de cobre
- Acetona
- Ácido clorhídrico (c)
- Ácido clorhídrico 1%
- Ácido clorhídrico 5%
- Ácido clorhídrico 0.5%
- Ácido clorhídrico 1N
- Ácido sulfúrico (c)
- Agua destilada
- Amoniaco
- Cloruro férrico al 1%

- Etanol 96%,70%, 60%, 50%, 40%.
- Hidróxido de sodio al 1%
- Hidróxido de potasio 2N
- Reactivo de Shinoda.
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Bajlet
- Reactivo de Fehling A y B

3.2.6 Medios de cultivo para activación de *Staphylococcus aureus* y su Respectivo

Antibiograma.

- Agar Muller Hinton MERCK®
- Agar Tripticasa Soja MERCK®
- Caldo Brain Heart Infusion (BHI) MERCK®

3.2.7 Reactivos para la Determinación de la Actividad Antioxidante

- Reactivo DPPH CALBIOCHEM®
- Ácido ascórbico MERCK®
- Etanol absoluto

3.2.8 Fármacos empleados como Patrón

- Penicilina G frasco vial 1M UI
- Doxiciclina 100mg

3.2.9 Otros Materiales

- Cuchillos.
- Cronómetro.
- Cámara fotográfica.
- Guantes quirúrgicos descartables.
- Mascarillas.
- Gorros.
- Mandil.
- Tijera estéril.
- Detergente.
- Lejía.
- Marcador.
- Molino.

3.3 Diseño Metodológico

3.3.1 Tipo de Estudio

3.3.1.1 Tipo de Investigación

El presente estudio es de tipo cuasiexperimental.

3.3.2 Diseño de la Investigación

El diseño es cuasiexperimental con post prueba únicamente y grupo control.

3.3.3 Ensayo de la Actividad Antioxidante

G₁	X₁	O₁
G₂	X₂	O₂
G₃	X₃	O₃
G₄	X₄	O₄
G₅	X₅	O₅
G₆	X₆	O₆
G₇	X₇	O₇
G₈	--	O₈

DONDE:

G_N: Oxidante (DPPH 50 µM, radical libre que se reduce cuando reacciona con el antioxidante lo que se aprecia con el cambio de coloración)

$$G_1=G_2=G_3=G_4= G_5= G_6= G_7=G_8$$

X: Es el tratamiento con antioxidante (expresado en µg/ml del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiphora cirsiifolia C. Presl*).

$$X_1= 5 \mu\text{g/mL}$$

$$X_2= 10 \mu\text{g/mL}$$

$$X_3= 30 \mu\text{g/mL}$$

$$X_4= 50 \mu\text{g/mL}$$

$$X_5= 70 \mu\text{g/mL}$$

$$X_6= 100 \mu\text{g/mL}$$

X₇: Patrón (Ácido Ascórbico)

--: Ausencia de tratamiento

O₁, O₂, O₃, ... O₆, O₇, O₈: Medición de la absorbancia del tubo de ensayo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, después de usar X.

3.3.4 Ensayo de la Actividad Antibacteriana

Para determinar la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Cori kisa" se siguió el diseño de Post Prueba y grupo control de la siguiente manera:

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
G ₃	X ₃	O ₃
G ₄	X ₄	O ₄
G ₅	X ₅	O ₅
G ₆	X ₆	O ₆
G ₇	X ₇	O ₇
G ₈	X ₈	O ₈
G ₉	X ₉	O ₉
G ₁₀	X ₁₀	O ₁₀
G ₁₁	X ₁₁	O ₁₁
G ₁₂	X ₁₂	O ₁₂
G ₁₃	X ₁₃	O ₁₃
G ₁₄	X ₁₄	O ₁₄
G ₁₅	X ₁₅	O ₁₅
G ₁₆	X ₁₆	O ₁₆
G ₁₇	X ₁₇	O ₁₇
G ₁₈	X ₁₈	O ₁₈
G ₁₉	--	O ₁₉

Donde:

G₁, G₂, G₃, ..., G₁₂, G₁₃, G₁₉: Cepas de *Staphylococcus aureus* que fueron sembradas en las placas Petri.

X_N: Son las diferentes concentraciones en mg/25mL del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa".

$X_1 = 0.05 \text{ mg/25mL}$

$X_2 = 0.10 \text{ mg/25mL}$

$X_3 = 0.30 \text{ mg/25mL}$

$X_4 = 0.40 \text{ mg/25mL}$

$X_5 = 0.50 \text{ mg/25mL}$

$X_6 = 0.80 \text{ mg/25mL}$

$X_7 = 1.00 \text{ mg/25mL}$

$X_8 = 1.50 \text{ mg/25mL}$

$X_9 = 2.50 \text{ mg/25mL}$

$X_{10} = 5.00 \text{ mg/25mL}$

$X_{11} = 7.50 \text{ mg/25mL}$

$X_{12} = 10.00 \text{ mg/25mL}$

$X_{13} = 12.50 \text{ mg/25mL}$

$X_{14} = 20.00 \text{ mg/25mL}$

$X_{15} = 30.00 \text{ mg/25mL}$

$X_{16} = 50.00 \text{ mg/25mL}$

- **X₁₇**: Concentración del fármaco patrón "Penicilina G".
- **X₁₈**: Concentración del fármaco patrón "Doxiciclina".
- --: Solución que será usado como blanco.
- **O₁, O₂, O₃, ..., O₁₆**: Observación y medición de los halos de inhibición que se observarán.
- **O₁₇, O₁₈**: Observación de los halos de inhibición representada por el grupo del fármaco patrón.
- **O₁₉**: Observación de los halos de inhibición representada por el grupo control.

NOTA: El modelo de ensayo de la actividad antibacteriana para el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiphora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa", se aplicó de igual forma a las cepas aisladas.

3.3.5 Identificación, Definición y Operacionalización de Variables

3.3.5.1 Variables Implicadas

3.3.5.1.1 Variable Independiente

Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las partes aéreas de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”.

Definición conceptual: Se define como la cantidad de extracto obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal por maceración en contacto con etanol al 70% que fue disuelta en agua destilada. (74)

Definición Operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Razón o Proporción.
- **Instrumento de Medición:** Balanza Analítica (sensibilidad de 0.001 g)
- **Proceso de Medición:** Se procedió a pesar el extracto seco hidroalcohólico al 70% (mg) luego se realizó una dilución en agua destilada (mL) y se tomará la cantidad adecuada.
- **Expresión final:** mg/mL

3.3.5.1.2 Variables Dependientes

Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

Definición conceptual: Se basa en la capacidad de secuestrar el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta característica. (75)

Definición Operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Indirecta
- **Escala:** Razón o Proporción.
- **Instrumento de Medición:** Espectrofotómetro UV-Visible
- **Proceso de Medición:** Se produjo una coloración morada cuando se trató al extracto seco hidroalcohólico con el reactivo DPPH y fueron incubadas por media hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se midió la absorbancia en el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. El grado de decoloración de DPPH-morado a DPPH-amarillo indica la eficiencia captadora del extracto.

- **Expresión final:** Porcentaje de captación de radicales libres´

Actividad antibacteriana in Vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.

Definición conceptual: Se define como la capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural a inhibir o matar bacterias. Los antibacterianos pueden ser bacteriostáticos o bactericidas según inhiban su crecimiento o produzcan lisis de las bacterias. (76)

Definición Operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Razón o Proporción.
- **Instrumento de Medición:** Vernier.
- **Proceso de Medición:** Se procedió a medir los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por el extracto seco hidroalcohólico de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
- **Expresión final:** mm

3.3.5.2 Variables intervinientes

3.3.5.2.1 De la Muestra Vegetal

- Tiempo de recolección.
- Altitud de recolección.
- Temperatura de secado.
- Lugar de secado (Ventilación, luz, temperatura, grado de humedad)

3.3.5.2.2 De la Extracción

- Tipo de extracción.
- Solvente, concentración del solvente.
- Temperatura ambiental.
- pH de la maceración.
- Temperatura de la maceración.

- Agitación periódica de la maceración.
- Tiempo de maceración

3.3.5.3 Criterios de Inclusión y Exclusión

De la muestra vegetal

- **Criterios de inclusión:** Se tomaron partes aéreas de las plantas, que no presentaron daño evidente y que están completas.
- **Criterios de exclusión:** No se tomaron en cuenta las raíces y los frutos de la planta en estudio, de igual manera de hojas y tallos que fueron dañados o con posible presencia de contaminantes y aquellas que no fueron plantas maduras

De la cepa bacteriana:

- **Criterios de inclusión:** Se trabajó con cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
- **Criterios de Exclusión:** No se utilizaron cepas distintas a las cepas aisladas y a la ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, ni aquellas de las cuales su procedencia no fue esclarecida.

Cuadro 3: Resumen de Variables de la Actividad Antioxidante

VARIABLES IMPLICADAS	INDEPENDIENTE	DEPENDIENTE
	Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las partes aéreas de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl "Ccori kisa"	Actividad antioxidante sobre el reactivo DPPH
DEFINICIÓN CONCEPTUAL	Concentración es relación que existe entre la cantidad de una sustancia disuelta y la del disolvente en una disolución. Extracto seco hidroalcohólico se define como aquella sustancia extraída por etanol, que posee una composición química que le proporciona una acción farmacológica útil en terapéutica y que no ha sufrido otro tratamiento que el necesario para su limpieza y desecación. (28)	Capacidad de secuestrar el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta característica. (28)
NATURALEZA	Cuantitativa	Cuantitativa
MEDICIÓN	Directa	Indirecta
ESCALA	Razón o proporción	Razón o proporción
INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	Balanza Analítica (Sensibilidad 0.001g)	Espectrofotómetro UV-Visible
PROCESO DE MEDICIÓN	Se procedió a pesar el extracto seco hidroalcohólico al 70% (µg) luego se realizó diluciones en etanol absoluto (mL) y se tomó la cantidad adecuada.	Se produjo una coloración morada cuando se trató al extracto seco hidroalcohólico al 70% con el reactivo DPPH y serán incubadas por media hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. El grado de decoloración de DPPH-morado a DPPH-amarillo indica la eficiencia captadora del extracto.
EXPRESIÓN FINAL	µg/mL	Porcentaje de captación de radicales libres

FUENTE: Elaboración Propia

Cuadro 4: Resumen de Variables de la Actividad Antibacteriana

VARIABLES IMPLICADAS	INDEPENDIENTE	DEPENDIENTE
	Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las partes aéreas de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl "Ccori kisa"	Actividad antibacteriana sobre los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>
DEFINICION CONCEPTUAL	Concentración es relación que existe entre la cantidad de una sustancia disuelta y la del disolvente en una disolución. Extracto seco hidroalcohólico al 70% se define como aquella sustancia extraída por etanol, que posee una composición química que le proporciona una acción farmacológica útil en terapéutica y que no ha sufrido otro tratamiento que el necesario para su limpieza y desecación. (28)	Capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural a inhibir o matar bacterias. Los antibacterianos pueden ser bacteriostáticos o bactericidas según inhiban su crecimiento o produzcan lisis de las bacterias. (28)
NATURALEZA	Cuantitativa	Cuantitativa
MEDICIÓN	Directa	Indirecta
ESCALA	Razón o proporción	Razón o proporción
INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	Balanza Analítica (Sensibilidad 0.001g)	Vernier
PROCESO DE MEDICIÓN	Se procedió a pesar el extracto seco hidroalcohólico al 70% (mg) luego se realizó una dilución en agua destilada (mL) y se tomó la cantidad adecuada.	Se procedió a medir los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido el extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl "Ccori kisa" frente a <i>S. aureus</i> .
EXPRESIÓN FINAL	mg/mL	mm

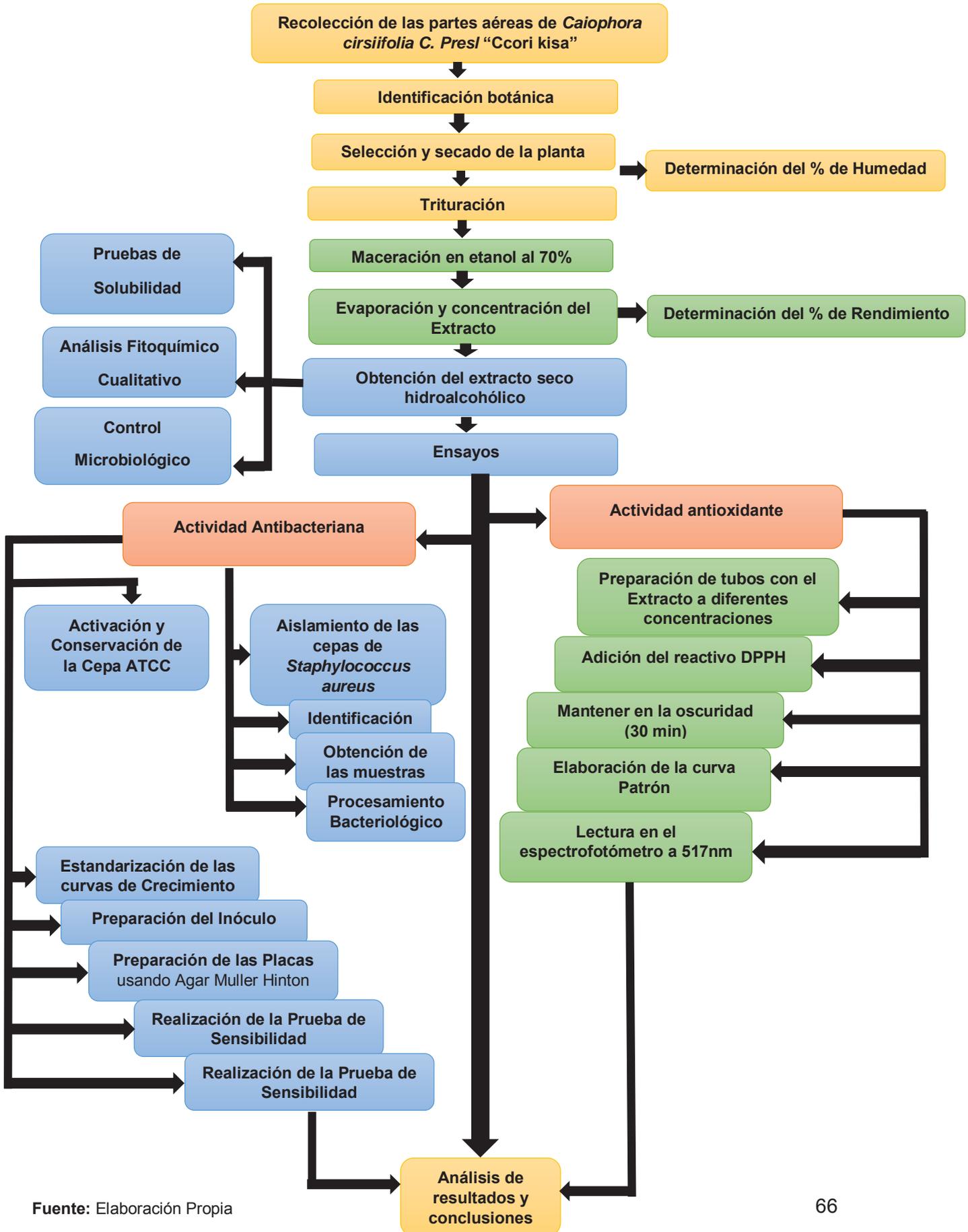
FUENTE: Elaboración Propia

Cuadro 5: Resumen de Variables Intervinientes

VARIABLES INTERVINIENTES	
DE LA MUESTRA VEGETAL	Tiempo de recolección, altitud de la recolección, temperatura del secado, lugar del secado (Ventilación, luz, temperatura, grado de humedad)
DE LA EXTRACCIÓN	Tipo de extracción, solvente, concentración del solvente, temperatura ambiental, pH de la maceración, temperatura de la maceración, agitación periódica de la maceración, tiempo de maceración

3.4 Procedimiento

FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN



- **Procedimiento General**

Se realizó la recolección de la planta en estudio en la comunidad de Llullucha, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, se seleccionó las partes aéreas (tallo, hojas y flores) en perfecto estado, al estar secas las partes aéreas se procedió a la molienda y secado después se realizó el macerado con alcohol al 70%, se filtró y se sometió a evaporación a baño María a 37°C y se obtuvo un extracto seco luego se procedió a determinar las pruebas de solubilidad, análisis fitoquímico cualitativo y control microbiológico, posteriormente se realizó el estudio farmacológico mediante la determinación de la actividad antioxidante del extracto por el método Brand-Williams captación del radical libre DPPH; en el que se preparó concentraciones de 100, 70, 50, 30, 10, 5 µg/mL (28) del extracto que fueron mezcladas con la solución DPPH luego fueron guardadas en la oscuridad por 30 minutos para leer sus absorbancias a 517 nm para determinar el porcentaje de actividad de captación y la determinación de la actividad antibacteriana del extracto sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* por el método de pozos excavados en el que se activaron, conservaron y estandarizaron las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, en las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* se aislaron y se realizaron pruebas para su identificación (Tinción Gram, Prueba de Catalasa, Fermentación del Manitol, Prueba de Coagulasa) luego se realizó la estandarización y la conservación de las cepas aisladas. Una vez obtenidas ambas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC y cepas aisladas) se procedió al sembrado de ambas cepas en medio de cultivo Agar Muller hinton luego se realizaron pozos (por triplicado) para colocar las concentraciones del extracto y de los fármacos patrón posteriormente fueron incubados a 36 °C por 24 horas. El diámetro de la zona de inhibición fue medido en mm en el que se determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto en ambas cepas y la susceptibilidad antibacteriana de los fármacos patrón.

3.4.1 Preparación de la Muestra

- **Recolección de la Especie *Caiphora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”**

La especie vegetal en estudio se recolectó en la comunidad de Llullucha, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, departamento del Cusco.

- **Selección**

Hojas sanas que no hayan sufrido ataque de plagas, hongos o insectos.

- **Secado**

En un lugar sombreado y ventilado a temperatura ambiente

- **Molienda y conservación**

La muestra seca fue triturada groseramente y se conservó en frascos de color ámbar herméticamente cerrados fresca.

3.4.1.1 Obtención del extracto hidroalcohólico al 70%

Procedimiento

- El extracto seco hidroalcohólico al 70% de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" se obtuvo por maceración, la planta seca fue pulverizada en un molino de granos y llevada a maceración al amparo de la luz y a temperatura ambiente, por un periodo de 14 días, el disolvente usado fue etanol al 70%, el solvente fue vertido en la botella color caramelo hasta cubrir por sobre 3 cm el nivel de la planta seca.
- Se filtró y el líquido filtrado se sometió a evaporación a baño María a 37°C hasta eliminar todo el solvente y obtener un extracto seco, en el cual se realizó el análisis fitoquímico.

Se procedió, a la determinación del Porcentaje de Rendimiento:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Dónde:

- % de Rendimiento: Porcentaje de rendimiento
- Peso Final: Peso del extracto seco
- Peso Inicial: Peso de la planta seca.

3.4.1.2 Determinación de la Humedad

La determinación de la humedad se realizó por triplicado.

- Se preparó 3 placas Petri vacías
- Se cortó en trozos las muestras vegetales de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl. "Ccori kisa".
- Se pesó la placa con la muestra vegetal fresca.

- Estas placas fueron introducidas a la estufa a la temperatura de 50°C por 24 horas, luego se procedió a leer los pesos respectivos y se calculó el porcentaje de rendimiento mediante la siguiente ecuación.

$$\%H = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

Dónde:

- %H: Porcentaje de humedad.
- M1: Peso de la muestra fresca.
- M2: Peso de la muestra seca

3.4.1.3 Pruebas de Solubilidad

Se tomaron unos 5 a 10 mg del extracto que fueron depositados en diferentes tubos de ensayo a los cuales se les agregó 1mL de solventes de diferentes polaridades en forma descendente: Agua destilada, Metanol, Etanol 40%, Etanol 70%, Etanol 70%, Acetato de etilo, Acetona, Cloroformo, Hexano.

3.4.1.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo

Se tomaron unos 5 a 10 mg del extracto que fueron depositados en diferentes tubos de ensayo a los cuales se les realizó los ensayos de indentificación de metabolitos siguiendo el procedimiento del analisis fitoquímico.

Tabla 4: Análisis Fitoquímico del extracto seco hidroalcohólico de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl. "Ccori kisa"

METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVOS
Azucares reductores	Benedict
Flavonoides	Shinoda y NH3
Compuestos fenólicos	Cloroformo
Alcaloides	Wagner
Lactonas	Ácido pícrico
Quinonas	KOH 10%
Taninos	KOH 10%

Fuente: Lock O., 1994 (77)

3.4.1.5 Control Microbiológico del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caioophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

Cuadro 6: Análisis Microbiológico

Criterios	Agar Usado	Peso del Extracto	Bacterias y Hongos	Cantidad Permisible
<u>Criterio Imperativo:</u> No debe presentarse caso contrario el riesgo muy elevado.	Agar SS	1 g	Salmonella	Negativo
<u>Criterio Indicativo de Higiene:</u> El exceso indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto puede ser rechazado.	Agar Mcconkey	1g	Coliformes Fecales (E. coli)	Negativo
<u>Criterios alerta o Límites Críticos:</u> Significa que durante el proceso de propagación del extracto no se debe exceder los límites especificados.	Agar Saboraud	1g	<ul style="list-style-type: none"> • Aerobios mesófilos • Hongos y levaduras 	Negativo

Fuente: DIGESA, 1999 (78)

3.4.2 Determinación de la Actividad Antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" se realizó de acuerdo al método de Brand-Williams. (79)

Procedimiento:

1. Se prepararon las concentraciones 100, 70, 50, 30, 10, 5 µg/mL del extracto seco hidroalcohólico al 70% en etanol absoluto. El control positivo fue una solución de ácido ascórbico hecha en concentraciones de 100, 70, 50, 30, 10, 5 µg/mL en etanol absoluto.
2. La solución de DPPH (0.004%) fue preparada en etanol absoluto y 5 mL de esta solución fue mezclada con el mismo volumen del extracto y solución estándar separadamente.
3. Estas soluciones fueron guardadas en la oscuridad por 30 minutos para leer sus absorbancias a 517nm. El grado de coloración DPPH-morado a DPPH-amarillo indicará la eficiencia de captación del extracto. Bajas absorbancias de la reacción de la mezcla indican una alta actividad de captación de radical libre. La actividad de captación frente a DPPH fue calculada usando la ecuación.

$$\text{Porcentaje de Captación de Radicales libres} = 100 - \frac{(A_m - A_b)}{A_c} \times 100$$

Donde:

A_m= Absorbancia de la muestra

A_b= Absorbancia del blanco de la muestra

A_c= Absorbancia del control

3.4.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana

3.4.3.1 Primera Fase

a. Cepas ATCC: Reactivación

La cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue adquirida de Microbiologics Inc, para su reactivación se usó Agar tripticasa Soja, empleando las instrucciones.

b. Conservación de la Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

La cepa fue conservada en un tubo de ensayo con tapa y con 5 mL de caldo BHI debidamente rotulado y codificado e incubado a 37°C por 24 horas, para posteriormente ser conservado a 4°C en refrigerador. (80)

c. Estandarización de la curva de crecimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

- Se tomó una asada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (que se encontraba en conservación en el caldo BHI) y se inoculó en 5 mL de caldo BHI.
- Se incubó durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se ajustó la suspensión bacteriana a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland, inmediatamente después de realizó una dilución de 1/100 tomando 1mL de este caldo con la cepa y verterlo en un matraz con 99 mL de caldo BHI puro.
- Se incubó a 37°C, la evaluación del crecimiento Bacteriano se realizó cada media hora mediante la lectura de la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 623nm en el espectrofotómetro durante 10 horas. (81)

d. Estandarización de la Concentración Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caioophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Las concentraciones se determinaron hallando el factor de incremento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, teniendo en cuenta las concentraciones mínima y máxima inhibitorias. (81)

$$\text{factor de Incremento} = \sqrt[r]{I}$$

Donde:

$$I = \frac{\text{Concentración Máxima}}{\text{Concentración mínima}}$$

$$r = N - 1$$

N = Número de concentraciones con las que se desea trabajar.

Las concentraciones con las que se trabajará serán las siguientes.

- I. Concentración mínima = Concentración 1
- II. Concentración 1 x Factor de Incremento = Concentración 2
- III. Concentración 2 x Factor de Incremento = Concentración 3
- IV. Concentración 3 x Factor de Incremento = Concentración 4
- V. Concentración 4 x Factor de Incremento = Concentración 5
- VI. Concentración 5 x Factor de Incremento = Concentración 6
- VII. Concentración 6 x Factor de Incremento = Concentración 7
- VIII. Concentración 7 x Factor de Incremento = Concentración 8
- IX. Concentración 8 x Factor de Incremento = Concentración 9
- X. Concentración 9 x Factor de Incremento = Concentración 10
- XI. Concentración 10 x Factor de Incremento = Concentración 11
- XII. Concentración Máxima

e. Prueba de la Actividad Antibacteriana por el método de Pozos Excavados para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Preparación del inóculo:

Se cultivó la especie bacteriana en estudio en 5 mL de caldo BHI y se incubó a una temperatura de 37°C durante 7 horas (Según la curva de crecimiento). Luego se ajustó la suspensión bacteriana a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de MacFarland. (80)

Preparación de las placas Petri y procedimiento:

- Se preparó las placas Petri con Agar Muller Hinton 20 mL aproximadamente. Luego se incubó a 37°C por 24 horas para el estudio de control de esterilidad.
- Se preparó las concentraciones del extracto en mg/mL y los fármacos patrón (Penicilina 1UI/25µL, Doxiciclina 30µg/25µL). (80)
- Obtenida la suspensión bacteriana (0.5 MacFarland=1.5x10⁸UFC/mL). Se procedió a la siembra con la ayuda de un hisopo estéril, en las placas de agar Muller Hinton ya prepradas.
- Se incubaron a 37°C por 30 minutos, luego se hicieron 3 pozos por placa con la ayuda de una pipeta Pasteur (diámetro de 5.9 mm).
- Luego usando una micropipeta se depositaron los extractos ya preparados y los fármacos patrón en los pozos.
- Finalmente se incubaron a 37 °C por 24 horas, luego de este tiempo se midieron los diámetros de los halos formados. (82) (83)

3.4.3.2 Segunda Fase

a. Aislamiento de las cepas *Staphylococcus aureus*

El aislamiento e identificación de las cepas *Staphylococcus aureus* fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Medicina Humana-UNSAAC en Setiembre del año 2017, se tomaron las muestras biológicas mediante un hisopado faríngeo con el fin de aislar a *Staphylococcus aureus* de la microbiota que se encuentra en el humano.

Las muestras se inocularon en caldo BHI y se incubaron durante 24 horas a 37°C para su óptimo crecimiento y reproducción. (84)

Identificación

Del cultivo en caldo BHI se realizó una resiembra en Agar Manitol Salado (durante 24 horas a 37°C) para identificar la presencia de *Staphylococcus aureus* en dicho medio de cultivo al ser selectivo permitió el aislamiento y diferenciación de *Staphylococcus aureus*, generando colonias con zonas amarillas a su alrededor. (84)

La identificación del microorganismo se realizó mediante las siguientes consideraciones:

1. Tinción Gram
2. Prueba de Catalasa
3. Fermentación del Manitol
4. Prueba de Coagulasa (84)

Obtención de las muestras:

Una vez obtenidos los cultivos positivos, los microorganismos fueron aislados a 5 mL de caldo BHI con el fin de ser conservadas para realizar el respectivo ensayo de sensibilidad bacteriana. (80)

b. Procesamiento bacteriológico

Las bacterias aisladas de cultivos positivos previamente identificadas en el laboratorio fueron conservadas en tubos con 4 mL de Agar Tripticasa Soja en pico de flauta debidamente rotulados y codificados en incubados a 37°C por 24 horas, para posteriormente ser conservados a 4°C en refrigerador y replicados a un medio cada 15 días para la conservación de la cepa. (80)

c. Estandarización de las curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Para proceder a la estandarización de las curvas de crecimiento, se tomó un inóculo de cada una de las bacterias que se encontraban en estado de conservación en el Agar Tripticasa Soja, este inóculo se propagó en 5 mL de caldo de cultivo BHI para luego incubar durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se realizó una dilución de 1/100 tomando 1 mL de este caldo con bacterias y vertiéndolo en un matraz con 99 mL de caldo BHI puro, luego se incubó a 37 °C, la evaluación del crecimiento bacteriano se realizará a cada hora mediante la lectura de la densidad óptica (D.O) del cultivo a una longitud de onda de 623 nm en el espectrofotómetro. (81)

d. Prueba de sensibilidad por el método de pozos excavados

• Preparación del inóculo:

Se Cultivaron las especies bacterianas en estudio en 5 mL de caldo BHI y se llevará a la estufa a una temperatura de 37 °C durante 5 a 6 horas (según la Curva de Crecimiento), con la finalidad de realizar a partir de este el sembrado en placas. (80)

• Preparación de las palcas Petri y procedimiento

1. Se prepararon las placas Petri que contengan Agar Muller Hinton con una cantidad de 20 mL aproximadamente, luego se incubaron a 37 °C por 24 horas para el respectivo control de esterilidad. (80)
2. Se elaboraron los preparados de las concentraciones del extracto en mg/mL y los fármacos patrón (Penicilina 1UI/25µL, Doxiciclina 30µg/25µL). (80)
3. Una vez obtenida la suspensión bacteriana se procedió a la siembra con la ayuda de un hisopo estéril, en placas con agar Muller Hinton ya preparadas.
4. Se incubaron a 37°C por 30 minutos, luego se realizaron 3 pozos por palca con la ayuda de una pipeta Pasteur (diámetro 5.9 mm)
5. Luego usando una micropipeta se depositaron los extractos ya preparados y los fármacos patrón en los pozos.
6. Finalmente se incubaron a 37°C por 24 horas, luego de este tiempo se medirán los halos formados. (82)

3.4.4 Técnicas para el Análisis y Procesamiento de Datos

Para el Análisis Estadístico de los datos en la Determinación de la Actividad Antioxidante y Antibacteriana in Vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aereus*. Se usó el paquete estadístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), en el cual se realizó la distribución ordenada de los datos para procesar la información sin errores.

CAPITULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Porcentaje de Humedad

Tabla 5: Resultado del Porcentaje de Humedad de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

N° de Determinaciones	1	2	3
Peso de la muestra fresca	5.007 g	5.039 g	5.060 g
Peso de la muestra seca	2.832 g	2.837 g	2.835 g
Porcentaje de humedad	43.43%	43.69%	43.97%
Promedio de Porcentaje de Humedad	43.69 %		

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACIÓN

Según la Tabla N°5, la especie en estudio (*Caiophora Cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”) presenta un porcentaje de humedad de 43.69 valor que refleja un alto contenido de agua en las partes aéreas de la especie vegetal en estudio.

Como dice **Stubsgaard, F., 1997** (85), el contenido de humedad determina la actividad fisiológica y bioquímica en la planta, por lo tanto, la determinación del porcentaje de humedad es un parámetro indicador de la cantidad relativa de agua, sustancias que participan en los procesos de degradación de metabolitos con acción de enzimas.

Por ello, el proceso de secado es de suma importancia, porque además de lo ya mencionado del porcentaje de humedad es un factor para el desarrollo de bacterias, hongos y la producción de reacciones de oxidación e hidrólisis, que son los principales causales de descomposición o alteración de los metabolitos presentes en la planta, este procedimiento se realizó en un ambiente fresco y limpio con lo cual se estabilizaron los procesos enzimáticos e interrumpieron la degradación de los metabolitos secundarios de las plantas en estudio.

4.2 Porcentaje de Rendimiento de Extracción

Tabla 6: Porcentaje de Rendimiento de Extracción de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

Peso de la muestra molida	250g
Peso del extracto seco	85.486 g
Porcentaje de extracción	34.19%

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

Los resultados de la Tabla N°6 permitió determinar la cantidad necesaria de muestra vegetal para la realización del trabajo de Investigación.

El porcentaje de extracción de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” obtenido por maceración con etanol al 70% fue de 34.19%, valor que indica un rendimiento estándar para este tipo de especie vegetal.

4.3 Pruebas de Solubilidad

Para la determinación de las pruebas de solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” se utilizaron diferentes solventes de diferente polaridad obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 7: Pruebas de Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

SOLVENTE	GRADO DE SOLUBILIDAD
Agua destilada	++
Metanol	-
Etanol 40%	++
Etanol 70%	+++
Etanol 90%	+
Acetato de etilo	-
Acetona	+
Cloroformo	-
Hexano	+

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

Leyenda:

- Muy soluble : +++
- Soluble : ++
- Poco soluble : +
- Insoluble : -

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

Como podemos apreciar en la tabla N° 7 el extracto seco de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" obtenido por maceración con etanol al 70% muestra poca solubilidad en los diferentes solventes polares y apolares.

El extracto es muy soluble en alcohol al 70% cumpliéndose que lo semejante disuelve a lo semejante. Además, se puede apreciar que es soluble en agua destilada y etanol 40%, poco soluble en etanol 90%, acetona y hexano e insoluble en metanol en metanol y hexano. Según estos resultados el extracto seco hidroalcohólico de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta naturaleza parcialmente polar.

4.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo

Tabla 8: Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto seco hidroalcohólico de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"

METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVOS	RESULTADOS
Azúcares reductores	Benedict	+++
Flavonoides	Shinoda y NH ₃	+++
Compuestos fenólicos	Cloroformo	+
Alcaloides	Wagner	---
Lactonas	Ácido pícrico	+++
Quinonas	KOH 10%	+++
Taninos	KOH 10%	+++
Saponinas	Prueba de espuma	+
Aminoácidos	Ninhidrina	+++

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

Leyenda:

- Abundante cantidad : +++
- Regular cantidad : ++
- Poca cantidad : +
- Ausente : -

INTERPRETACIÓN, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:

Según los resultados de coloración y precipitación obtenidos en la marcha fitoquímica se observa que el extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta abundante cantidad de azúcares reductores, flavonoides, lactonas, quinonas, taninos y aminoácidos; ligera cantidad de compuestos fenólicos y saponinas; y ausencia de alcaloides.

Aquino E. (2017) (21) al estudiar el aceite esencial de *Caiophora cirsiifolia* determinó que presenta abundante cantidad de alcaloides, fenoles y carbohidratos.

Quino F. et al. (2015) (23) al estudiar las características fitoquímicas de *Caiophora carduiifolia* determinó la presencia de compuestos fenólicos, saponinas, alcaloides, aminoácidos libres y flavonoides.

Matta M. (2009) (13) al estudiar los extractos, aceites e infusos de *Caiophora sepiaria* determinó la presencia de terpenos y esteroides en el aceite esencial, flavonoides y cumarinas en la infusión y respecto a *Caiophora rhameri* determina la presencia de terpenos en el aceite esencial esteroides y triterpenos, flavonoides y cumarinas en la infusión.

Los flavonoides son sintetizados por las plantas en respuesta a una infección microbiana; su actividad probablemente se debe a su habilidad de formar complejos con proteínas extracelulares solubles, así como también formar complejos con la pared celular bacteriana, los flavonoides más lipofílicos probablemente sean los que quebrantan la membrana celular. Además, los flavonoides tienen la capacidad para neutralizar radicales libres. (86)

Según estos resultados la actividad antioxidante y antibacteriana se debería a la presencia de Flavonoides.

4.5 Control Microbiológico

Tabla 9: Resultados del Control Microbiológico del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

CRITERIOS	RESULTADOS EN LA DILUCIÓN 10 ⁻¹	LIMITES MICROBIOLÓGICOS PERMISIBLES (LMP)	OBSERVACIONES
CRITERIO IMPERATIVO	Ausencia de <i>Salmonella spp</i>	<i>Salmonella spp</i> : Ausencia	La muestra cumple los LMP
CRITERIOS INDICATIVOS DE HIGIENE	Número de Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> : Ausencia	<i>Escherichia coli</i> : Ausencia	La muestra cumple los LMP
CRITERIO DE ALERTA O LÍMITES CRÍTICOS	Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos Viables: <10 ² UFC	10 ⁴ – 10 ⁵ UFC	La muestra cumple los LMP
	Recuento de hongos y levaduras <10 ² UFC	10 ² – 10 ³ UFC	La muestra cumple los LMP

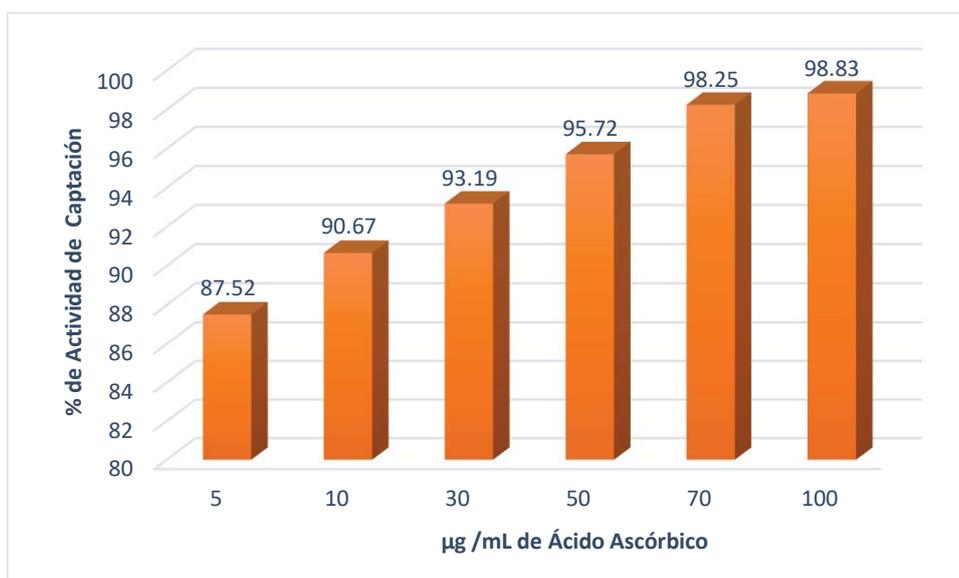
Fuente: Resultado de Control Microbiológico (ANEXO 2)

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 9 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado al extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” para determinar la presencia de microorganismos contaminantes. Los resultados indican que los extractos están libres de contaminación (salmonella, coliformes fecales, mesófilos viables hongos y levaduras), usando los criterios que se encuentran dentro de los límites de Control de Calidad a nivel microbiológico indicado por la DIGESA y el MINSA, lo cual nos lleva a decir que los extractos están aptos para el ensayo de la actividad antioxidante y antibacteriana in vitro. (87)

4.6 Determinación de la Actividad Antioxidante

Gráfico 1: Efecto del porcentaje de Actividad de Captación del Radical DPPH del Patrón Ácido Ascórbico



Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:

El Gráfico N° 1 muestra el porcentaje de captación de radical libre DPPH por el ácido ascórbico, observándose un 98.83% a una concentración de 100µg/mL y un 87.52% a 5µg/mL del cual se puede observar que a medida que aumenta la concentración del patrón aumenta también el porcentaje de actividad antioxidante del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante.

Teves F. (2011) (88) en su estudio sobre la actividad antioxidante in vitro de 4 especies vegetales mediante el método DPPH reporta el uso de ácido ascórbico como patrón en el que se trabajó a diferentes concentraciones de 0.25µg/mL, 0,5 µg/mL, 1µg/mL, 1.5µg/mL, 2µg/mL, 3µg/mL, 5µg/mL y 7.5µg/mL obteniéndose porcentajes de inhibición de 7.21%, 14.01%, 31.21%, 46.28%, 56.05%, 77.70%, 81.10% y 81.74% respectivamente.

Ninantay K., Ardiles L. (2018) (89) en su estudio sobre la actividad antioxidante de 2 especies vegetales reportan al ácido ascórbico como patrón, trabajaron a concentraciones de 10µg/mL, 50µg/mL y 100µg/mL y obtuvieron porcentajes de inhibición de 95.52%, 96.5% y 96.78% respectivamente.

El ácido ascórbico actúa como antioxidante al estar disponible para una oxidación energéticamente favorable. El ácido ascórbico es un donante de electrones y esta propiedad representa todas sus funciones conocidas. (11)

Tabla 10: Resultados de la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. <i>Presl</i> “Ccori kisa” ($\mu\text{g/mL}$)	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES	PROMEDIO DE PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES
5	43.03	43.64
	43.94	
	43.94	
10	73.77	74.01
	74.14	
	74.14	
30	82.82	83.06
	83.18	
	83.18	
50	85.89	86.13
	86.25	
	86.25	
70	88.60	88.78
	88.78	
	88.96	
100	90.77	90.69
	90.77	
	90.55	

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

Abs. Control: 0.553

INTERPRETACIÓN, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:

Se detallan los porcentajes de actividad antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” obteniéndose 90.69% a 100 $\mu\text{g/mL}$ y un 43.64% a 5 $\mu\text{g/mL}$; los resultados del porcentaje de captación y/o inhibición de

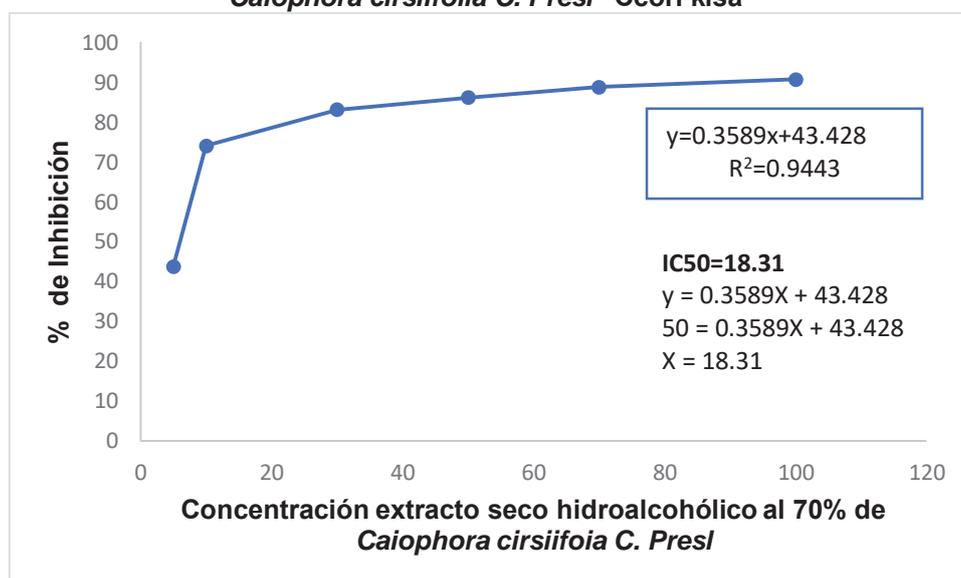
radicales DPPH nos indica que a medida que aumenta la concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% aumenta también el porcentaje de inhibición del cual se puede concluir que a mayor concentración mayor capacidad antioxidante.

Quino F. et al (23), reportó capacidad antioxidante *Caiophora carduifolia* superior al 25% a 0.420 mg/mL por el método DPPH, mientras **Khera S. et al, 2003** (90) reportó que *Caiophora coronata*, alcanzó altos potenciales de inhibición mediante el método de DPPH y ABTS.

Compuestos con potencial antioxidante pueden actuar como prooxidantes, el grupo de sustancias polifenolicas en parte proporcionan ligeras cargas prooxidantes a traves de reacciones de transferencia de electrones llevando a una formación moderada de ROS influyen en ello factores como: la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la ERO es formada; las condiciones del ensayo, la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante; la lipofilicidad para ser captados por la membrana y el pH del medio. (91)

4.6.1 Valor de concentración de inhibición 50 (IC50)

Gráfico 2: Concentración de Inhibición 50 del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"



Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:

En el Gráfico 2 se observa el valor de IC50 del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" con el valor de 18.31ug/ml. Este valor indica que cuanto menor sea el IC50 del extracto tendrá mayor actividad antioxidante según **Carhuapoma M., (2006)** (92) en su trabajo sobre actividad antioxidante de *Luma*

chequen (Arrayan), donde trabajo con tres concentraciones (10 ug/ml, 50 ug/ml y 100ug/ml), para determinar el IC50; el aceite esencial de arrayan presento valores de 43.3571ug/ml, y la vitamina C de 36.4090ug/ml, de IC50 respectivamente.

Este dato sirve de referencia para comparar la actividad antioxidante del extracto que presenta una excelente capacidad antioxidante.

Tabla 11: Resultados Descriptivos de la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (µg/mL)	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MÍNIMO	MÁXIMO
5	3	43.64	0.53	43.03	43.94
10	3	74.02	0.21	73.77	74.14
30	3	83.06	0.21	82.82	83.18
50	3	86.13	0.21	85.89	86.25
70	3	88.78	0.18	88.60	88.96
100	3	90.70	0.13	90.55	90.77

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 11 se observan los resultados descriptivos de la actividad antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” donde la media mayor fue de 90.70% a 100µg/mL de extracto y la media de menor actividad fue de 43.64% para una concentración de 5µg/mL, se distingue que los porcentajes de captación de radical DPPH son concentraciones-dependientes.

Tabla 12: Análisis de la Varianza (ANOVA) para la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4696.048	5.	939.210	12341.783	0.000
Dentro de grupos	0.913	12	0.076		
Total	4696.962	17			

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

La tabla N° 12 muestra el análisis de Varianza de los resultados de la actividad antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia C. Presl* “Ccori kisa” de la tabla N° 11, según la tabla N° 12 se aprecia que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las medias del porcentaje de captación de radical DPPH a favor del extracto de *Caiophora cirsiifolia C. Presl*, siendo el valor de la significancia 0.00 (<0.005), por tanto se acepta la hipótesis alterna de que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la captación del radical DPPH.

Tabla 13: Prueba de Scheffé para la Actividad Antioxidante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia C. Presl* “Ccori kisa”

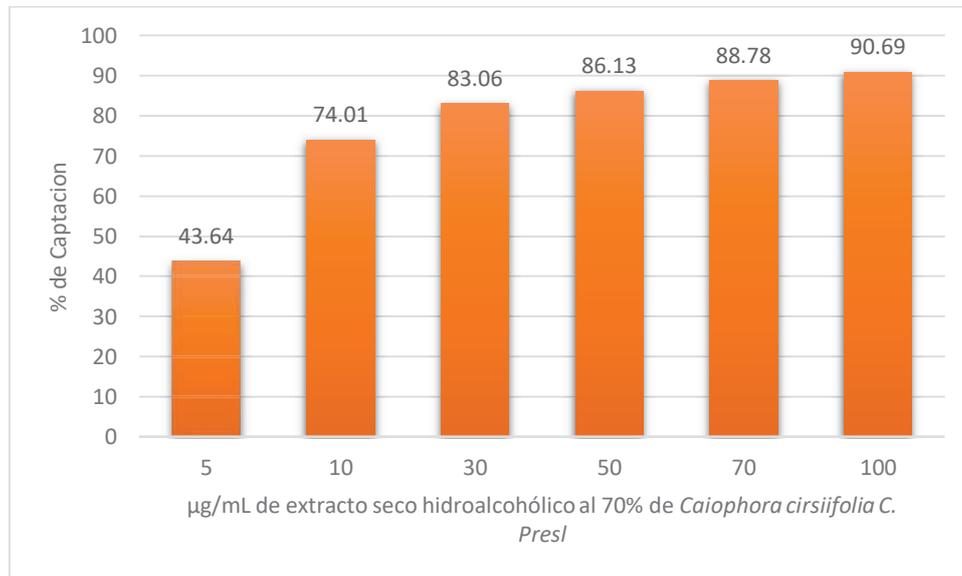
CONCENTRACION DEL EXTRACTO (µg/mL)	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05			
		1	2	3	4
5	3	43.6367			
10	3		74.0167		
30	3			83.0600	
50	3			86.1300	86.0600
70	3			88.7800	88.7800
100	3				90.6967
Sig.		1.00	1.00	,262	,092

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 13 se realizó la prueba de post hoc de Scheffé que realiza todos los contrastes de igualdad de medias entre rangos, el cual realiza la agrupación entre la media de los porcentajes de actividad de captación de radicales obteniéndose 4 subgrupos de concentraciones, entre los grupos 3 y 4 se observa heterogeneidad ya que el valor de significancia es mayor de 0.05 a excepción de los grupos 1 y 2 que solo se encuentra conformado por la media del porcentaje de actividad de captación de radicales.

Gráfico 3: Porcentaje de Actividad de Captación del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caioophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”

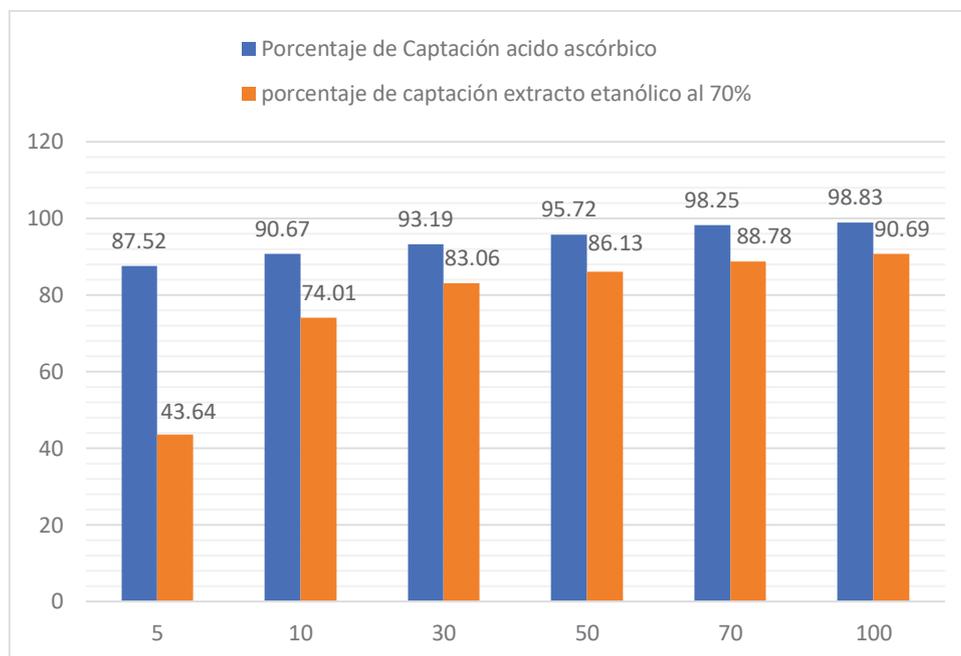


Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

Se muestran gráficamente las medidas de los porcentajes de actividad de captación de extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caioophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” obteniéndose 90.69% a 100µg/mL. Se muestran variaciones de actividad, siendo proporcionales a la concentración.

Gráfico 4: Comparación del porcentaje de actividad de captación de radicales libres entre el Ácido Ascórbico y el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”



Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN:

En el gráfico N°3 se observan los resultados del efecto de captación de radical DPPH del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” y el patrón ácido ascórbico, expresados en porcentajes. Donde se muestran a concentración de 100µg/mL actividades de 98.83% y 90.69% del patrón ácido ascórbico y extracto seco hidroalcohólico al 70% respectivamente con una diferencia entre ambos 8.14%.

4.7 Determinación de la Actividad Antibacteriana

4.7.1 De la estandarización de la Curva de Crecimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Tabla 14: Absorbancias para la Estandarización de la Curva de Crecimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

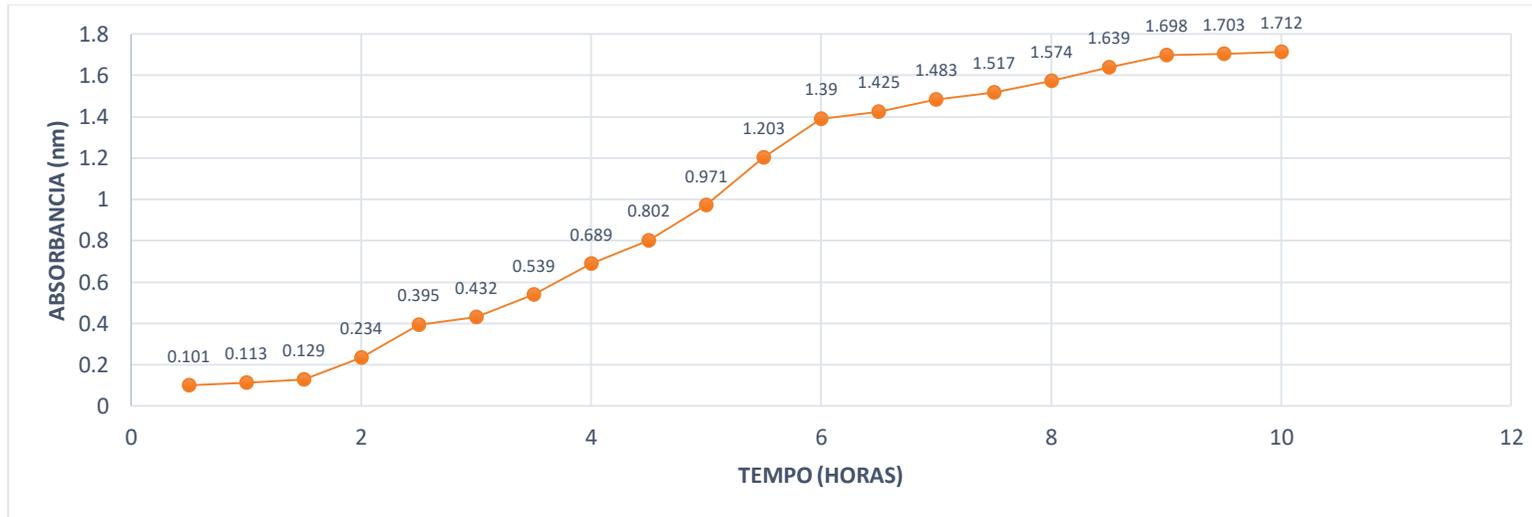
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
Horas	Absorbancias (A 623 nm)
0.5	0.016
1.0	0.027
1.5	0.035
2.0	0.060
2.5	0.108
3.0	0.191
3.5	0.270
4.0	0.343
4.5	0.400
5.0	0.482
5.5	0.560
6.0	0.627
6.5	0.720
7.0	0.789
7.5	0.881
8.0	0.954
8.5	1.008
9.0	1.018
9.5	1.029
10.0	1.035

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N°14 se observan los valores de las absorbancias obtenidas en la curva de crecimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en caldo BHI cada 30 minutos por el lapso de 10 horas a una longitud de onda de 623nm

Gráfico 5: Curva de Crecimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN:

En el gráfico N° 4 se puede observar el desarrollo de la bacteria en estudio *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; donde se aprecia la curva de crecimiento celular y se pueden reconocer las fases de crecimiento como son: La fase estacionaria, la fase exponencial y la fase de latencia. La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se adaptó al medio de cultivo en un tiempo de 2 horas, esta fase es la llamada fase de latencia; la fase exponencial de crecimiento está entre las 2 y 8.5 horas, es esta fase donde la cepa ya está adaptada a su ambiente por lo que presenta un crecimiento acelerado, entre las 8.5 y 10 horas se puede observar la fase estacionaria, donde los nutrientes del medio se están agotando, y además existe la acumulación de desechos metabólicos de la bacteria este gráfico es semejante a la curva de crecimiento típica de una población bacteriana según **Madigan, M., 2003** (68).

4.7.2 De la Estandarización de la Curva de Crecimiento para Cepas Aisladas *Staphylococcus aureus*

Tabla 15: Absorbancias para la Estandarización de la Curva de Crecimiento para cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*

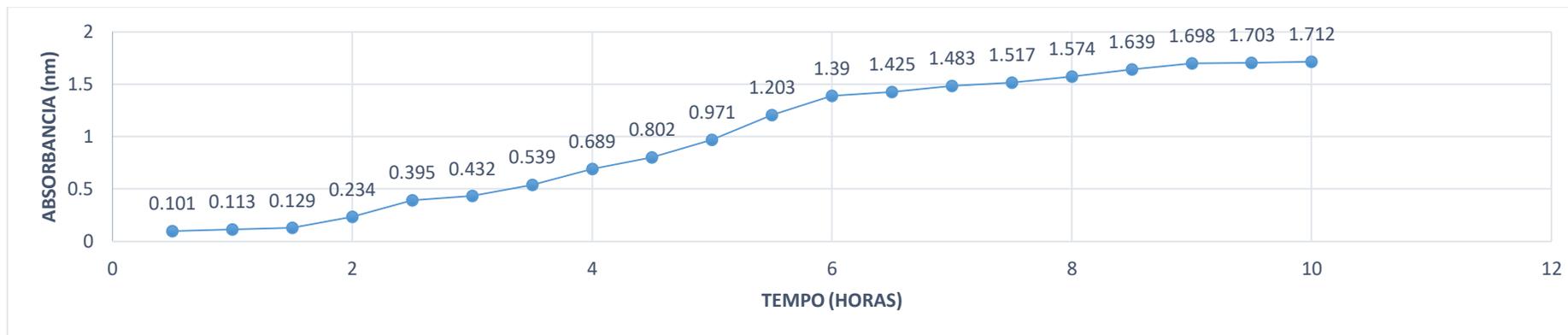
Cepa Aislada de <i>Staphylococcus aureus</i>	
Horas	Absorbancias (A 623 nm)
0.5	0.101
1.0	0.113
1.5	0.129
2.0	0.234
2.5	0.395
3.0	0.432
3.5	0.539
4.0	0.689
4.5	0.802
5.0	0.971
5.5	1.203
6.0	1.39
6.5	1.425
7.0	1.483
7.5	1.517
8.0	1.574
8.5	1.639
9.0	1.698
9.5	1.703
10.0	1.712

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N°15 se observan los valores de las absorbancias obtenidas en la curva de crecimiento de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* en caldo BHI cada 30 minutos por el lapso de 10 horas a una longitud de onda de 623nm.

Gráfico 6: Curva de Crecimiento para Cepas Aisladas de *Staphylococcus aureus*



Fuente: Datos Experimentales del Estudio

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

En el gráfico N° 5 se puede observar el desarrollo de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*; donde se aprecia la curva de crecimiento celular y se pueden reconocer las fases de crecimiento como son : la fase estacionaria, la fase exponencial y la fase de latencia. Las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* se adaptaron al medio de cultivo en un tiempo de media hora, esta fase es la llamada fase de latencia; la fase exponencial esta entre las 1 y 6.5 horas, en esta fase donde la cepa ya está adaptada a su ambiente por lo que presenta un crecimiento acelerado; entre las 7 y 10 horas la bacteria entra en la fase estacionaria debido a que los nutrientes del medio se están agotando, y además de la acumulación de desechos metabólicos de la bacteria. Probablemente las lecturas sigan aumentando muy ligeramente como en el estudio de **Martinez S, 2005** (93), donde las lecturas crecen levemente desde las 8 horas hasta las 24 horas según **Madigan M, 2005** (68) muchas funciones bioquímicas continúan, algunas bacterias crecen y otras mueren llegando a un equilibrio y puede deberse a en el método espectrofotométrico no se distingue a las células muertas de viables, por lo que, todos los elementos del medio , al cabo de las horas serán leídos.

4.7.3 Del Ensayo de la Sensibilidad Bacteriana de la Prueba Piloto sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.7.3.1 Resultado de los Diametros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% De *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” obtenidos en la Prueba Piloto sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla N°16: Resultados de la Prueba Piloto del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

N° de disco	Concentración del Extracto (mg/25µl)	Diámetro del Halo de Inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.30	7.80	7.50	7.30	7.53
4	0.40	8.50	8.60	8.55	8.55
5	0.50	10.00	10.20	10.10	10.07
6	0.80	11.60	11.40	11.70	11.57
7	1.00	12.40	12.80	12.50	12.57
8	1.50	13.60	13.70	13.60	13.63
9	2.50	14.90	14.70	14.50	14.70
10	5.00	15.60	15.50	15.70	15.60
11	7.50	16.90	16.50	16.50	16.63
12	10.00	17.50	17.00	17.00	17.17
13	12.50	18.70	19.00	18.50	18.73
14	20.00	18.20	18.15	18.18	18.17
15	30.00	17.92	17.85	17.83	17.87
16	50.00	18.13	18.15	18.17	18.15

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

IG: Primer Grupo de Halos

IIG: Segundo Grupo de Halos

IIIG: Tercer Grupo de Halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 16 se encuentra los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de la prueba piloto de la evaluación del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla podemos ver que el extracto presenta un halo mínimo de inhibición de 7.53mm en promedio a una concentración de 0.30mg/25µL, a menores concentraciones no se logran obtener halos de inhibición, como se observa a la concentración de 0.10mg/25µL se pusieron valores de 0.00 que presenta alrededor del pozo que mide 6mm no se evidencia ningún halo.

Los halos máximos promedio que se obtuvieron fueron de 18.73mm en promedio a una concentración de 12.50mg/25µL, concentraciones mayores se obtienen halos menores que se indican que el extracto empieza a perder actividad sobre la cepa e incluso a mayores concentraciones se observó en el experimento saturación del extracto en pozos.

De esta manera se evidencia que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" posee actividad antibacteriana in vitro sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Con las concentraciones de los halos mayores y menores, se procedió a calcular el **Factor de Incremento** para obtener las concentraciones estandarizadas del extracto seco hidroalcohólico de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa".

Tabla 17: Resultados Descriptivos para la Prueba Piloto de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/25µL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
0.05	3	0.00	0.00	0.00	0.00
0.1	3	0.00	0.00	0.00	0.00
0.3	3	7.30	7.80	7.53	0.25
0.4	3	8.50	8.60	8.55	0.05
0.5	3	10.00	10.20	10.10	0.10
0.8	3	11.40	11.70	11.57	0.15
1	3	12.40	12.80	12.57	0.21
1.5	3	13.60	13.70	13.63	0.06
2.5	3	14.50	14.90	14.70	0.20
5	3	15.50	15.70	15.60	0.10
7.5	3	16.50	16.90	16.63	0.23
10	3	17.00	17.50	17.17	0.29
12.5	3	18.50	19.00	18.73	0.25
20	3	18.15	18.20	18.18	0.03
30	3	17.83	17.92	17.87	0.05
50	3	18.13	18.17	18.15	0.02

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 17 se observan los resultados descriptivos de la prueba piloto, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 18.73mm a una concentración de extracto de 12.5mg/25µL y la medida del diámetro de menor actividad fue de 7.53mm a una concentración de extracto de 0.3mg/25µL. La menor desviación estándar de la media de diámetro de inhibición se dio a una concentración de 0.4mg/25µL con 8.55mm de diámetro. Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentraciones-dependientes.

Tabla 18: Análisis de Varianza (Anova) para la Prueba Piloto de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre la Cepa Bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1637.236	15.000	109.149	4375.809	0.000
Dentro de grupos	0.798	32.000	0.025		
Total	1638.035	47.000			

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

La tabla N° 18 muestra el Análisis de varianza de los resultados de la actividad antibacteriana de la prueba piloto del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de la tabla N° 16, según la tabla N° 18 se aprecia que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las medidas del diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl, siendo el valor de la significancia 0.000 (<0.05), por tanto se acepta la hipótesis alterna de que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento.

Tabla 19: Prueba POST HOC de Scheffé para la Prueba Piloto de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre la Cepa Bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Concentración del (mg/25µl)	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.05	3	0.0000								
0.1	3	0.0000								
0.3	3		7.5333							
0.4	3		8.5500							
0.5	3			10.1000						
0.8	3			11.5667	11.5667					
1	3			12.5667	12.5667					
1.5	3				13.6333	13.6333				
2.5	3					14.7000	14.7000			
5	3						15.6000			
7.5	3						16.6333			
10	3							17.1667		
12.5	3							18.7333		
30	3								17.8667	
50	3								18.1500	18.1500
20	3								18.1767	18.1767
Sig.		1.000	.734	.262	.453	0.80	.092	.146	.558	.376

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 19 según la prueba de POST HOC scheffé que realiza todos los contrastes de igualdad de medias entre rangos, el cual realiza la agrupación entre la media de los halos de inhibición obteniéndose 9 subgrupos de concentraciones. Entre los subgrupos se observa heterogeneidad ya que el valor de significancia es mayor de 0.05.

También podemos observar que el subgrupo 7 está conformado por las concentraciones que presentaron una actividad antimicrobiana marcada que según Toda y Col es a partir de 16mm.

4.7.3.2 Resultado de los Diametros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del Extracto Seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” obtenidos en la Prueba Piloto sobre Cepas Aisladas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 20: Resultados de la Prueba Piloto del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre Cepas Aisladas de *Staphylococcus aureus*.

N° de disco	Concentración del Extracto (mg/25µl)	Diámetro del Halo de Inhibición (mm) en cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00
7	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	1.50	0.00	0.00	0.00	0.00
9	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00
10	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	7.50	0.00	0.00	0.00	0.00
12	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13	12.50	0.00	0.00	0.00	0.00
14	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	30.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

IG: Primer Grupo de Halos

IIG: Segundo Grupo de Halos

IIIG: Tercer Grupo de Halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 20 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto de la evaluación del extracto seco hidroalcohólico de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” frente a cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*. En el cual podemos observar que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” no presenta actividad antibacteriana, no formó

en ninguna concentración halo de inhibición como se puede evidenciar, se debe a que la cepa aislada de es una bacteria resistente y muy patógena ya que al realizar el ensayo con 2 antibióticos patrón (Penicilina 10 UI/25µl y Doxiciclina 30µg/25µL) no se formaron halos de inhibición con Penicilina y fue de resistencia intermedia con Doxiciclina.

4.7.3.3 Determinación de las concentraciones estandarizadas para el ensayo de la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Factor de Incremento = 1.49

INTERPRETACIÓN:

Empleando la fórmula de estandarización, se logra hallar el factor de incremento de concentraciones de extracto al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" a usarse frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obteniéndose un factor de incremento de 1.49.

Tabla 21: Concentraciones Estandarizadas del extracto seco hidroalcohólico al 70% sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

OPERACIÓN	Nº DE CONCENTRACIÓN	RESULTADO mg/25µL
Concentración mínima	Concentración 1	0.300
Concentración 1 x F	Concentración 2	0.450
Concentración 2 x F	Concentración 3	0.590
Concentración 3 x F	Concentración 4	0.750
Concentración 4 x F	Concentración 5	0.190
Concentración 5 x F	Concentración 6	1.490
Concentración 6 x F	Concentración 7	2.240
Concentración 7 x F	Concentración 8	3.730
Concentración 8 x F	Concentración 9	7.450
Concentración 9 x F	Concentración 10	11.160
Concentración 10 x F	Concentración 11	14.900
Concentración 11 x F	Concentración 12	18.630

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 21 se encuentran los valores de las concentraciones antibacterianas estandarizadas determinadas luego de hallar el factor de incremento, con los datos obtenidos de la orueba piloto. Como se puede observar la concentración mínima prevalece de la prueba piloto (0.30mg/25µL) y la concentración máima a evaluarse ahora es 18.630mg/25µL con estas concentraciones se procedió al nuevo ensayo de la actividad antibacteriana.

4.8 Del Ensayo de la actividad Antibacteriana con las concentraciones estandarizadas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.8.1 Resultados de los diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del Extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC obtenidos con las Concentraciones Estandarizadas.

Tabla 22: Halos de Inhibición del extracto Seco hidroalcohólico al 70% sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con las Concentraciones Estandarizadas.

N° de disco	Concentración del extracto (mg/µl)	Diámetro del Halo de Inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.300	8.10	8.10	8.00	8.06
2	0.450	10.00	10.20	10.10	10.10
3	0.590	11.30	11.20	11.30	11.27
4	0.750	12.50	12.40	12.50	12.47
5	0.950	13.20	13.40	13.30	13.30
6	1.490	14.30	14.50	14.20	14.33
7	2.240	15.10	15.00	15.10	15.07
8	3.730	16.40	16.30	16.40	16.37
9	7.450	17.80	17.80	17.70	17.77
10	11.160	18.70	18.60	18.70	18.67
11	14.900	19.20	19.20	19.50	19.3
12	18.630	20.40	20.50	20.30	20.23
13	Penicilina (10UI/25µl)	23.00	23.20	23.50	23.23
14	Doxiciclina (30µg/25µl)	27.00	26.90	26.90	26.93

Fuente: Ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición.

IG: Primer Grupo de Halos

IIG: Segundo Grupo de Halos

IIIG: Tercer Grupo de Halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

En la tabla N°22 se aprecia que el mayor tamaño del diámetro de halo de inhibición es de 20.23 que corresponde a la concentración de 18.63 mg/25µl del extracto; mientras que el diámetro de halo de inhibición para Penicilina y Doxiciclina (82) es de 23.93mm y 29.93mm respectivamente.

En cuanto a la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" se obtuvo mayor halo de inhibición (20.23mm) a 18.6330mg/25µL presentando una diferencia de 3mm y 6.7mm con respecto a Penicilina y Doxiciclina respectivamente. **Apaza E. 2012** (21) reportó que el aceite esencial de *Caiophora cirsiifolia* a concentraciones de 5µl, 10µl, 20µl y 1mL no mostró actividad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*. **Matta M. 2009** (13) reportó que los extractos polares y aceite esencial de *Caiophora rahmeri* presentó actividad para *Staphylococcus aureus*.

La actividad antibacteriana de esta especie podría deberse a la presencia de flavonoides que se encontró en el análisis fitoquímico cualitativo, ya que se han reportado estudios sobre la actividad antibacteriana atribuyendo la actividad a los flavonoides como lo menciona Rahman, A., 2012 (31) en su estudio sobre actividad antibacteriana de los extractos etanólicos.

Para la clasificación de la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" se tomó en cuenta los criterios de **Toda y col (1994) (ANEXO N°8)** teniendo en cuenta esta clasificación se puede observar que entre las concentraciones 0.30-0.590mg/25ul, el extracto presenta una ligera actividad antibacteriana; entre las concentraciones 0.750-2.240mg/25ul, el extracto presenta una moderada actividad antibacteriana y entre las concentraciones 3.730-18.630mg/25ul el extracto presenta una marcada actividad antibacteriana. En este sentido se toma la CMI de la actividad antibacteriana para el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 el valor de 0.300mg/25ul.

De acuerdo a los datos del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (82) los diámetros críticos para *Staphylococcus* usando a la Penicilina y Doxiciclina como fármacos patrón son:

Tabla 23: Halos de Inhibición de los Fármacos Patrón para cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*

Fármacos	Halos de inhibición (mm)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
Penicilina 10UI	≤28	--	≥29
Doxiciclina 30µg	≤14	15-18	≥19

Fuente: Elaborado con datos del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión, 2012. (82)

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Los halos de inhibición obtenidos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para la Penicilina (10UI/25µL) y Doxiciclina (30µg/25µL) fueron 23.23mm y 26.93 respectivamente, de acuerdo a estos resultados la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* es resistente al patrón Penicilina y es sensible al patrón Doxiciclina, de acuerdo a los datos elaborados de patrones estándar de halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión, 2012 (82).

Tabla 24: Resultados Descriptivos para la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” con las Concentraciones Estandarizadas sobre la Cepa Bacteriana de *Staphylococcus aureus* 25923.

Concentración del Extracto (mg/25µl)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
0.3	3	8.00	8.10	8.0667	.05774
0,45	3	10.00	10.20	10.1000	.10000
0,59	3	11.20	11.30	11.2667	.05774
0.75	3	12.40	12.50	12.4667	.05774
0.95	3	13.20	13.40	13.3000	.10000
1.49	3	14.20	14.50	14.3333	.15275
2.25	3	15.00	15.10	15.0667	.05774
3.73	3	16.30	16.40	16.3667	.05774
7.45	3	17.70	17.80	17.7667	.05774
11.16	3	18.60	18.70	18.6667	.05774
14.9	3	19.20	19.50	19.3000	.17321
18.63	3	20.30	20.50	20.4000	.10000
Penicilina 10UI/25µl	3	23.00	23.50	23.2333	.25166
Doxiciclina 30µg/25µl	3	26.90	27.00	26.9333	.05774

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 24 se observan los resultados descriptivos para la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 20.40mm a una concentración de 18.63 mg/25µl y la media del diámetro de menor actividad fue 8.0667mm a una concentración de extracto de 0.3mg/25µl. La menor desviación estándar de la media de diámetro de inhibición se dio a una concentración de 0.3mg/25µL con 8.0667mm de diámetro. Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentraciones-dependientes. Con respecto a los fármacos patrón Penicilina 10UI/25µl posee un diámetro de inhibición 23.23mm siendo *S. aureus* ATCC 25923 resistente a penicilina y con respecto a la Doxiciclina 30µg/25µl posee un diámetro de inhibición 26.93mm siendo *aureus* ATCC 25923 sensible al patrón Doxiciclina, de acuerdo con el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (82).

Tabla 25: Análisis de Varianza (ANOVA) para la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” con las Concentraciones Estandarizadas sobre la Cepa Bacteriana de *Staphylococcus aureus* 25923.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1065.867	13.000	81.990	6622.249	0.000
Dentro de grupos	0.347	28.000	0.012		
Total	1066.213	41.000			

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS:

La tabla N° 25 muestra el Análisis de varianza de los resultados de la actividad antibacteriana con concentraciones estandarizadas del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl. “Ccori kisa” sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* de la tabla N° 21, según la tabla N° 24 se aprecia que se encontró una diferencia significativa en las medias del diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl, siendo el valor de la significancia 0,000 (<0.05), por tanto se acepta que la hipótesis alterna de que las concentraciones agrupadas de extracto no tiene un efecto similar en la inhibición del crecimiento.

Tabla 26: Prueba POST HOC HDS DE TUKEY para la Actividad Antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiohora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” con las Concentraciones Estandarizadas sobre la Cepa Bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/25µL)	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0.3	3	8.0667												
0.45	3	10.1000	10.1000											
0.59	3		11.2667	11.2667										
0.75	3		12.4667	12.4667	12.4667									
0.95	3			13.3000	13.3000	13.3000								
1.49	3				14.3333	14.3333	14.3333							
2.24	3					15.0667	15.0667	15.0667						
3.73	3						16.3667	16.3667	16.3667					
7.45	3							17.7667	17.7667	17.7667				
11.16	3								18.6667	18.6667	18.6667			
14.90	3									19.3000	19.3000			
18.63	3										20.4000			
Penicilina 10UI/25µl	3												23.2333	
Doxiciclina 30µg/25µl	3													26.9333
Sig.		.73	.262	.99	.061	.453	.471	.080	.146	.354	.268	1.000	1.000	

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 26 según la prueba de POST HOC scheffé que realiza todos los contrastes de igualdad de medias entre rangos, el cual realiza la agrupación entre la media de los halos de inhibición obteniéndose 12 subgrupos de concentraciones. Entre los subgrupos se observa heterogeneidad ya que el valor de significancia es mayor de 0.05 a excepción del subgrupo 11 y 12 que sólo se encuentra conformado por la media de los halos frente a penicilina y doxiciclina respectivamente

También podemos observar que el subgrupo 10 está conformado por las concentraciones que presentaron una actividad antimicrobiana marcada que según Toda y Col es a partir de 16mm.

4.9 Determinación de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana in vitro de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* frente a fármacos antimicrobianos.

Tabla 27: Resultados de los halos de inhibición de los patrones sobre cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*

Fármacos	Diámetro del Halo de Inhibición (mm) en cepas aisladas de <i>Staphylococcus aureus</i>			
	IG	IIG	IIIG	Promedio
Penicilina (10UI/25µl)	0.00	0.00	0.00	0.00
Doxiciclina (30µg/25µl)	18	18.5	18.5	18.33

Fuente: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

La tabla N° 27 muestra los resultados de los halos de inhibición obtenidos sobre cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* Penicilina (10UI/25µL) y Doxiciclina (30µg/25µL) fueron 0.00mm y 18.33m respectivamente, de acuerdo a estos resultados la cepa aislada de *Staphylococcus aureus* es resistente a Penicilina y tiene sensibilidad intermedia frente a Doxiciclina de acuerdo a los datos elaborados de patrones estándar de halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (82).

Russi N. (2008) (94) en su estudio Susceptibilidad a antibióticos de *Staphylococcus aureus* reporta que se aislaron 95 cepas y el 52,6% de estas fueron resistentes a Penicilina. **López R.** (95) en su estudio Determinación de la Resistencia Microbiana de cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* reporta que se aislaron 31 cepas de *S. aureus* coagulasa positivas y el 96.77% de esta fueron resistentes a Penicilina.

Según **Levy S. (2002)** (96) los principales factores que favorecen el surgimiento de la resistencia bacteriana son: el movimiento de pacientes dentro y entre instituciones médicas; la apropiación de prescripción y uso de antibióticos (automedicación); las medidas excesivas del control de las infecciones; los viajes; la dosis y duración del tratamiento y otros factores socioeconómicos diversos.

CONCLUSIONES

1. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta actividad antioxidante in vitro siendo el efecto dosis dependiente, presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y no presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
2. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta: porcentaje de humedad: 43,69%, porcentaje de rendimiento: 34.19%, es de naturaleza parcialmente polar y en el análisis fitoquímico cualitativo el extracto presenta abundante cantidad de azúcares reductores, flavonoides, lactonas quinonas, taninos y aminoácidos.
3. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta alta actividad antioxidante in vitro por el método Brand-Williams captación del radical libre DPPH con 90.69% de porcentaje actividad de captación a una concentración de 100 µg/mL.
4. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cepas ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 20.23 mm a 18.630 mg/25µL de extracto y el extracto no presenta actividad antibacteriana sobre las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
5. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" presenta una concentración mínima inhibitoria en cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* fue de 0.30mg/25µL y en cepas aisladas no presenta concentración mínima inhibitoria.
6. La actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* es menor en relación a la actividad antibacteriana de los fármacos patrón, con halos de inhibición de 23.23mm y 26.93mm para Penicilina y Doxiciclina respectivamente y la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* es menor en relación a Doxiciclina con un halo de inhibición de 18.33mm y Penicilina no presentó ninguna actividad antibacteriana sobre cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.
7. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana muestra que las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* son resistentes a Penicilina con un halo de inhibición de

0.00 mm y son de sensibilidad intermedia frente a Doxiciclina con un halo de inhibición de 18.33 mm.

SUGERENCIAS

A las Autoridades de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

- Implementar los laboratorios de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, con equipos dedicados a la investigación científica para facilitar la ejecución de los trabajos de investigación y su respectiva capacitación.

A los Docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

- Permitir e incentivar a los investigadores a realizar más estudios de especies ya estudiadas, para así poder recabar mayor información de estas, así como también garantizar la veracidad de los resultados y la variabilidad que puede existir entre diferentes tipos de estudio
- Permitir al estudiante el estudio de todo tipo de especies sean propias de la región o no. Debido a que estas pueden presentar una variada actividad referente a otra región o país.
- Permitir el acceso a todos los laboratorios necesarios o útiles, así como también tomar medidas para el apoyo en el uso de reactivos o materiales necesarios para el investigador. Para así reducir costos e incentivar a la investigación.

A los Estudiantes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

- Realizar más estudios con diferentes métodos de extracción para la obtención de metabolitos de diferente naturaleza polar, así como también comparar sus actividades farmacológicas.
- Realizar un análisis fitoquímico cuantitativo, para caracterizar cuantificar y aislar los metabolitos secundarios presentes en el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" con el fin de evaluar los mecanismos de acción de los principios activos responsables de la actividad antioxidante y antibacteriana.
- Realizar estudios de toxicidad del xtracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" para así establecer una dosis adecuada permitida para uso clínico.
- Desarrollar y evaluar formulaciones farmacéuticas con el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa", para su uso clínico y coadyuvar en el tratamiento de afecciones causados por *Staphylococcus aureus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Quesada A. Las Plantas Medicinales. Herbario Nacional de Costa Rica. Revista Biocenosis. 2008; 21(1-2).
2. Prieto S, Garrido Gabino , González J. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2004 Enero; 35(1): p. 19-36.
3. Organización Mundial de la Salud. Centro de Prensa. Resistencia a Antimicrobianos. [Online].; 2013 [cited 2016 Octubre 5. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/facts>.
4. D D, Brea ML. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Princesa. Revista Española. 2003.
5. Solis EM. Capacidad Antioxidante in Vitro de Extractos Hidroalcohólicos de *Bidens triplinervia* var. *macrantha* (Qello T'ika). Tesis de Pregrado. Cusco: Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2010.
6. Rodríguez M, Tomasini L. Antioxidant Capacity and antibacterial activity of phenolic argentinean herbs infusions. Elsevier. 2010 Setiembre; 21(5): p. 779-785.
7. Huaman Eriquez Y, Oroche Soto R. Determinación de la Actividad Antibacteriana in Vitro de los Extractos Etanólicos y Clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton (Yawar Chonq'a) y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles (Ojotillo) frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC y *Escherichia coli* cepa ATCC. Tesis de pregrado. Cusco: Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Farmacia y Bioquímica; 2015.
8. Halliwell B, Gutteridge J. Antioxidant Defense Mechanism: From The Beginning To The End(of the beginning) Berlin: Free Radics Res; 1999.
9. Ramírez Pérez M, Alvarado Martínez M, Rodríguez González JG. Correlación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Potencial Reductor de Plantas Nativas del semidesierto de Coahuila. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2016; I(1): p. 151-156.
10. Pardo Jumbo AN. Evaluación de la capacidad antioxidante y Compuestos Fenólicos en la Pulpa de la Maracuya (*Passiflora edulis*). Tesis de Pregrado. Machala-Ecuador: Universidad Técnica de Machala, Ciencias Químicas y de la salud; 2015.
11. Jimenez N, Londoño J, Arango GJ. Actividad Captadora de Radicales Libres y Citotoxicidad de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae. Acta Farm. Bonaerense. 2005 Marzo; III(24): p. 337-342.
12. Puelles Gallo M, Gómez Galarza V, Gabriel y Galan Gómez J. Las Plantas Medicinales del Perú. Etnobotánica y Viabilidad Comercial. Primera ed. Pérez Enciso J, editor. Madrid: Estudio Pérez Enciso; 2010.

13. Matta L M. Screening fitoquímico, antimicrobiano y antioxidante de plantas preandinas y del antiplano chileno. UNiversidad de Chile. Tesis de Pregrado. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Departamento de Química Farmacología y Toxicología; 2009.
14. Nichols RL, Florman S. Clinical presentations of soft tissue infections and surgical site infections. *Clin Infect Dis*. 2001 Julio; II(33).
15. Morrone A, Toma L, Franco G. Skin diseases highlighting essential global public health priorities. *Int J Dermatol*. 2005; IV(44).
16. Castillo Garcia E, Martines Solis L. Manual de Fitoterapia. Revista Digital Elsevier. 2007.
17. Franco Quino C, Muñoz Espinoza D, Gómez Herreros C, Chau Miranda G, Cueva Piña L, Guardia Ortiz E, et al. Características fitoquímicas y capacidad antioxidante in vitro de Aloe vera, Plukenetia volubilis, Caiophora carduifolia, Crecopia Membranácea. *An Fac Med*. 2016 Agosto 11; I(77): p. 9-13.
18. Cerón GT. Etnobotánica de Plantas con Uso Medicinal en la Comunidad de Quero, jauja, región de Junín. Tesis de Pregrado. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2015.
19. Rado B. Etnobotánica del Distrito de Ocongate- Quispicanchi-Cusco. Tesis. Cusco-Perú: Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco; 2011.
20. Favio FP. La Flora local como estrategia para deducir riesgos climáticos desde un enfoque etnoecológico; caso comunidad Challoma. Tesis de Pregrado. Tapacari: Universidad Mayor de San Simón; 2014.
21. Apaza EA. Actividad Antimicrobiana de aceites esenciales de Chenopodium ambrosioides, Artemisia absinthium, Caiophora cirsiifolia sobre cepas negativas *Satphylococcus aureus* y su toxicidad en Artemia salina. Tesis de Pregrado. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2017.
22. Tenorio R, al e. Capacidad inhibitoria de filtrados de Trichoderma inhamatum y Caiophora andina sobre fitopatógenos de Theobroma cacao. *Revista Boliviana de Quimica*. 2016 Junio 30; 33(3): p. 116-126.
23. Quino Cesar F., Muñoz E. Dany. Características Fitoquímicas y Capacidad Antioxidante In Vitro de Aloe vera, Plukenetia volubilis, Caiophora carduifolia, Cecropia membranácea. *Revista de la Facultad de Odontología*. 2015 Noviembre 6; I(1).
24. Gutiérrez Góngora IdP, Mamani Huittocollo M. Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa de los extractos secos etanólicos al 70% de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de Gota y Determinación de Metabolitos Secundarios. Tesis de Pregrado. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2011.

25. Weigend M, Kufer J, Müller AA. Seed Oil Fatty acids of Loasaceae-A New Source of γ -Linolenic and Stearidonic Acids. *American Journal of Botany*. 2004 Enero; 81(3).
26. Weigend M, Kufer J, Müller AA. Phytochemistry and the Systematics and Ecology of Loasaceae and Gronoviaceae (Loasales). *American Journal of Botany*. 2000 Setiembre; VIII(87): p. 1202-1210.
27. Achauanco C. M, Aragón P. P. Actividad antibacteriana in vitro de los extractos Etanólicos y Glicólicos de las hojas de la especie vegetal *Flouencia polycephala* M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *propinobacterium acnes* y su relación con la actividad anti. Tesis de Pregrado. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2015.
28. Rosell Cáceres G. Determinación del Contenido total de Polifenoles y Actividades Antioxidante y Antibacteriana In Vitro del extracto etanólico al 70% de *Thymus vulgaris* L. frente a *Staphylococcus aureus* Cepa ATCC 25923. Tesis de Pregrado. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2014.
29. Talkuder E, al e. In Vitro Antioxidant Potential of Momodirca Charantia Fruit Extracts. Tesis de Pregrado. Universidad Chittagong; 2013.
30. Quispe Tapia J, Quiroga D. Determinación de la Actividad Antibacteriana sobre cepas ATCC y cepas aislada de *Escherichia coli* y *Pseudomona aureginosa* y determinación de la toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcohólico al 70%de la especie vegetal *Spidium guajava* "sahuinto". Tesis de Pregrado. Cusco: universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2012.
31. Rahman A, Imran T. Antioxidative, Antimicrobialand Cytotoxic effects of the phenolics oh *Leea indica* extracts. Tesis de Pregrado. Natal.; 2012.
32. Inocente M. Actividad Antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada). Tesis de pregrado. Lima: Universidad Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2009.
33. Venero J. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar Dr. Luis Diaz Soto. 2002..
34. Hicks, J; et al. *Bioquímica Mexico*: McGraw-Hill Interamericana S.A. de C.V; 2000.
35. Sohio , A; Turno F, M; et al. Factores Amientales Generadores de radiales libres y factores clinicos-sanitarios y ocupacionales de riesgo de irradiaciones: Prevención y Proteccion. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 2004; I(4): p. 65-71.
36. Villavicencio M. *Avances en Bioquimica Médica*: CONCYTEC; 2000.
37. Tan Paul V, Dimo T, Dongo E. Effects of methanol, cyclohexane and methylebe chloride extracts of *bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats. *Jounal of Ethnopharmacology*. 2000; 73(415-421).
38. Delvin T M. *Bioquímica*. Cuarta ed. Barcelona: Reverte; 2004.

39. Gil H, A; et al. Nutrición Clínica: Implicaciones del Estrés Oxidativo y de los Alimentos Funcionales España: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2001.
40. Moreno R. Nutrición Dietética para Tecnólogos de Alimentos España: Diaz Santos; 2000.
41. Shindo Y, E W, D H, W E, L P. Antioxidantes Enzimáticos y no Enzimáticos en la Epidermis y Dermis de la Piel Humana. *Journal of Investigative Dermatology*. 1994;(103): p. 122-124.
42. Grando de Oliveira R, Prado M, Texeira Godoy H. Quantification of L-ascorbic acid and D-iso-ascorbic acid in jellies fruit by high performance liquid chromatography. *QuimicaNova*. 2011 Diciembre; 35(5): p. 1020-1024.
43. Chavez R, Plaza A, Lock O. Antioxidantes de Origen Vegetal. *Revista Química*. 1996; X(1).
44. Gormaz JG. Extracto hidroalcohólico de Buddleja globosa y extracto seco de Rosmarinus officinalis como Preservantes de Filetes de Oncohorynchus mykiss. Tesis de titulación. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2005.
45. Sastre A. Tratado de Nutrición España: Edición Diaz Santos; 2005.
46. Desikan R, Mackerness S, Hancock J, Neill SJ. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by. *Plant Physiology*. 2001; 5(127): p. 159-172.
47. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girao da Cruz MT, Cordeiro MNDS, Milhazes N. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure activity relationship study Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004; 12(13): p. 351-358.
48. Martínez Miguel A. Evaluación antibacteriana y Antioxidante de extractos de cáscara de naranja (Citrus senensis) variedad valencia. Tesis. Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2014.
49. Malgor LA, ME. V. Farmacología Médica. [Online].; 2014 [cited 2016 Diciembre 18. Available from: http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacología/temas_farma7indice.v1.thml.
50. Hernandez Muñoz A. Microbiología Madrid: Paraninfo; 1997.
51. Kasper D, Braunwlad E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Y Isselbacher KJ. Harrison, Principios de medicina Interna. Décimo sexta ed.: Mc Graw Hill; 2005.
52. Pinilla G, Muñoz L, Navarrete J, Arévalo. El ataque de las bacterias: cómo prevenirlo sin morir en el intento. *Scielo*. 2012 Diciembre; 10(18).
53. Mendo Rubio M. Medios de cultivo en Microbiología, Manual de Laboratorio. Quinta ed. España: Ediciones Laboratoriales SRL; 2005.

54. Palavecino Rosales E. Boletín de la Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile. [Online].; 2010 [cited 2016 Noviembre 28. Available from: <http://escuelademed.puc.cl/pub//boletin/laboratorio/interpretacion.html>].
55. Toda M, Kubo Y. Antibacterial and bactericide activity of tea extracts and catechins against methicillin resistant Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 1994; 5(46): p. 845-949.
56. Castro Sumaria V. Actividad Antibacteriana in Vitro de los Extractos Etabólico y Clorofórmico de Flourensia polycephala Dillon y elaboración de una forma farmacéutica tópica para su Evaluación in vivo en Infecciones dérmicas por Staphylococcus aureus en ratones. Tesis de Pre grado. Cusco: Umiversidad Nacional San Antonio Abad de Cusco, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquimca; 2011.
57. Vallenás C. J, Velázquez V. R. Procedimientos Operativos Estándar para Control de Calidad de Producto Terminado. Primera ed. Cusco; 2010.
58. Gil Ejea J. Servicio de Dermatología. Hospital del Mar. Universidad Autónoma de barcelona. Scielo. 2008 Mayo; 47(5).
59. Carmona O, Gómez M, Montes JO. Microbiología Médica. Quinta ed. Venezuela: Megrew Hill Interamericana; 1997.
60. Capdevila Morell JA, Almirante Grajera C, Pigrau Serrallach YA, Pahissa B. Infecciones por estafilococos aureus, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Vall d'Hebron. Primera ed. Barcelona: Universidad Autónoma de barcelona.
61. Harrison S. Public Health Image Library. [Online].; 2012 [cited 2018 Junio 29. Available from: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=19059>].
62. Brokt D T, Madigan T M. Microbiología. Segunda ed. Mexico: Englewoth Cliffs; 1998.
63. Farreras R. Medicina Interna. Décimo Cuarta ed. Barcelona-España: Mosvy-Doyma; 2005.
64. Pelzcar. Jr MJ, Reid RD, Chan ECS. Microbiología. cuarta ed. México: Mc Graw-Hill; 1997.
65. Dorantes Luis C. Investigación Clínica. Primera ed. Marcos UNMdS, editor. Lima: Interamericana Mc Graw-Hill; 1998.
66. Brees , Mark A YB, Robert. Manual de Merck de Diagnóstico y Tratamiento. Décima ed. España: Harcourt; 1997.
67. Jawetz , Melnick , Adelberg. Microbiología Médica. décimo Octava ed. México: El Manual Moderno S.A; 2005.
68. Madigan M, Martinko J, J. P. Brock-Biología de los microorganismos. Décima ed. México: Pearson; 2004.

69. Schlegel G H. Microbiología General. Tercera ed. Barcelona España: Ediciones Omega; 1997.
70. Thopson J. Práctica Contemporaneo en Farmacia. Segunda ed. España: Mc Graw-Hill Interamericana Editores s.a; 2006.
71. Lastra J, Arias E. Cinética del crecimiento Santa Fé: El Cid Editor; 2009.
72. Sanchez I. Influencia del Crecimiento de bacillus subtilis conteniendo varias copias del gen vgb de Vitrioscilla stercoraria a diferentes concentraciones de oxígeno y a diferentes presiones. Tesis. Mexico D.F: Universidad Autonoma de México, Departamento de Microbiología; 2012.
73. Vademecum IQB. Amoxicilina. [Online].; 2013 [cited 2016 Octubre 19. Available from: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a051.htm>.
74. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Tesis Pregrado. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química; 2004.
75. Gutierrez, D; et al. Medición de fenoles y actividad antioxidante en maleza utilizada para alimentación animal. Tesis de Pregrado. Querétaro: Universidad Autónoma de Queretaro, Simposio de Metrología; 2008.
76. Esacademic. Esacademic. [Online].; 2011 [cited 2016 Mayo 15. Available from: http://www.esacademic.com/actividad_antibacteriana_def.htm.
77. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Primera ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica ; 1994.
78. DIGESA. Norma Sanitaria sobre Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano Cusco-Perú; 1999.
79. Brand-Williams W, al. e. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 1995;(28): p. 25-30.
80. García L. Conservación de cepas Microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) España; 2009.
81. Colivet, J.; et al. Efecto Antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (Ocimum basilicum L.) sobre el crecimiento de Staphylococcus aureus. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2012; II(2).
82. Sacsquispe R, Velasquez J. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión Salud INd, editor. Lima; 2012.
83. Rojas J. Evaluación de dos Metodologías para determinar la Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales. Cuarta ed. Chile; 2005.
84. Guzmán Lista Militza del Carmen, Lozada Oca Ritmar Alejandra. Detección de Staphylococcus aureus meticilino-resistentes aislados de pacientes con

infecciones. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2007 Enero-Junio; 27(1): p. 503-5011.

85. Stubsgarrd F. Humedad de semillas y principio de secado. Danida Forest Seed Centre. Lecture Note C-5.CATIE. Serie Tecnica. Manual Tecnico. 1997 Julio; 2(24): p. 1-37.
86. Abdala, Susana et al. Farmacognosia General. Primera ed. Fresno ÁMVd, editor. Madrid: Editorial Síntesis; 1999.
87. Vallenas C. Julio, Velázquez V. Ross. Procedimientos Operativos Estándar para Control de Calidad de Producto Terminado. Primera ed. Regional ÁDFdH, editor. Cusco; 2010.
88. Tevez Meza F, Torres Apaza R. Estudio comprativo de la actividad Antioxidante in vitro de los extractos antociánicos de las antocianidinas en los frutos de las especies vegetales prunus serotina (capuli), muehlenbeckla volcánica (Mullak'a), Monnina salicifolia (Aceitunilla). Tesis de Pregrado. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Farmacia; 2011.
89. Ninantay K, Ardiles L. Estudio comparativo in vitro de la actividad antibacteriana de lo extractos acuosos liofilizados de pelargonium x hortorum L.H y senecio rhizomatus rusby sobre cepas ATCC de Staphylococcus aureus, Propinobacterium acnes y determinacion de su capacidad ant. Tesis de Pregrado. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2018.
90. Khera S. WG, SMSE. A novel antibacterial iridoic and triterpene from Caiophora coronate. Natural Products; 2003.
91. Urtagondo V. Caracterización de derivados polifenolicos obtenidos de fuentes naturales. citotoxicidad y capacidad antioxidante rente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis de Pregrado. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2009.
92. Carhuaopoma M. Estudio de la composición química y Actividad Antioxidante del aceite esencial de Luma Chequen (Molina) A. Gray "arrayan". Tesis de pregrado. Lima: Universidad Mayor de San Marcos, Farmacia y Bioquímica; 2006. Report No.: ISSN1561-0861.
93. S. M. Influencia de la Catalasa y de la B-toxina en la patogénesis de "Staphylococcus aureus". Tesis. España: Universidad Complutense de Madrid; 2005.
94. Russi N. Susceptibilidad a antibióticos de Staphylococcus aureus aisaldos de mastitis bovina. Tesis de Pregrado. Esperanza-Argentina: Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2008.
95. López R. Determinación de la Resistencia Microbiana de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana. Tesis de Pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2016.

96. Levy S. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 5(2): p. 25-30.
97. Jiménez Arellanes , Román Cortés NR, García. Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto hexánico y compuestos puros del rizoma de *Aristolochia taliscana*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 2011 Agosto 8; 41(2): p. 35-41.
98. Ehsan, U.; et al. In vitro antioxidant potential of *Momordica charantia* fruit extracts.. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2013; III(4): p. 963-971.
99. Sharapin N. *Materias Primas Vegetales para la Industria de los Productos Fitoterapeuticos*. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. 2013.
100. L. C. Evaluación de susceptibilidad in vitro de *Staphylococcus aureus*. *Rev Chil Infect*. 2002; 2(19): p. 116-118.

ANEXOS
ANEXO N° 1

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA

CERTIFICACIÓN

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ) y experto científico CITES certifica que la Alumna **Alejandra Lida Espinoza Mormontoy**, Código **041068** de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; ha sido sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas a tratamiento taxonómico corresponden a las especies:

En la clasificación APG III (Angiosperm Phylogenetic Group) la ubicación taxonómica corresponde a:

***Caiophora cirsiifolia* C. Presl**, Familia Loasaceae. Nombre común Ccori kisa, Quisa.

- Clase : Equisetopsida C. Agardh
- Subclase : Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden : Asteraneae Takht.
- Orden : Cornales Link
- Familia : Loasaceae Juss.
- Género : *Caiophora* C. Presl
- Especie : ***Caiophora cirsiifolia* C. Presl**

Lo que se certifica para los fines concernientes al caso.



Washinton Galiano Sánchez M. Sc., Dr. (c).
Prof. Principal Dpto. Académico de Biología
Experto Científico CITES

ANEXO N° 2

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO al 70% DE *Caiothora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caiothora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"

SOLICITANTE: Br. Alejandra Lida Espinoza Mormontoy

Para la tesis de Investigación intitulada "Actividad Antioxidante y Antibacteriana In Vitro del extracto seco hidroalcohólico de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre Cepas ATCC y Cepas Aisladas de *Staphylococcus aureus*"

Muestra: Extracto etanólico al 70% de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"

Lugar y fecha: Cusco 11 de Setiembre del 2017.

Indicadores Microbiológicos:

1. **Criterio imperativo:** Presencia de *Salmonella* spp (Agar SS).
2. **Criterios indicativos de higiene:** Número de Coliformes fecales- *Escherichia coli* (Caldo lactosado verde brillante billis 2%)
3. **Criterio de alerta o límites críticos:**
 - 3.1 Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos Viables (Agar Plate Count)
 - 3.2 Recuento de hongos y levaduras (agar OGYE)

Cuadro N° 01:
Reporte de resultados del control microbiológico del extracto etanólico
de *Caiothora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"

CRITERIOS	RESULTADOS EN LA DILUCIÓN 10 ¹	LIMITES MICROBIOLÓGICOS PERMISIBLES (LMP)	OBSERVACIONES
Criterio imperativo	Ausencia de <i>Salmonella</i> spp	Ausencia de <i>Salmonella</i> spp	La muestra Cumple los LMP
Criterios indicativos de higiene	Numero de Coliformes fecales - <i>Escherichia coli</i> : Ausencia	<i>Escherichia coli</i> : Ausencia	La muestra Cumple los LMP
Criterio de alerta o límites críticos	Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos Viables: < 10 ² UFC	10 ⁴ - 10 ⁵ UFC	La muestra Cumple los LMP
	Recuento de hongos y levaduras: < 10 ² UFC	10 ² - 10 ³ UFC	La muestra Cumple los LMP

El Método es el de la ICMSF (Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para Alimentos), Laboratorio General de Calidad de Agua Ministerio de Salud.

Conclusión:

La muestra Cumple los criterios de los Límites Microbiológicos Permisibles.


Dra. Yanet Mendoza Muñoz
CBP N° 2917 F.N.E. N° 0005
D.R.S.I. N° 1007-95
Docente de la E.P. de Medicina Humana
UNSAAG

ANEXO N° 3

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LA CEPA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-250 Reference Number: ATCC® 25923™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2017/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2015/12/10
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)

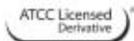
ID System: Vitek GP (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
--	---

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

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.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologica, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



TESTING CERT #2655.01

ANEXO N° 4

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO



Certificate of Analysis

1.00468.0100 L(+)-Ascorbic Acid for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch K48743968

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (iodometric)	99.7 - 100.5	%	99.9	%
Identity (IR-spectrum)	conforms		conforms	
Appearance	white or almost white, crystalline powder		white or almost white, crystalline powder	
Appearance of solution (50 g/l CO ₂ -free water)	clear (< 3 NTU) and not so intense in colour than reference solution BY ₇		clear (< 3 NTU) and not so intense in colour than reference solution BY ₇	
pH (50 g/l CO ₂ -free water)	2.1 - 2.6		2.3	
Spec. rotation [α] _D (100 g/l, water)	+20.5 - +21.5	°	+20.9	°
Chloride (Cl)	≤ 50	ppm	≤ 50	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 20	ppm	≤ 20	ppm
Cu (Copper)	≤ 5	ppm	≤ 5	ppm
Fe (Iron)	≤ 2	ppm	≤ 2	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 10	ppm	≤ 10	ppm
Oxalic acid	≤ 0.2	%	≤ 0.2	%
Related substances (HPLC) (Impurity C)	≤ 0.15	%	0.06	%
Related substances (HPLC) (Impurity D)	≤ 0.15	%	< 0.01	%
Related substances (HPLC) (unspecified impurities singly)	≤ 0.10	%	< 0.05	%
Related substances (HPLC) (sum of impurities (except impurity A and D))	≤ 0.2	%	< 0.1	%
Sulfated ash (600 °C)	≤ 0.05	%	≤ 0.05	%
Loss on Drying (105°C)	≤ 0.1	%	< 0.1	%

Date of release (DD.MM.YYYY) 15.02.2017
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.01.2019

Dr. Stefan Frey
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

ANEXO N° 5

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL DPPH

Calbiochem®



Certificate of Analysis

DPPH, Free Radical - CAS 1898-66-4 - Calbiochem

Batch Number: 2803502
Material Number: 300267-50MG
Molecular Formula: C₁₈H₁₂N₅O₆
Molecular Weight: 394.3
RTECS Number: MW3250000
CAS Number: 1898-66-4

Quality Release Date: 17-AUG-2016
Recommended Retest Date: 31-MAY-2018

Analytical Data		
Test	Tolerance	Result
Solubility:		DMF (10 mg/ml) or EtOH (5 mg/ml)
Color:		Black
Form:		Solid
Purity by Elemental analysis:	≥90.0 %	93.5 %
Carbon:	50.00 % - 58.00 %	55.20 %
Nitrogen:	16.00 % - 19.00 %	16.60 %

Storage and Handling: -20°C

This lot conforms to specifications established by EMD Millipore Corporation for this product.

24 February 2017

Quality Control / Assurance

Date

Prices and availability are subject to change. ©Copyright 2017 EMD Millipore Corporation, an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Each product is sold with a limited warranty, which is provided with each purchase. Each product is intended to be used for research purposes only. It is not to be used for drug or diagnostic purposes, nor is it intended for human use. EMD Millipore products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without written approval of EMD Millipore.

EMD Millipore Corporation | 28820 Single Oak Dr., Temecula, CA 92590

Technical Support NA +1-800-221-1975 | email: www.millipore.com/techservices | www.calbiochem.com

Technical Support All Other Countries - Contact Your Local Office

FOR RESEARCH USE ONLY.

Not for use in diagnostic procedures. Not for human or animal consumption. Purchase of this product does not include any right to resell or transfer, either as a stand-alone product or as a component of another product. Any use of this Product for purpose other than research is strictly prohibited.

Calbiochem and all other trademarks, unless specifically identified as belonging to a third party, are owned by Merck KGaA, Darmstadt, Germany

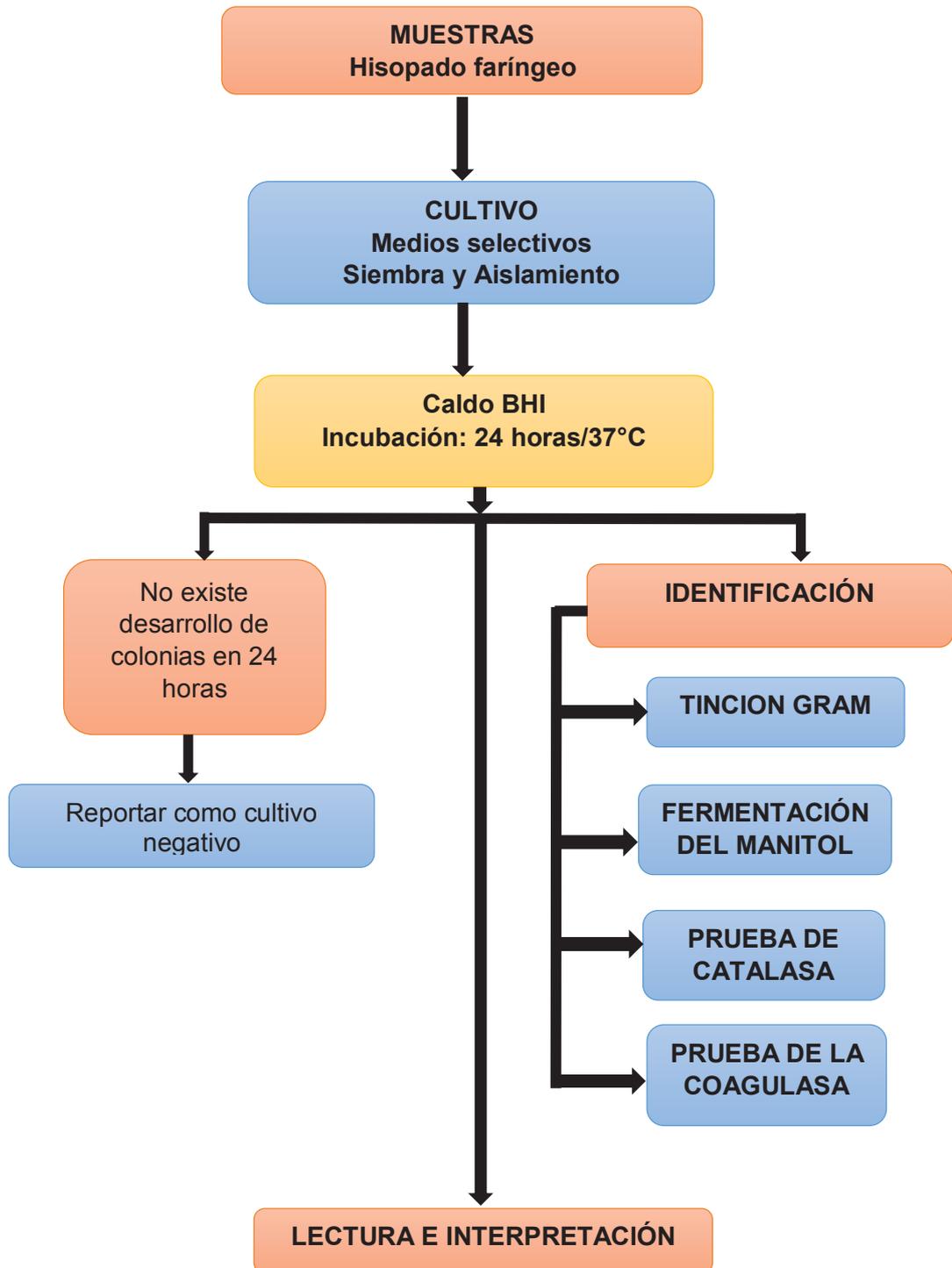
ANEXO N° 6

REACCIONES DE RECONOCIMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO

Metabolitos	Procedimiento	Resultado
Azucares reductores	A 0.5 mL agregar 1 mL de reactivo de Fehling a y 0.5 de reactivo de Fehling B, se calentará a baño maría a ebullición por 5 minutos.	La formación de un precipitado de color rojo ladrillo indica prueba positiva
Flavonoides	Reacción de Shinoda: A 0.5 mL de extracto añadir algunas limaduras de magnesio metálico más 2 a 3 gotas de HCL concentrado.	Coloración rojiza que tiende al amarillo o azul indican prueba positiva.
Compuestos fenólicos	Tomar 0.5mL de extracto y agregar 1 a 2 gotas de cloruro férrico al 1%	Indica prueba positiva la coloración azulada o verdosa a presencia de precipitado.
Alcaloides	Reacción de Dragendorff: A 0.4 mL de solución ácida agregar 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff.	La formación de un precipitado naranja o marrón indica la presencia de alcaloides
Lactonas	Prueba de Baljet: Se pone en contacto 200mg de extracto con 2-3 gotas de reactivo (mezcla A y B en volúmenes iguales). Baljet: (reactivo A: ácido pícrico al 1% en etanol y reactivo B KOH al 10%)	Coloración naranja o rojo oscuro indicara prueba positiva.
Quinonas	Reacciones de Bomtrager: A 0.5 mL del extracto agregar 0.5mL de hidróxido de potasio al 0.5%, calentar, filtrar si es necesario, enfriar y acidular luego extraer con benceno separada, agregar 0.5mL de hidróxido de amonio.	La coloración roja en la fase amoniaco indica la presencia de naftoquinona y antraquinonas.
Taninos	A 0,5 mL de extracto adicionar 2-3 gotas de cloruro férrico al 1%	la aparición de coloración o formación de precipitado indica que la prueba es positiva. La coloración azul oscuro indica la presencia de taninos gálico y una colocación verde la presencia de taninos catéquicos.
Saponinas	Aproximadamente 0,1 g del extracto se solubiliza en 5 mL de agua o en 5 mL de etanol al 40%, filtrar si es necesario, el filtrado agitar vigorosamente por 30 segundos.	. La formación de espuma persiste por 30 minutos, indica la presencia de saponinas.
Aminoácidos	A 0,5 mL de extracto acidificarlo con HCl al 1% agregar 2-3 gotas de la solución de Ninhidrina al 1%, calentar por 5 minutos en baño de agua a ebullición.	Las coloraciones rojizas, violetas o amarillas indican prueba positiva

ANEXO N°7

FLUJOGRAMA DE AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*
AISLADOS DE PACIENTES EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA-UNSAAC



Fuente: Elaboración Propia

ANEXO N° 8

Criterios de actividad antimicrobiana atendiendo al halo de inhibición

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

Actividad	Halo de Inhibición (mm)
Marcada	≥ 16
Moderada	$16 < \text{halo} < 12$
Ligera	$12 < \text{halo} < 8$
No actividad	< 8

Donde:

- Halo de inhibición ≥ 16 : Significa una actividad antimicrobiana marcada.
- Halo de inhibición $16 < \text{halo} < 12$: Significa una actividad antimicrobiana moderada.
- Halo de inhibición $12 < \text{halo} < 8$: Significada una actividad antimicrobiana ligera.
- Halo de inhibición < 8 : Significa ausencia de actividad antimicrobiana.

Fuente: Toda M, Kubo Y. Antibacterial and bactericide activity of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1994; 46 (5): 845-49.

ANEXO N° 9
FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS
ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Lugar: _____

Temperatura ambiente: _____

N° _____

Fecha: ____ / ____ / ____ Hora: _____

Especie: *Caiohora cirsiifolia C. Presl* "Ccori kisa"

TIPO DE PRUEBA	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Caiohora cirsiifolia C. Presl</i>
AZUCARES REDUCTORES	
FLAVONOIDES	
COMPUESTOS FENÓLICOS	
ALCALOIDES	
LACTONAS	
QUINONAS	
TANINOS	
SAPONINAS	
AMINOÁCIDOS	

LEYENDA:

- Abundante cantidad : +++
- Regular cantidad : ++
- Poca cantidad : +
- Ausente : -

OBSERVACIONES

RESPONSABLE

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Lugar: _____

Temperatura ambiente: _____

Fecha: ____/____/____ Hora: _____

N° ____

Especie: *Caiothora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"

TIPO DE PRUEBA	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Caiothora cirsiifolia</i> C. Presl
AGUA DESTILADA	
METANOL	
ETANOL 40%	
ETANOL 70%	
ETANOL 90%	
ACETATO DE ETILO	
ACETONA	
COLORFORMO	
HEXANO	

LEYENDA:

- Muy soluble : +++
- Soluble : ++
- Poco soluble : +
- Insoluble : -

OBSERVACIONES

RESPONSABLE

ANEXO N°9

FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

CAPTACIÓN DE RADICAL DPPH DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Caiophora cirsiifolia* C. Presl Y EL PATRÓN ÁCIDO ASCÓRBICO

Lugar: _____

Temperatura ambiente: _____

N°

Fecha: ____ / ____ / ____ Hora: _____

Tubo	Etanol absoluto (mL)	Etanol 70% (mL)	Ácido Ascórbico (mL)	DPPH 0.004% (mL)	Extracto seco hidroalcohólico de <i>Caiophora cirsiifolia</i> C. Presl (mL)	Total (mL)	Abs (517nm)
Blanco	1.50	1.50				3.00	
Control		1.50		1.50		3.00	
A1			1.50	1.50		3.00	
A2			1.50	1.50		3.00	
A3			1.50	1.50		3.00	
A4			1.50	1.50		3.00	
A5			1.50	1.50		3.00	
A6			1.50	1.50		3.00	
E1				1.50	1.50	3.00	
E2				1.50	1.50	3.00	
E3				1.50	1.50	3.00	
E4				1.50	1.50	3.00	
E5				1.50	1.50	3.00	
E6				1.50	1.50	3.00	

A1: Ácido Ascórbico 5µg/mL en etanol al 70%

E1: Extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl 5µg/mL

A2: Ácido Ascórbico 10µg/mL en etanol al 70%

E2: Extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl 10µg/mL

A3: Ácido Ascórbico 30µg/mL en etanol al 70%

E3: Extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl 30µg/mL

A4: Ácido Ascórbico 50µg/mL en etanol al 70%

E4: Extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl 50µg/mL

A5: Ácido Ascórbico 70µg/mL en etanol al 70%

E5: Extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl 70µg/mL

A6: Ácido Ascórbico 100µg/mL en etanol al 70%

E6: Extracto de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl 100µg/mL

OBSERVACIONES

RESPONSABLE

PARA HALOS DE INHIBICIÓN (PILOTO)

Lugar: _____

Temperatura ambiente: _____ Temperatura de Incubadora: _____

Tiempo de Incubación: _____

Fecha: ____/____/____ Hora: _____

N°

Cepa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

N°	Concentración del Extracto (mg/25µL)	Diámetro de los Halos de Inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.05				
2	0.10				
3	0.30				
4	0.40				
5	0.50				
6	0.80				
7	1.00				
8	1.50				
9	2.50				
10	5.00				
11	7.50				
12	10.00				
13	12.50				
14	20.00				
15	30.00				
16	50.00				

OBSERVACIONES

RESPONSABLE

HALOS DE INHIBICIÓN

Lugar: _____

Temperatura ambiente: _____ Temperatura de Incubadora: _____

Tiempo de Incubación: _____

Fecha: ____ / ____ / ____ Hora: _____

N°

N°	Concentración del extracto (mg/μL)	Diámetro del Halo de Inhibición (mm) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	Promedio
1	0.300				
2	0.450				
3	0.590				
4	0.750				
5	0.190				
6	1.490				
7	2.240				
8	3.730				
9	7.450				
10	11.160				
11	14.900				
12	18.630				
13	Penicilina (10UI/25μl)				
14	Doxiciclina (30μg/25μl)				

OBSERVACIONES

RESPONSABLE

ANEXO 10

ARCHIVO FOTOGRÁFICO

Fotografía 2: Especie *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa” tomado en la localidad de Llullucha, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis – Cusco



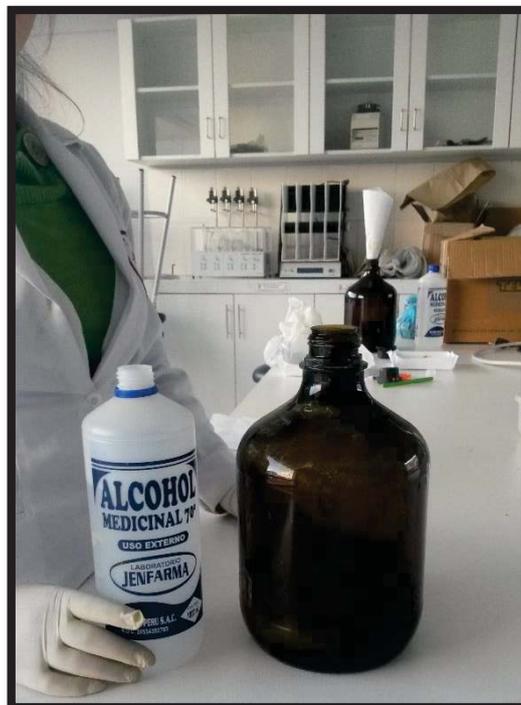
Fotografía 3: Recolección de la especie *Caiophora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”



Fotografía 4: Selección y secado a temperatura ambiente de la especie *Caiphora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”



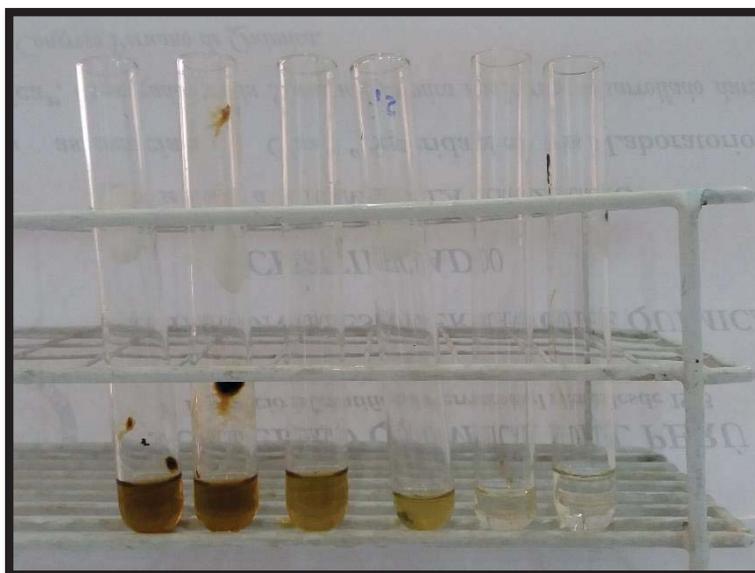
Fotografía 5: Maceración después de la molienda y tamizado en alcohol al 70% de la especie *Caiphora cirsiifolia* C. Presl “Ccori kisa”



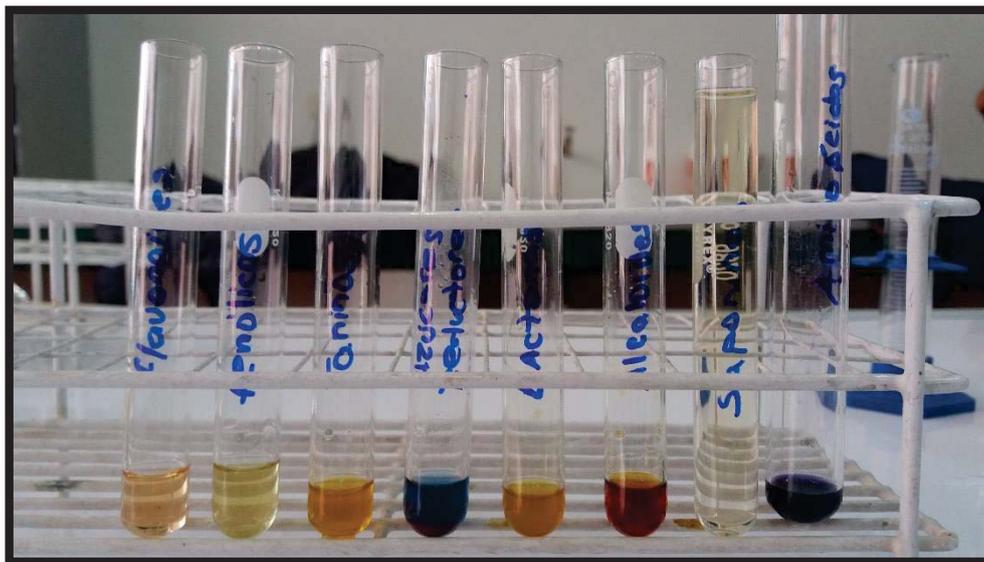
Fotografía 6: Extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"



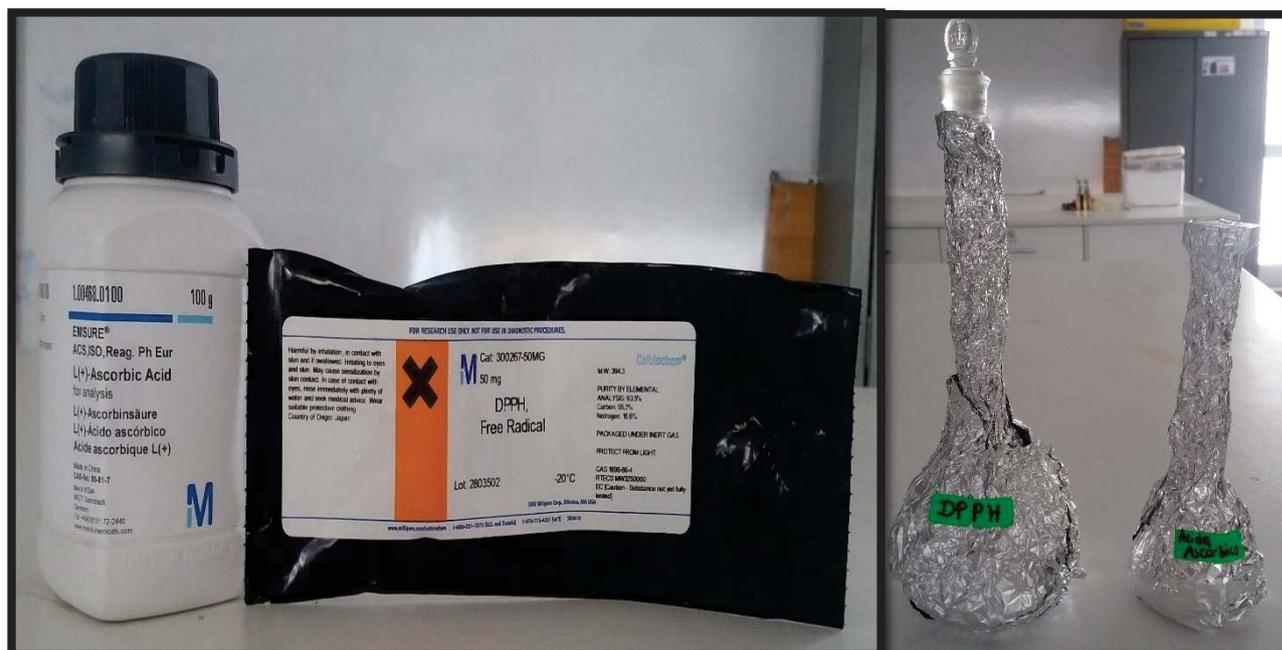
Fotografía 7: Pruebas de solubilidad para el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa"



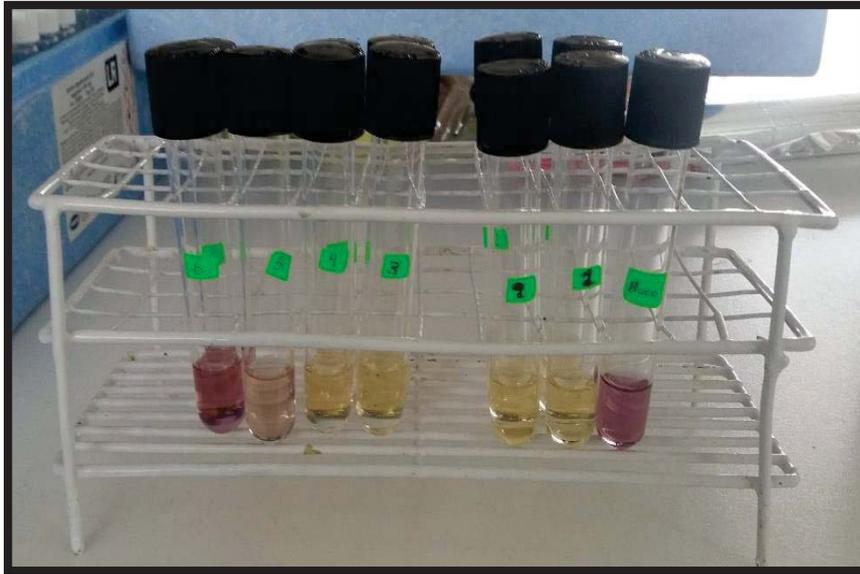
Fotografía 8: Identificación fitoquímica cualitativa del extracto seco hidroalcohólico al 70%



Fotografía 9: Preparación del Reactivo DPPH y el Patrón Ácido ascórbico para evaluar la actividad antioxidante



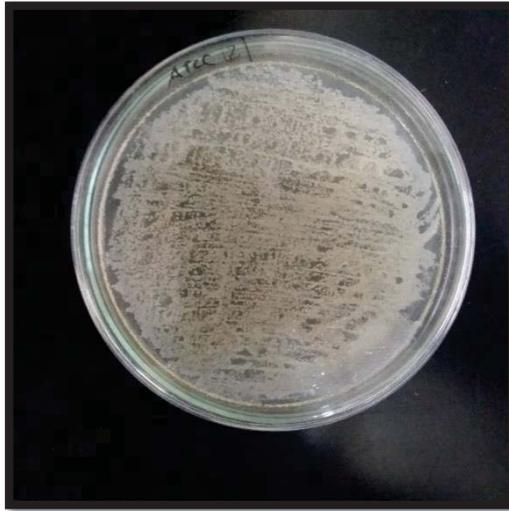
Fotografía 10: Tubos con las diferentes concentraciones de extracto + DPPH después de 30 minutos en oscuridad para luego ser leídos en el espectrofotómetro



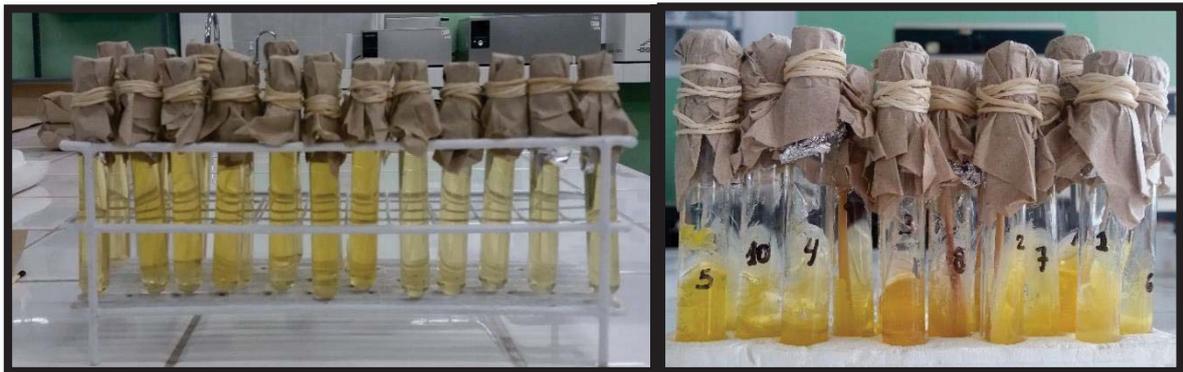
Fotografía 11: Sachet y dispositivo KwikStick de Microbiologics INC que contiene a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Fotografía 12: Obtención de la Cepa activada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, después de haber sido sembrado del dispositivo e incubado de acuerdo a la técnica del fabricante



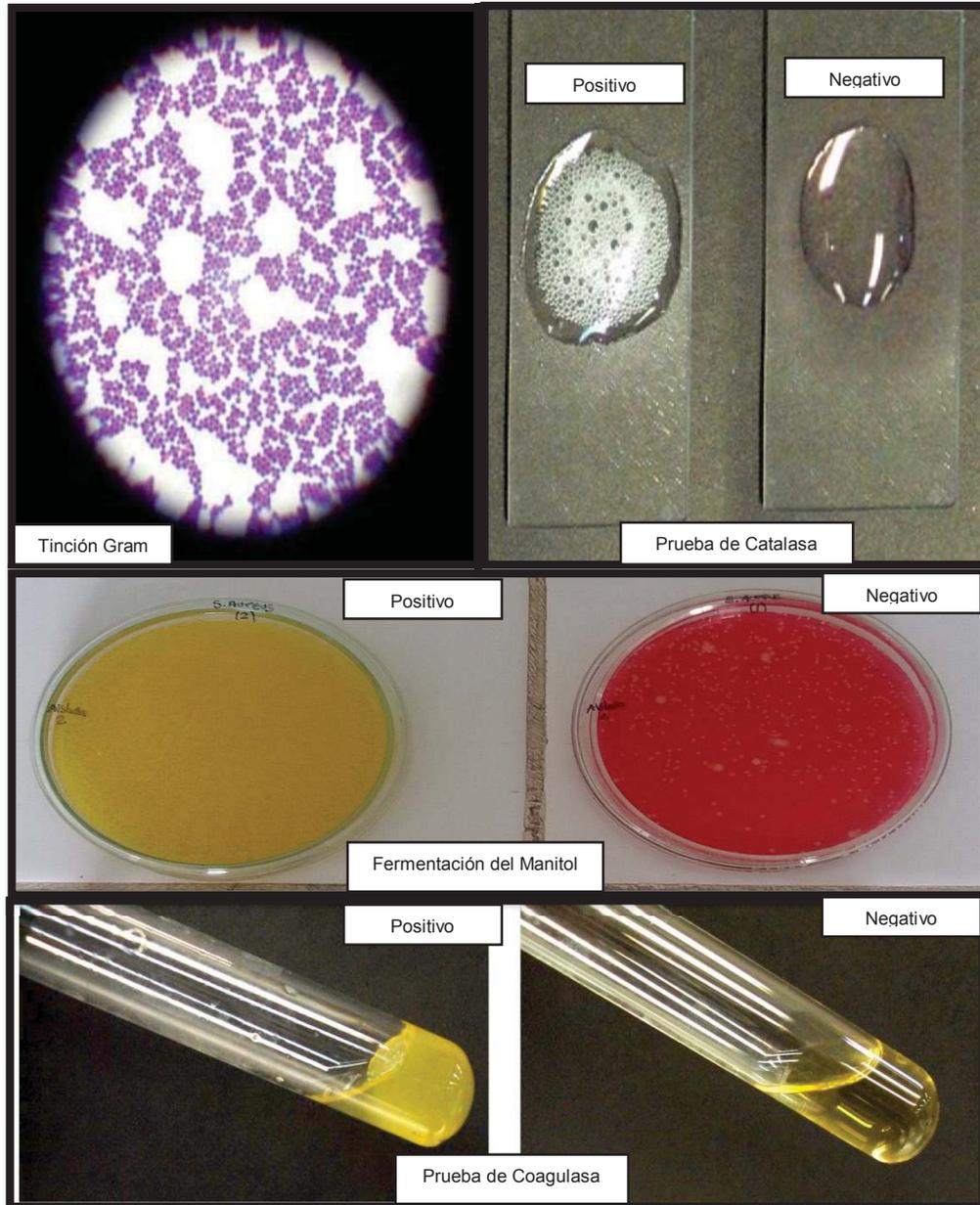
Fotografía 13: Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*



Fotografía 14: Cepa aislada de *Staphylococcus aureus* sembrado en agar Tripticasa soya



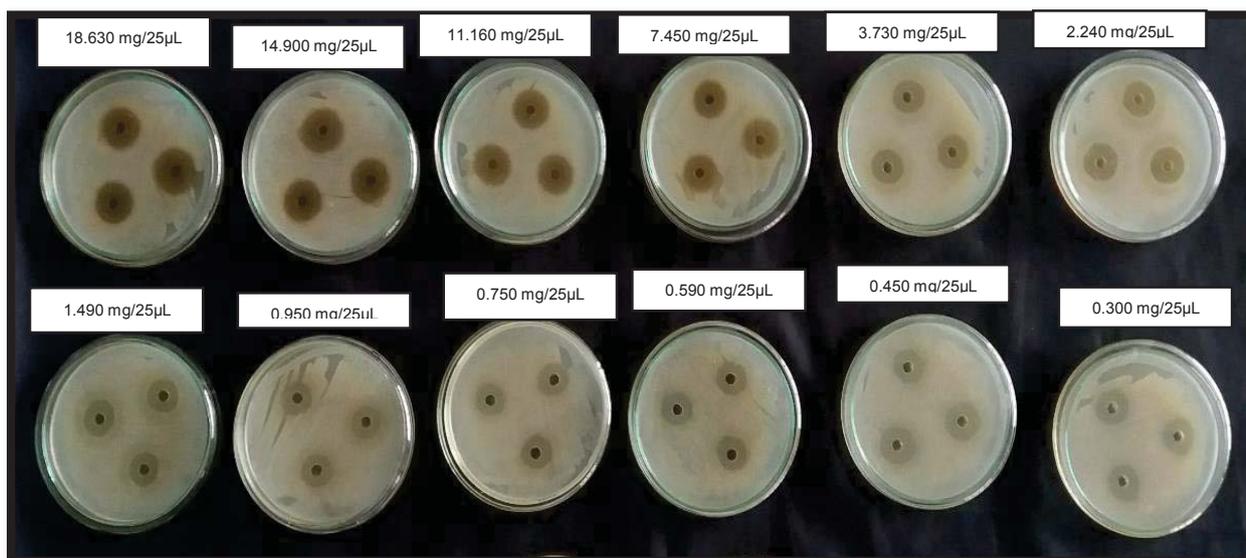
Fotografía 15: Resultados de las Pruebas de Identificación de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*



Fotografía 16: Cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* en baño maría para realizar la estandarización y lectura en el espectrofotómetro



Fotografía 17: Se observan los halos de inhibición formados para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 después de su incubación por triplicado, donde el mayor promedio de diámetro de inhibición fue de 20.23mm a una concentración de 18.63mg/25 μ L



Fotografía 18: Se aprecia la medida de uno de los diámetros de inhibición del extracto a una concentración de 18.63mg/25µL.

