

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE
LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea*
“YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* “OJOTILLO” FRENTE A
Staphylococcus aureus CEPA ATCC Y *Escherichia coli* CEPA ATCC Y
DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL”**

Tesis para Optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

PRESENTADO POR:

Bach. Yeni Huaman Enriquez
Bach. Yaneth Roxana Oroche Soto

ASESORA:

M.Cs. Lelia M. Rodríguez Torres

CO – ASESORES:

Q.F. Carlos A. Moreyra Pachas
Blga. Lilia D. Gutierrez Moreno

Tesis Financiada por el Consejo de Investigación

CUSCO – PERU

2016

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
SUMMARY.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	VII

CAPÍTULO I GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del Problema.....	1
1.1.1 Descripción del Problema.....	1
1.1.2 Formulación del Problema.....	2
1.2 Objetivos.....	2
1.2.1 Objetivo General.....	2
1.2.1 Objetivos Específicos.....	2
1.3 Justificación	3
1.4 Hipótesis.....	3

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 Visión Histórica.....	4
2.2 Antecedentes.....	4
2.2.1 Antecedentes Internacionales.....	4
2.2.2 Antecedentes Nacionales.....	5
2.2.3 Antecedentes Locales.....	9
2.3 Bases Teóricas Científicas.....	14
2.3.1 Aspectos botánicos de las especies en Estudio.....	14
2.3.1.1 <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar chonq’a”.....	14
2.3.1.2 <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	15
2.3.2 Descripción de las Cepas Utilizadas.....	17
2.3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.3.2.1.1 Clasificación Científica.....	17
2.3.2.1.2 Descripción.....	17
2.3.2.1.3 Patogenia.....	17
2.3.2.1.4 Virulencia.....	17
2.3.2.1.5 Mecanismo de Resistencia.....	19
2.3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.2.2.1 Clasificación Científica.....	20
2.3.2.2.2 Descripción.....	20
2.3.2.2.3 Patogenia.....	20
2.3.2.2.4 Virulencia.....	20
2.3.2.2.5 Clasificación.....	21

2.3.2.2.6 Mecanismo de Resistencia.....	22
2.3.3 Descripción de los fármacos usado como patrón comparativo.....	22
2.3.3.1 Oxacilina.....	24
2.3.3.2 Clindamicina.....	25
2.3.3.3 Ciprofloxacino.....	28
2.3.3.4 Amikacina.....	29
2.3.4 Crecimiento Microbiano.....	31
2.3.4.1 Curva de Crecimiento.....	31
2.3.5 El Cepario.....	32
2.3.5.1 Cepas ATCC.....	33
2.3.6 Obtención de una Curva Estándar.....	33
2.3.7 Actividad Antibacteriana Relacionada a Plantas.....	33
2.3.7.1 Actividad Antibacteriana.....	33
2.3.7.2 Medición de la Actividad Antibacteriana.....	33
2.3.7.2.1 Método de Dilución en Caldo.....	34
2.3.7.2.2 Métodos Automatizados.....	34
2.3.7.2.3 Método de Dilución en Placa.....	35
2.3.8 Aspectos Toxicológicos.....	35
2.3.8.1 Clasificación de Estudios de Toxicidad.....	36
2.3.8.2 Aspectos Generales del Estudio Histopatológico.....	39
2.4 Definición de Términos.....	44

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales Biológicos.....	45
3.1.1 Muestra Vegetal.....	45
3.1.2 Muestra Microbiana.....	45
3.1.3 Animales de Experimentación.....	45
3.2 Materiales e Instrumentos.....	45
3.2.1 Materiales de Campo.....	45
3.2.2 Materiales de Laboratorio.....	45
3.2.3 Equipos de Laboratorio.....	46
3.2.4 Solventes y Reactivos.....	47
3.2.5 Medios de Cultivo.....	47
3.2.6 Fármacos Empleados como Patrón.....	47
3.2.7 Otros Materiales.....	48
3.3 Diseño Metodológico.....	49
3.3.1 Tipo de Investigación.....	49
3.3.1.1 Ensayo de la actividad antibacteriana.....	49
3.3.1.2 Ensayo de la toxicidad aguda.....	50
3.4 Identificación y operacionalización de variables.....	52
3.4.1 Variables implicadas.....	52
3.4.1.1 Variables Independientes.....	52
3.4.1.2 variables Dependientes.....	52

3.4.2 Operacionalización de Variables.....	53
3.4.2.1 Variables Independientes.....	53
3.4.2.2 Variables Dependientes.....	54
3.4.2.3 Variables Intervinientes.....	56
3.5. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	60
3.5.1 De las Muestras Vegetales.....	60
3.5.2 De las Bacterias.....	60
3.6 Procedimiento de la Investigación.....	61
3.6.1 Muestreo y Preparación de las Muestras.....	61
3.6.1.1 Recolección de las Plantas en Estudio.....	61
3.6.1.2 Selección y Secado de las Muestras.....	61
3.6.1.3 Molienda y Tamizaje de las Muestras.....	61
3.6.2 Determinación del Porcentaje de Humedad.....	61
3.6.3 Obtención del Extracto.....	62
3.6.4 Porcentaje de Extracción.....	63
3.6.5 Pruebas de Solubilidad.....	63
3.6.6 Análisis Fitoquímico Cualitativo.....	63
3.6.7 Procedimiento General del Estudio.....	64
3.6.8 Control microbiológico de los extractos Etanólicos y Clorofórmicos.....	65
3.6.9 Determinación de la Actividad Antibacteriana.....	70
3.6.10 Determinación de la Toxicidad Aguda.....	74
3.6.10.1 Diseño Metodológico.....	74
3.6.10.2 Estudio Histopatológico.....	76
3.6.10.2.1 Procedimiento del Estudio Histopatológico.....	76
3.7 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	77
3.8 Técnicas para el Procesamiento y Análisis de la Información.....	77

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Determinación del Porcentaje de Humedad.....	78
4.2 Porcentaje de Extracción.....	79
4.3 Pruebas de Solubilidad.....	80
4.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo.....	81
4.5 Del Control Microbiológico de los Extractos Etanólicos y Clorofórmicos de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	84
4.6 Determinación de la Actividad Antibacteriana.....	86
4.6.1 De la Estandarización de la Curva de Crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	86
4.6.2 Del Ensayo de la Sensibilidad Bacteriana de la Prueba Piloto frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	88

4.6.2.1	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera Rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	88
4.6.2.1.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” obtenidos en la prueba piloto frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	90
4.6.2.2	Resultados de la estandarización del extracto clorofórmico de <i>Oenothera Rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923.....	93
4.6.2.2.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” obtenidos en la prueba piloto frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	94
4.6.2.3	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	95
4.6.2.3.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” obtenidos en la prueba piloto frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	97
4.6.2.4	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto clorofórmico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	100
4.6.2.4.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” obtenidas en la prueba piloto frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	101
4.6.3	Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	103
4.6.3.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas.....	103

4.6.3.2	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas.....	109
4.6.4	De la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	115
4.6.5	Del ensayo de la sensibilidad bacteriana de la prueba piloto frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	117
4.6.5.1	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera Rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	117
4.6.5.1.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” obtenidos de la prueba piloto frente a <i>Escherichia coli</i> cepa ATCC 35218.....	118
4.6.5.2	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto clorofórmico de <i>Oenothera Rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	119
4.6.5.2.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” obtenidos en la prueba piloto frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	121
4.6.5.3	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	122
4.6.5.3.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70% de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” obtenidos en la prueba piloto rente a <i>Escherichia coli</i> cepa ATCC 35218.....	124
4.6.5.4	Resultados de la estandarización de la concentración antibacteriana del extracto clorofórmico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	127

4.6.5.4.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” obtenidos en la prueba piloto frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	128
4.6.6	Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	130
4.6.6.1	Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 obtenidos con las concentraciones estandarizadas.....	130
4.7	De la comparación de la actividad antibacteriana entre ambas especies vegetales en estudio.....	136
4.8	De la Toxicidad Aguda por vía oral.....	139
CONCLUSIONES.....		146
SUGERENCIAS.....		148
BIBLIOGRAFÍA.....		149
ANEXOS.....		154

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1	Factor de virulencia <i>Staphylococcus aureus</i>	18
TABLA N° 2	Toxinas presentes en <i>Staphylococcus aureus</i>	18
TABLA N° 3	Enzimas presentes en <i>Staphylococcus aureus</i>	19
TABLA N° 4	Susceptibilidad antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i>	23
TABLA N° 5	Susceptibilidad antimicrobiana para <i>Escherichia coli</i>	24
TABLA N° 6	Escala de toxicidad de una sustancia según la magnitud de la dosis letal probable.....	38
TABLA N° 7	Resumen de la operacionalización de variables.....	57
TABLA N° 8	Marcha Fitoquímica.....	63
TABLA N° 9	Análisis Microbiológico.....	65
TABLA N° 10	Distribución de grupos para las pruebas de toxicidad aguda por vía oral en ratas albinas.....	74
TABLA N° 11	Porcentaje de humedad de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	78
TABLA N° 12	Porcentaje de rendimiento de extracción de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	79
TABLA N° 13	Resultados de la solubilidad de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	80

TABLA N° 14	Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	82
TABLA N° 15	Resultados del control microbiológico de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”	84
TABLA N° 16	Resultados del control microbiológico de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	85
TABLA N° 17	Absorbancias para la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	86
TABLA N° 18	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a volumen estándar de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	88
TABLA N° 19	Resultados de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y determinación de la CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	90
TABLA N° 20	Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”.....	92
TABLA N° 21	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto clorofórmico de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a un volumen estándar de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	93
TABLA N° 22	Resultados de la prueba piloto del extracto clorofórmico de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y determinación de la CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	94
TABLA N° 23	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a un volumen estándar de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	95
TABLA N° 24	Resultados de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” y determinación de la CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	97
TABLA N° 25	Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana de la prueba piloto del extracto Etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”	99
TABLA N° 26	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto clorofórmico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” y determinación de la CMI frente a un volumen estándar de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	100

TABLA N° 27	Resultados de la prueba piloto del extracto clorofórmico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” y determinación de la CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	101
TABLA N° 28	Halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	103
TABLA N° 29	Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Staphylococcus aureus</i>	104
TABLA N° 30	Resultados descriptivos para la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de la de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas ...	105
TABLA N° 31	Análisis de la varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	106
TABLA N° 32	Prueba post hoc de Scheffe para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	107
TABLA N° 33	Halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 28923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	109
TABLA N° 34	Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Staphylococcus aureus</i>	110
TABLA N° 35	Resultados descriptivos para la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas ...	111
TABLA N° 36	Análisis de la varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	112
TABLA N° 37	Prueba post hoc de Scheffe para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	113

TABLA N° 38	Absorbancias para la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	115
TABLA N° 39	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y frente a un volumen estándar de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	117
TABLA N° 40	Resultados de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y determinación de la CMI frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	118
TABLA N° 41	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto clorofórmico de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” frente a un volumen estándar de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	119
TABLA N° 42	Resultados de la prueba piloto del extracto clorofórmico de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y determinación de la CMI frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	121
TABLA N° 43	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a un volumen estándar de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	122
TABLA N° 44	Resultados de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” y determinación de la CMI frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	124
TABLA N° 45	Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	126
TABLA N° 46	Prueba piloto de las diluciones crecientes del extracto clorofórmico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a un volumen estándar de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	127
TABLA N° 47	Resultados de la prueba piloto del extracto clorofórmico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” y determinación de la CMI frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	128
TABLA N° 48	Halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Escherichia coli</i> cepa ATCC 35218 obtenidos con las concentraciones estandarizadas.....	130
TABLA N° 49	Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Escherichia coli</i>	131

TABLA N° 50	Resultados descriptivos para la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 obtenidos con las concentraciones estandarizadas.....	132
TABLA N° 51	Análisis de la varianza (ANOVA) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	133
TABLA N° 52	Prueba post hoc de Scheffe para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923 obtenidos con las concentraciones estandarizadas	134
TABLA N° 53	De la diferencia de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	136
TABLA N° 54	Estadísticos de grupo para la diferencia de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	136
TABLA N° 55	Prueba T – Student para la diferencia de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % de <i>Oenothera Rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y de <i>Geranium Sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923.....	137
TABLA N° 56	Dosificación de los extractos etanólicos al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonqá” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	139
TABLA N° 57	Signos observados durante las primeras 24 horas en el ensayo de toxicidad aguda por vía oral.....	140
TABLA N° 58	Variación en porcentaje de peso de los animales en los diferentes días de observación.....	141
TABLA N° 59	Resultados de la dl50 de la toxicidad aguda por vía oral de los extractos etanólicos al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” Y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	142
TABLA N° 60	Estudio histopatológico del extracto etanólico al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonqá”.....	143
TABLA N° 61	Estudio histopatológico del extracto etanólico al 70 % de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”	144

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA N° 1	Obtención de los extractos secos etanólicos y clorofórmicos y análisis fitoquímico cualitativo.....	62
FLUJOGRAMA N° 2	De la investigación.....	64
FLUJOGRAMA N° 3	Control de calidad de los extractos concentrados en base al criterio imperativo (Salmonella).....	66
FLUJOGRAMA N° 4	Control de calidad de los extractos concentrados en base al criterio indicativo de higiene (Coliformes Fecales).....	67
FLUJOGRAMA N° 5	Control de calidad de los extractos concentrados en base al criterio de alerta o límites críticos (Mesofilos Viables).....	68
FLUJOGRAMA N° 6	Control de la calidad de los extractos concentrados en base al criterio de alerta o límites críticos (Hongos y Levaduras).....	69
FLUJOGRAMA N° 7	De la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	71
FLUJOGRAMA N° 8	De la determinación de la actividad antibacteriana por el método de pozos excavados de los extractos etanólicos y clorofórmicos de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	73
FLUJOGRAMA N° 9	Toxicidad por el método de sube y baja (UDP).....	75
FLUJOGRAMA N° 10	Procedimiento secuencial del estudio histopatológico..	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1	Curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	87
GRÁFICO N° 2	Actividad antibacteriana in vitro de las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”.....	108
GRÁFICO N° 3	Actividad antibacteriana in vitro de las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	114
GRÁFICO N° 4	Curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	116
GRÁFICO N° 5	Actividad antibacteriana in vitro de las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	135
GRÁFICO N° 6	Diferencia de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70% de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1	Planta de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”.....	14
FIGURA N° 2	Flor de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”.....	14
FIGURA N° 3	Planta de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	16
FIGURA N° 4	Flor de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.....	16
FIGURA N° 5	Curva de crecimiento típica de una población bacteriana.....	31
FIGURA N° 6	Método de espectrofotometría.....	33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1	Identificación botánica de las especies vegetales en estudio..	154
ANEXO N° 2	Certificado de análisis de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	155
ANEXO N° 3	Certificado de análisis de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	156
ANEXO N° 4	Certificado sanitario de los animales de experimentación.....	157
ANEXO N° 5	Reacciones de reconocimiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal en estudio.....	158
ANEXO N° 6	Instrucciones para la activación de las cepas ATCC – KWIK_STIK.....	160
ANEXO N° 7	Agar Mueller Hinton.....	161
ANEXO N° 8	Caldo de Cerebro Corazon (Brain Heart Infusion).....	162
ANEXO N° 9	TSA: Trypticase Soja Agar.....	163
ANEXO N° 10	Determinación del porcentaje de humedad.....	164
ANEXO N° 11	Porcentaje de extracción.....	165
ANEXO N° 12	Pruebas de solubilidad.....	166
ANEXO N° 13	Análisis fitoquímico cualitativo.....	167
ANEXO N° 14	Para el análisis histopatológico de los principales órganos de las ratas.....	168
ANEXO N° 15	Estandarización de la concentración antibacteriana de los extractos.....	169
ANEXO N° 16	Halos de inhibición.....	170
ANEXO N° 17	Cuadro de signos del ensayo de toxicidad aguda.	171
ANEXO N° 18	OCDE para verificación de Productos Químicos: Toxicidad Oral Aguda Up-And-Down-Procedimiento (Udp).....	172
ANEXO N° 19	Media de los halos de inhibición para los Fármacos Patrón Según El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio.....	184
ANEXO N° 20	Ficha de Validación de Instrumentos.....	185
ANEXO N° 21	Preguntas realizadas para la selección de las especies vegetales en estudio.	188

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO Y
CONCEPTUAL

CAPÍTULO III
MATERIALES Y
MÉTODOS

CAPÍTULO IV
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN
DE LOS RESULTADOS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

ARCHIVO FOTOGRAFICO

DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro a Dios, por estar siempre conmigo brindándome fortaleza frente a todas las adversidades que nos presenta la vida, por iluminar mi camino todos los días de mi vida, por ser mi guía espiritual y forjar mi camino.

A mi amada mamita Gloria E. S. por su amor, por su preocupación de que nunca me falte nada, por su esperanza puesta en mí y por haberme traído al mundo y ser una bendición en mi vida; con mucho amor para ti, mi querida mami.

A todos mis familiares quienes contribuyeron en mi desarrollo profesional, por regalarme su amor incondicional, por escucharme y aconsejarme estimulándome a no caer y alcanzar mis metas, por ser mi apoyo y estar a mi lado en los momentos más difíciles.

Yeni Huaman E.

A mi querido papito Casiano H. H. por su apoyo, comprensión, por animarme siempre a lograr mis metas, por sus acertados consejos y por ser un ejemplo a seguir.

A mis hermanas, hermano y sobrinos Rosabel, Yesica, Wilys, Alexander y Hasael por haberme brindado todo su cariño, su amor, su paciencia, su comprensión y apoyo durante todo este tiempo. A todos ellos gracias.

A mis amigas y amigos por brindarme su compañía, amistad sincera, enseñanzas y vivencias que nos recordaban lo bello que es la vida, gracias por dedicarme un espacio de vuestro tiempo.

DEDICATORIA

En primer lugar dedico este logro a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis Padres Ali y Lulita que han sido lo más importante para mí, me han brindado todo lo que he necesitado y desde pequeña han sido mi guía y el ejemplo a seguir para lograr todas mis metas y llegar hasta donde estoy.

A mis hermanos por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar. A Michael Alex, Yaquelin Solandý y a Eduar Denilson por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado.

A mis tíos en especial a mi tía Marthita que me ha dado su ayuda incondicional, me ha brindado lo que muy pocas personas harían y sin pedir nada a cambio que es su cariño, su hospitalidad y preocupación como si fuese otra hija más para ella.

Y a toda mi familia que siempre han tenido los mejores deseos para mí en todo momento.

A Juan Carlos que ha sido la persona más especial para mí, quien me apoya, me da ánimos en los malos momentos y los buenos me hace estar feliz y es a quien admiro por ser como es, eres el regalo más lindo que recibí durante mi carrera porque en ella tuve la fortuna de conocerte. Te amo gordito

A ti Yeni, mi compañera, juntos recorrimos este camino y lo logramos, entre diferencias y aciertos, pero siempre unidas.

Y Amigos Roxita y Frank E, de imaginarlos ya vienen a mis pensamientos bellos y únicos momentos que sería imposible plasmar, pero sin duda recuerdo cada experiencia que viví con cada uno, lo más importante es que siempre estuvimos juntos a lo largo de nuestra carrera (Amigo que te cuesta vale).

A Yovita y Nis, amigas las adoro, tantos años invalorable de amistad, compañía, momentos tan apreciables, a pesar de la distancia siempre nos volvemos a reencontrar, sin duda sé que siempre estaremos juntas en donde estemos.

Y por último a todas aquellas personas que de alguna u otra manera están enlazadas con la trayectoria de mi vida (código 2008 - I).

Roxy O.S.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su amparo, protección y fortaleza en todo lugar y momento.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por habernos aceptado ser parte de ella y acogido en sus aulas e inculcado conocimiento durante nuestro desarrollo profesional.

Al instituto de investigación de la UNSAAC por el apoyo para la realización del trabajo de tesis.

*A nuestra asesora **M.Cs. Lelia Maria Rodríguez Torres**, por su apoyo incondicional, por su atención, su tiempo, sus consejos, orientaciones y confianza puesta en nosotras durante todo el proceso de ejecución de la tesis.*

Así también agradecemos a la plana docente de nuestra querida escuela profesional farmacia y bioquímica, que nos brindaron su conocimiento e inculcaron valores en nuestra formación profesional.

A nuestras queridas familias por todo su apoyo incondicional que nos mostraron y por el esfuerzo realizado para que nosotros lleguemos a concluir nuestra carrera profesional.

Finalmente, pero no con menor reconocimiento, queremos agradecer a cada una de las personas que intervinieron, aportaron y acompañaron durante la formulación, ejecución del trabajo, quienes amablemente e incondicionalmente nos ayudaron, gracias por sus sugerencias y experiencias compartidas.

Yeni y Rox.

ABREVIATURAS

ANOVA	: Análisis de Varianza
NCCSL	: Comité Nacional de Control de Estándares de Laboratorio
ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Infusión Cerebro Corazón
°C	: Grados Centígrados
CMI	: Concentración Mínima Inhibitoria
g	: Gramos
µg	: Microgramos
µL	: Microlitros
mg	: Miligramos
mm	: Milímetros
mL	: Mililitros
msnm	: Metros Sobre el Nivel del Mar
nm	: Nanómetros
OGYE	: Agar Extracto Levadura Oxitetraciclina Glucosa
OMS	: Organización Mundial de Salud
QP	: Químicamente Puro
TSA	: Agar Trypticase Soja
UFC	: Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % 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 y determinar la toxicidad aguda por vía oral.

Para lo cual los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se obtuvieron por maceración, filtración y evaporación. Se determinó la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de las especies vegetales en estudio por el método de pozos excavados y se determinó la toxicidad aguda por vía oral por el método de la OCDE 425 o también llamada “Up and Down”.

RESULTADOS: La marcha fitoquímica reveló la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en abundante cantidad para ambos extractos etanólicos al 70 %. La presencia de taninos y lactonas en abundante cantidad en el extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles y en poca cantidad para el extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 fueron de 0.050 mg/50uL y 0.150 mg/50uL, respectivamente. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 fue 11 mg/50uL. Y el CMI de los extractos clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” para ambas cepas fueron de 0,00 y 0,00 mg/50uL. El promedio de los halos máximos obtenidos fueron de 21,17 y 28,66 mm/50uL para *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 con los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, respectivamente; para *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 fue de 17,11 mm/50uL con el extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, y ninguno de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presentaron toxicidad aguda por vía oral.

CONCLUSIONES: En conclusión, los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presentan actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* cepas ATCC 25923 en comparación a los fármacos patrón y frente a *Escherichia coli* cepas ATCC 35218 solo el extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presenta actividad antibacteriana in vitro en comparación a los fármacos patrón. Y en cuanto a la toxicidad aguda de ambos extractos etanólicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” no presentan toxicidad.

PALABRAS CLAVE: Actividad antibacteriana, toxicidad aguda, Concentración Mínima Inhibitoria, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

SUMMARY

The present study's objective was to determine the activity the extracts antibacteriana in vitro ethanolic to the 70 % and chloroform of *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo in the face of *Staphylococcus aureus* ancestry ATCC and *Escherichia coli* ancestry ATCC and determining intense toxicity orally.

Stop it as the extracts ethanolic to the 70 % and chloroform of *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo they obtained themselves for maceration, leak and evaporation. activity Determined the extracts antibacteriana in vitro itself ethanolic to the 70 % and chloroform of the vegetable sorts in he studied for the wells method excavados and OCDE 425 determined intense toxicity himself orally for her method or also called "Up and Down".

RESULTS: The running fitoquímica revealed the presence of phenolic compounds and flavonoides in abundant quantity in order to both extracts ethanolic to the 70 %. He witnesses it of tannins and lactonas in abundant quantity in the extract *Geranium sessiliflorum* Cavanilles's chloroform and in little quantity in order to the extract *Oenothera rosea* Aiton chloroform. The extracts's Concentration Mínima Inhibitoria ethanolic to the 70 % of *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo in the face of *Staphylococcus aureus* ancestry ATCC they were 25923 of 0.050 mg/50uL and 0.150 mg/50uL, respectively. The extract Concentration Mínima Inhibitoria ethanolic to the 70.% of *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo in the face of *Escherichia coli* ancestry ATCC 35218 was 11 mg/50uL. And the extracts's CMI *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a chloroform and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo in order to both ancestries went of 0,00 and 0,00.mg/50uL. The maximum haloes's average obtenidos went of 21,17 and 28,66 mm/50uL in order to *Staphylococcus aureus* ancestry ATCC 25923 with the extracts ethanolic to the 70 % of *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo, respectively; In order to *Escherichia coli* ancestry ATCC ethanolic was 35218 of 17,11 mm/50uL with the extract to the 70 % of *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo. And no one of the extracts ethanolic to the 70 % of *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo presented intense toxicity orally.

CONCLUSIONS: In conclusion, the extracts ethanolic to the 70 % of *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo Antibacteriana in vitro in the face of *Staphylococcus aureus* present activity ancestries ATCC 25923 comparatively to the drugs employer and in the face of *Escherichia coli* ancestries ATCC 35218 alone the extract ethanolic to the 70 % he shows of *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo activity antibacteriana in vitro comparatively to the drugs employer. And as to both extracts's ethanolic intense toxicity *Oenothera rosea* Aiton Yawar Chonq'a and *Geranium sessiliflorum* Cavanilles Ojotillo do not present toxicity.

KEY WORDS: Activity antibacteriana, intense toxicity, Concentración Mínima Inhibitoria, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

La presencia permanente de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos es un problema de salud pública a nivel mundial, variando ampliamente con la situación geográfica y probablemente son influenciadas por factores tanto ambientales como étnicos, siendo una causa importante de morbilidad y pérdida económica, *Escherichia coli* es causante de una gran parte de muertes con enfermedades diarreicas agudas (EDA) representando el 29 % a nivel nacional. Por otro lado *Staphylococcus aureus*, es la responsable del 32 al 47 % de infecciones de piel y tejido celular subcutáneo, causando así el 15 % de infecciones intrahospitalarias. ¹

El uso exagerado e inapropiado de los antibióticos ha favorecido un aumento importante en la prevalencia de estos microorganismos patógenos, la pérdida de eficacia de ciertos tratamientos por causa de la resistencia a los antimicrobianos aumenta el sufrimiento humano, se han realizado innumerables estudios, con la finalidad de combatir la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, uniéndose a esto, la desventaja que presentan los principales antibióticos sintéticos, en relación al espectro de acción antibacteriana y/o efectos colaterales que pueden originar. ¹

El uso de las plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas, vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en diferentes lugares como una alternativa de curación. Por ello esta investigación busca, brindar la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural. Por esta razón existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar sustancias naturales que posean propiedades farmacológicas antibacterianas. ²

Por lo tanto es urgente el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación de sustancias antibacterianas que combatan de forma más efectiva a estos microorganismos. Para esto las plantas han demostrado ser un enorme reservorio a partir del cual se ha encontrado una gran diversidad de sustancias antimicrobianas que pueden servir para el desarrollo de nuevos medicamentos. ³

Las especies vegetales *Oenothera rosea* Aiton (Yawar Chonq'a) y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles (Ojotillo) buscan ser una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos, debido a que estos son utilizados en diferentes tratamientos como: cicatrizante, bronquitis, tos, infecciones de la piel, inflamación de heridas, infección urinaria, y en la reabsorción de la sangre en caso de hematomas⁴ además que según **Soria R.** en su estudio Farmacobotánico nos da a conocer el estudio fitoquímico y la presencia de flavonoides, taninos, quinonas, alcaloides y saponinas en las plantas en estudio, los cuales podrían ser la causa de la actividad antibacteriana. ³

En el presente trabajo se buscó verificar la Actividad Antibacteriana de las especies vegetales *Oenothera rosea* Aiton (Yawar Chonq'a) y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles (Ojotillo), en el tratamiento, así como su inocuidad⁴.

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Se determina la actividad antibacteriana debido a que en los últimos años se ve un incremento de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos, siendo así la resistencia antimicrobiana un problema de salud pública que va en incremento y de gran complejidad, que afecta a la gran parte de las poblaciones alrededor del mundo. Este problema también viene afectando al Perú destacando que en el año 2010 *Staphylococcus aureus* alcanzó un 60.7 % y *Escherichia coli* alcanzó un 50 % de resistencia, a penicilinas (penicilina, metilmicina) requiriendo así tratamientos alternativos más costosos y muchas veces la presencia de numerosos efectos colaterales registrados por el MINSA, siendo una de las causas el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales y centros de salud (Postas), por lo cual es necesario disponer de nuevos agentes antimicrobianos.¹

En el año 2012 dentro de los principales grupos de morbilidad registrados por consulta externa en la dirección de salud Cusco las infecciones de la piel y el tejido subcutáneo ocupa el décimo lugar, que corresponden al 13 % del total de casos registrados (MINSA, 2012) y también teniendo en conocimiento que el sector salud continua con problemas relacionados a resistencia bacteriana.¹

Como se observa, la resistencia antimicrobiana plantea una amenaza cada vez mayor para la salud pública a nivel mundial, y aunque en la naturaleza se disponga de múltiples alternativas (medicamentos) para distintas enfermedades, la falta de evaluación de carácter científico los limita a ser empleados de mejor forma, debido a ello se busca nuevos 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 han seleccionado las especies *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” a los cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas, teniendo en cuenta que estudios de especies de su misma familia y género presentan actividad bactericida y fungicida.⁴

Los estudios de toxicidad nos permitirán conocer si las plantas son seguras o no al momento de utilizarlas, ya que se establecen regulaciones internacionales que exigen amplias investigaciones fármaco-toxicológicas en animales de experimentación antes de iniciar su aplicación en seres humanos, es así que en esta investigación se evaluó la toxicidad aguda vía oral, la que contribuirá con aquellos investigadores que requieran ampliar y continuar con los estudios de estas especies vegetales.

1.1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

- ¿Presentarán actividad antibacteriana in vitro los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 y presentarán toxicidad aguda por vía oral?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar 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 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 y determinar la toxicidad aguda por vía oral.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” y determinar sus porcentajes de rendimiento.
2. Determinar el porcentaje de humedad, establecer la solubilidad y análisis fitoquímico cualitativo de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.
3. Determinar 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 25923, en comparación a los fármacos patrón “Oxacilina y Clindamicina”.
4. Determinar 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 *Escherichia coli* cepa ATCC 35218, en comparación a los fármacos patrón “Amikacina y Ciprofloxacino”.
5. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y a *Escherichia coli* cepa ATCC 35218.
6. Determinar la toxicidad aguda por vía oral por el método de la OECD 425 de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.
7. Realizar el estudio histopatológico en órganos (hígado, estómago y riñón) de ratas albinas de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

1.3 JUSTIFICACIÓN

- **De conocimiento:** Durante mucho tiempo el uso de las plantas medicinales se ha basado en conocimientos empíricos, utilizándose las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos en forma de preparados tradicionales.³ Muchos fármacos que actualmente son utilizados provienen de principios activos de plantas medicinales, estos fármacos deben 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 el presente estudio ayudará al conocimiento científico de las especies *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” en cuanto a la actividad antibacteriana.

La presente investigación sobre la actividad antibacteriana busca revalorar los recursos naturales que se encuentran en nuestro medio; aportando bases científicas de la actividad antibacteriana de las especies vegetales en estudio.⁴

- **De prioridad:** Debido a que en los últimos años se ve un incremento de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos conllevando a un problema de salud pública que va en incremento y de gran complejidad, pues es la principal causa de infecciones intrahospitalarias registradas en nuestro país¹ y aún se ve un aumento en la prevalencia de cepas resistentes a medicamentos y desinfectantes, por lo que nos vemos motivadas a realizar la búsqueda de nuevos antimicrobianos de origen vegetal.
- **De aplicabilidad:** La presente investigación busca aportar alternativas de tratamiento antibacteriano sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que son la principal causa de enfermedades en nuestra región¹; puesto que las especies *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” son utilizadas empíricamente en el tratamiento de infecciones urinarias y curación de heridas⁴ en las que podrían estar involucradas estas dos bacterias, por lo que se evaluó la actividad antibacteriana de estas dos especies.

1.4 HIPÓTESIS

- Los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presentan actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218, y no presentan toxicidad aguda por vía oral.

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTÓRICA

Las comunidades campesinas de los Andes tienen en su territorio una gran diversidad de especies silvestres, generalmente ubicadas en sus zonas altas, laderas y zonas ribereñas, así como algunas especies cultivadas en pequeñas parcelas en sus viviendas, o en parcelas muy cercanas, que son utilizadas como plantas medicinales por sus propiedades curativas. Las plantas silvestres constituyen una fuente valiosa de prevención y curación para la mayoría de los pobladores rurales de la sierra andina.⁴

Las plantas medicinales desde tiempos muy remotos, sirven para curar muchos de los malestares que aquejan a las personas de zonas rurales, ante lo expuesto y considerando que en nuestro país existe una amplia cultura en el uso tradicional de plantas medicinales, dirigimos nuestra atención en dos especies vegetales: *Oenothera rosea* Aiton y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles como solución a problemas de salud relacionados a infecciones de la piel e infecciones urinarias. La existencia de algunas propiedades terapéuticas, por parte de ambas especies y estudios realizados nos conlleva a dirigir nuestra investigación a probar la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.⁴

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Pinzón, J. (2010). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de anís estrellado *Illicium verum* contra *Staphylococcus epidermitis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. (Tesis de pre-grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.* El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de anís estrellado *Illicium verum* contra *Staphylococcus epidermitis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. El método fue cuasi-experimental, transversal y prospectivo, la técnica fue por perforación y disco en agar, se logró evidenciar la actividad del anís estrellado (*I. verum*) contra las cepas *Escherichia coli* (NCIMB 8545), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermitis* (NCIMB). La técnica de destilación permitió la extracción y obtención del extracto total (etanólico) y que al ser sometido a fraccionamiento líquido/líquido con los solventes cloroformo y acetato de etilo, se logró obtener las fracciones por polaridades permitiendo separar los compuestos y de esta manera facilitar la identificación de la fracción con mayor actividad antimicrobiana. Obteniendo los siguientes resultados: Los extractos acuosos del anís estrellado tienen efecto inhibitorio sobre las tres cepas evaluadas, evidenciándose que el extracto total y el acetato de etilo fueron los antimicrobianos que presentaron mejor efecto sobre los microorganismos a comparación del cloroformo. Las conclusiones fueron: las concentraciones iniciales de la fracción, el extracto total de anís estrellado a su concentración de 18.5 mg/mL fue el que presentó mejor efecto sobre *E. coli* y *B.*

subtilis; sin embargo a la concentración de 10 mg/mL, la fracción de acetato de etilo fue la de mejor efecto antimicrobiano y su mayor inhibición fue reflejada sobre *E. coli*, finalmente.⁶

Heylin, E., & Carolina, C. (2006). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger* - Evaluación de su carga microbiológica. (Tesis de pre-grado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica. El objetivo fue la evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger* y evaluación de su carga microbiológica. El método fue cuasi-experimental, prospectivo y transversal, la técnica utilizada fue de serie de recuentos, para lo cual se trabajaron con una carga microbiológica de 25 muestras de miel de abeja adquiridas en el comercio costarricense, se evaluó por medio de una serie de recuentos (recuento total aerobio, recuento total anaerobio, recuento de esporulados aerobios, recuento de esporulados anaerobios y recuento de hongos y levaduras). Obteniendo los siguientes resultados sobre la evaluación de la carga microbiológica de la miel mostró que el 91 % de las muestras tenía valores iguales o menores a $1,0 \times 10^1$ UFC/g y no se obtuvo ningún resultado positivo en la determinación de la presencia de *Clostridium botulinum*. 92 % de las muestras mostraron algún tipo de inhibición sobre las bacterias evaluadas, un 24 % logró inhibir el crecimiento de *S. aureus*, hasta en una concentración de 25 % v/v. No se observó la inhibición de *Aspergillus niger* por ninguna de las muestras analizadas. Se concluyó que la miel de abeja presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*.¹

2.2.2 ANTECEDENTES NACIONALES

Villena, C., & Arroyo, J. (2012). Efecto Antiinflamatorio del Extracto Hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar Socco) en ratas con Inducción a la Inflamación Aguda y Crónica. (Tesis de pre-grado). Facultad de Medicina - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. El objetivo fue determinar el efecto antiinflamatorio de *Oenothera rosea* en ratas con inducción de inflamación aguda y crónica. La metodología es experimental, para la actividad antiinflamatoria crónica se usó el modelo del granuloma inducido por carragenina utilizando una modificación de la técnica descrita por Sedwick y Lees. Se utilizaron 132 ratas albinas con peso promedio 300 g, distribuidas al azar en grupos de 8 cada uno, considerando un grupo control con suero fisiológico de 5 mL/kg, uno con el agente inductor de inflamación (AI), grupos con AI más extracto en tres dosis y grupos con AI, dexametasona e ibuprofeno; siendo 56 ratas para evaluación frente a la carragenina donde se consideró mililitros de volumen de la subplantar porcentaje de eficacia

antiinflamatoria, nivel de PCR en sangre y observación histológica del proceso inflamatorio; primero en 56 ratas frente al xilol expresándose en miligramos de una porción del lóbulo (oreja derecha). Se utilizaron 50 ratones para evaluar toxicidad aguda, 20 ratas normales para la observación de efectos por administración a dosis repetidas durante 28 días. Los resultados mostraron un 60 % de reducción de la inflamación aguda ($p < 0,01$), así como 60% la inflamación crónica ($p < 0,05$) y la PCR se redujo en 45 % ($p < 0,03$); no hubo evidencia de efectos adversos, un 60% del efecto antiinflamatorio en ratas y 60 % del efecto en edema auricular crónico; determinándose una DEM de 61 mg/kg y sin efectos adversos. Se concluye que las condiciones experimentales se demostraron que el extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* en ratas presenta efecto antiinflamatorio y sin cambios hematológicos e histopatológicos en ratas.⁷

Díaz, V., Fuertes, C., Jurado, B., Roque, M. & Arroyo, J. (2011). Efecto Antiagregante Plaquetario In Vivo y Fibrinolítico In Vitro del Extracto Etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (Chupasangre). (Tesis de pre-grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. El objetivo fue determinar el efecto antiagregante plaquetario in vitro y fibrinolítico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton. El método fue experimental, longitudinal y prospectivo. Resultados: Se encontró flavonoides en una concentración de 58,25 mg por gramo de extracto; el principal flavonoide tiene una estructura general que responde a la estructura 4',5, 7- trihidroxiflavona, la cual parece ser la responsable de la actividad fibrinolítica in vitro. Conclusiones: Se demostró el efecto antiagregante plaquetario in vivo del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre) al haber diferencia significativa en 8 % para la prueba de tiempo de protrombina y 45% para la prueba de tiempo de coagulación ($p < 0,001$) comparado con la aspirina que fue usada como fármaco estándar. Se demostró el efecto fibrinolítico in vitro al lisar los coágulos formados en sangre de voluntarios sanos, con el extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton, a la concentración de 5,8 mg/ml.⁸

Gonzales, J., Lechuga, A. & Serrano C. (2001). Estudio Fitoquímico Comparativo de *Oenothera rosea* Y *Oenothera multicaulis* (Yawar Chong'a). (Trabajo de investigación), Universidad Nacional de San Marcos, Lima. El objetivo fue realizar el estudio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis*, a través del estudio de los componentes fenólicos mediante el tratamiento del extracto hidroalcohólico con acetato. El método fue experimental, el monitoreo de la cromatografía de columna se ha realizado con la cromatografía de capa fina utilizando como eluyentes: AcOEt, HCO₂H; AcO₂H, H₂O revelado con FeCl₃ al 1 %; El método espectroscópico ultravioleta visible con reactivos de desplazamiento para elucidar la estructura del flavonoide aislado por cromatografía (fracción 12) reporta para *Oenothera rosea* la presencia de un flavonoide glicosídico el resultado de los espectros UV de *Oenothera rosea* indica que uno de los compuestos fenólicos aislados es un flavonoide glicosídico denominado Quercetina, mientras que *Oenothera multicaulis* no reporta resultados cuantitativos por espectroscopia.

Finalmente se concluye que los resultados obtenidos determinan que los compuestos fenólicos en lo que respecta a flavonoides no son parecidos en ambas especies.⁹

Kasay M., Huamán K. & Guerrero M. (2013). Estudio Cualitativo y Cuantitativo de Taninos de la *Oenothera rosea* L'Hér. Ex Aiton. (Trabajo de investigación), Universidad Nacional de San Marcos, Lima. El objetivo fue la evaluación de los compuestos polifenólicos de la planta *Oenothera rosea* L'Hér. Ex Aiton en ramas y hojas fue por cinco diferentes métodos. Por un análisis fitoquímico se determinó la presencia abundante de taninos los cuales son de gran importancia industrial. Se identifica y clasifica a los taninos de la *Oenothera rosea* L'Hér. Ex Aiton, encontrándose presencia de taninos hidrolizables y también condensados. Los resultados se profundizaron en la valoración de los diferentes tipos de taninos encontrados, utilizando los métodos de Lowenthal y Folín - Ciocalteu para taninos hidrolizables, Stiasny y la técnica de la Proantocianidina para taninos condensados, usando el método Ultravioleta para la determinación de ambos taninos en extractos acuosos y etanólicos, siendo los extractos etanólicos los que presentan mayor poder extractante. Los datos obtenidos para taninos condensados, permitieron concluir que ambas partes analizadas de la planta no contienen cantidades suficientes que justifiquen su extracción para la aplicación en la industria de adhesivos o curtiembre, pero sí en las industrias farmacéuticas y cosméticas, ya que actualmente se prefieren productos naturales en estas industrias.¹⁰

Anunnaki (2013). Efecto de los Extractos de *Tabebuia obscura* (Tahuari negro) y *Geranium ayavacense* (Pasuchaca) sobre la Glicemia en ratas con Diabetes mellitus experimental. (Trabajo de investigación). ESSALUD, Lima. El objetivo fue evaluar el efecto de los extractos de *Tabebuia obscura* (tahuari negro) y *Geranium ayavacense* (pasuchaca) sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental. El método fue experimental y prospectivo. Para ello se emplean ratas machos albinas cepa Holtzmann estas ingresaron al estudio cumplieron con los siguientes criterios: presentar una glicemia > 200 mg/dl post-administración de aloxano y tener un peso > 200 gramos. De las ratas evaluadas 60 completaron el estudio. Las 60 ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos (del I al VI) de 10 ratas cada uno. Grupo I recibió 3 ml de agua destilada, grupo II recibió glibenclamida 10 mg/kg, grupo III recibió *Geranium ayavacense* 6.3 mg/kg, grupo IV recibió *Geranium ayavacense* 12.7 mg/kg, grupo V recibió *Tabebuia obscura* 100 mg/kg, grupo VI recibió *Tabebuia obscura* 200 mg/kg. Se determinó el valor basal de glicemia, y el resto de controles de glicemia se realizaron a la 1, 3, 6, 12 y 24 horas, después de administrar las diferentes intervenciones. Resultados: El grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg disminuyó significativamente la glicemia a la 6 ta (p < 0.05), 12 ava (p < 0.01) y 24 ava (p < 0.01) hora después de administrar el extracto, cuando se compara con el placebo. No hubo diferencia significativa entre el grupo de *Tabebuia obscura* 100 mg/kg y el grupo de la glibenclamida. El grupo de *Tabebuia* disminuyó su glicemia en 18.15 %, 34.27 % y 50.31 %, a la 6 ta, 12 ava y 24 ava hora respectivamente; mientras que el grupo de la glibenclamida disminuyó su glicemia en

3.5 %, 3 24.05 % y 52.17 %, a la 6 ta, 12 ava y 24 ava hora respectivamente. El grupo de *Geranium ayavacense* 12.7 mg/kg disminuyó significativamente la glicemia ($p < 0.01$) solo a la 24 ava hora de administrar el extracto, cuando se compara con el placebo. Conclusiones: El extracto de *Tabebuia obscura* a la dosis de 100 mg/kg tiene buen efecto hipoglicemiante equiparable a la glibenclamida y *Geranium ayavacense* presenta efecto hipoglicemiante en ratas machos albinas a una concentración de 18.15% en comparación a la glibenclamida.¹¹

Chamión, C. (2013). Actividad Antibacteriana In Vitro del extracto acuoso de hojas y corteza de *Vismia angusta* (Pichirina) sobre Agentes Patógenos. (Trabajo de investigación), Iquitos. El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso de hojas y corteza de *vismia angusta* sobre agentes patógenos. El método fue experimental, prospectivo y transversal, el estudio fitoquímico del extracto acuoso de hojas y corteza de la especie de *vismia angusta*, determinó la presencia de aceites esenciales, taninos, flavonoides, saponinas y quinonas, encontrado mayor concentración en la corteza. Resultados: La mejor actividad antimicrobiana fue en las concentraciones de 300 y 400 mg/mL del extracto acuoso de la corteza de *Vismia angusta* sobre las cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Y en cuanto al porcentaje de inhibición del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta* a concentraciones de 400 mg/mL fue de 57,68 % para *Escherichia coli* y 59,60 % para *Staphylococcus aureus*. El porcentaje de inhibición del extracto acuoso de hojas de *Vismia angusta* a concentraciones de 400 mg/mL fue 45.45 % para *Escherichia coli* y 43.47 % para *Staphylococcus aureus*. En conclusión la cepa referencial de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue más sensible que la cepa referencial de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a las concentraciones de 300 y 400 mg/mL del extracto acuoso de corteza de *Vismia angusta*.¹²

Mamani, B. (2013). Actividad Antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival. (Tesis de pre-grado) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. El objetivo fue determinar la actividad Antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival el aceite esencial fue obtenido de las hojas frescas de *Mentha spicata* L. Por el método de hidrodestilación, tiene un rendimiento del 0,128 % v/p, que estaría sujeto a factores de variabilidad como; variedad de la especie, medio ecológico y zonas geográficas. Se obtuvieron los siguientes resultados el aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25 % no presenta actividad antibacteriana. El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50 % y al 100 % presentan igual actividad antibacteriana por lo cual se concluye que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50 % y al 100 % es significativamente mayor al control negativo. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50 % y al 100 % es significativamente menor a la clorhexidina al 2 %.¹³

Maravi, G. (2012). Efecto Antibacteriano y Antifúngico del aceite esencial de: *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) Y *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luisa) Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028. (Tesis de pre-grado). Facultad de Odontología. Universidad Privada Norbert Wiener Facultad de Ciencias de la Salud, Lima. El objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) Y *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luisa) Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028, El método empleado fue cuasiexperimental mediante la obtención de 3 aceites esenciales, los cuales demostraron en donde se obtuvieron los siguientes resultados: De los tres aceites esenciales, al 50 % (8.53 mm) y al 100 % (25.72 mm) el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el *Origanum vulgare* (Orégano). El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) al 90 % posee una mayor actividad antifúngica que antibacteriana, ya que formo un halo inhibitorio de 76.15mm sobre *Cándida albicans* ATCC 90028. De la comparación entre los 3 aceites esenciales, con mayores valores frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Cándida albicans* los presentó el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), mientras que los menores valores se observaron con el aceite esencial de *Menta piperita* (Menta). Concluyendo que a una concentración de 100 % del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) al 100 % y 90 %, tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos: Clorhexidina al 0.12 % y Nistatina, a excepción de la *Menta piperita* (Menta) al 50 % que su acción fue menor que los controles positivos. El aceite esencial de *Menta piperita* (Menta) al 50 % no formó halos de inhibición (0 mm) frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.¹⁴

2.2.3 ANTECEDENTES LOCALES

Achahuanco, M., & Aragón, P. (2015). Actividad antibacteriana in vivo de los extractos Etanólicos y glicólicos de las hojas de la especie vegetal *Flourenxia polycephala* M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés*, y su relación con la Actividad antioxidante. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abab del Cusco, Cusco. El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana in vivo de los extractos Etanólicos y glicólicos de las hojas de la especie vegetal *Flourenxia polycephala* M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium 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 cada 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 extractos y los halos formados. La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico sobre

cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés*, fue de 0.368 mg/25uL y 0.34 mg/25uL respectivamente. Y el CMI del extracto glicólico sobre *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium 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 (DPPH) con el patrón ácido ascórbico. Luego se relacionó la actividad antibacteriana con la actividad antioxidante, mediante la correlación lineal de Pearson, llegando a la conclusión de que el extracto etanólico y glicólico de *Flouencia polycephala* M.O. Dillon presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés* y posee actividad antixidante.¹⁵

Rosell, G. (2014). *Determinación del contenido total de polifenoles-flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de Thymus vulgaris L. "tomillo" frente a Staphylococcus aureus Cepa ATCC 25923.* (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abab del Cusco, Cusco. El objetivo fue determinar el contenido total de polifenoles-flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de *Thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *Staphylococcus aureus* Cepa ATCC 25923, el método fue cuasiexperimental, la determinación cuantitativa de polifenoles se realizó por el Metodo Folin-Ciocalteau, para flavonoides por el Método woisky y Salatino y la determinación de sus actividades antioxidantes fue por el método Brand Williams y la actividad 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 100ug de extracto, el contenido de flavonoides fue de 50.82 ug de quercetina dihidratada/500ug, el valor de la CMI frente *S. 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 la actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto.¹⁶

Oviedo, Y., & Aiquipa, K. (2011). *Estudio comparativo in vitro de la Actividad Antibacteriana de los extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de Spidium guajava (sahuinto) y Chenopodium ambrosioides (paico) frente a bacterias que causan infecciones de las vías respiratorias y determinación de la toxicidad aguda en animales de experimentación.* (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco. El objetivo fue el estudio comparativo in vitro de la actividad antibacteriana de los extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de *Spidium guajava* (sahuinto) y *Chenopodium ambrosioides* (paico) frente a bacterias que causan infecciones de las vías respiratorias y determinación de la toxicidad aguda en animales de experimentación, la metodología empleada fue por el método de difusión en disco. Obteniéndose los siguientes resultados el sahuinto presento una CMI de 0.3 mg/pozo, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136 y

Streptococcus pyogenes ATCC 19615, respectivamente. El paico presentó una CMI de 25 mg/pozo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29523; 75 mg/pozo frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136; 10 mg/pozo frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Las concentraciones máximas estandarizadas ensayadas en los extractos dieron como resultado diferentes medidas de halo de inhibición; para el sahuinto a la máxima concentración de 100.18 mg/pozo presentó: 23.83 mm, 23.50 mm y 28.67 mm de halos de inhibición frente a ATCC 29523, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 respectivamente. Se realizaron estudios de toxicidad aguda en ratones albinos de la especie *Mus musculus* Cepa Balbc/CNPB para las especies de sahuinto y paico observándose que la Dosis letal media (DL50) se encuentra por encima de los 5000 mg/kg considerando a ambas especies vegetales como no tóxicos. Por lo cual se concluye que extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de *Spidium guajava* (sahuinto) y *Chenopodium ambrosioides* (paico) presenta actividad antibacteriana frente a bacterias que causan infecciones de las vías respiratorias y no presenta toxicidad aguda en los animales de experimentación¹⁷

Castro, V. (2011). Actividad Antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Flourensia polycephala* M. O. Dillon (Phauca) y elaboración de una forma farmacéutica tópica para su evaluación in vivo en infecciones dérmicas por *Staphylococcus aureus* en ratones albinos. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco. El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de *Flourensia polycephala* M. O. Dillon (Phauca), donde la metodología empleada fue por el método de difusión por disco, donde los resultados para la Concentración Mínima Inhibitoria fue de 3,24 mg/disco y 4.7 mg/disco respectivamente e in vivo de la forma farmacéutica elaborada con el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* M. O. Dillon (Phauca) comparada con dos fármacos patrones (Neomicina y bacitracina), demostrándose estadísticamente que la emulsión que contiene 0.25 mg de extracto etanólico / 10 g. presenta un efecto antibacteriano igual al patrón. A así también en el análisis fitoquímico cualitativos ambos extractos clorofórmicos y etanólicos presentaron en abundante cantidad flavonoides y compuestos fenólicos. Conclusión el extracto etanólico de las hojas de *Flourensia polycephala* M. O. Dillon (Phauca) presenta actividad antibacteriana in vivo en infecciones dérmicas causadas por *Staphylococcus aureus*.¹⁸

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

Psidium 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 30 ug/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 presento un halo de inhibición de 28 mm mientras que el extracto hidroalcohólico presento un halo de inhibición mayor de 15 mm a una concentración 284.4 mg/100uL y en cuanto a las cepas aisladas se obtuvo un halo de inhibición de 29.9 mm a una concentración de 276 mg/100uL. Respecto a *Pseudomona aeruginosa* se obtuvo un halo de inhibición de 26 mm con respecto al patrón mientras que el extracto hidroalcohólico presento un halo de inhibición mayor de 28mm a una concentración de 219.2 mg/100uL. En cuanto a la cepa aislada se obtuvo un halo de inhibición 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 determino la actividad antibacteriana sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, y no se encontró toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcohólico al 70 % de la especie vegetal *Psidium guajava* "sahuinto".¹⁹

Lacuta, C. (2012). Determinación del contenido total de Polifenoles-Flavonoides y Actividad Antibacteriana del Extracto Seco Hidroalcohólico Al 70 % de las Hojas de la especie vegetal de *Populus nigra linnaeus* "Alamo negro" sobre Cepas ATCC de *Propionibacterium acnés* Y *Staphylococcus aureus* Causantes Principales de Acné. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco. El ojetivo fue determinar el contenido total de polifenoles y la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70 % de las hojas de *Populus nigra linnaeus* "Álamo negro" frente a cepas ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* y frente a cepas ATCC 6919 de *propionibacterium acnés*. El método fue cuasiexperimental, mediante la técnica de método de posos excavados y el método de recuento de unidades formadoras de colonias y en los resultados se compararon con el patrón doxiciclina y se evaluó su relación con el contenido total de polifenoles y flavonoides. Llegando a la conclusión de que el extracto hidroalcolico al 70 % de las hojas de *Populus nigra linnaeus* "Álamo negro" presenta actividad antibacteriana frente a cepas ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.²⁰

Vega, M. (2010). Actividad antimicótica y antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Junglans neotropica Diels* (Nogal) sobre *Trichophyton rubrum* y *Staphylococcus epidermidis*, microorganismos causantes de infecciones dérmicas. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco. El objetivo fue determinar la actividad antimicótica y antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas *Junglans*

neotropica Diels (Nogal) sobre cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 microorganismos causantes de infecciones epidérmicas. El método cuasiexperimental y la técnica usada fue por difusión en agar excavado - placa. Los resultados finales obtenidos en los ensayos fueron los siguientes: en la determinación de la actividad antimicótica sobre cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 se observó que a la concentración de 3.71 mg/20uL el extracto presenta una actividad antimicótica ligera con un halo de inhibición de 8.3 mm en promedio, a la concentración de 60 mg/20uL el extracto presenta una actividad antimicótica marcada con un halo de inhibición promedio de 24.5 mm. En la determinación de la actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se pudo ver que la concentración de 0.74 mg el extracto presenta una actividad antibacteriana ligera reportándose para esta un halo de inhibición de promedio de 9 mm, a la concentración de 29.99 mg el extracto presenta una actividad antibacteriana marcada con un halo de inhibición promedio de 21.3 mm. Con estos resultados se concluyó que el extracto de las hojas de *Juglans neotropica* Diels (Nogal) presenta actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.²¹

Ccori, F., & Vilcahuaman, R. (2009). Efecto Antibacteriano y antimicótico in vitro de los extractos hidroalcohólicos, acuoso y clorofórmico de la raíz de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Candida albicans* causantes de infecciones del tracto genitourinario. (Tesis de Pre-grado) Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco. El objetivo fue determinar el efecto antibacteriano y antimicótico in vitro atribuido a los extractos secos hidroalcohólicos al 70 %, 96 %, acuoso y clorofórmico de la raíz del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Candida albicans* causantes de infecciones del tracto genitourinario. El método fue experimental mediante el método de Hafford (difusión en agar excavado - placa). Los resultados obtenidos fueron: La Concentración Mínima Inhibitoria para el extracto hidroalcohólico al 70 % de la raíz del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Escherichia coli* fue de 60 mg/200uL y para *Candida albicans* fue de 40 mg/200uL, La Concentración Mínima Inhibitoria para el extracto clorofórmico de la raíz del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Escherichia coli* fue de 20 mg/200uL y para *Candida albicans* fue de 40 mg/200uL. La Concentración Mínima Inhibitoria para el extracto acuoso de la raíz del *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Escherichia coli* fue de 80 mg/200uL y para *Candida albicans* el extracto acuoso no presentó actividad. De la comparación del efecto antibacteriano entre los extractos hidroalcohólicos al 70 %, 96 %, acuoso y clorofórmico de la raíz *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 en relación al fármaco (Ciprofloxacino 0.2 g/mL). Se concluye que el efecto antibacteriano es igual entre los extractos secos hidroalcohólicos al 70 %, 96 % y acuoso y el fármaco patrón debido a que no existe diferencia alguna en la formación de los diámetros de los halos de inhibición. De la comparación del efecto antimicótico entre los extractos secos hidroalcohólicos al 70 %, 96 % y clorofórmico y el fármaco patrón (fluconazol 0.2 g/mL)²²

2.3 BASES TEÓRICOS CIENTÍFICAS

2.3.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LAS ESPECIES *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

2.3.1.1 *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A”

A. Localización

Oenothera rosea Aiton es una especie botánica de planta herbácea anual, se le puede encontrar en los siguientes países como México, Costa Rica, Guatemala, Bolivia, Ecuador, Perú, Argentina y Uruguay. ⁴

B. Descripción

Hierba 10-50 cm, anual o perenne que florece el primer año, erecta o procumbente. Hojas 2-5 x 1-2 cm, lanceoladas o estrechamente ovaladas, al menos las inferiores de sinuado-dentadas a pinnatífidas en la base. Flores erectas en el botón. Tubo del hipanto 0,4-0,8 cm, sépalos 0,5-0,8 cm verduscos: con apículos erectos en el botón floral. Pétalos 0,5-1cm purpúreos. Filamentos estaminales 4-6mm; anteras de 2,5-4 mm, ovario 1-1,5 cm; estilo 0,8-1,2 cm; estigma rodeado por las anteras durante la antesis, frutos 1,5 - 2,5 cm, de 0,3-0,4 cm de diámetro en la parte superior, claviformes, con 4 alas de 1mm de anchura y 4 nervios engrosados alternos, con la parte atenuada, estéril que semeja un estípote de 0,5-1,5 cm, semillas 0,6-1 x 0.4-0,5 mm, de contorno elíptico, redondeadas. ¹⁰



FIGURA N° 1: Planta de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”
Fuente: Plantas medicinales del Perú



FIGURA N° 2: Flor de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”
Fuente: Elaboración propia

Clasificación taxonómica de *Oenothera rosea* L'Her. Ex Aiton. "Yawar Chonq'a".
Fuente: Herbario Vargas (Anexo 1)

Clase	<i>Equisetopsida</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Superorden	<i>Rosanae</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Familia	<i>Onagraceae</i>
Género	<i>Oenothera</i> L.
Especie	<i>Oenothera Rosea</i> Aiton

C. Sinonimias

Oenothera pycnophila Ball, *Oenothera rubra* Cavanilles, *Oenothera virgata* R&P, *Xylopleurum roseum* (Aiton) Raimann

D. Nombres comunes

Hierba del golpe, Yawar Chonq'a, Yawar sacco, Chupa sangre.

E. Usos

Se utiliza en el tratamiento de cólicos, golpes e inflamaciones (se hierven las hojas y se aplica en lavados). Para el dolor de estómago y matriz caída como antiinflamatorio; también se utiliza para la diarrea, dolores musculares, heridas y llagas. Se machaca la planta fresca y se coloca como cataplasma en la parte afectada y también se utiliza en infusión.⁴ Tradicionalmente utilizada para infecciones del tracto respiratorio, golpes y cicatrizante. (Ver ABEXO N° 21)

2.3.1.2 *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "OJOTILLO"

A. Localización

Geranium sessiliflorum Cavanilles, denominada Ojotillo, es una planta que se desarrolla en la zona quechua alta sobre todo en suelos turbosos ricos en materia orgánica, originaria de Sudamérica entre los 3000 a 4500 msnm crece como planta que forma parte del césped de punas, en lugares húmedos, que junto a otras plantas forman una gruesa capa en forma de almohadilla sobre el suelo.²³

B. Descripción:

Subarbusto perenne acaule, con raíces gruesas y profundas, son plantas herbáceas, permanentes, rastreras. Los rizomas permiten que la planta rebrote cada vez que la humedad es adecuada y desde los cuales nacen abundantes raíces secundarias. Las hojas son palmadas, arrosadas, orbiculares, lobuladas de color verde plomizo y pubescentes. Sus flores son blanco rosáceo similar a la del geranio común, pero más pequeñas.²³



FIGURA N° 3: Planta de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”

FUENTE: Plantas medicinales de Cajamarca



FIGURA N° 4: Flor de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”

FUENTE: www. Terrain.net.nz

Clasificación taxonómica de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles. “Ojotillo”.

Fuente: Herbario Vargas (Anexo 1)

Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Rosanae
Orden	Geraniales
Familia	Geraniaceae
Género	Geranium
Especie	<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles

C. Sinonimia

Geranium caespitosum walpers, *G. razuhillcaense* knuth, *G. sessiliflorum* var. *Albatum* J.F. Macbride

D. Nombres comunes

Ojotilla, ojotillo, chile ojotillo

E. Usos

La parte más importante y que se comercializa en abundancia son los rizomas, que se utilizan para tomarlos en infusión o decocción para tratar infecciones de las encías, especialmente para el mal de la piorrea, también se utiliza para tratar heridas y como cicatrizante.²³ Infusión: se colocan tres a cuatro trozos de la raíz en una taza de agua hirviendo, se deja reposar y luego se toma para tratar los males de la garganta y para las infecciones urinarias. Decocción: el rizoma seco y cortado en trozos se hace hervir por cinco minutos y se toma dos veces al día para tratar los males de la garganta. Para tratar los males de la boca, se hacen hervir dos trozos del rizoma por 15 o 20 minutos y luego se hacen gárgaras o buchadas. Tintura: se prepara poniendo en maceración pequeños trozos del rizoma en una mezcla de agua ardiente con agua..²³ Tradicionalmente utilizada para infecciones urinarias. (Ver ANEXO N° 21)

2.3.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS UTILIZADAS

2.3.2.1 *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923

2.3.2.1.1 Clasificación científica *Staphylococcus aureus* (Rosenbach 1884)

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Cocci
Orden	Bacillales
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Epíteto Específico	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.3.2.1.2 Descripción

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positivo que miden cerca de 1µm de diámetro, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada. El nombre binominal de esta bacteria proviene de la raíz griega, que se compone de *staphylé*, que significa racimo y *coccus*, que significa grano, baya o uva; y del latín *aureus* que significa dorado. Este nombre significa racimo de uvas dorado y lo lleva en función de su morfología microscópica y su color dorado en el cultivo de agar sal manitol.²⁴

2.3.2.1.3 Patogenia

Staphylococcus aureus tiene a su disposición un amplio arsenal contra las defensas del hospedero. Los mecanismos patógenos de este microorganismo dependen de sus factores adhesivos, las toxinas y enzimas estafilocócicas y sus defensas contra la inmunidad.²⁴

2.3.2.1.4 Virulencia

Este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.²⁵

TABLA N° 1: FACTOR DE VIRULENCIA *Staphylococcus aureus*

COMPONENTES ESTRUCTURALES	
FACTOR DE VIRULENCIA	FUNCIÓN
Cápsula	Inhíbe quimiotaxis y dificulta la fagocitosis.
Capa de polisacáridos extracelulares	Facilita la adherencia a los cuerpos extraños (como cables de marcapasos, catéteres, etc.).
Peptidoglicanos	Evita la lisis celular (estabilizador osmótico). Estimula la producción de pirógeno endógenos. Quimiotaxis leucocitaria provocando abscesos.
Ácido teicoico	Media la adherencia del estafilococo a fibronectina, un componente mayoritario del tejido conectivo.
Proteína A	Protección contra la inmunidad humoral. Fija anticuerpos.

FUENTE: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. "*Staphylococcus aureus*" (HTML). Revista Soc Ven Microbiology (Venezuela: Scielo): Julio 2002.

TABLA N° 2: TOXINAS PRESENTES EN *Staphylococcus aureus*

TOXINAS	
Toxinas exfoliativas (ETA, ETB)	Serina proteasas que atacan a la Desmogleína-1. Síndrome de piel escaldada por estafilococo.
Enterotoxinas	Produce diarrea por apertura de canales o muerte de enterocitos. Algunas son superantígenos.

FUENTE: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. "*Staphylococcus aureus*" (HTML) ²⁴.

TABLA N° 3: ENZIMAS PRESENTES EN *Staphylococcus aureus*

ENZIMAS	
Coagulasa	Cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina provocando el depósito de <i>Staphylococcus aureus</i> , al estar cubierto por fibrina se vuelve menos inmunógeno.
Hialuronidasa	Cataliza la destrucción del ácido hialurónico en el tejido conjuntivo para ayudar a la diseminación del estafilococo.
Fibrinolisisina	Disuelve coágulos de fibrina.
Lipasas	Promueven la hidrólisis de lípidos lo que hace que <i>Staphylococcus aureus</i> se disemine en el tejido cutáneo y subcutáneo
Endonucleasas /DNasas	Hidrólisis de ADN.
β -lactamasa	<i>Staphylococcus aureus</i> posee 3 tipos. Por lo general residen en plásmidos.

FUENTE: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. "*Staphylococcus aureus*" (HTML) ²⁴

2.3.2.1.5 Mecanismo de resistencia a los antibióticos

La producción constitutiva de una gran cantidad de β -lactamasas, por parte de algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, le da la capacidad de hidrolizar lentamente a las penicilinas-resistentes. Naturalmente *Staphylococcus aureus* produce una penicilasa estafilocócica, pero ciertos plásmidos ocasionan que exista una hiper-producción de esta enzima que degrada penicilinas naturales y en forma limitada, pero notable, penicilinas semisintéticas (principalmente Oxacilina y Meticilina). ²⁵

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para oxacilina y meticilina en estos estafilococos es 1-2 μ g-mL y 2-4 μ g-mL, respectivamente. En estas cepas se denominan *borderline resistant Staphylococcus aureus* (BORSA) y la mayoría de estas pertenece al fagogrupo 94/96 y poseen un plásmido de 17,2 Kb común que produce a la β -lactamasa estafilocócica del tipo A. ²⁵

2.3.2.2 *Escherichia Coli* ATCC 35218

2.3.2.2.1 Clasificación científica *Escherichia coli* (Migula, 1895)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacterias
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Epíteto Especifico	: <i>Escherichia coli</i>

2.3.2.2.2 Descripción

Escherichia coli es un bacilo anaerobio facultativo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, mide de 1-3 um que se presenta solo, en pares, cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flagelados, no forma esporas y por lo general es no capsulado y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. En cultivos jóvenes la forma coco bacilar es bastante frecuente, en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se lo considera un microorganismo de flora normal. ²⁶

2.3.2.2.3 Patogenia:

Es capaz de ocasionar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente severas, debido a que posee componentes de patogenicidad tales como las adhesinas, en especial en los pilis que aglutinan glóbulos rojos y hemolisinas, frecuente en la pielonefritis, por una endotoxina ligada al lípido A, de naturaleza pirógena, y también por citotoxinas que actúan sobre la adenilciclase, similar al *Vibrio cholerae*. Los componentes de patogenicidad son proteínas de membrana termoresistentes y no antigénicas, que le confieren a *Escherichia coli* la capacidad de invadir células epiteliales. ²⁷

2.3.2.2.4 Virulencia

Escherichia coli está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70°C. ²⁸

2.3.2.2.5 Clasificación

Se distinguen seis cepas según su capacidad patógena (serotipos): *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD).²⁸

I) *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP)

La ECEP fue la primera cepa identificada serológicamente y es, frecuentemente, la cepa causante de cuadros diarreicos en conejos, perros, caballos y, por supuesto, en humanos, en general en ancianos y en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo. El principal factor de patogenicidad es la adherencia entre la bacteria y membrana de las células del epitelio intestinal. La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman pilis en forma de bulto.²⁷

II) *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET)

La ECET es el causante de la “Diarrea del Viajero”, ya que se adquiere habitualmente por la ingesta de alimentos o agua contaminados.

Se presenta con cólicos abdominales o deposiciones acuosas en personas de todas las edades pero es una causante importante en diarreas en los lactantes de los países en vías de desarrollo. La ECET posee pilis o fimbrias que poseen varias formas de antígenos del factor de colonización (CFA) que le permite colonizar la mucosa del intestino delgado sintetizando enterotoxinas llamadas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Las toxinas LT y ST aumentan los niveles intracelulares de AMPc y GMPc encontrados en la membrana de las células intestinales, lo que provoca la salida de iones y de agua.²⁷

III) *Escherichia coli* Enteroinvasiva (ECEI)

Es inmóvil, es lactosa y descarboxilasa negativas. Es una de las que causa más daño debido a que invade el epitelio intestinal. La bacteria requiere de mucinas y adhesinas para adherirse a las microvellosidades de la mucosa para poder entrar a la célula por endocitosis, luego se multiplica dentro de la célula y se disemina a las células sanas adyacentes. Causa diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis.²⁷

IV) *Escherichia coli* Enterohemorrágica o Verotoxigénica (ECEH)

La convención internacional de nomenclatura de patógenos ha recomendado el uso de Shiga Toxin *Escherichia coli* (STEC) para este grupo, debido a que estas bacterias producen una toxina citotóxica para células Vero de cultivo de similaridad estructural a la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. Las STEC producen verotoxinas que

actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocito pénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central). Esta cepa no fermenta el sorbitol y posee un fago, donde se encuentran codificadas las verotoxinas, también llamadas "Toxinas Shiga", no posee una fimbria formadora de mechones, en vez de esto posee una fimbria polar larga que usa para adherencia.²⁷

V) *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA)

Sólo encontrada en humanos. Son llamadas enteroagregativas porque tienen fimbrias con las que aglutinan células en los cultivos de tejidos. Se unen a la mucosa intestinal causando diarrea acuosa sin fiebre. No son invasivas. Producen hemolisina y una enterotoxina ST similar a la de las enterotoxigénicas.²⁷

VI) *Escherichia coli* de Adherencia Difusa (ECAD)

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos.²⁷

2.3.2.2.6 Mecanismo de resistencia a los antibióticos

La *Escherichia coli* usa mecanismos como producción de enzimas inactivadoras de antibiótico, por ejemplo, las β -lactamasas. Estas se han caracterizado en detalle, sobre todo las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales pueden hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro como las de tercera y cuarta generación. Otro mecanismo es la alteración de los sitios de acción del antibiótico, por ejemplo, proteínas de unión a la penicilina (PBP) alteradas y disminución de la concentración antibiótica, ya sea, por impermeabilidad o mecanismos de bombeo hacia el exterior. Algunas veces, modifica con sus girasas de forma que la hacen resistente a la fluoroquinolonas.²⁷

2.3.3 DESCRIPCIÓN DE LOS FÁRMACOS USADOS COMO PATRÓN COMPARATIVO

De acuerdo a la tabla N° 4 se determinó trabajar con los siguientes antimicrobianos Oxacilina y Clindamicina debido a que presenta susceptibilidad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*. Se escogieron dos antimicrobianos para *Staphylococcus aureus* debido a que Oxacilina es el fármaco de primera alternativa y muestra ser 100% efectiva contra la cepa de *Staphylococcus aureus* de los 36 casos registrados, mientras que el antibiótico Clindamicina muestra un porcentaje de 72.2% de sensibilidad antimicrobiana frente a esta cepa de los 26 casos registrados.

TABLA N° 4: SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA *Staphylococcus aureus*

ANTIMICROBIANO	SENSIBILIDAD PARA <i>Staphylococcus aureus</i>	
	N°	%
Oxacilina	36	100.0
Amox-ac. clav	35	97.2
Meticilina	35	97.2
Penicilina	05	13.8
Ampicilina	01	2.7
Cefalotina	33	91.6
Imipenem	36	100.0
Vancomicina	36	100.0
Ciprofloxacina	34	94.4
Cotrimoxazol	35	97.2
Rifampicina	34	94.4
Eritromicina	32	88.8
Tetraciclina	33	91.6
Cloranfenicol	29	80.5
Clindamicina	26	72.2
Gentamicina	25	69.4

FUENTE: Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a la meticilina. MENDOZA TICONA Carlos Alberto- *Rev Med Hered* 14 (4), 2003 (29)

De acuerdo a la tabla N° 5 se determinó trabajar con los siguientes antimicrobianos Amikacina y Ciprofloxacino debido a que presenta susceptibilidad antimicrobiana para *Escherichia coli*.

Se escogieron dos antimicrobianos para *Escherichia coli* debido a que se Amikacina es el fármaco de primera alternativa y muestra ser 99.3% efectiva contra la cepa de *Escherichia coli* de los 325 casos registrados, mientras que el antibiótico Ciprofloxacino muestra un porcentaje de 67.6% de sensibilidad antimicrobiana frente a esta cepa de los 325 casos registrados.

TABLA N° 5: SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA *Escherichia coli*

SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Escherichia coli</i> SEGÚN SU ORIGEN INTRAHOSPITALARIO-EXTRAHOSPITALARIO			
ANTIBIÓTICO	N	INTRA_ HOSPITALARIAS (%)	EXTRA_ HOSPITALARIAS (%)
Ampicilina	2.612	325 (34,2)	2.287 (35,6)
Piperacilina	2.469	325 (39,1)	2.144 (46,0)
Cefalotina	1.493	148 (56,1)	1.345 (72,4)
Cefuroxima	2.609	324 (78,1)	2.285 (87,1)
Cefoxitina	1.065	244 (94,7)	0.821 (93,4)
Cefotaxima	2.471	325 (85,8)	2.146 (93,3)
Ceftazidima	2.470	324 (91,4)	2.146 (96,6)
Cefepima	2.469	325 (91,1)	2.144 (96,8)
Aztreonam	1.961	314 (83,4)	1.647 (89,7)
Amoxicilina/clavulánico	2.610	286 (85,7)	2.324 (87,8)
Piperacilina/tazobactam	2.470	325 (94,2)	2.145 (97,2)
Ácido nalidíxico	2.217	195 (56,4)	2.022 (52,9)
Ciprofloxacino	2.612	325 (65,2)	2.287 (67,6)
Nitrofurantoína1	2.061	105 (96,2)	1.956 (95,0)
Gentamicina	2.612	325 (84,6)	2.287 (90,4)
Amikacina	2.471	325 (99,4)	2.146 (99,3)
Trimetoprim-sulfametoxazol	2.607	325 (65,2)	2.282 (63,2)
Fosfomicina	2.208	105 (98,1)	2.103 (97,2)

FUENTE: M. V. García López, et al. Distribución de los patrones de sensibilidad de *Escherichia coli* intrahospitalario y extrahospitalario y los fenotipos de resistencia asociados durante el año 2005.³⁰

2.3.3.1 OXACILINA

La Oxacilina es un antibiótico betalactámico, de espectro reducido del grupo de las penicilinas, por lo que se indica en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas, en particular las especies de estafilococos que suelen ser resistentes a otras penicilinas. Terapéuticamente, la oxacilina es considerada equivalente a la nafcilina, aunque difieren en su seguridad farmacológica.³¹

2.3.3.1.1 Mecanismo de Acción

La acción de los b-lactámicos se desarrolla mediante la inhibición de las etapas finales de la síntesis del peptidoglucano o mureína que es un polímero esencial en la pared de casi todas las bacterias (las clamidias carecen de peptidoglucano y son, por lo tanto, naturalmente resistentes a los b-lactámicos). Antes de entrar en detalles sobre el modo de acción de este grupo de antibióticos, conviene recordar los aspectos básicos de la biología y la síntesis de la mureína.³¹

2.3.3.1.2 Espectro Antimicrobiano

Infecciones causadas por *Staph. Aureus* resistentes a la penicilina (productores de penicilinas): *Staphylococcus Aureus* meticilin sensibles: Meningitis, Endocarditis, Septicemia, Osteomielitis, neumonía. Espectro: son sensibles: Gram (+): *Strep.* Grupo: A,B,C,G, *Strep. pneumoniae*, *Strep. milleri*, *Staph. aureus* meticilin sensible. Anaerobios: *Peptostreptococcus*. Pueden ser sensibles: Viridans strep, *Staph.epidermidis*.³²

2.3.3.1.3 Farmacocinética

Una dosis intramuscular de 500 mg alcanza C_{max} de 5,3 a 10,9 µg/mL después de 30 a 60 min. Un pico de aprox. 52 – 63 µg/mL se alcanza posterior a una dosis endovenosa de 500mg. Se une a proteína plasmática en un 89 - 94%. Tiene un t_{1/2} de 0,5 a 1 h, prolongándose a 2 h en pacientes con insuficiencia renal severa. Es metabolizada parcialmente a nivel hepático. Se requiere ajustes de dosis en pacientes con depuración de creatinina < 10 mL/min.³²

2.3.3.1.4 Efectos Adversos

Frecuentes: gastrointestinales (náusea o vómito, diarrea leve), cefalea, candidiasis oral o vaginal. Poco frecuente: hipersensibilidad incluyendo anafilaxia (alteración en la respiración, hipotensión arterial), dermatitis exfoliativa, reacción tipo enfermedad del suero (eritema, artralgia, fiebre), eritema. Raras: colitis asociada al uso de antibiótico, hepatotoxicidad (hepatitis colestásica reversible), nefritis intersticial, leucopenia o neutropenia, alteración plaquetaria, alteraciones neuropsiquiátricas, dolor en el sitio de administración parenteral.³¹

2.3.3.2 CLINDAMICINA

La Clindamicina es un antibiótico que tiene acción contra gérmenes aerobios Gram positivos (estafilococos, neumococos y estreptococos). Es eficaz contra bacterias anaerobias susceptibles, como *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y estreptococo microaerófilico. Los niveles séricos y tisulares que se alcanzan con la Clindamicina, generalmente son superiores a las C.M.I. de los microorganismos sensibles.³¹

2.3.3.2.1 Mecanismo de Acción

Aunque se considera que la Clindamicina es bacteriostática, se ha demostrado su acción bactericida contra algunas cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacteroides*.

Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, impidiendo la iniciación de la cadena peptídica. El sitio de unión en el ribosoma es el mismo que para los macrólidos y el cloranfenicol, inhibiendo sus

acciones por competencia. Por lo tanto estos agentes son antagónicos y no deben ser usados concomitantemente. *In vitro* se ha demostrado que inhiben la producción de toxinas estafilocócicas asociadas al síndrome de shock tóxico y previenen la producción de biofilms. Al alterar las moléculas de superficie, Clindamicina facilita la opsonización, fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, incluso en concentraciones sub inhibitorias. La consecuente alteración de la pared bacteriana disminuye la capacidad de adherencia de gérmenes como *Staphylococcus aureus* a las células huésped y facilita su destrucción. La Clindamicina ejerce un efecto post antibiótico duradero, contra algunas bacterias susceptibles, quizá por la persistencia del fármaco en el sitio de unión ribosómica.²⁴

2.3.3.2.2 Espectro Antimicrobiano

La Clindamicina es activa contra casi todos los anaerobios, muchos de los cocos grampositivos y algunos protozoarios.

Anaerobios:

Muestra actividad contra: Casi todos los cocos Gram positivos: especies de *Peptostreptococcus* y *Peptococcus niger*, existiendo cepas resistentes.

Bacilos Gram positivos no esporulados: especies de *Actinomyces*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*, *Clostridium* (exceptuando *C. difficile* y un notable porcentaje de algunas especies de *C. perfringens*).

Bacilos Gram negativos: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y especies de *Fusobacterium*. Se han aislado cepas resistentes de *Bacteroides fragilis*.

Aerobios:

Cocos Gram positivos: Es activa frente a *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus beta hemolítico* del grupo A (*S. pyogenes*), B (*S. agalactiae*), C y G, *S. bovis*, *Streptococcus microaerófilos* y casi todas las cepas de *S. pneumoniae* y *S. viridans*. Todos los Enterococcus son resistentes.

Además es activa frente a *S. aureus* meticilinosensible y *S. epidermidis*, debiéndose comprobar esto mediante el estudio de la sensibilidad. Las cepas de *Staphylococcus* resistentes a metilina suelen serlo también a clindamicina.

Bacilos Gram positivos: Es activa frente a *Corynebacterium spp.*, *Nocardia*, *Actinomyces* y *Bacillus anthracis*.

Los bacilos Gram negativos aerobios son resistentes a la acción de la clindamicina, a excepción de *Campylobacter fetus* y algunas cepas de *Haemophilus influenzae*²⁸

2.3.3.2.3 Farmacocinética

La Clindamicina se absorbe casi completamente después de una administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas de 2-3 ug/mL en una hora después de una dosis de 150 mg. La presencia de alimento no reduce la absorción significativamente. La vida media de este antibiótico es aproximadamente de 2.7 horas.

El palmitato de Clindamicina tiene una absorción similar al clorhidrato de Clindamicina. Después de varias dosis con un intervalo de 6 horas, se alcanzan concentraciones plasmáticas en los niños de 2 a 4 ug/ml con la administración de 8 a 16 mg/kg. Mientras que la Clindamicina es ampliamente distribuida en muchos líquidos y tejidos, incluyendo hueso, no se distribuye en el líquido cefalorraquídeo aun cuando las meninges están inflamadas. Este medicamento cruza la barrera placentaria.

El antibiótico se une en 90 % a las proteínas séricas. Se acumula en los leucocitos polimorfonucleares y en los macrófagos alveolares; la importancia clínica de este fenómeno es desconocida. Solamente 10 % de la Clindamicina administrada es excretada sin alteración alguna en la orina y pequeñas cantidades en las heces.³²

2.3.3.2.4 Efectos Adversos

- **Gastrointestinales:** Dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea y esofagitis con las preparaciones orales.
- **Reacciones de hipersensibilidad:** Se ha observado rash maculopapular y urticaria durante la terapia con el fármaco. Las reacciones más frecuentemente reportadas son los rash cutáneos generalizados semejantes a los morbiliformes de leves a moderados. Casos raros de eritema multiforme semejante al síndrome de Stevens-Johnson, han sido asociados con la clindamicina.
- **Hígado:** Se ha observado ictericia y anormalidades en las pruebas de funcionamiento hepático durante la terapia con clindamicina.
- **Piel y membranas mucosas:** Se ha reportado prurito, vaginitis y casos raros de dermatitis exfoliativa y vesiculobulosa.
- **Hematopoyético:** Se ha reportado neutropenia transitoria (leucopenia) y eosinofilia. Se han tenido reportes de agranulocitosis y trombocitopenia. No podría establecerse ninguna relación etiológica directa de la terapia concurrente con clindamicina en nada de lo anterior.³³

Como la Clindamicina no se difunde adecuadamente dentro del fluido cerebroespinal, el fármaco no debe utilizarse en el tratamiento de meningitis. Se ha demostrado antagonismo entre la Clindamicina y la Eritromicina *in vitro*. Debido a su posible significancia clínica, estos dos fármacos no deben administrarse conjuntamente. La Clindamicina ha demostrado tener propiedades de bloqueo neuromuscular que pueden mejorar la acción de otros agentes bloqueadores neuromusculares. Por lo

tanto, debe utilizarse con precaución en pacientes que reciben dichos agentes. Si la terapia es prolongada, deben realizarse pruebas de funcionamiento hepático y renal.³³

2.3.3.3 CIPROFLOXACINO

El Ciprofloxacino tiene un amplio espectro antibacteriano bactericida, que incluye a la mayoría de las enterobacterias, causantes no sólo de enfermedades urinarias e intestinales, sino de las bacterias responsables de infecciones prostáticas; así como de infecciones respiratorias tanto de vías respiratorias altas como bajas, incluyendo a pacientes que presentan fibrosis quística; ha demostrado también gran utilidad en tratamientos de infecciones en la piel, hueso y articulaciones, infecciones en ginecología e incluso en el tratamiento de la gonorrea no complicada. Su gran efectividad la logra gracias a su poder contra: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella*, especies de *Shigella* y *Campylobacter*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* y *Neisseria gonorrhoeae*; es también efectiva contra estafilococos (incluyendo los resistentes a meticilinas).³²

Posee alguna actividad inhibidora contra intracelulares como *C. trachomatis*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Brucella* y *Mycobacterium tuberculosis*. El ciprofloxacino tiene actividad moderada contra bacilo y cocos anaerobios, enterococos y neumococos. Puede ser utilizado como profiláctico en pacientes inmunosuprimidos o neutropénicos en los cuales existe peligro inminente de infección. Uno de los aspectos microbiológicos más importantes de esta quinolona se refiere a que la resistencia bacteriana se desarrolla de manera lenta y, por otro lado, también inhibe a los organismos que poseen betalactamasas y a los organismos resistentes a aminoglucósidos.³²

2.3.3.3.1 Mecanismo de Acción

El Ciprofloxacino actúa inhibiendo la girasa (enzima que conserva la estructura del ácido, DNA bacteriano), logrando con esto destruir el enrollamiento del DNA del cromosoma de la bacteria, evitando así su replicación y alterando el crecimiento bacteriano; esto lo logra con una concentración de 0.1 a 10 microgramos por mililitro. El Ciprofloxacino logra también inhibir eucariotes (bacterias que carecen de DNA girasa y poseen DNA tipo isomerasa), sólo que esto lo logra con concentraciones más altas de 100 a 1,000 microgramos por mililitro.³²

2.3.3.3.2 Espectro Antibacteriano

In vitro e in vivo (aerobios Gram +): *Enterococcus Fecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Staphylococcus Saprophyticus* Y *Streptococcus Agalactiae*.²⁴

In vitro e in vivo (aerobios Gram -): *Citrobacter Freundii*, *Enterobacter Aerogenes*, *Enterobacter Cloacae*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Neisseria*

*Gonorrhoeae, Proteus Mirabilis, Proteus Vulgaris, Pseudomonas Aeruginosa Y Serratia Marcescens.*³¹

2.3.3.3.3 Farmacocinética

Una de las ventajas del Ciprofloxacino, es la de ser un antibiótico que puede ser administrado por vía oral y en casos graves por vía intravenosa. Su viabilidad es aproximadamente de 60 % y la concentración pico en plasma es de 2.4 microgramos por mililitro. Después de una administración oral de 500 mg, 50 % de la dosis es recuperada por orina sin cambios, el resto es recuperada inalterada en las heces y como metabolitos urinarios. El tiempo medio para la eliminación de Ciprofloxacino es de 3 a 4 horas, cuando la función renal es normal y aumenta cuando la función renal está alterada. Su unión con proteínas es sólo de 10 a 15 %.³²

2.3.3.3.4 Efectos Adversos

Los efectos adversos suelen aparecer en vías gastrointestinales y en 2 a 4 % de los pacientes surgen náuseas, vómito o ambos; en 1 a 3 % de los pacientes hay cefalea, mareos y obnubilación.³²

Pueden presentarse alteraciones como cansancio, irritabilidad, rash incluyendo reacciones de fotosensibilidad; anorexia, taquicardia, migraña, colitis pseudo-membranosa, reacciones psicóticas, convulsiones, shock, síndrome de Stevens-Johnson, nefritis intersticial y en casos graves se han presentado necrosis hepática y falla renal pasajera, así como, pérdida del sentido del oído, disminución de la aptitud para conducir o manejar máquinas. Son raras las anomalías que se presentan en el laboratorio, entre los datos más frecuentes encontrados en este sentido están: eosinofilia, leucopenia, alteraciones en las cifras de la función hepática como la elevación de las bilirrubinas totales.³²

2.3.3.4 AMIKACINA

Amikacina es un aminoglucósido perteneciente al grupo de antibióticos de estructura química compleja que se asemejan en su actividad antimicrobiana, está indicado en el tratamiento de las infecciones del aparato respiratorio bajo, en infecciones del aparato genitourinario, en infecciones de huesos y articulaciones, en infecciones del sistema nervioso central, de piel y tejidos blandos así como infecciones intra-abdominales, septicemias, bacteriemia y quemaduras e infecciones postquirúrgicas producidas por bacterias Gram negativas sensibles.³²

2.3.3.4.1 Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis proteica bacteriana, su penetración a través de la membrana celular de la bacteria depende en parte de un transporte activo dependiente de oxígeno por un sistema transportador poliamínico y tienen una acción mínima frente a los microorganismos anaerobios, el efecto de los aminoglucósidos es

bactericida y es potenciado por los fármacos que interfieren en la síntesis de la pared celular.³²

2.3.3.4.2 Espectro antibacteriano

Los aminoglucósidos son eficaces frente a muchos microorganismos anaerobios gramnegativos y frente a algunos Gram positivos

Gram-negativos: Especies de *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus* (indol-positivos e indol-negativos), especies de *Providencia*, especies de *Klebsiella-Enterobacter Serrana*, especies de *Acinetobacter* (Mima-Herellea) y *Citrobacter freundii*.³¹

Gram-positivos: Especies de *Estafilococos* productores y no productores de penicilinas, incluyendo cepas resistentes a la Meticilina. No obstante, la amikacina es poco activa frente a otros Gram-positivos: *Streptococcus pyogenes*, *Enterococos* y *Streptococcus pneumoniae* (*Diplococcus pneumoniae*).³²

2.3.3.4.3 Farmacocinética

No se absorben en el tubo digestivo y habitualmente se administran por vía intramuscular o intravenosa. No atraviesan la barrera hematoencefálica, no penetran en el humor vítreo del ojo ni alcanzan concentraciones elevadas en las secreciones y líquidos corporales, aunque se pueden conseguir concentraciones elevadas en el líquido articular y pleural. La semivida plasmática es de 2-3 horas. Se eliminan casi totalmente por filtración glomerular en el riñón y el 50 %-60 % de la dosis se excreta sin modificaciones en 24 horas. Cuando está alterada la función renal, se acumula rápidamente, con un aumento secundario de los efectos tóxicos.³²

2.3.3.4.4 Efectos Adversos

Amikacina es potencialmente inductor de toxicidad vestibular auditiva y renal y de bloqueo neuromuscular. Raramente se pueden presentar erupción cutánea, fiebre por antibióticos, cefalea, parestesias, náusea y vómito, eosinofilia, artralgia, anemia, hipotensión e hipomagnesemia.

Es potencialmente nefrotóxico, ototóxico y neurotóxico, se debe considerar la posibilidad de bloqueo neuromuscular y parálisis respiratoria cuando se administre junto con agentes anestésicos o bloqueadores neuromusculares. Si esto llegara a ocurrir, se puede administrar sales de calcio para revertir este fenómeno. amikacina no es compatible con aminofilina, anfotericina, clorotiacida, dexametasona, heparina, fenitoína, tetraciclinas, vitaminas B y C, así como cefalosporinas, nitrofuranos y sulfadiacina sódica.³³

2.3.4 CRECIMIENTO MICROBIANO

En microbiología, 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 se mantiene como resultado del crecimiento continuo de la población.³⁴

2.3.4.1 Curva de crecimiento

En un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado (cultivo monofásico) se obtiene una curva de crecimiento típica como la que se indica en la figura 05. Esta curva puede dividirse en distintas fases llamadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y la fase de muerte.³⁴

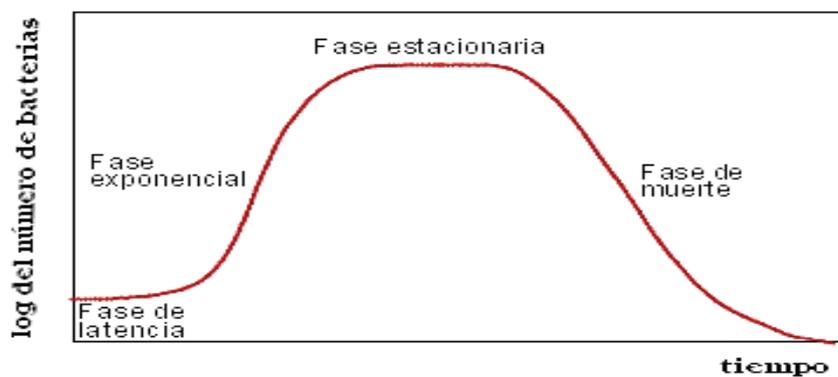


FIGURA N° 5: Curva de crecimiento típica de una población bacteriana.
FUENTE: Microbiología "reproducción y técnicas de siembra" www.oocities.org

2.3.4.1.1 Fase de latencia

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino solo tras un periodo de tiempo que constituye la fase de latencia, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y las condiciones de crecimiento. Para que ocurra crecimiento bacteriano en un medio de cultivo particular, las células deben tener un equipo enzimático completo que permita la síntesis de metabolitos esenciales ausentes en el medio. Al pasar a otro medio, se necesita tiempo para la síntesis de las nuevas enzimas.³⁴

2.3.4.1.2 Fase exponencial

Es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos, cada una de las cuales va a formar otras dos, y así consecutivamente. En general, las células en crecimiento exponencial están en estado fisiológico más sano, y por ello, las células tomadas en el punto medio del crecimiento exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales. La velocidad de crecimiento

está influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) así como por las características genéticas del organismo.³⁴

2.3.4.1.3 Fase estacionaria

En un sistema de cultivo cerrado, en medio o renovado o monofásico, como por ejemplo un tubo o un matraz, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido, lo que sucede es que un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante del crecimiento; o bien se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial. Frecuentemente ocurren ambas cosas. Al producirse esto, la población alcanza la fase estacionaria. En algunos casos puede ocurrir un lento crecimiento, muchas funciones celulares continúan como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos.³⁴

2.3.4.1.4 Fase de muerte

Si la incubación continua después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte. En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis real.³⁴

2.3.5. EL CEPARIO

Los procesos de validación son los procesos que se requieren para asegurar que los parámetros de funcionamiento de los test, tanto comerciales como los de uso doméstico, son los esperados y las pruebas pueden ser utilizadas como medio de diagnóstico en el laboratorio. La mayoría de los procedimientos en microbiología clínica, dependen de que los microorganismos viables en el cultivo sean capaces de mantener sus características morfológicas, fisiológicas y que sean típicas y reproducible. Para ayudar en este control, las cepas estándar de control son componente esencial de un proceso de validación.³⁵

Existe varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad, algunos ejemplos son:

ATCC: american type culture collection-rockville, USA

NCIC: national collection of industrial bacterial-survey, Inglaterra.

JFCC: japanese federation of culture collection of microorganism Japón.

CCTM: collection national-lille, Francia.

RIA: USSR research institute for antibiotics-moscu, Rusia.

NCBI: colección nacional industrial-aberdee, Escosia.

DCM: deutsche sammlung von mikroorganismen-guttinger, Alemania.

Es necesaria una historia del microorganismo que incluya nombre, área de aislamiento, reacciones bioquímicas y patrón de sensibilidad a antibióticos, forma de almacenaje, fecha de último transporte, etc. En todo caso las cepas de referencia deben tener requisitos específicos:

- Características típicas
- Características estables
- Reproducibilidad

2.3.5.1 CEPAS ATCC

Las cepas ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION), constituyen la colección más grande e importante del mundo estas cepas bacterianas pueden ser utilizadas como control de una gran variedad de utilidades, la cual nos permite conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en el laboratorio.³⁵

2.3.6 OBTENCIÓN DE UNA CURVA ESTÁNDAR

En el caso de organismos unicelulares, las unidades fotométricas o de densidad óptica son proporcionales (dentro de ciertos límites) al número de células; por consiguiente, las lecturas de turbidez pueden usarse como un sustituto de los métodos de recuento directo. Las medidas de turbidez tienen la virtud de ser rápidas y fáciles de realizar. Además de estas determinaciones se pueden hacer normalmente sin destruir o modificar significativamente la muestra, los resultados se pueden presentar semilogarítmicamente frente al tiempo y usarse para calcular el tiempo de generación de un cultivo en crecimiento.³⁴

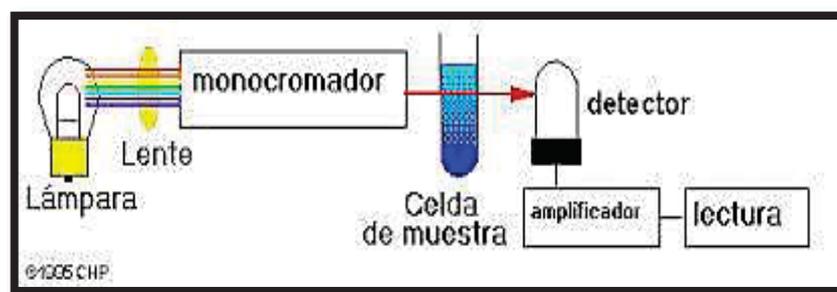


FIGURA N° 6: Método de espectrofotometría
FUENTE: Determinación de sílice-arturobola.tripod.com

2.3.7 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA RELACIONADA A PLANTAS

2.3.7.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana puede darse por la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupo sulfhídrico o por interacciones no específicas con proteínas (compuestos fenólicos); formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces

inactivando la proteína y anulando su función, como lo hacen las quinolonas, los taninos son capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, interaccionan con el DNA, lo que explica también su actividad antiviral, como lo hacen las cumarinas.³²

2.3.7.2 Medición de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se mide por la determinación de la concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento de una bacteria en prueba. Uno de los métodos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), es utilizando las pruebas de sensibilidad, el cual servirá para orientar un mejor tratamiento con respecto a los antibióticos para la determinación de la sensibilidad bacteriana, existen diferentes procedimientos siendo las más utilizadas:

Modelos Experimentales In Vitro

2.3.7.2.1 Método de la dilución en caldo

Las técnicas de dilución en caldo, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un antibacteriano, frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos con caldo, a los cuales se les agrega el antibacteriano en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio.³⁶

Esta prueba de sensibilidad en caldo puede realizarse en tubo (macro método) o en microplaca (micro método); este método alcanzó gran difusión debido a su mecanización y comercialización.³⁶

Puede ser utilizado cuando:

- No se observa una adecuada evolución clínica, pese haber indicado el antimicrobiano de acuerdo con los resultados del antibiograma por difusión.
- Debe realizarse el tratamiento con antimicrobianos selectivos potencialmente tóxicos, por lo que debe conocerse bien la dosis a utilizar.

Se trata de un método cuantitativo considerando de referencia, que permite determinar la Concentración Inhibitoria Mínima y la concentración bactericida mínima.³⁷

2.3.7.2.2 Métodos automatizados

Al cultivar una suspensión bacteriana sobre estos medios, en un momento se presentara una turbidez en aquellos medios en los cuales el antimicrobiano se encuentra en una concentración insuficiente para inhibir el crecimiento, mientras que en los otros medios de cultivo donde el antimicrobiano se encuentra en mayor proporción no se presentará ninguna turbidez lo que indica que la bacteria no se ha desarrollado. La dilución menor del antimicrobiano, en la cual no hay crecimiento bacteriano constituye el parámetro más importante, ya que este es el índice de la cantidad mínima del antimicrobiano que impide el crecimiento bacteriano (que se

indica por la ausencia de la turbidez visible). Los instrumentos sensibles como un espectrofotómetro o un colorímetro pueden servir en turbidimetría que permite que mida la densidad de cultivo a medida que crece. La turbidez se expresa en unidades de absorbancia. Para los organismos unicelulares, la absorbancia es proporcional a la cantidad de células.³⁸

2.3.7.2.3 Método de dilución en placa

El método de difusión en placa, generalmente llamado técnica de kirby-baver o “método OMS”, involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio aplicado sobre la superficie del agar en el cual, se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formara así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio.³⁶

La correlación diámetro /CIM no se efectúa en términos cuantitativos, por la técnica no es lo suficientemente exacta como para permitir cuantificar con precisión las CIM en relación a los halos producidos. Por ello, en la técnica de difusión se trabaja con puntos de corte, basados en dos medidas, un diámetro menor del halo de inhibición, por debajo del cual el microorganismo es resistente (R), y un diámetro mayor por encima del cual es sensible (S). Entre ambos diámetros la sensibilidad se considera intermedia o indeterminada (I).³⁶

2.3.8 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Una pregunta que siempre se plantea acerca de cualquier medicamento, sea una planta medicinal o un medicamento sintético: ¿es seguro? En vez de seguro, se usa muchas veces la palabra toxico. Es necesario distinguir entre las dos. Un medicamento o planta medicinal puede ser seguro en cuanto a su acción, pero esto no incluye que sea toxico; o una planta medicinal o medicamento sintético puede ser toxico, pero esto no excluye que sea medicinal. Aparentemente hay grados de seguridad y toxicidad.³⁹

En diferentes países que están cambiando la legislación para incluir plantas medicinales, se exige que la planta medicinal sea segura. Con el término seguro, se refiere a los efectos colaterales o secundarios (según Litter se considera como sinónimos). Fuera del efecto terapéutico deseado, el medicamento o planta medicinal puede ejercer efectos no deseados, por ejemplo, vómitos (es decir, no se desea el efecto emético, aunque en otros casos, como en las intoxicaciones, el vómito es el efecto terapéutico deseado), nauseas, vértigo, etc.³⁹

Depende del grado de la gravedad de estos efectos para declarar una planta medicinal o medicamento seguro o no. Las plantas medicinales están en el grupo de medicamentos que se puede adquirir sin receta médica. Los medicamentos seguros entran en lo que se llama la automedicación. Muchas plantas medicinales se usan así, por efectos idiosincráticos y de cultura.³⁹

2.3.8.1 CLASIFICACIÓN DE ESTUDIOS DE TOXICIDAD

A) TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de la sustancia. Usualmente el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50 (DL50), que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales se lleva cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados. La determinación de la DL50 se suele llevar a cabo en ratas o ratones, en el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce unos severos efectos adversos.⁴⁰

B) TOXICIDAD SUBAGUDA

En estos test la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Las principales administraciones sanitarias requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad subaguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia.⁴⁰

Durante el estudio se controla diariamente un buen número de parámetros y al final los animales son sacrificados y autopsiados. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en toma de especímenes para su examen anatomopatológico. Esta prueba tiene la intención de investigar los efectos de una variedad muy amplia de potenciales objetivos de toxicidad. Proporciona información sobre los riesgos de salud que puede provocar una exposición continuada durante un periodo relativamente limitado de tiempo.⁴⁰

C) ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA Y CRÓNICA

Básicamente estos estudios tienen características similares a los anteriores en cuanto al número de animales, número de dosis, observaciones, etc. Los estudios de toxicidad subcrónica suelen durar 3 meses, mientras los estudios de toxicidad crónica suelen durar 6 meses o un año, según el uso terapéutico que vaya tener la sustancia. Si por ejemplo la sustancia es un antidiabético o antidepresivo oral, cuya administración en el hombre se prevé y dure años, la toxicidad crónica durara un año. En el caso de un antibiótico, usado en el hombre durante periodos de 8-10 días, bastara con estudios de 6 meses. Es importante decidir la forma de administrar la sustancia a los animales durante estos periodos largos, si la administración con una sonda gástrica no suele ocasionar problemas en tratamientos cortos, el estrés o la posibilidad de accidentes con el sondaje deben ser considerados frente a la mayor imprecisión y otros problemas que conllevan el administrar el fármaco mezclado con

el alimento (rechazo del alimento, dilución de la dosis en el tiempo, adsorción diferente, etc.).⁴⁰

a) Pruebas de toxicidad en animales

Dos principios forman la base de todas las pruebas descriptivas de toxicidad que se realizan en animales. En primer lugar, los efectos de sustancias químicas producidos en animales de laboratorio, pueden aplicarse a la toxicidad en seres humanos. Cuando se calculan con base en la dosis por unidad de superficie corporal, los efectos tóxicos para el ser humano suelen surgir en la misma gama de concentraciones que se observa en animales de experimentación. Con base en el peso corporal, los seres humanos suelen ser más vulnerables que los animales de experimentación. Esta información se utiliza para escoger la dosis en estudio clínicos de "posibles" agentes terapéuticos, y para fijar límites de la exposición o contacto permisibles, a tóxicos ambientales.

En segundo lugar, es que la exposición de algunos animales de experimentación a dosis altas de agentes tóxicos es un método necesario y válido para identificar posibles riesgos para seres humanos expuestos a dosis muchos menores. El principio en cuestión se basa en el concepto de dosis- respuesta de todo o nada. Los efectos de contacto o exposición inmediatos (agudos) a una sustancia química suelen ser distintos de los que aparecen con la exposición subaguda o crónica, es decir, prolongada. La exposición aguda se produce cuando se administra la dosis en una sola vez; la crónica probablemente entraña el contacto o la exposición a pequeñas cantidades de la sustancia por largo tiempo, lo cual genera una acumulación lenta en el organismo.⁴⁰

b) Relaciones con la dosis

Toxicidad es un término relativo empleando para comparar una sustancia con otra. Para poder afirmar que una sustancia es más tóxica otra es necesario establecer una comparación cuantitativa de las dosis. Esta comparación solamente tendrá valor si es efectuada en el organismo considerado en idénticas condiciones de exposición. En la tabla N° 6 se muestra un índice de toxicidad cuantitativo de acuerdo al criterio de Williams referido a la dosis letal de una sustancia para un hombre normal (peso corporal de 70 kilos).

TABLA N° 6: ESCALA DE TOXICIDAD DE UNA SUSTANCIA SEGÚN LA MAGNITUD DE LA DOSIS LETAL PROBABLE.

GRADO O TIPO DE TOXICIDAD	DOSIS LETAL PROBABLE (EN LOS HUMANOS)	
	DOSIS (*) (**)	EN UN HUMANO DE 70KG (**)
Super toxico	Menos de 5 mg/kg	Menos de 7 gotas
Extremadamente toxico	5-50 mg/Kg	Entre 7 gotas y una cucharada de té (15 mL)
Muy toxico	51-500 mg/Kg	Entre una cucharada de té y 28,35 gramos
Moderadamente toxico	501 mg/Kg – 5 gr/Kg	Entre 28,35 y 450 gramos
Levemente toxico.	5 – 15 gr/Kg	Entre 450 y 1000 gramos
Prácticamente atoxico.	Más de 15 gr/Kg	Más de 1000 gramos

FUENTE: IQB.ES Principios de toxicología; disponible en:
<http://www.iqb.es/cbasica/farma/farma05/tox/tox02.htm>.

Los parámetros cuantitativamente importantes en toxicología incluyen la cantidad de sustancia introducida en un organismo (es decir, la dosis), la vía de administración, el número de dosis y el periodo en el que el agente es administrado.⁴⁰

c) Influencia de la vía de administración sobre la toxicidad

Las sustancias químicas pueden ser introducidas en el complejo organismo biológico por varias vías. Las propiedades químicas y físicas de cada compuesto determinan sustancialmente la vía por la que tiene lugar la exposición intencional o accidental. Un agente sólido, en contraste con un agente muy volátil, requerirá especiales procedimientos para ser administrado a un animal por otra vía distinta a la oral. En el hombre, la aplicación de los productos químicos en la superficie corporal (administración tópica) o su introducción por sus orificios naturales, particularmente las vías más adecuadas y más comunes para una exposición no intencional a sustancias químicas, mientras que el uso de técnicas de inyección puede ser la vía más conveniente para la administración intencional de compuestos a animales “que no cooperan”.⁴⁰

La vía oral es probablemente el tercer camino (después de la percutánea e inhalatoria) más común por el que entran sustancias químicas en el organismo. El tracto gastrointestinal en los animales de experimentación puede considerarse como un tubo a través del cuerpo que empieza en la boca y termina en el ano. Por tanto, en el TGI las sustancias químicas solo pueden producir un efecto en la superficie de las células de las mucosas, a menos que tengan lugar la adsorción desde el mismo.

La toxicidad de las sustancias químicas administradas por vía oral puede variar según la frecuencia con lo que son y según en qué condiciones se hace, es decir, si son mezcladas con alimentos o administradas a un estómago vacío.⁴⁰

2.3.8.2 ASPECTOS GENERALES DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

La anatomía patológica es uno de los pilares básicos en los que se asienta el conocimiento médico, ya que se encarga del estudio morfológico de las lesiones producidas por la enfermedad.⁴¹

Estas lesiones pueden encontrarse a nivel molecular, celular tisular, e incluso en toda la economía del cuerpo humano. El estudio de estas lesiones se realiza visualizándolas, haciéndolas asequibles a nuestro análisis mediante el estudio de estructuras dañadas. De esta manera puede extraerse información muy valiosa sobre las causas (etiología) de las enfermedades, mecanismos (patología) y su relación con las manifestaciones clínicas; igualmente importante es que mediante este estudio se realizan diagnósticos confiables y se da la precisión la precisión de factores pronósticos de muchas enfermedades como el cáncer, son de gran parte el sustento de los médicos clínicos para la toma de decisiones terapéuticas efectivas para cada paciente.⁴²

El proceso habitual es:

- 1.- Realizar estudios macroscópicos precisos y sistematizados de las piezas quirúrgicas.
- 2.- Hacer analizables los tejidos al microscopio óptico mediante el procesamiento químico de las muestras, preparación de cortes especiales (bloques de tejido incluido en parafina) y su coloración (hematoxilina y eosina de rutina). Este proceso llamado "técnica histológica" puede incluir otras técnicas muy complejas (inmunohistoquímica, biología molecular, etc.) como complemento en casos especiales.
- 3.- El análisis y diagnóstico de las muestras por el patólogo.⁴¹

TÉCNICA HISTOLÓGICA

La técnica histológica es una serie secuencial de pasos a través de los cuales una muestra de tejido llega a transformarse en delgados cortes coloreados capaces de ser observados al microscopio.⁴²

Para obtener una preparación histológica es necesario procesar el material siguiendo las etapas que se detallan a continuación:

- a. Obtención del material biológico
- b. Fijación
- c. Inclusión
- d. Corte (microtoma)
- e. Coloración
- f. Montaje
- g. Identificación y archivo

a. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Consiste en la provisión del material que se desea estudiar por medio del microscopio. El método seleccionado debe ser el adecuado para cada tipo de material. En todos los casos el instrumental con el cual se seccionan los tejidos debe estar muy afilado para evitar aplastar sus elementos, así como se debe evitar cualquier otro tipo de maltrato en su manipulación. Los principales métodos empleados son: biopsia, la resección quirúrgica y la autopsia.^{41, 42}

- ✓ La biopsia consiste en la extracción de pequeños fragmentos de tejido de un organismo vivo.
- ✓ La resección quirúrgica consiste en la extirpación de órganos completos o grandes partes de los mismos, a través de un procedimiento quirúrgico.
- ✓ La autopsia o necropsia es el examen de los órganos luego de la muerte, generalmente con el objetivo de determinar las causas de las mismas.

b. FIJACIÓN

La fijación es la esencia de un método para la preservación de la morfología y de la composición química de las células y los tejidos. Consiste en producir la muerte de las células, de manera tal que las estructuras que poseían estas en el estado viviente se conserven con un mínimo de modificaciones, a lo largo del tiempo y de los subsiguientes pasos de la técnica. Así mismo algunos métodos tratan de observar intacta su composición química.⁴¹

La fijación debe realizarse inmediatamente de extraer las células del organismo, para evitar las lesiones agónicas ocasionadas por la anoxia, que inicialmente producen cambios osmóticos y luego alteraciones estructurales y bioquímicas más profundas, fenómeno conocido en conjunto como autólisis. Por el mismo motivo los fijadores deben actuar sobre fragmentos relativamente pequeños de tejidos (como regla general menos de un cm cubico) .⁴²

Propiedades de los fijadores:

- Producen una rápida muerte celular, evitando la autólisis
- Preservan la morfología celular y tisular
- Preservan la composición química
- Facilitan la coloración posterior
- Inhiben el crecimiento microbiano y por lo tanto la putrefacción
- Algunos de ellos colorean sustancias de los tejidos.

c. INCLUSIÓN

Luego que una pieza ha sido fijada se debe proceder a impregnarla con una sustancia plástica, que sea fácilmente manejable y que, por su mayor dureza, permita obtener cortes finos (3 a 10 μ). Dicha sustancia debe penetrar íntimamente en el tejido u órgano, de manera homogénea, formando con el material una masa de consistencia pareja. Esta operación se denomina impregnación o inhibición.

El paso siguiente de la inclusión, que consiste en colocar la pieza en el inferior de un bloque de la misma sustancia, tratando de ubicar los tejidos u órganos en posición adecuada (orientarlos), para obtener cortes en el plano deseado.⁴¹

Los productos empleados para la inclusión se denominan genéricamente “masas de inclusión”. Para que estas sustancias penetren más fácilmente en los tejidos, deben estar en solución o fundidas. Al enfriarse, dichas masas plásticas recobran su consistencia, posibilitando la realización de los cortes finos.⁴¹

d. CORTE (MICROTOMÍA)

Los tejidos deben ser cortados en láminas delgadas para posibilitar su observación en el microscopio, los instrumentos utilizados para la obtención de cortes son los micrótomos. Básicamente, todos los tipos de micrótopo constan de una navaja muy afilada que seccionará el taco histológico y un mecanismo de avance automático regulable de a unos pocos micrones (usualmente entre 5 y 8 micrones).⁴¹

Los cortes así obtenidos presentan pequeños pliegues y arrugas que pueden eliminarse si se los flota en agua tibia, debido a la elevada tensión superficial del agua. Luego de ello se recogen sobre delgadas láminas de vidrio llamada portaobjetos, a los cuales se adhiere generalmente a través de adhesivos como el silane o la poli-L-lisina. Los cortes se secan y luego se los pasa por solventes intermediarios como el xileno, el benceno o el tolueno y se los hidrata en alcoholes de concentración decreciente hasta llevarlos al agua destilada para su posterior coloración, el sistema de congelación se utiliza para obtener rápidamente cortes histológicos durante una cirugía para realizar un diagnóstico intraoperatorio por medio de micrótomos de congelación refrigerados por la expansión de dióxido de carbono líquido, o bien para conseguir cortes de tejido con su estructura química prácticamente

inalterada, para los cuales se emplean generalmente el denominado criostato, compuesto por un micrótomo incluido en una cámara de baja temperatura.⁴²

e. COLORACIÓN

La obtención de cortes delgados soluciona uno de los inconvenientes de la observación microscópica pero hace evidente a otro de ellos: si bien permite que los cortes sean transparentes, la falta de colores y contrastes en las estructuras celulares no permite visualizar prácticamente ningún componente.

La tinción o coloración se efectúa con dos propósitos:

- La coloración rutinaria trata de posibilitar el estudio morfológico o estructural, sin que se pueda obtener mayor información sobre la naturaleza química de las estructuras observadas.
- La histoquímica utiliza métodos tendientes a identificar a un determinado tipo de molécula o sustancia, visualizándola microscópicamente.⁴¹

f. Histoquímica

La histoquímica es el conjunto de técnicas de coloración destinadas a visualizar sustancias específicas en los tejidos. Este propósito es tanto cualitativo como cuantitativo. Puede realizarse con fines de diagnósticos y desde ya resaltemos que los procedimientos histoquímicos se convirtieron en un instrumento invaluable en el diagnóstico y/o pronóstico de innumerables enfermedades. El método histoquímico en sentido estricto es microscópico debiendo cumplirse varias condiciones:

- La sustancia original debe ser inmovilizada y visualizada por el microscopio en su localización celular original.
- La sustancia debe ser identificada por un procedimiento que sea específico para ella o para el grupo químico al que pertenece. (Magariños, 2008)

La coloración de rutina se realiza con hematoxilina y eosina.

✓ Hematoxilina

- Se extrae de la pulpa de palo Campeche (árbol centroamericano).
- Viene en polvo o cristales de color amarillo pardo.
- Es soluble en agua y en alcohol, pero por sí sola no colorea, necesitando entonces de un oxidante y de un mordiente.

Oxidantes: iodato de sodio, iodato de potasio, permanganato de potasio, agua oxigenada.

Mordiente: alumbre de potasio.

Hematoxilina + oxidante = hemateína: la hemateína por sí sola no colorea, sino que necesita un mordiente. Se forma entonces un complejo (Iaca-hematoxilina-colorante), que sí colorea (Iastra, 2004)

✓ Eosina

Las eosinas son xanteno; ácidos ó colorantes de naftaleína.

Las más comunes son:

- Eosina A (amarilla), es la más usada.
- Eosina B (azul).
- Floxina.
- Eritrocina (esta halogenada con iodo en lugar de bromo)
- Safranina
- Rosa de bengala

El nombre de eosina proviene de aurora (naranja).

Su punto de solubilidad es del 44% de agua y el 7 % en alcohol.

Se puede usar un centrador del color (por ejemplo ácido acético al 0.2 % o ácido tánico).

Da una buena coloración citoplasmática ó de fondo. (Lastra, 2004)

g. MONTAJE

Consiste en colocar sobre el corte histológico ya coloreado una delgada lámina de vidrio llamada cubreobjetos, el cual se adhiere con algún adhesivo transparente conocidos como medios de montaje. Previamente, y dado que éstos son una sustancias hidrofóbicas los cortes se deshidratan en alcoholes de concentración creciente pasándolos después por solventes intermediarios como el xileno, el benceno o el tolueno. El medio de montaje clásico es el bálsamo del Canadá, el cual prácticamente se ha dejado de utilizar debido a que ha sido superado por los medios sintéticos como el DPX y otros.⁴¹

h. IDENTIFICACIÓN Y ARCHIVO

- Etiquetar rotulando con lápiz la preparación.
- También se puede grabar el extremo del porta objeto con diamante.⁴²

2.4 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Antibiótico:** agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos o mata. ³⁰
- **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento. ³⁰
- **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente. ³⁶
- **Concentración Mínima Inhibitoria:** Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 -24 horas de incubación. ³⁴
- **Halo de inhibición:** zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. ³⁴
- **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo. ³⁶
- **In vitro:** Expresión que se designa a las reacciones fisiológicas que se estudian en el laboratorio, fuera del organismo. ³⁶
- **Medio de Cultivo:** Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*. ³⁶
- **Principio Activo:** Cualquier constituyente de un fármaco que confiere una propiedad medicinal. ⁴³
- **Sensible:** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones. ³⁶

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS

3.1.1 MUESTRA VEGETAL

- Se utilizaron las hojas y el tallo de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”. siendo la zona de recolección de la muestra vegetal la localidad de Urcos (3158 m.s.n.m.), provincia de Quispicanchis, ubicada al sur este del departamento de Cusco.
- Se utilizaron las raíces de la especie vegetal *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, siendo la zona de recolección de la muestra vegetal la localidad de Marangani (3698 m.s.n.m.), provincia de Canchis, ubicada al sur este del departamento de Cusco.

3.1.2 MUESTRA MICROBIANA

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218

3.1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

- Se utilizaron ratas albinas hembras de especie *Rattus norvegicus*, cepa Holtzman con un peso promedio de 80 a 110 gr. De 1 mes y medio de edad que se obtuvieron del Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Productos Biológicos - Coordinación de Bioterio. (Lima – Perú). (Anexo N° 4)

3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.2.1 MATERIALES DE CAMPO

- Bolsas de polietileno transparente
- Bolsas de papel kraft
- Cámara fotográfica
- Cuaderno de campo
- Cúter
- Guantes de cuero
- Lapiceros
- Plumones de tinta indeleble
- Tijeras podadoras

3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Baguetas
- Botellas de color ámbar de 5L
- Embudos

- Fiolas de 50,100 y 250 mL
- Goteros de 10 y 20 mL
- Lunas de reloj
- Matraces de 250 mL
- Pipetas de 1,5 y 10 mL
- Placas Petri
- Probetas de 50, 100 y 500 mL
- Tubos de ensayo 5,10 y 20 mL
- Tubos de ensayo de 20 mL con tapa rosca
- Vaso de precipitados 50, 100, 250 y 500 mL
- Aguja y asa de siembra
- Calibrador digital
- Cintas medidoras de pH
- Gradilla
- Mechero bunsen
- Micropipeta de 100 a 1000 uL
- Micropipeta de 1000 a 2000 uL
- Micropipeta de 5 a 50 uL
- Mortero
- Papel filtro
- Pinzas
- Pissetas
- Soporte universal
- Termómetros
- Vernier

3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Agitador VORTEX VELP SCIENTIFICA® MOD: WIZARD IR
- Autoclave PHOENIX® MOD: AVPLUS, vertical de 75 litros.
- Balanza Analítica AND® MOD: GR-200, CON UNA CAPACIDAD de 210 g. resolución de 0.1 mg y sensibilidad de 1 mg.
- Baño María JSWB® MOD: JSR
- Destilador de agua IVYMAN OPTIC® MOD: AC – L8
- Estufa eléctrica MEMMERT®, con una capacidad de 32 litros y un rango de temperatura desde 5°C (temperatura ambiente) hasta 200°C.
- Incubadora SELECTA MOD: 2000994, con un rango de temperatura desde 5°C (temperatura ambiente) hasta 60°C.
- Refrigeradora BOSCH®, hasta -20 °C

3.2.4 SOLVENTES Y REACTIVOS

- Acetato de etilo Q.P al 99.9 %
- Acetona al 99.9 %
- Ácido clorhídrico concentrado al 36 %
- Ácido sulfúrico concentrado al 98 %
- Agua destilada
- Cloroformo Q.P al 99.9 %
- Cloruro férrico al 1 %
- Etanol 40° 70° 96°C
- Éter etílico Q.P al 99.9 %
- Hidróxido de sodio al 1 %
- Limaduras de magnesio
- Metanol absoluto al 99.9 %
- N-hexano Q.P al 99.9 %
- Propilenglicol
- Reactivo de Bajlet
- Reactivo de Fehling A y B
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo Dragendorff

3.2.5 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Muller Hinton
- Agar Trypticasa Soja
- Caldo Brain Heart Infusion (BHI)
- Agar Mc Conkey
- Agar SS
- Agar Sabouraud

3.2.6 FÁRMACOS EMPLEADOS COMO PATRÓN (DISCOS DE SENSIBILIDAD)

Para *Staphylococcus aureus*

- Oxacilina 1 ug GRUPO HEMEHERNE S.A.C
- Clindamicina 2 ug GRUPO HEMEHERNE S.A.C

Para *Escherichia coli*

- Amikacina 30 ug GRUPO HEMEHERME S.A.C
- Ciprofloxacino 5 ug GRUPO HEMEHERME S.A.C

3.2.7 OTROS MATERIALES

- Barbijo o mascarillas
- Cronómetro
- Cánulas orales
- Detergente
- Gorro
- Guantes descartables
- Guardapolvo
- Lejía
- Ligas
- Mandil descartable
- Materiales de escritorio
- Molino
- Pabilo
- Papel aluminio
- Pinzas
- Plumón marcador
- Tijera estéril

3.3 DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio de investigación tiene un alcance explicativo porque este estudio se encarga de responder a las causas de los eventos, es decir por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se da éste.

Es un estudio transversal porque describe la relación entre dos o más variables. En este diseño lo que se mide es la relación entre variables en un tiempo determinado.

Para la determinación de la actividad antibacteriana se realizó un estudio:

- **Cuasi experimental:** Porque se manipula deliberadamente al menos una variable independiente para ver su efecto y relación con una o más variables dependientes.⁵¹
- **Prospectivo:** Por el tiempo de ocurrencia en el futuro de los hechos; orientado a demostrar la probable actividad antibacteriana en cepas estándar.⁵¹

Para la determinación de la toxicidad aguda por vía oral se realizó un estudio:

- **Experimental:** Por la manipulación del factor de estudio por el investigador y por la aleatorización de los casos o sujetos en dos grupos, llamados “Grupo control” y “Grupo experimental”.⁵¹
- **Prospectivo:** Es un estudio que se realizó con los datos obtenidos en un momento puntual en el futuro. Orientado a demostrar la probable toxicidad aguda por vía oral en ratas.⁵¹

3.3.1.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se siguió el diseño de post prueba y grupo control de la siguiente manera.

A. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Oenothera rosea* Aiton Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles FRENTE A *Staphylococcus aureus*:

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
:	:	:
G _x	X _x	O _x
G _{x+1}	X _{x+1}	O _{x+1}
G _{x+2}	X _{x+2}	O _{x+2}

Dónde:

- $G_1, G_2, \dots, G_{X+1}, G_{X+2}$: cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- X_1, X_2, \dots, X_X : son diferentes concentraciones en mg/mL de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”. que fueron sembradas en placas Petri por triplicado por el método de pozos excavados.
- X_{X+1} : concentración del fármaco patrón, “Oxacilina”
- X_{X+2} : concentración del fármaco patrón, “Clindamicina”
- $O_1, O_2, \dots, O_{X+1}, O_{X+2}$: observación y medición de los halos de inhibición.

B. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Oenothera rosea* Aiton Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles FRENTE A *Escherichia coli*:

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G_1	X_1	O_1
G_2	X_2	O_2
:	:	:
G_X	X_X	O_X
G_{X+1}	X_{X+1}	O_{X+1}
G_{X+2}	X_{X+2}	O_{X+2}

Dónde:

- $G_1, G_2, \dots, G_{X+1}, G_{X+2}$: cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 35218
- X_1, X_2, \dots, X_X : son diferentes concentraciones en mg/mL de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”. que fueron sembradas en placas Petri por triplicado por el método de pozos excavados.
- X_{X+1} : concentración del fármaco patrón, “Amikacina”
- X_{X+2} : concentración del fármaco patrón, “Ciprofloxacino”
- $O_1, O_2, \dots, O_{X+1}, O_{X+2}$: observación y medición de los halos de inhibición.

3.3.1.2 ENSAYO DE LA TOXICIDAD AGUDA

Para determinar la toxicidad aguda por vía oral de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se siguió el diseño de post prueba y grupo control de un solo grupo de la siguiente manera.

A. ENSAYO DE TOXICIDAD DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A”

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G ₁	X ₀	O ₀
G ₁	X ₁	O ₁
G ₁	X ₁	O ₂
G ₁	X ₁	O ₃
G ₁	X ₁	O ₄
G ₁	X ₁	O ₅

Dónde:

- G₁: Grupo a los que se administraron una dosis única de 2000 mg/kg de peso corporal del extracto seco.
- X₀: Grupo control al que se administró agua destilada
- X₁: Dosis única que se administró del extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”.
- O₀: Grupo de comparación de las diferentes reacciones que se pudieron observar.
- O₁, O₂,... O₅: Observación de signos y síntomas de la dosis única durante las primeras 24 horas.

B. ENSAYO DE TOXICIDAD DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G ₁	X ₀	O ₀
G ₁	X ₁	O ₁
G ₁	X ₁	O ₂
G ₁	X ₁	O ₃
G ₁	X ₁	O ₄
G ₁	X ₁	O ₅

Dónde:

- G₁: Grupo a los que se administraron una dosis única de 2000 mg/kg de peso corporal del extracto seco.
- X₀: Grupo control al cual se le administró agua destilada
- X₁: Es la dosis única que se administró del extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.
- O₀: Grupo de comparación de las diferentes reacciones que se pudieron observar.
- O₁, O₂,... O₅: Observación de signos y síntomas de la dosis única durante las primeras 24 horas.

C. EVALUACIÓN DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

<i>Oenothera rosea</i> Aiton “YAWAR CHONQ’A”			<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “OJOTILLO”		
GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA	GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G ₁	X ₀	O ₀	G ₁	X ₀	O ₀
G ₁	X ₁	O ₁	G ₁	X ₁	O ₁
G ₁	X ₁	O ₂	G ₁	X ₁	O ₂
G ₁	X ₁	O ₃	G ₁	X ₁	O ₃
G ₁	X ₁	O ₄	G ₁	X ₁	O ₄
G ₁	X ₁	O ₅	G ₁	X ₁	O ₅

Dónde:

- G₁: Grupo a los que se administraron una dosis única de los extractos secos hidroalcohólicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.
- X₀: Grupo control al que se administró agua destilada
- X₁: Es la dosis única de 2000 mg/kg de peso corporal que se les administraron de los extractos etanólicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.
- O₀: Grupo de comparación de las diferentes lesiones que se pudieron observar.
- O₁, O₂,... O₅: Observación de las lesiones celulares y tisulares.

3.4 IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS

3.4.1.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Extractos etanólico al 70 % y clorofórmico de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”.
- Extractos etanólico al 70 % y clorofórmico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

3.4.1.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

- b) Toxicidad aguda por vía oral de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

3.4.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.2.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

A. Extractos etanólico al 70 % y clorofórmico de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”.

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto sólido obtenido por evaporación del etanol y cloroformo previa maceración de las hojas y tallo de este. Disuelto en el solvente adecuado. (Villar, 1999).

Definición operacional:

- **Naturaleza** : Cuantitativo
- **Tipo de medición** : Directa
- **Escala de medición** : Razón
- **Instrumento de medición** : Balanza analítica
- **Procedimiento de medición de la variable:** Se pesó el extracto seco etanólico y clorofórmico en mg luego se realizaron las diluciones con los solventes adecuados (mL).
- **Indicadores** : cantidad de extracto disuelto/cantidad de solvente.
- **Expresión final** : mg/mL

B. Extractos etanólico al 70 % y clorofórmico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto sólido obtenido por evaporación del etanol y cloroformo previa maceración de la raíz de este. Disuelto en el solvente adecuado. (Villar, 1999).

Definición operacional:

- **Naturaleza** : Cuantitativo
- **Tipo de medición** : Directa
- **Escala de medición** : Razón
- **Instrumento de medición** : Balanza analítica
- **Procedimiento de medición** : Se pesó el extracto seco etanólico y clorofórmico en mg luego se realizaron las diluciones con los solventes adecuados (mL).
- **Indicadores** : Cantidad de extracto disuelto/cantidad de solvente.
- **Expresión final** : mg/mL

3.4.2.2 VARIABLES DEPENDIENTES

A. Actividad antibacteriana “in vitro” de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Definición conceptual: Capacidad de una sustancia que actuando sobre una etapa esencial y específica del metabolismo microbiano puede inhibir el crecimiento a algunos microorganismos (Farreras, 2005)

Definición operacional:

- **Naturaleza** : Cuantitativo
- **Tipo de medición** : Directa
- **Escala de medición** : Razón
- **Instrumento de medición** : Vernier
- **Procedimiento de medición** : Se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la sensibilidad de las bacterias al extracto.
- **Indicador** : Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano
- **Expresión final** : mm (diámetro del pozo 5 mm)

B. Toxicidad aguda por vía oral de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”

Definición conceptual: Es la cantidad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos perjudiciales. La toxicidad aguda señala los efectos de una dosis administrada en 24 horas pudiendo aparecer sus efectos en pocas horas o días.

Definición operacional:

Sub variables:

a) **Signos:** signo es un dato objetivo es decir perceptible.⁵⁰

- **Lagrimeo:** acción de lagrimear, flujo independiente de toda animación del ánimo, por no poder pasar las lágrimas desde el lagrimar a las fosas nasales o ser su secreción muy abundante por irritación del ojo.⁵⁰
- **Secreción nasal:** Salida de material líquido-mucoso por la nariz. El material puede ser mucosidad de la nariz, los senos y la garganta, o pus debido a infecciones o líquido cefalorraquídeo del cerebro.⁵⁰
- **Salivación:** Es el hecho de salivar, la salivación permite humidificar la boca, favorecer la deglución de los alimentos y su progresión hacia el

esófago hasta el estómago. La saliva participa también en la digestión (la amilasa salivar degrada una parte del almidón).⁵⁰

- **Temblores:** Son movimientos rítmicos involuntarios y oscilatorios de una o varias partes del cuerpo.⁵⁰
- **Convulsión:** Síntoma transitorio caracterizado por la actividad neuronal en el cerebro que conlleva a hallazgos físicos peculiares como la contracción y distensión repetida y temblorosa de uno o varios músculos de forma brusca o generalmente violenta.⁵⁰
- **Letargia:** Es la pérdida temporal o completa de la sensibilidad y del movimiento por una causa fisiológica.⁵⁰
- **Somnolencia:** Actitud exagerada para el sueño, estado en el que ocurre una fuerte necesidad de dormir.⁵⁰
- **Muerte:** Es un efecto terminal que resulta de la extinción del proceso homeostático de un ser vivo.⁵⁰

- **Naturaleza** : Cualitativa
- **Medición** : Directa
- **Escala** : Ordinal
- **Instrumento de medición** : visual
- **Procedimiento de medición** : Observación de los diferentes signos y síntomas durante las primeras 24 horas después de la administración de los extractos etanólicos al 70 % de las especies en estudio.
- **Expresión final** : (0: sin alteración, 1: Leve, 2: moderado y 3: severo).

b) Estudio histopatológico: Estudio con el microscopio de los tejidos y de los órganos enfermos. La anatomía patológica es uno de los pilares básicos en los que se asienta el conocimiento médico, ya que se encarga del estudio morfológico de las lesiones producidas por la enfermedad. Estas lesiones pueden encontrarse a nivel molecular, celular, tisular e incluso en toda la economía del cuerpo humano.

El estudio de estas lesiones se realiza visualizándolas, haciéndolas asequibles a nuestro análisis mediante el estudio de las estructuras dañadas. De esta manera puede extraerse información muy valiosa sobre las causas (etiología) de las enfermedades, mecanismos (patogenia) y su relación con las manifestaciones clínicas, igualmente importante es que mediante este estudio se realizan diagnósticos confiables y se da la precisión de factores pronósticos de muchas enfermedades, como el cáncer que son en gran parte el sustento de los médicos clínicos, para la toma de decisiones terapéuticas efectuadas para cada paciente.⁴²

- **Naturaleza** : Cualitativa
- **Medición** : Directa
- **Escala** : Nominal
- **Instrumento de medición** : Microscopio
- **Procedimiento de medición** : Se realizó la eutanasia de los animales de experimentación con la finalidad de examinar macroscópicamente y microscópicamente los diferentes órganos (estomago, hígado y riñones).
- **Expresión final** : alteraciones celulares y tisulares observadas al microscopio (congestión, hemorragia, edema y necrosis).

3.4.2.3 VARIABLES INTERVINIENTES

A. DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

- Estado de crecimiento
- Lugar de recolección
- Altitud de recolección
- Temporada de recolección
- Parte de la planta a estudiar
- Control microbiológico

B. DE LAS BACTERIAS

- Tipo de cepa
- Medios de cultivo
- Temperatura de incubación

C. DE LAS RATAS

- Raza
- Edad
- Sexo
- Peso

TABLA N° 7: RESUMEN DE LA OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES IMPLICADAS								
DEFINICIÓN OPERACIONAL								
INDEPENDIENTES	INDICADOR	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	TIPO DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
Extractos etanólico al 70 % y clorofórmico de las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton "Yawar Chonq'a"	Cantidad del extracto disuelto/ cantidad de solvente	Es la cantidad de extracto sólido obtenido por evaporación del etanol y cloroformo previa maceración de las hojas y tallo de éste. Disuelto con los solventes adecuados. (Villar, 1999).	Cuantitativa	Directa	Razón	Se pesó el extracto seco en mg luego se realizaron las diluciones con el solvente adecuado (mL).	-Balanza analítica -Ficha de datos (ANEXO N° 11)	mg/mL
Extractos etanólico al 70 % y clorofórmico de la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "Ojotillo"	Cantidad del extracto disuelto/ cantidad de solvente	Es la cantidad de extracto sólido obtenido por evaporación previa maceración de la raíz de éste. Disuelto con los solventes adecuados (Villar, 1999).	Cuantitativa	Directa	Razón	Se pesó el extracto seco en mg luego se realizaron las diluciones con el solvente adecuado (mL).	-Balanza analítica -Ficha de datos (ANEXO N° 11)	mg/mL

DEPENDIENTES	INDICADOR	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	TIPO DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de <i>Oenothera rosea</i> Aiton "Yawar Chonq'a" y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "Ojotillo" sobre cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano	Capacidad de una sustancia que actuando sobre una etapa esencial y específica del metabolismo microbiano puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos (Farreras, 2005).	Cuantitativa	Directa	Razón	Se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la sensibilidad de las bacterias al extracto.	-Vernier -Ficha de datos de los halos de inhibición. (ANEXO N° 16)	mm.
Toxicidad aguda por vía oral de los extractos etanólicos al 70 % de <i>Oenothera rosea</i> Aiton "Yawar Chonq'a" y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "Ojotillo".	Signos	Signo es un dato objetivo es decir perceptible,. (Diccionario médico)	Cualitativa	Directa	Nominal	Observación de los diferentes signos durante las primeras 24 horas después de la administración de los extractos etanólicos al 70 % de las especies en estudio.	-Visual -Ficha de datos para el registro de signos. (ANEXO N° 17)	Signos 0: sin alteración 1: leve 2: moderado 3: severo
	Estudio histopatológico.	Estudio con el microscopio, de los tejidos y órganos enfermos.	Cualitativa	Directa	Ordinal	Se realizó la eutanasia de los animales de experimentación con la finalidad de examinar macroscópicamente y microscópicamente los diferentes órganos (estomago, hígado y riñones).	-Microscopio -Ficha de datos del estudio histopatológico. (ANEXO N° 14)	Cantidad de alteraciones (congestión, hemorragia, edema y necrosis).

VARIABLES NO IMPLICADAS	
INTERVINIENTES	
A. DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO	Estado de crecimiento: Las plantas de las especies vegetales <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” al momento de la recolección se encontraban en estado joven de crecimiento.
	Lugar de recolección: Se eligió para la recolección de las especies en estudio las provincias de Canchis y Quispicanchis del departamento de Cusco
	Altitud de recolección: Las especies vegetales en estudio <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” se recolectaron a 3158 msnm y 3698 msnm, respectivamente.
	Temporada de recolección: Las especies vegetales en estudio <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo” se recolectaron en el mes de Marzo.
	Parte de la planta a estudiar: Se usaron las hojas y tallo de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a” y la raíz de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”.
	Control microbiológico de los extractos: Se realizó el control microbiológico de los extractos de las especies en estudio, donde se encontró que estaban libres de contaminantes (salmonella, coliformes fecales, mesófilos viables, hongos y levaduras).
	Tipo de cepa: Se usaron las bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> cepa ATCC 35218.
B. DE LAS BACTERIAS	Medios de cultivo: Se usaron los medios de cultivo caldo cerebro corazón, Mueller Hinton, Agar Trypticase Soja.
	Temperatura de incubación: Las bacterias fueron incubadas a 37 °C.
	Raza: se usaron para la prueba de toxicidad aguda ratas albinas de especie <i>Rattus norvegicus</i> .
C. DE LAS RATAS	Edad: la edad de las ratas fue aproximadamente entre 1 mes y medio a 2 meses de vida.
	Sexo: Se usaron ratas hembras.
	Peso: Las ratas tenían un peso promedio de 80 a 110 gr.

3.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

3.5.1 DE LAS MUESTRAS VEGETALES

Criterios de inclusión:

- Hojas y tallos sanos en buen estado de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”
- Raíces sanas en buen estado de la especie vegetal *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

Criterios de exclusión:

- Hojas y tallos dañados, con parásitos o contaminados por hongos de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”.
- Raíces dañadas, con parásitos o contaminados por hongos de la especie vegetal *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

3.5.2 DE LAS BACTERIAS

Criterios de inclusión:

- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

Criterios de exclusión:

- Las cepas bacterianas que no se encontraron en buenas condiciones o presentaron contaminación y que no cumplieron con las características básicas de las cepas.

3.6 PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.6.1 MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.6.1.1 RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

Se recolectaron la parte aérea (hojas y tallo) de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” en el mes de Marzo, en la localidad de Urcos a una altitud de 3150 msnm, del departamento de Cusco.

Se recolectó la parte subterránea (raíz) de la especie vegetal *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” en el mes de marzo, en la localidad de Marangani a una altitud de 3350 msnm, del departamento de Cusco.

3.6.1.2 SELECCIÓN Y SECADO DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidas las muestras se procedió a la selección y limpieza de los mejores ejemplares de hojas y tallos de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de las raíces de la especie vegetal de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, luego se extendieron las hojas, tallos y raíces en papel kraft para su secado el cual se realizó en un lugar fresco, limpio, ventilado, en sombra y a temperatura ambiente.

3.6.1.3 MOLIENDA Y TAMIZAJE DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidas las muestras secas se procedió a molerlas con un molino de granos previamente desinfectado, luego se tamizaron las muestras para obtener la finura adecuada y se traspasaron a frascos de color ámbar con tapas herméticas.

3.6.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

La determinación de los porcentajes de humedad de las hojas y tallo de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de la especie vegetal *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se realizó por triplicado en placas Petri con 5g de muestra fresca, las mismas que fueron introducidas a la estufa a 40°C hasta peso constante para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente relación.⁴³

$$\%H = \frac{M1 - M2}{M1} \times 10$$

Dónde:

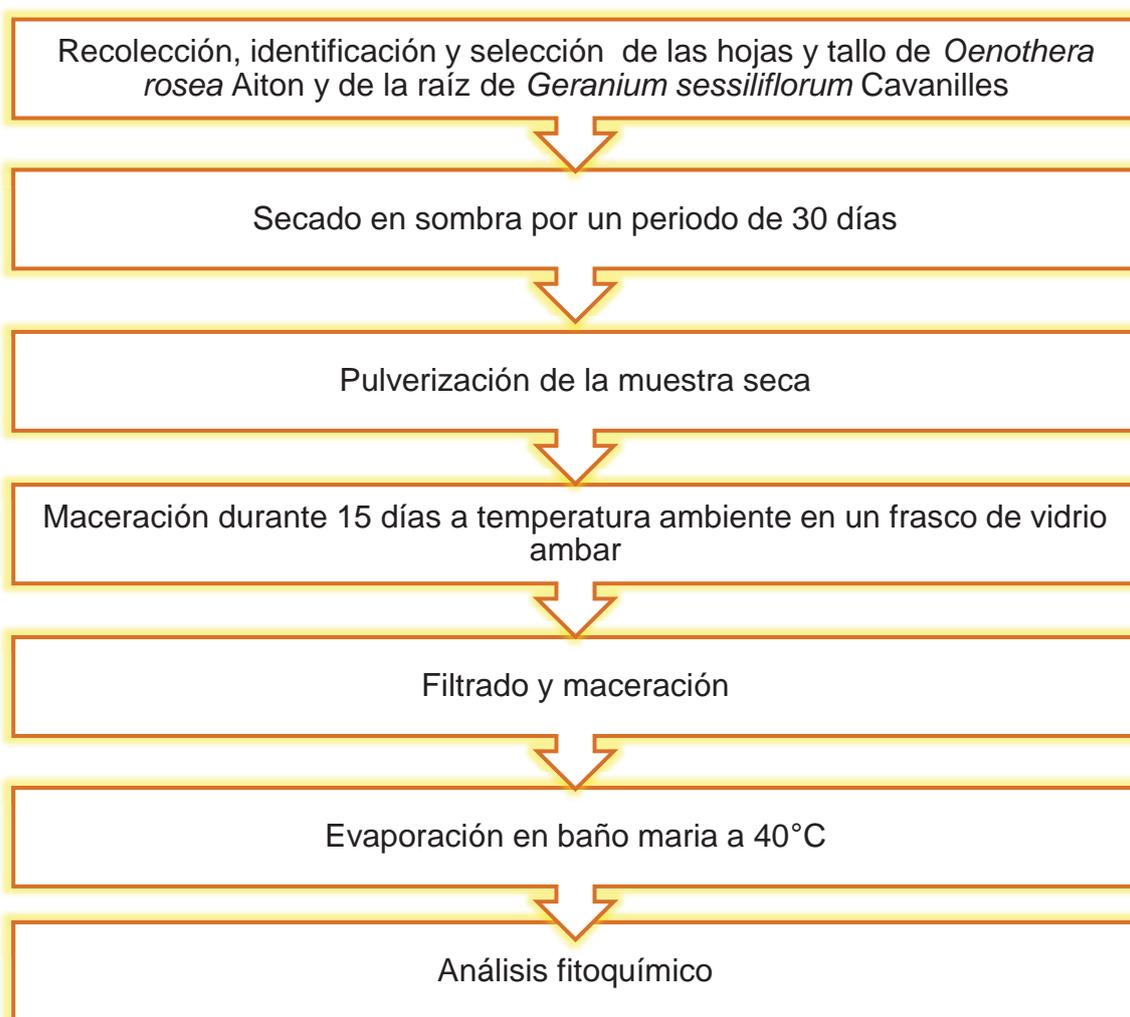
- %H = % Humedad
- M1 = peso de la muestra fresca
- M2 = Peso de la muestra seca

3.6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

La parte molida se colocó en un envase, el cual se sometió a maceración con etanol al 70 % y cloroformo de las dos especies vegetales en envases de color ámbar debidamente etiquetados según el extracto obtenido, se agitó diariamente por un periodo de 15 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se procedió a filtrar el macerado; el producto filtrado se trasvaso a envases de boca ancha y fueron sometidos a evaporación a una temperatura de 40° C.

Estos extractos se usaron para las pruebas de solubilidad, análisis fitoquímico cualitativo, control de calidad microbiológico y para la determinación antibacteriana y a la vez toxicidad.⁴⁵

FLUJOGRAMA N°1: OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS SECOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO



FUENTE: Elaboración propia

3.6.4 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

El porcentaje de extracción se calculó con la siguiente relación.⁴³

$$\% \text{ Extracción} = \text{PF/PI} \times 100$$

Dónde:

- PI= Peso Inicial (muestra molida)
- PF=Peso Final (extracto seco)

3.6.5 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para realizar las pruebas de solubilidad se pesó aproximadamente 100 mg de los extractos etanólicos y clorofórmicos los cuales se depositaron en diferentes tubos de ensayo a los cuales se agregó 1 a 3 mL en disolventes de mayor a menor polaridad: agua, metanol, etanol de 40, 70 y 96 %, acetona, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, bencina y hexano.⁴⁵

3.6.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Los extractos etanólicos y clorofórmicos obtenidos fueron analizados mediante una marcha fitoquímica para la determinación de los metabolitos secundarios.⁴³

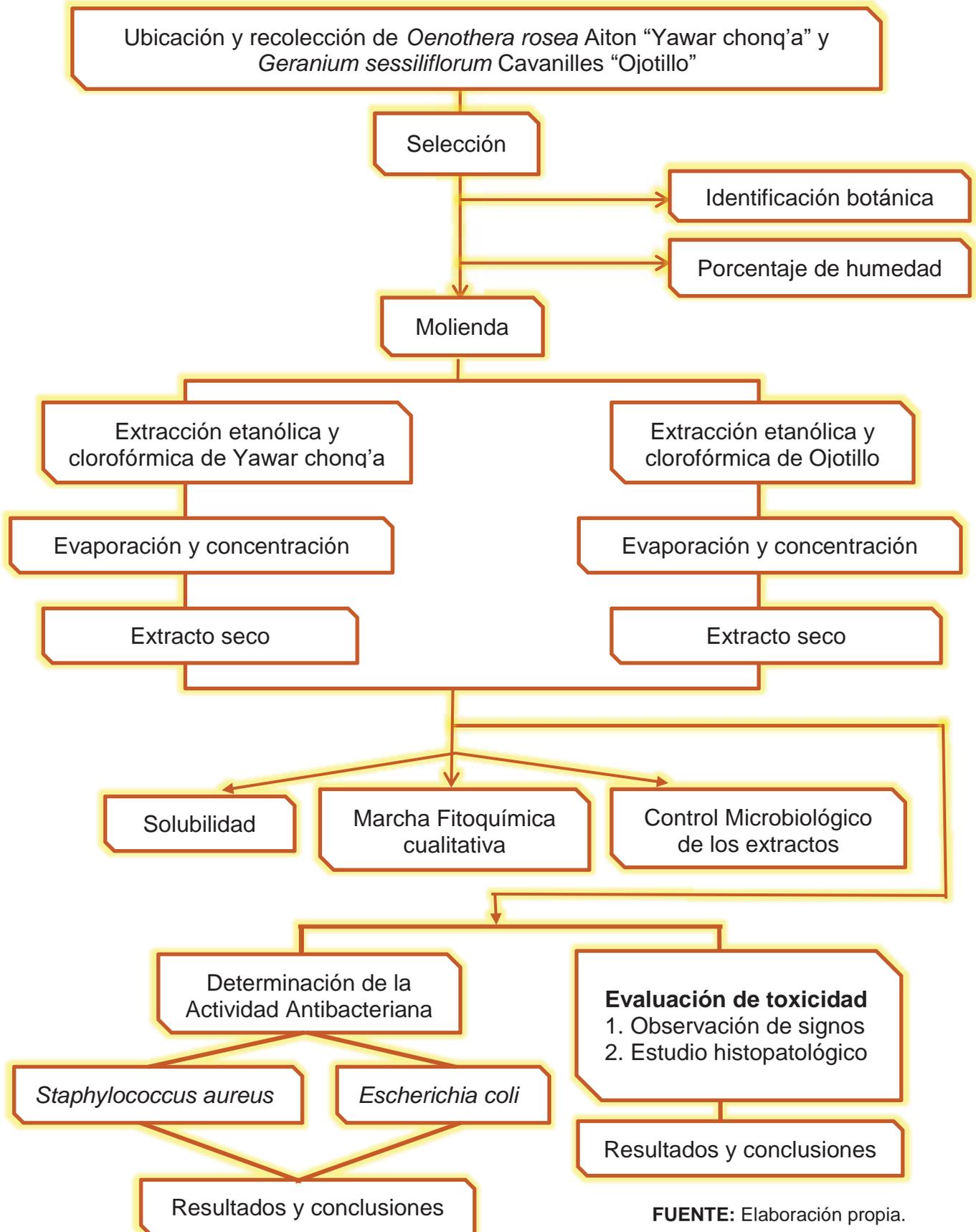
TABLA N° 8: MARCHA FITOQUÍMICA

REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO
Dragendorff	Alcaloides
Benedict	Azúcares reductores
Cloruro férrico al 1%	Compuestos fenólicos
Reacción de Shinoda	Flavonoides
Fehling A y B	Glicósidos
Ácido sulfúrico concentrado	Saponinas
Lieberman – Burchart	Esteroides
Molish	Glicósidos
Ninhidrina	Aminoácidos
Bontranger	Quinonas
Gelatina	Taninos

FUENTE: O. LOOCK de UGAZ, 1994

3.6.7. PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ESTUDIO

FLUJOGRAMA N°2: DE LA INVESTIGACIÓN



FUENTE: Elaboración propia.

3.6.8 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”.

Según la Norma Sanitaria sobre los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria de Salud, se observa en el siguiente cuadro los criterios a tomar en cuenta para el control de calidad de los extractos secos en estudio.⁴⁶

TABLA N° 9: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

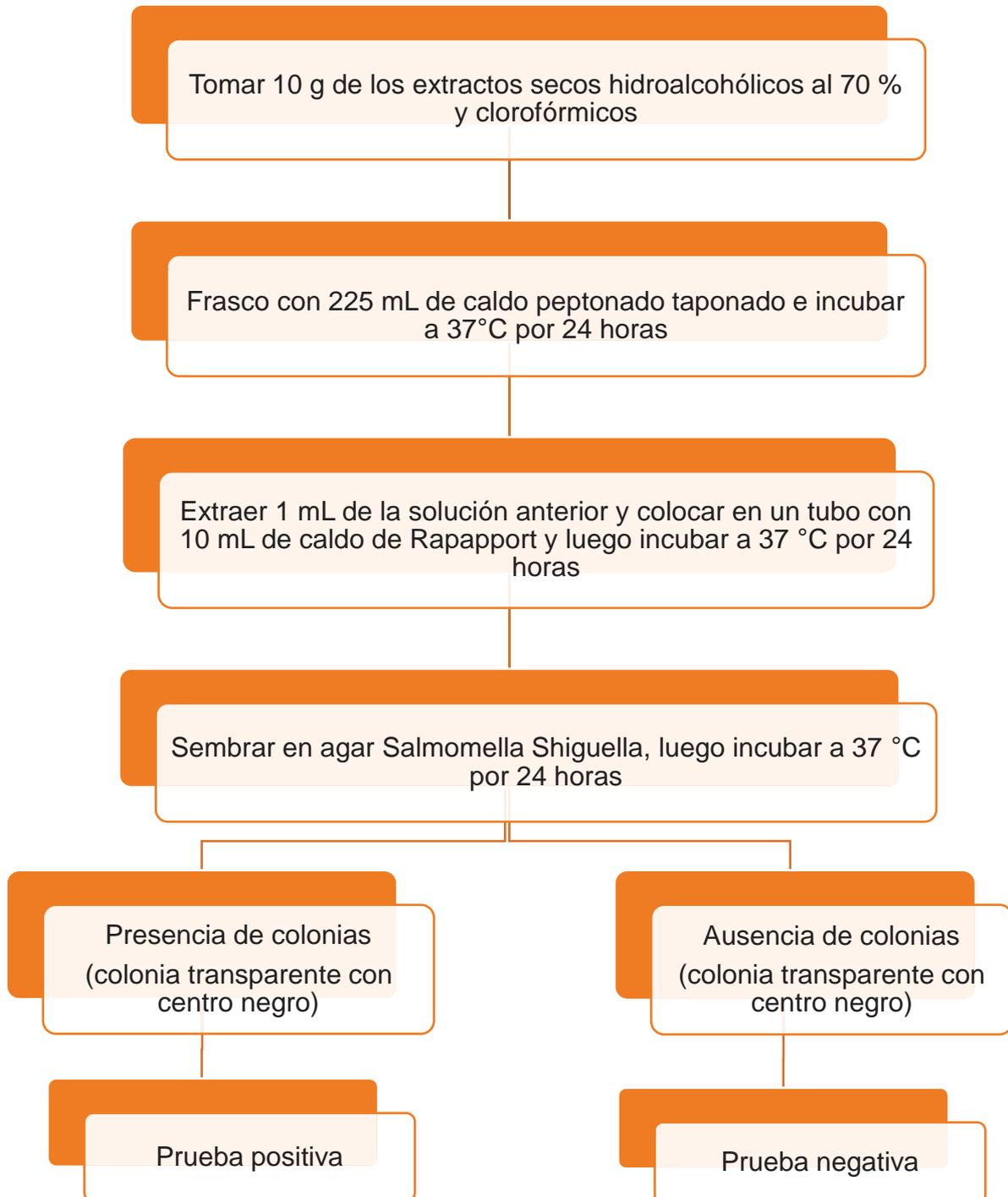
CRITERIOS	AGAR USADO	PESO DEL EXTRACTO	BACTERIAS Y HONGOS	RESULTADOS ACEPTADOS
Criterio imperativo: no debe presentar, en caso hubiera el riesgo es muy elevado.	Agar SS	10 g	Salmonella	Negativo
Criterios indicativos de higiene: el exceso indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto puede ser rechazado.	Agar Mc Conkey	1 g	Coliformes fecales (E. coli)	Negativo
Criterios de alerta o límites críticos: significa que durante el proceso de propagación del extracto no debe exceder los límites especificados.	Agar Sabouraud	1 g	Aerobios mesófilos Hongos y levaduras	Negativo

FUENTE: DIGESA, Norma Sanitaria sobre Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Cusco – Perú, 1999

FLUJOGRAMA N° 3

CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS CONCENTRADOS EN BASE AL CRITERIO IMPERATIVO

(SALMONELLA)

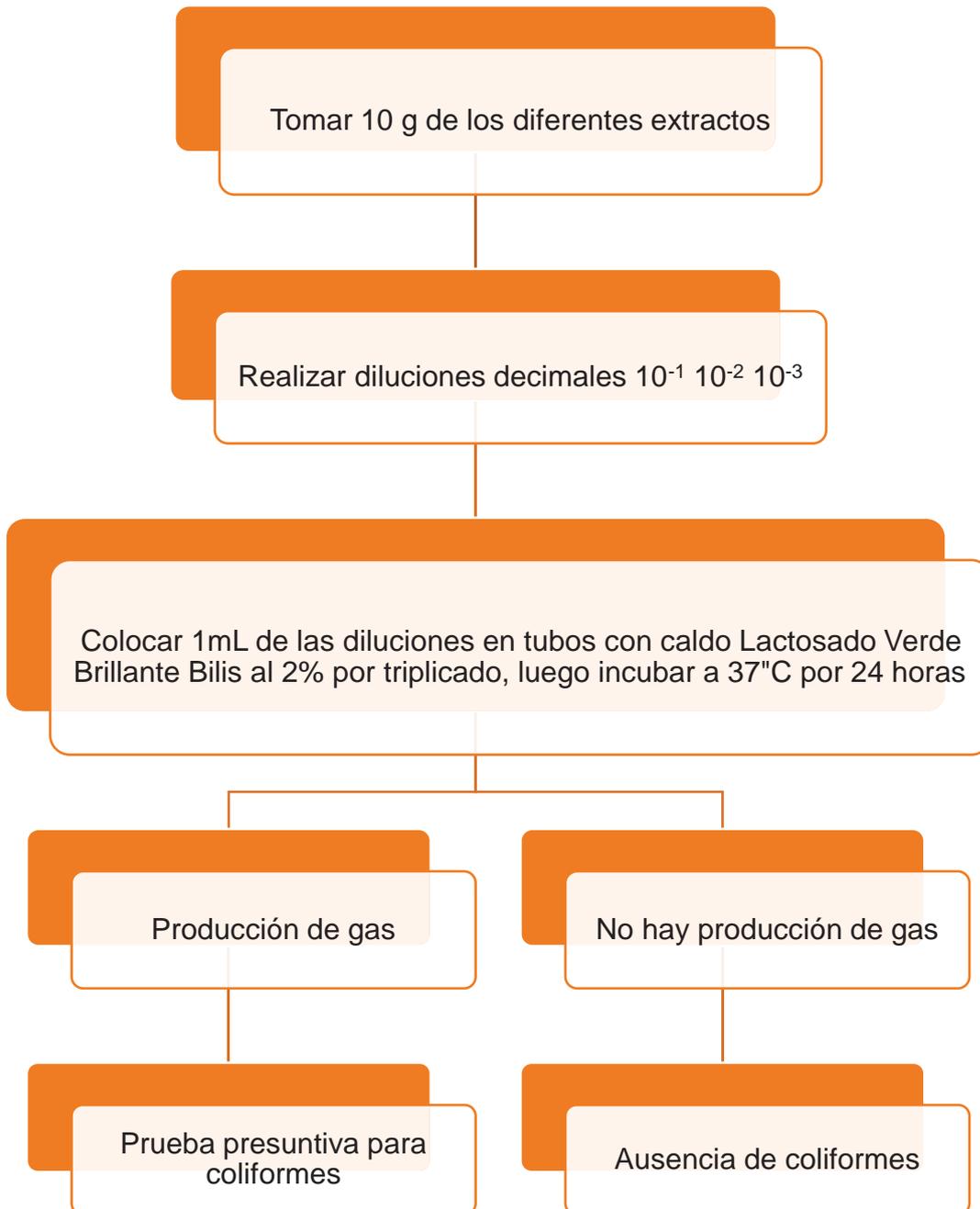


FUENTE: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N°4

CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS CONCENTRADOS EN BASE AL CRITERIO INDICATIVO DE HIGIENE

(COLIFORMES FECALES)

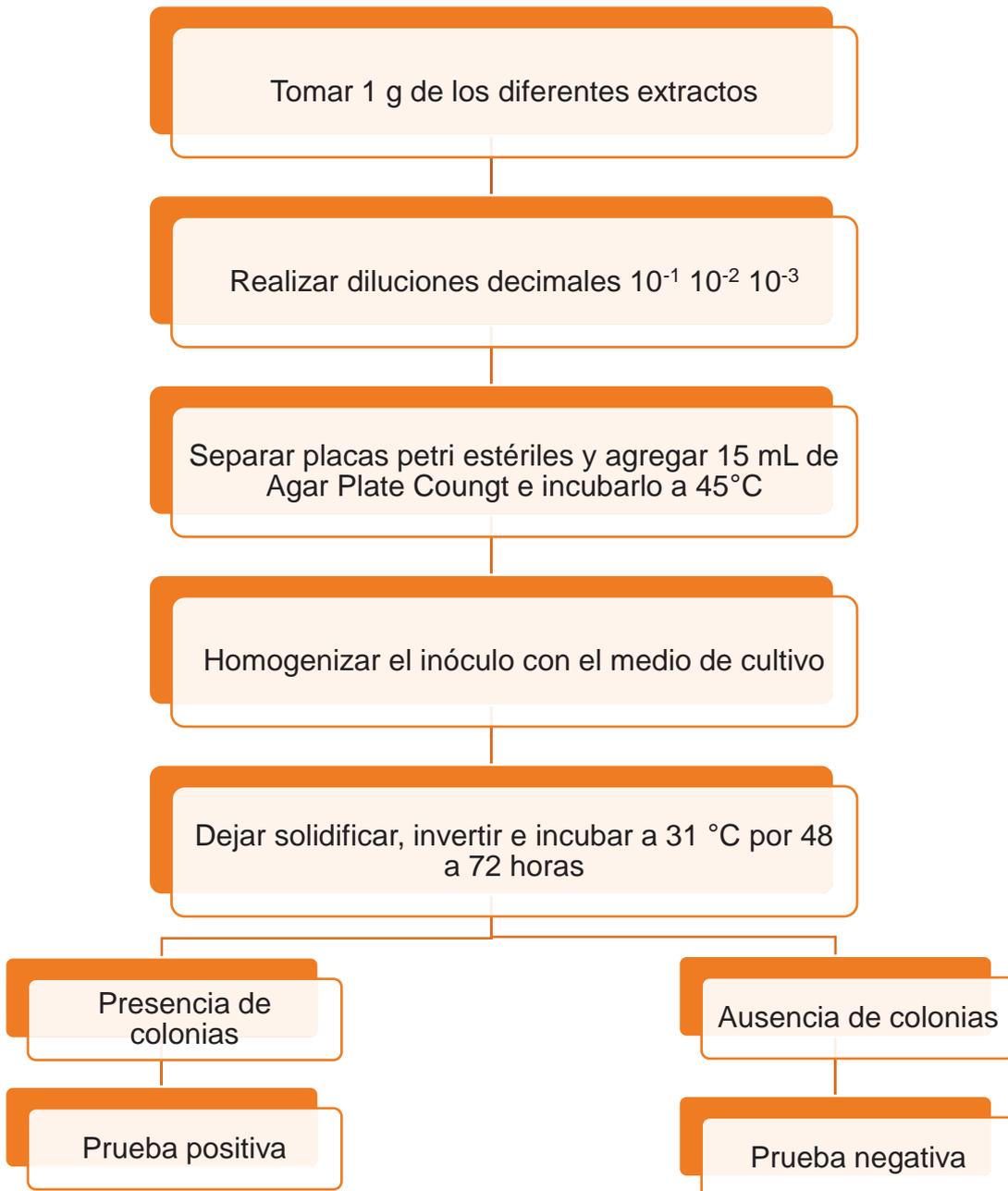


FUENTE: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N°5

CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS CONCENTRADOS EN BASE AL CRITERIO DE ALERTA O LÍMITES CRITICOS

(MESOFILOS VIABLES)

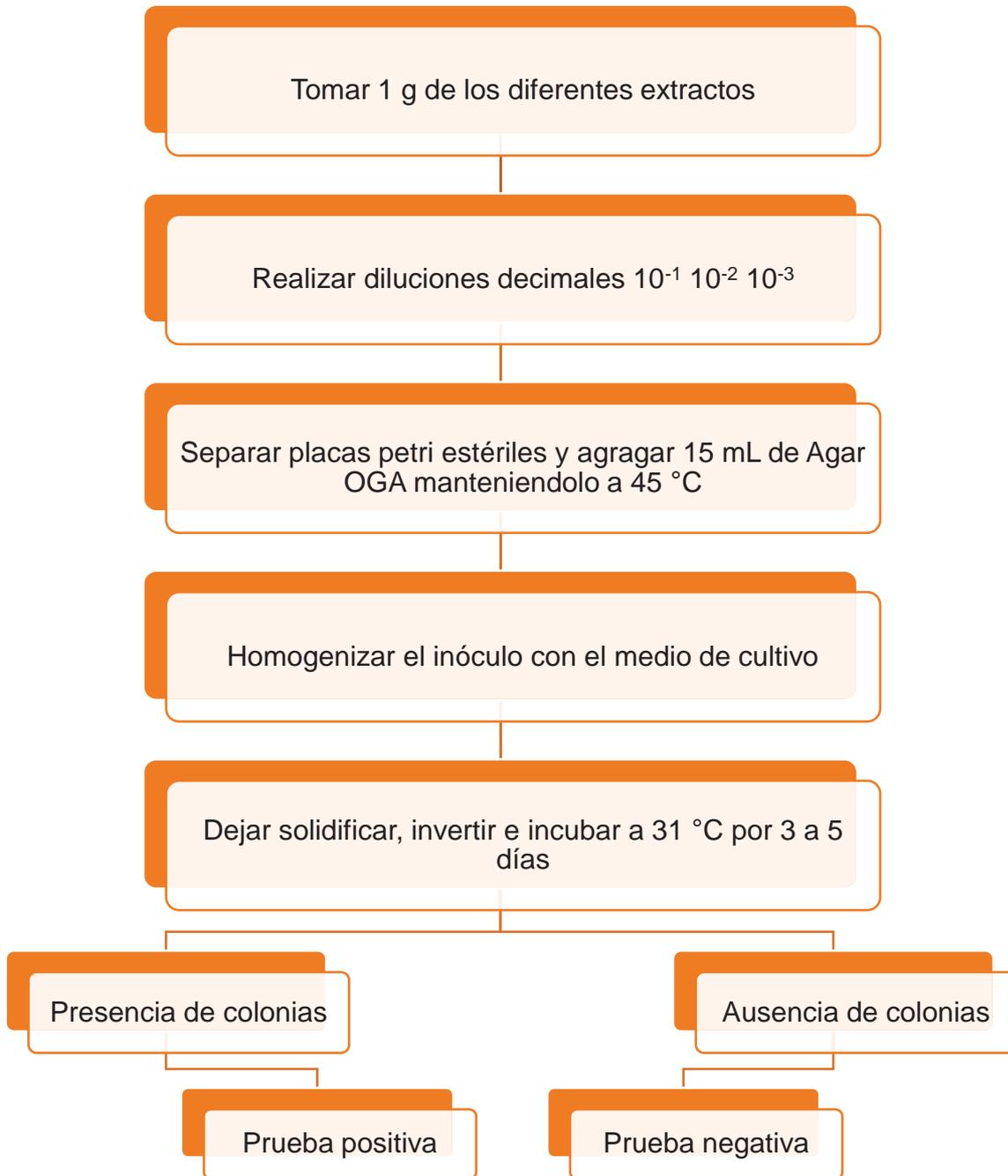


FUENTE: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N°6

CONTROL DE LA CALIDAD DE LOS EXTRACTOS CONCENTRADOS EN BASE AL CRITERIO DE ALERTA O LÍMITES CRITICOS

(HONGOS Y LEVADURAS)



FUENTE: Elaboración propia

3.6.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

A. Reactivación de las cepas ATCC

Las cepas ATCC fueron obtenidas de Microbiologics INC, para su reactivación se recomienda los siguientes Agares:

- Agar Trypticasa Soja,
- Agar Mueller Hinton.

Entonces para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218 se usó Agar Trypticasa Soja y para favorecer el desarrollo bacteriano el agar Mueller Hinton.⁴⁷

B. Conservación de las bacterias

Staphylococcus aureus ATCC 25923

La cepa bacteriana fue conservada en un tubo con tapa y con 4 mL de Agar Trypticasa Soja en pico de flauta debidamente rotulado y codificado e incubado a 37° C x 24 horas, para posteriormente ser conservado a 4°C en refrigerador y repicado en un medio nuevo cada 15 días para la conservación de la cepa.⁴⁷

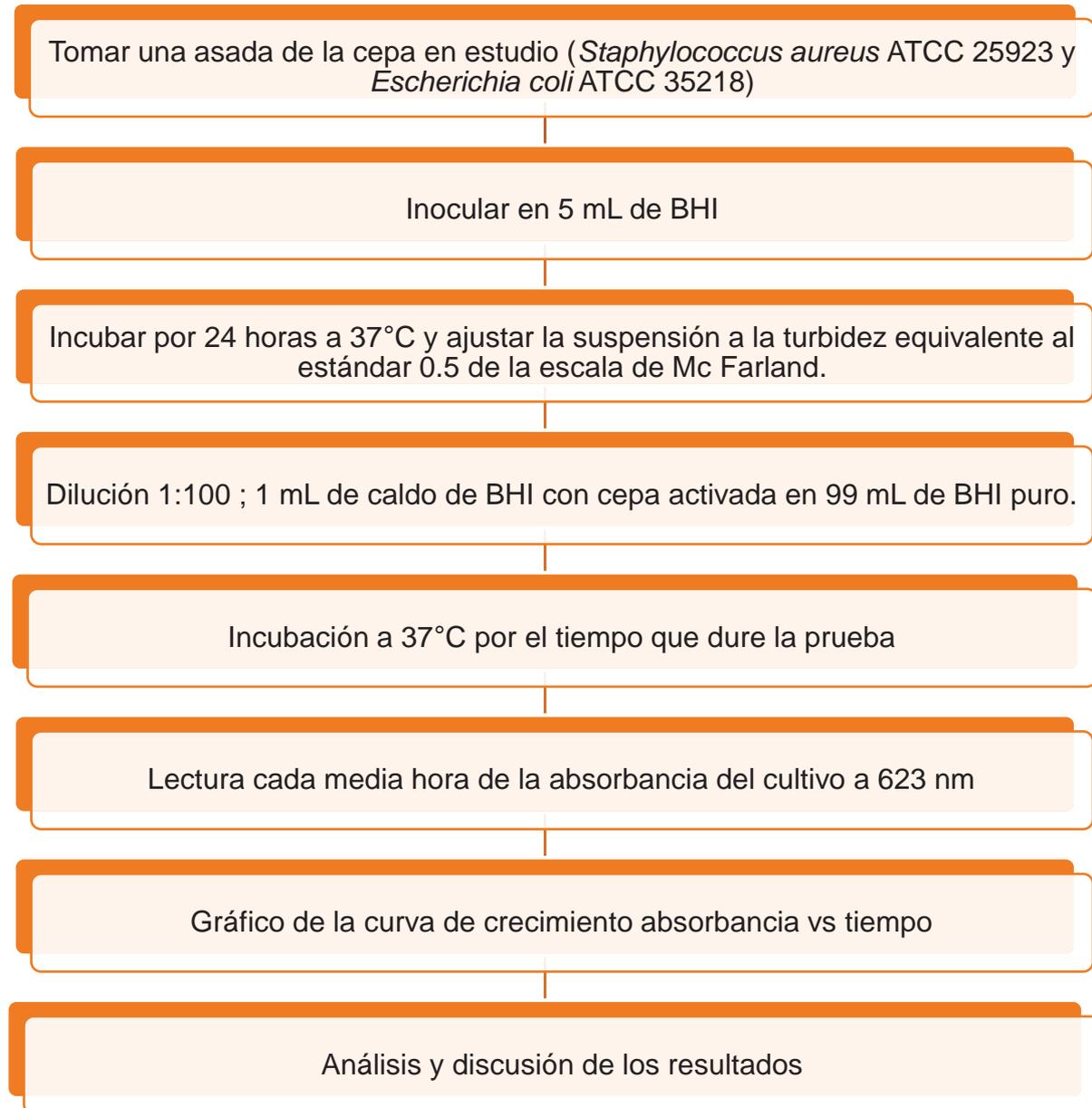
Escherichia coli ATCC 35218

La cepa bacteriana fue conservada en un tubo con tapa y con 4 mL de Agar Trypticasa soja en pico de flauta debidamente rotulado y codificado e incubado a 37° C x 24 horas, para posteriormente ser conservado a 4°C en refrigerador y repicado en un medio nuevo cada 15 días para la conservación de la cepa.⁴⁷

C. Estandarización de la curva de crecimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218

Se tomó una asada (2 a 3 colonias) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218 que se encontraban en estado de conservación en el Agar Trypticasa Soja, y se inoculó en 5 mL de caldo de cultivo BHI y luego 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 escala MC. Farland, inmediatamente después 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 incubaron 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 623 nm en el espectrofotómetro.⁴⁸

FLUJOGRAMA N°7: DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Y *Escherichia coli* ATCC 35218



FUENTE: Elaboración propia

D. Determinación de la Actividad Antibacteriana de los extractos etanólicos y clorofórmicos por el método de pozos excavados sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y sobre *Escherichia coli* ATCC 35218

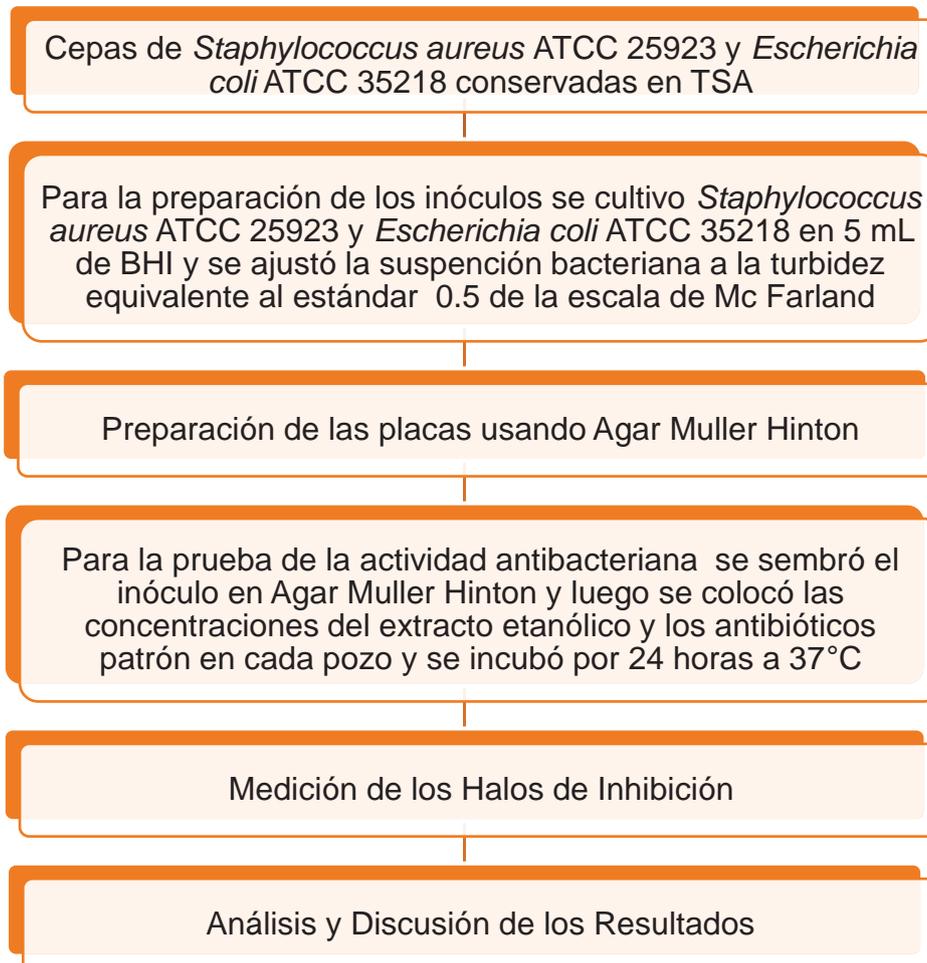
D.1 Preparación del inóculo

Se cultivaron las especies bacterianas en estudio en 5mL de caldo de BHI y se incubaron a temperatura de 37°C durante un periodo de 7 horas con la finalidad de realizar a partir de este el sembrado en las placas. Además se ajustó la suspensión bacteriana a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc Farland.²⁰

D.2 Preparación de las placas Petri y procedimiento

- Se prepararon las placas Petri que contengan agar Mueller Hinton con una cantidad de 20 mL aproximadamente.
- Luego se incubaron a 37 °C por 24 horas para el respectivo control de esterilidad, luego se realizaron tres pozos por placa con la ayuda de un tubo de Durham (diámetro 6mm).
- Se elaboraron los preparados de las concentraciones de los extractos etanólicos y clorofórmicos.
- Una vez obtenida la suspensión bacteriana se procedió a la siembra con la ayuda de un hisopo estéril, en las placas con agar Mueller Hinton ya preparadas.
- Luego usando la micropipeta se introdujeron los extractos ya preparados y se colocaron los discos de sensibilidad de los fármacos patrón, finalmente se incubó a 37°C por 24 horas luego de este tiempo se midieron los halos formados.²⁰

FLUJOGRAMA N°8: DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE POZOS EXCAVADOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”



FUENTE: Elaboración propia

E. Ensayo con el antibiótico patrón

De acuerdo a los protocolos de tratamiento, se considera a los aminoglucósidos como una de las opciones para tratar infecciones del tracto urinario producidas a nivel intrahospitalario, a las quinolonas que son de amplio espectro tanto Gram positivos como negativos y a las penicilinas se les considera específicas con Gram positivos por esa razón escogimos los diferentes fármacos patrón de acuerdo al cuadro de sensibilidad de las bacterias en estudio.

3.6.10 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA

3.6.10.1 DISEÑO METODOLÓGICO

Se utilizaron 12 ratas hembras las cuales fueron obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Salud, fueron divididas al azar en dos grupos de 6, recibieron la dosis única de los extractos etanólicos al 70 % de las especies vegetales *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, como se describe en el siguiente cuadro:

TABLA N° 10

DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS PARA LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL EN RATAS ALBINAS

GRUPO	N° DE ANIMALES	DOSIS DE EXTRACTO ETANÓLICO (2000 mg/kg)
A	1	1mL de agua destilada
	5	Extracto de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”
B	1	1mL de agua destilada
	5	Extracto de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”

FUENTE: Elaboración propia

LEYENDA:

- A: grupo de 6 ratas para *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”
- B: grupo de 6 ratas para *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”
- 1: Rata a la que se le administró 1mL de agua destilada.
- 5: Ratas a las que se les administró 2000 mg/kg de peso de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

Las ratas estuvieron en cuarentena durante cinco días antes de la investigación, fueron distribuidas, pesadas y separadas una en cada jaula un día antes a la experimentación. Las ratas fueron observadas por 14 días, en las primeras 24 horas se observaron la presencia de signos y síntomas, a partir de las 24 horas recibieron su alimentación y agua..

Después de los 14 días se procedió a la eutanasia de los animales para realizar el estudio histopatológico.

FLUJOGRAMA N° 9: TOXICIDAD POR EL MÉTODO DE SUBE Y BAJA (UDP)

Protocolo de toxicidad aguda por el método del sube y baja (UDP)- OCDE 425

Se utilizaron 6 ratas hembras

Las ratas estuvieron en cuarentena durante cinco días previo al estudio.

Los animales fueron pesados y distribuidos "uno a cada caja" un día antes de iniciar la administración.

El extracto se disolvió con agua destilada, en una proporción de 2 g/10ml.

Se suministró la dosis de 2000 mg/Kg de peso.

Después de la administración, se procedió hacer un seguimiento de 24 horas y observar a los animales. (Signos)

Se realizó un seguimiento por 14 días.

Al cabo de los 14 días se sacrificaron a los animales de experimentación y se observó algunos órganos como: estómagos, hígados y riñones en cada uno de los animales.

FUENTE: Toxicidad aguda de un extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* Cav. en el modelo de sube y baja en ratas- Revista Cubana Plant Med v.13 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2008.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962008000200006&script=sci_arttext&tlng=pt

3.6.10.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El estudio histopatológico de los estómagos, los hígados y riñones se realizó en el laboratorio de citología e histología del Hospital Regional del Cusco, donde se realizó la fijación de las muestras en parafina, se realizarán los cortes respectivos y la tinción con hematoxilina-eosina, para su observación microscópica.

3.6.10.2.1 PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

A) Fijación de los tejidos

El proceso de fijación se llevó a cabo una vez extendidos los estómagos, hígados y riñones, después se realizó la laparotomía, se utilizó formaldehído al 10%.

B) Procesamiento de tejidos: deshidratación, aclaramiento e infiltración

El procesamiento de los tejidos se realizó en el laboratorio de patología del hospital Regional del Cusco. La deshidratación se realizó con alcohol isopropílico y el aclaramiento se hizo con xileno.

C) Inclusión de tejidos

Para el proceso de inclusión de tejidos se utilizó parafina.

D) Microtomía

Se utilizó el micrótopo rotatorio, con el cual se realizó un corte de 6 a 10 micrones.

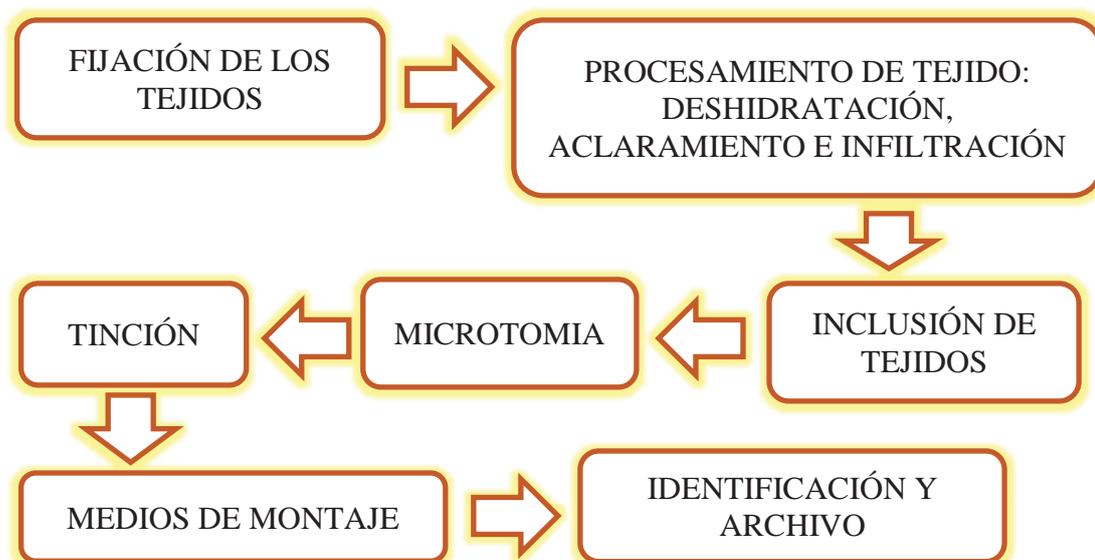
E) Tinción

La tinción fue realizada en combinación de colorantes (hematoxilina y eosina).

F) Medios de montaje

Es el paso final del procedimiento, que consistió en colocar la lámina cubreobjetos sobre la lámina portaobjetos que contiene el tejido.

FLUJOGRAMA N° 10
PROCEDIMIENTO SECUENCIAL DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO



FUENTE: Elaboración propia

3.7 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

En el presente trabajo de investigación se realizó la recolección de datos utilizando la técnica de observación experimental mediante instrumentos como la cámara fotográfica (se utilizó durante el proceso de investigación) y las siguientes fichas de recolección de datos:

- | | |
|--|------------|
| ✓ Para la determinación del porcentaje de humedad. | Anexo N°10 |
| ✓ Para la determinación del porcentaje de extracción. | Anexo N°11 |
| ✓ Para las pruebas de solubilidad. | Anexo N°12 |
| ✓ Para el análisis fitoquímico cualitativo. | Anexo N°13 |
| ✓ Para el análisis histopatológico. | Anexo N°14 |
| ✓ Para la estandarización de la concentración antibacteriana. | Anexo N°15 |
| ✓ Para la medición de los halos de inhibición de los extractos Etanólicos y Clorofórmicos. | Anexo N°16 |
| ✓ Para la observación de los signos y síntomas | Anexo N°17 |

3.8 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para el análisis de los datos que se obtuvieron en la determinación de la actividad antibacteriana de las especies vegetales *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se utilizó el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 22. Para el procesamiento de variables cuantitativas se realizará mediante el análisis de la varianza ANOVA y la prueba post hoc de Scheffé con el 95 % de confianza y la prueba de T-Student.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

Dónde:

%H = Porcentaje de humedad

M1 = Peso de la muestra fresca

M2 = Peso de la muestra seca

TABLA N° 11
PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

<i>Oenothera rosea</i> Aiton “YAWAR CHONQ’A”				
N° DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1	5.048 g	1.096 g	78.28 %	78.34 %
2	5.016 g	1.097 g	78.12 %	
3	5.005 g	1.069 g	78.64 %	
<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “OJOTILLO”				
N° DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1	10.050 g	4.605 g	54.40 %	54.74 %
2	10.080 g	4.495 g	55.40 %	
3	10.031 g	4.570 g	54.44 %	

FUENTE: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

El porcentaje de humedad de las especies vegetales: *Oenothera rosea* Aiton es 78.34 % y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles es 54.74 %, valores que reflejan un alto contenido de agua en las especies vegetales de estudio.

Como dice **Stubsgaard, F., 1997**⁵³, 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 los 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.

Según **Muena et al., 2010⁵²** en su estudio Efectos del Encalado y la Fertilización Nitrogenada sobre el desarrollo de *Oenothera affinis* presentó un 70 %. El cual es menor al porcentaje de humedad obtenido en nuestra planta de 78.34 %, que podría ser un valor que puede determinar ciertas diferencias entre la especie por ubicación geográfica.

4.2 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

El porcentaje de extracción se calculó mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ Extracción} = \text{PF/PI} \times 100$$

Dónde:

PI: Peso inicial (muestra molida)

PF: Peso final (extracto seco)

TABLA N° 12
PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LAS HOJAS Y EL TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN		PESO DE LA MUESTRA MOLIDA	PESO DEL EXTRACTO SECO	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN
<i>Oenothera rosea</i> Aiton “YAWAR CHONQ’A”	EXTRACTO ETANÓLICO	300 g	38.8 g	12.93 %
	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	150 g	2.41 g	1.60 %
<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “OJOTILLO”	EXTRACTO ETANÓLICO	300 g	72.5 g	24.16 %
	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	150 g	1.2 g	0.80 %

FUENTE: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Los resultados de la Tabla N° 12 nos permitieron determinar la cantidad necesaria de muestra vegetal para la realización del trabajo de investigación.

El porcentaje de extracción obtenido por maceración con **etanol al 70 %** de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” fue de 12.93 % y el porcentaje de extracción obtenido por maceración con etanol al 70 % de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” fue de 24.16 %. Con lo cual concluimos que

Geranium sessiliflorum Cavanilles “Ojotillo” presenta un mayor porcentaje de rendimiento en comparación a *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”.

El porcentaje de extracción obtenido por maceración con **cloroformo** de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” fue de 1.6 % y el porcentaje de extracción con cloroformo de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” fue de 0.8 %, porcentajes bajos para la obtención de la muestra en estudio, los cuales son comparables con otros trabajos donde obtuvieron un porcentaje de rendimiento del 4 % con este tipo de solvente (Ccori y Vilcahuaman, 2009).²²

4.3 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para la determinación de las pruebas de solubilidad los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se utilizaron diferentes solventes de diferente polaridad obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N° 13
RESULTADOS DE LA SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

SOLVENTE	<i>Oenothera rosea</i> Aiton “YAWAR CHONQ’A”		<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “OJOTILLO”	
	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO
Agua destilada	++	-	+++	-
Solución salina	+	-	+++	-
Metanol	+	++	+++	+
Etanol del 40%	++	-	++	+
Etanol del 70%	+++	+	+++	+
Etanol del 96%	+	+	+	+
Acetona	-	+++	+	++
Acetato de etilo	-	++	-	++
Cloroformo	-	+++	-	+++
Hexano	-	++	-	++

FUENTE: Datos Experimentales del Estudio

Dónde:

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

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 13 se muestra la solubilidad de los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, en diferentes solventes, empezando del solvente más polar al menos polar.

Se observó que el **extracto etanólico al 70 %** de *Oenothera rosea* Aiton “**Yawar Chonq’a**” es muy soluble en un solvente polar etanol al 70 %, soluble en agua destilada y etanol al 40 %, poco soluble en solución salina y etanol al 96 % e insoluble en acetona, acetato de etilo, cloroformo y hexano; los cuales coinciden con los estudios sobre *Oenothera rosea* Aiton (**Gonzales et al, 2001**).⁹

Se observa que el **extracto etanólico al 70 %** de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “**Ojotillo**” es muy soluble en agua destilada, solución salina, metanol y etanol al 70 %; soluble en etanol al 40 %, poco soluble en etanol al 96% y acetona e insoluble en acetato de etilo, cloroformo y hexano. De acuerdo a otros estudios realizados estos datos coinciden con los nuestros (**Ccori y Vilcahuaman, 2009**).²²

Se observó que el **extracto clorofórmico** de *Oenothera rosea* Aiton “**Yawar Chonq’a**” es muy soluble en acetona y cloroformo, soluble en metanol, acetato de etilo y hexano; poco soluble en etanol de 70 % y 96 %, insoluble en agua destilada, solución salina y etanol al 40 %, lo que demuestra que en el extracto se encuentran metabolitos de naturaleza apolar. Los cuales coinciden con otros estudios realizados sobre extracción clorofórmica a diferencia del hexano que resultó ser insoluble en dicha investigación. (**Castro, 2011**).¹⁸

Se observó que el **extracto clorofórmico** de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “**Ojotillo**” es muy soluble en clorofórmico, soluble en acetona, acetato de etilo y hexano; poco soluble en metanol, etanol de 40 %, 70 % y 96 %, e insoluble en agua destilada y solución salina, lo que demuestra que en el extracto se encuentran metabolitos de naturaleza apolar.

4.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y clorofórmico de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y las raíces de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” en los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA N° 14
ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	<i>Oenothera rosea</i> Aiton “YAWAR CHONQ’A”		<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “OJOTILLO”	
		EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO
Alcaloides	Dragendorf, Wagner	-	-	-	-
Lactonas	Hidroxamato férrico	+++	+	+++	+++
Quinonas	Bontranger	++	-	+++	++
Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico 1%	+++	-	+++	-
Flavonoides	Shinoda	+++	-	++	-
Taninos	Gelatina	+++	+	+++	+++
Saponinas	Prueba de espuma	++	-	++	-
Glicósidos	Molish	++	-	+++	-
Esteroides	Lieberman-Burchart	-	-	-	-

FUENTE: Datos Experimentales del Estudio

Dónde:

Abundante cantidad	+++
Regular cantidad	++
Poca cantidad	+
Ausencia	-

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 14 se puede observar que:

El **extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”**, tiene abundante cantidad de flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y lactonas; presenta en regular cantidad saponinas, glicósidos y quinonas; ausencia de alcaloides y núcleos esteroideos. Según **Gonzales et al., 2010**⁹ En su estudio fitoquímico comparativo entre *Oenothera rosea* Aiton y *Oenothera multicaulis* determino que los componentes mayoritario en estas especies son los flavonoides y los compuestos fenólicos en los que respecta no son parecidos en ambas especies, y solo se observó alcaloides O. multicaulis. **Fuertes et al, 2011**⁸ identificó en el análisis fitoquímico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton taninos, flavonoides, quinonas, alcaloides y saponinas. Estos hallazgos coinciden con los datos obtenidos en nuestro estudio.

El **extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”**, presenta abundante cantidad de lactonas, quinonas, compuestos fenólicos, taninos y glicósidos; regular cantidad de flavonoides; poca cantidad de saponinas y ausencia de alcaloides y núcleos esteroideos. Estos resultados nos permitieron conocer

preliminarmente la presencia de los metabolitos secundarios que presenta la especie en estudio. Según **Cabrera, J.L., 2014**⁵⁴ Determino que los componentes mayoritarios en *Geranium lechleri* son los alcaloides, compuestos fenólicos y esteroides. Lo cual es comparable con nuestro estudio por que también se encontraron en abundante cantidad los compuestos fenólicos.

El **extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”** presenta poca cantidad de lactonas y taninos; ausencia de alcaloides, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, glicósidos y núcleos esteroideos en comparación.

El **extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”** presenta abundante cantidad de lactonas y taninos; regular cantidad de quinonas y ausencia de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, glicósidos, saponinas y núcleos esteroideos. De acuerdo a otros estudios realizados los resultados obtenidos demuestran similitud.

Según la guía de Ingeniería Agroforestal.⁵⁵ en cuanto a la acción farmacológica de los metabolitos encontrados en la tabla N°14 se tiene:

- **Lactonas:** presentan actividad antibacteriana, antifúngica y algunas producen dermatitis en la piel ya que producen alérgenos.
- **Quinonas:** presentan actividad antibacteriana, fungicida y también se le atribuye el efecto laxante, son empleados en cosmética como colorante natural.
- **Compuestos fenólicos:** presentan diferentes actividades farmacológicas como: antibacteriana, analgésica, antipirética y antiinflamatoria.
- **Flavonoides:** presentan una amplia actividad farmacológica se han descrito efectos protectores en diversas condiciones patológicas, como la hipotensión cardiovascular, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, aterosclerosis y el cáncer, recientemente sus efectos benéficos se han asociado como una alternativa en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y el Parkinson.
- **Taninos:** presentan propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Al ser astringentes tienen también un poder antidiarreico y vasoconstrictor ya que se unen y precipitan las proteínas existentes en las mucosas y también tienen la propiedad de ser antidotos para alcaloides y metales pesados.
- **Saponinas:** son excelentes agentes emulsionantes y algunas de ellas se utilizan como detergente, tienen acción hemolítica sobre glóbulos rojos al ser inyectados directamente en sangre.
- **Glicósidos:** su acción farmacológica a nivel del sistema cardiovascular son cardiotónicos, a nivel del aparato digestivo son purgantes.

4.5 DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

TABLA N° 15
RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

CRITERIOS	BACTERIAS Y HONGOS	EXTRACTOS	RESULTADOS
CRITERIO IMPERATIVO: La presencia de este microorganismo indica riesgo elevado, la prueba debe resultar negativa	<i>Salmonella</i>	Etanólico de Yawar Chonq’a	Negativo
		Etanólico de Ojotillo	Negativo
CRITERIOS INDICATIVOS DE HIGIENE: Su presencia indica la deficiencia de higiene del producto y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformes fecales (<i>Escherichia coli</i>)	Etanólico de Yawar Chonq’a	Negativo
		Etanólico de Ojotillo	Negativo
CRITERIOS DE ALERTA O LIMITES CRÍTICOS: El producto no debe de exceder los límites específicos	Aerobios mesofilos, hongos y levaduras	Etanólico de Yawar Chonq’a	Negativo
		Etanólico de Ojotillo	Negativo

FUENTE: Datos experimentales propios

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el tabla N° 15 se observan los resultados del control microbiológico que se realizó a los extractos etanólicos 70 % y clorofórmicos de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”. Los resultados indican que los extractos están libres de contaminación (salmonella, coliformes fecales, mesofilos 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 antibacteriana in vitro y la evaluación de la toxicidad aguda vía oral.⁴⁶

TABLA N° 16
RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS
CLOROFÓRMICOS DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR
CHONQ’A” Y DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

CRITERIOS	BACTERIAS Y HONGOS	EXTRACTOS	RESULTADOS
CRITERIO IMPERATIVO: La presencia de este microorganismo indica riesgo elevado, la prueba debe resultar negativa	<i>Salmonella</i>	Clorofórmico de Yawar Chonq’a	Negativo
		Clorofórmico de Ojotillo	Negativo
CRITERIOS INDICATIVOS DE HIGIENE: Su presencia indica la deficiencia de higiene del producto y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformes fecales (<i>Escherichia coli</i>)	Clorofórmico de Yawar Chonq’a	Negativo
		Clorofórmico de Ojotillo	Negativo
CRITERIOS DE ALERTA O LIMITES CRÍTICOS: El producto no debe de exceder los límites específicos	Aerobios mesofilos, hongos y levaduras	Clorofórmico de Yawar Chonq’a	Negativo
		Clorofórmico de Ojotillo	Negativo

FUENTE: Datos experimentales propios

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el tabla N° 16 se observan los resultados del control microbiológico que se realizó a los extractos clorofórmicos de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”. Los resultados obtenidos nos indican que los extractos están libres de contaminación (salmonella, coliformes fecales, mesofilos 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 antibacteriana in vitro.⁴⁶

4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

4.6.1 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

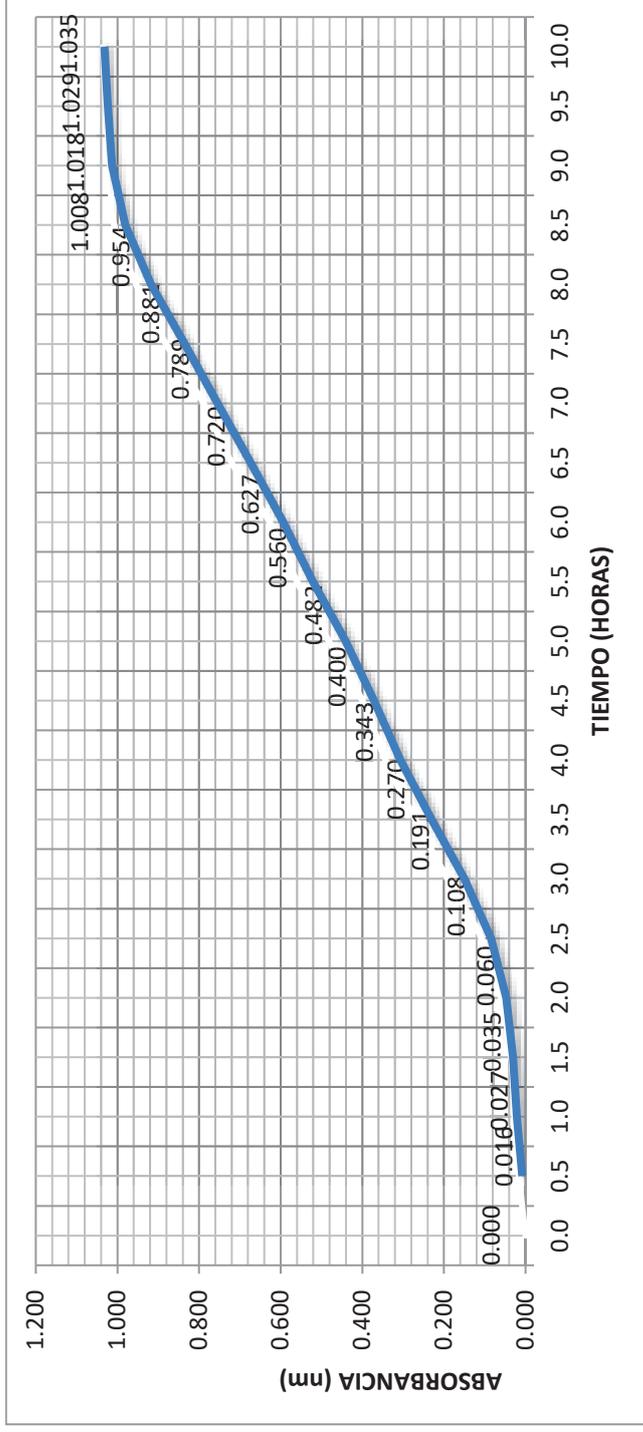
TABLA N° 17
ABSORBANCIAS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

TIEMPO (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: Elaboración propia a partir de los datos experimentales

(*) = Promedio de dos medidas de absorbancias

GRÁFICO N° 1: CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



FUENTE: Elaboración propia a partir de datos experimentales

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el gráfico N° 1 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 de 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, en 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.**³⁴

4.6.2 DEL ENSAYO DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

4.6.2.1 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC 25923.

TABLA N° 18
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TUBOS N°	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (mg/50uL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.015	+	Crecimiento bacteriano
2	0.020	+	Crecimiento bacteriano
3	0.025	+	Crecimiento bacteriano
4	0.030	+/-	Crecimiento bacteriano
5	0.035	+/-	Crecimiento bacteriano
6	0.050	-	Ausencia
7	0.100	-	Ausencia
8	0.150	-	Ausencia
9	0.200	-	Ausencia
10	0.250	-	Ausencia
11	0.300	-	Ausencia
12	0.350	-	Ausencia
13	0.400	-	Ausencia
14	0.450	-	Ausencia
15	0.500	-	Ausencia
16	0.600	-	Ausencia
17	0.700	-	Ausencia
18	0.800	-	Ausencia
19	0.900	-	Ausencia

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Muy turbio
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Se utilizó la siguiente fórmula para la determinación de los volúmenes de las concentraciones establecidas a partir de 100mg/1000uL.

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Dónde:

- N_1 = concentración 1
- V_1 = volumen 1
- N_2 = concentración 2
- V_2 = volumen 2

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 18 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en los tubos del 1 al 3 (relacionado al crecimiento bacteriano), en los tubos 4 y 5 no es muy claro. Hay traslucidez desde el tubo 6 hasta el 19 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 6 ó 7.

Con los datos de esta prueba piloto se puede realizar una nueva prueba y encontrar el valor de la CMI.

Observando la turbidez de manera visual, no podemos determinar exactamente si existe crecimiento bacteriano o no; para poder determinar exactamente esto, se procedió al resembrado de los resultados obtenidos en los tubos, en placas Petri con Agar Muller Hinton. La siembra se incubó a 37 °C por 24 horas, luego se observa y evalúa el crecimiento bacteriano o la ausencia de este. Observándose crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los tubos del 1 al 3, habiendo ausencia de crecimiento a partir del tubo 6 al 19 a la concentración de 0.050 mg/50uL del extracto etanólico al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a". Los controles sin cepa no presentaron crecimiento bacteriano. (Ver fotografía N° 13)

4.6.2.1.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TABLA N° 19
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.030	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.040	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.050	7.28	7.43	7.15	7.29
7	0.100	7.57	7.88	8.24	7.90
8	0.150	9.09	9.34	9.31	9.25
9	0.200	9.09	9.46	9.64	9.40
10	0.250	10.76	10.64	11.03	10.81
11	0.500	11.90	11.51	11.41	11.61
12	0.750	11.97	12.09	12.06	12.04
13	1.000	12.58	13.01	12.77	12.79
14	1.500	13.66	13.38	13.91	13.65
15	2.500	14.45	14.09	14.78	14.44
16	5.000	16.34	16.80	17.26	16.80
17	7.500	18.11	17.81	18.21	18.04
18	10.000	18.42	18.45	18.77	18.55
19	12.500	18.53	18.73	18.45	18.57
20	15.000	19.89	18.91	18.88	19.23
21	20.000	20.96	20.75	21.15	20.95
22	25.000	20.94	20.20	20.83	20.66
23	30.000	19.70	19.81	19.97	19.83
24	40.000	20.12	20.14	20.55	20.27
25	50.000	20.63	20.92	21.08	20.88

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- IG:** Primer grupo de halos
- IIG:** Segundo grupo de halos
- IIIG:** Tercer grupo de halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 19 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de la prueba piloto del extracto etanólico al 70 % de *Oenothera rosea* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Podemos observar que el extracto etanólico presenta un halo mínimo de inhibición de 7.29 mm (resaltado de color verde) en promedio a una concentración de 0.05 mg/50uL, a menores concentraciones no se logró obtener halos de inhibición, como se puede observar en el esquema, la lectura de los halos de inhibición son valores de 0.00 mm como se puede evidenciar.

El halo máximo promedio que se obtuvo fue de 20.95 mm (resaltado de color amarillo) en promedio a una concentración de 20 mg/50uL., a concentraciones mayores los halos de inhibición son menores lo cual indica que el extracto empieza a sobresaturarse y va perdiendo la actividad frente a la cepa. De esta manera se evidencia que el extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” posee actividad antibacteriana in vitro sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA PILOTO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TABLA N° 20
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A”

CONCENTRACIONES PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO (mg/50uL)	N°	MEDIA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA AL 95%		MÍNIMO	MÁXIMO
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR		
0.025	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.030	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.035	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.040	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.045	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.050	3	7,29	0,14	0,08	6,94	7,63	7,15	7,43
0.100	3	7,90	0,34	0,19	7,06	8,73	7,57	8,24
0.150	3	9,25	0,14	0,08	8,91	9,59	9,09	9,34
0.200	3	9,40	0,28	0,16	8,70	10,09	9,09	9,64
0.250	3	10,81	0,20	0,12	10,31	11,31	10,64	11,03
0.500	3	11,61	0,26	0,15	10,96	12,25	11,41	11,90
0.750	3	12,04	0,06	0,04	11,88	12,20	11,97	12,09
1.000	3	12,79	0,22	0,12	12,25	13,32	12,58	13,01
1.500	3	13,65	0,27	0,15	12,99	14,31	13,38	13,91
2.500	3	14,44	0,35	0,20	13,58	15,30	14,09	14,78
5.000	3	16,80	0,46	0,27	15,66	17,94	16,34	17,26
7.500	3	18,04	0,21	0,12	17,53	18,56	17,81	18,21
10.000	3	18,55	0,19	0,11	18,06	19,03	18,42	18,77
12.500	3	18,57	0,14	0,08	18,21	18,93	18,45	18,73
15.000	3	19,23	0,57	0,33	17,80	20,65	18,88	19,89
20.000	3	20,95	0,20	0,12	20,46	21,45	20,75	21,15
TOTAL	63	10,54	7,02	0,88	8,77	12,31	0,00	21,15

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 20 se observan los resultados descriptivos de la prueba piloto de la evaluación del extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Donde se interpreta que las desviaciones estándar son aceptables y establecen que existe precisión en cuanto a las medidas de los halos de una misma concentración.

4.6.2.2 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC 25923.

**TABLA N° 21
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100 mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.015	+	Crecimiento bacteriano
2	0.020	+	Crecimiento bacteriano
3	0.025	+	Crecimiento bacteriano
4	0.030	+	Crecimiento bacteriano
5	0.035	+	Crecimiento bacteriano
6	0.050	+	Crecimiento bacteriano
7	0.100	+	Crecimiento bacteriano
8	0.150	+	Crecimiento bacteriano
9	0.200	+	Crecimiento bacteriano
10	0.250	+	Crecimiento bacteriano
11	0.300	+	Crecimiento bacteriano
12	0.350	+	Crecimiento bacteriano
13	0.400	+	Crecimiento bacteriano
14	0.450	+	Crecimiento bacteriano
15	0.500	+	Crecimiento bacteriano
16	0.600	+	Crecimiento bacteriano
17	0.700	+	Crecimiento bacteriano
18	0.800	+	Crecimiento bacteriano
19	0.900	+	Crecimiento bacteriano

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Muy turbio
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Como se muestra en la tabla N° 21 se evidencia turbidez en todos los tubos corroborándose con el sembrado en placas de Mueller Hinton en los cuales se obtuvo crecimiento bacteriano positivo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por lo cual se concluye que el extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton no presenta actividad antibacteriana.

4.6.2.2.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**TABLA N° 22
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.030	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.040	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.050	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.100	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.150	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.200	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.250	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.500	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.750	0.00	0.00	0.00	0.00
13	1.000	0.00	0.00	0.00	0.00
14	1.500	0.00	0.00	0.00	0.00
15	2.500	0.00	0.00	0.00	0.00
16	5.000	0.00	0.00	0.00	0.00
17	7.500	0.00	0.00	0.00	0.00
18	10.000	0.00	0.00	0.00	0.00
19	12.500	0.00	0.00	0.00	0.00
20	15.000	0.00	0.00	0.00	0.00
21	20.000	0.00	0.00	0.00	0.00
22	25.000	0.00	0.00	0.00	0.00
23	30.000	0.00	0.00	0.00	0.00
24	40.000	0.00	0.00	0.00	0.00
25	50.000	0.00	0.00	0.00	0.00

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- IG:** Primer grupo de halos
- IIG:** Segundo grupo de halos
- IIIG:** Tercer grupo de halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 22 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto de la evaluación del extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En el cual podemos observar que el extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” no presenta actividad antibacteriana, no formo en ninguna concentración halo de inhibición como se puede evidenciar, podría deberse a que el extracto clorofórmico en la marcha fitoquímica no presentó metabolitos polares (flavonoides y compuestos fenólicos).

4.6.2.3 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

TABLA N° 23
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A UN VOLUMEN ESTABDAR DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.010	+	Crecimiento bacteriano
2	0.015	+	Crecimiento bacteriano
3	0.020	+	Crecimiento bacteriano
4	0.025	+	Crecimiento bacteriano
5	0.030	+/-	Crecimiento bacteriano
6	0.050	+/-	Crecimiento bacteriano
7	0.150	-	Ausencia
8	0.200	-	Ausencia
9	0.250	-	Ausencia
10	0.300	-	Ausencia
11	0.350	-	Ausencia
12	0.400	-	Ausencia
13	0.450	-	Ausencia
14	0.500	-	Ausencia
15	0.600	-	Ausencia
16	0.700	-	Ausencia
17	0.800	-	Ausencia
N18	0.900	-	Ausencia
19	1.000	-	Ausencia
20	1.500	-	Ausencia

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Muy turbio
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Se utilizó la siguiente fórmula para la determinación de los volúmenes de las concentraciones establecidas a partir de 100mg/1000uL.

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Dónde:

- N_1 = concentración 1
- V_1 = volumen 1
- N_2 = concentración 2
- V_2 = volumen 2

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 18 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en los tubos del 1 al 4 (relacionado al crecimiento bacteriano), en los tubos 5 y 6 no es muy claro. Hay traslucidez desde el tubo 7 hasta el 20 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 7 ó 8.

Con los datos de esta prueba piloto se puede realizar una nueva prueba y encontrar el valor de la CMI.

Observando la turbidez de manera visual, no podemos determinar exactamente si existe crecimiento bacteriano o no; para poder determinar exactamente esto, se procedió al resembrado de los resultados obtenidos en los tubos, en placas Petri con Agar Muller Hinton. La siembra se incubó a 37 °C por 24 horas, luego se observa y evalúa el crecimiento bacteriano o la ausencia de este. Observándose crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los tubos del 1 al 6, habiendo ausencia de crecimiento a partir del tubo 7 al 20 a la concentración de 0.150 mg/50uL del extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo". Los controles sin cepa no presentaron crecimiento bacteriano. (Ver fotografía N° 14)

4.6.2.3.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE LA RAIZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TABLA N° 24
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.010	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.015	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.020	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.050	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.150	7.36	7.36	7.59	7.44
10	0.250	11.20	10.38	10.55	10.71
11	0.500	13.78	13.69	13.33	13.60
12	0.750	14.70	14.44	15.68	14.94
13	1.000	17.55	18.46	17.92	17.98
14	1.500	17.86	18.33	18.72	18.30
15	2.500	20.40	20.06	19.99	20.15
16	5.000	23.05	23.76	23.45	23.42
17	7.500	23.83	24.76	23.48	24.02
18	10.000	24.75	24.68	25.20	24.88
19	12.500	25.54	24.86	25.38	25.26
20	15.000	25.60	25.71	25.55	25.62
21	20.000	26.14	24.43	26.97	25.85
22	25.000	25.76	25.43	26.61	25.93
23	30.000	26.76	26.10	25.70	26.19
24	40.000	28.63	26.86	26.00	27.16
25	50.000	25.09	25.09	25.43	25.20

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- 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° 24 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” obtenidos de la prueba piloto de la evaluación del extracto etanólico frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En el cual podemos observar que el extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles presenta un halo mínimo de inhibición de 7.44 mm (resaltado de color naranja) en promedio a una concentración de 0.15 mg/50uL, a menores concentraciones no se logró obtener halos de inhibición, como se puede observar en el esquema, las demás concentraciones los halos de inhibición son valores de 0.00 como se puede observar.

El halo máximo promedio que se obtuvo fue de 27.16 mm (resaltado de color amarillo) a una concentración de 40 mg/50uL, a concentraciones mayores los halos de inhibición son menores lo cual indica que el extracto empieza a perder actividad frente a la cepa debido a una sobresaturación del extracto.

De esta manera se evidencia que el extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” posee actividad antibacteriana in vitro sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA PILOTO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TABLA N° 25
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

CONCENTRACIONES PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO (mg/50uL)	N°	MEDIA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA AL 95%		MÍNIMO	MÁXIMO
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR		
0.005	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.010	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.015	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.020	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.025	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.035	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.045	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.050	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.150	3	7,44	0,13	0,08	7,11	7,77	7,36	7,59
0.250	3	10,71	0,43	0,25	9,63	11,79	10,38	11,20
0.500	3	13,60	0,24	0,14	13,01	14,19	13,33	13,78
0.750	3	14,94	0,65	0,38	13,32	16,56	14,44	15,68
1.000	3	17,98	0,46	0,26	16,84	19,11	17,55	18,46
1.500	3	18,30	0,43	0,25	17,23	19,37	17,86	18,72
2.500	3	20,15	0,22	0,13	19,61	20,69	19,99	20,40
5.000	3	23,42	0,36	0,21	22,54	24,30	23,05	23,76
7.500	3	24,02	0,66	0,38	22,38	25,67	23,48	24,76
10.000	3	24,88	0,28	0,16	24,18	25,58	24,68	25,20
12.500	3	25,26	0,36	0,21	24,38	26,14	24,86	25,54
15.000	3	25,62	0,08	0,05	25,42	25,82	25,55	25,71
20.000	3	25,85	1,30	0,75	22,63	29,06	24,43	26,97
25.000	3	25,93	0,61	0,35	24,42	27,45	25,43	26,61
30.000	3	26,19	0,54	0,31	24,86	27,52	25,70	26,76
40.000	3	27,16	1,34	0,77	23,83	30,49	26,00	28,63
TOTAL	72	13,81	11,02	1,30	11,22	16,40	0,00	28,63

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N° 25 se observan los resultados descriptivos de la prueba piloto de la evaluación del extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Donde se interpreta que las desviaciones estándar son aceptables y establecen que existe precisión en cuanto a las medidas de los halos de una misma concentración.

4.6.2.4 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TABLA N° 26
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100MG/ML)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.010	+	Crecimiento bacteriano
2	0.015	+	Crecimiento bacteriano
3	0.020	+	Crecimiento bacteriano
4	0.025	+	Crecimiento bacteriano
5	0.030	+	Crecimiento bacteriano
6	0.050	+	Crecimiento bacteriano
7	0.150	+	Crecimiento bacteriano
8	0.200	+	Crecimiento bacteriano
9	0.250	+	Crecimiento bacteriano
10	0.300	+	Crecimiento bacteriano
11	0.350	+	Crecimiento bacteriano
12	0.400	+	Crecimiento bacteriano
13	0.450	+	Crecimiento bacteriano
14	0.500	+	Crecimiento bacteriano
15	0.600	+	Crecimiento bacteriano
16	0.700	+	Crecimiento bacteriano
17	0.800	+	Crecimiento bacteriano
18	0.900	+	Crecimiento bacteriano
19	1.000	+	Crecimiento bacteriano
20	1.500	+	Crecimiento bacteriano

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Muy turbio
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Como se muestra en la tabla N° 26 se evidencia turbidez en todos los tubos corroborándose con el sembrado en placas de Mueller Hinton en los cuales se obtuvo crecimiento bacteriano positivo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por lo cual se concluye que el extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles no presenta actividad antibacteriana.

4.6.2.4.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TABLA N° 27
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.010	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.015	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.020	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.050	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.150	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.250	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.500	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.750	0.00	0.00	0.00	0.00
13	1.000	0.00	0.00	0.00	0.00
14	1.500	0.00	0.00	0.00	0.00
15	2.500	0.00	0.00	0.00	0.00
16	5.000	0.00	0.00	0.00	0.00
17	7.500	0.00	0.00	0.00	0.00
18	10.000	0.00	0.00	0.00	0.00
19	12.500	0.00	0.00	0.00	0.00
20	15.000	0.00	0.00	0.00	0.00
21	20.000	0.00	0.00	0.00	0.00
22	25.000	0.00	0.00	0.00	0.00
23	30.000	0.00	0.00	0.00	0.00
24	40.000	0.00	0.00	0.00	0.00
25	50.000	0.00	0.00	0.00	0.00

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

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° 27 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto de la evaluación del extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En el cual podemos observar que el extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" no presenta actividad antibacteriana, no formo halo de inhibición a ninguna concentración como se puede evidenciar. , podría deberse a que el extracto clorofórmico en la marcha fitoquímica no presentó metabolitos polares (flavonoides y compuestos fenólicos).

4.6.3 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

4.6.3.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

TABLA N° 28
HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.050	7.28	7.43	7.15	7.29
2	0.100	7.57	7.88	8.24	7.90
3	0.150	9.09	9.34	9.31	9.25
4	0.200	9.09	9.46	9.64	9.40
5	0.250	9.54	10.04	9.84	9.81
6	0.300	10.64	10.18	10.26	10.36
7	0.350	11.88	11.95	11.78	11.87
8	0.400	11.77	12.01	12.09	11.96
9	0.450	12.15	11.76	12.16	12.02
11	0.500	11.81	12.06	12.57	12.15
11	1.000	12.66	12.79	12.95	12.80
12	1.500	13.28	13.37	12.48	13.04
13	2.000	13.42	13.05	13.26	13.24
14	2.500	13.95	14.04	13.70	13.90
15	5.000	17.16	16.36	16.26	16.59
16	10.000	18.49	18.09	18.34	18.31
17	15.000	18.96	18.25	17.79	18.33
18	20.000	21.78	21.24	20.50	21.17
25	Oxacilina 1 ug	30.67	28.8	31.17	30.21
26	Clindamicina 2ug	21.77	24.52	25.65	23.98

FUENTE: Ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición

LEYENDA:

- 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° 28 se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con las concentraciones estandarizadas de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

De acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS), 2000 los diámetros críticos para *Staphylococcus aureus* son:

TABLA N° 29
HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Staphylococcus aureus*

FARMACO	CONCENTRACIÓN	Zona de Diámetro de Interpretación Crítica (mm)		
		SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Clindamicina	2 ug	≥ 21	15-20	≤14
Oxacilina	1 ug	≥ 22	15-21	≤14

La tabla N° 29 nos muestra los halos de inhibición para discos de sensibilidad de Clindamicina 2 ug y oxacilina 1 ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). Estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana, lo cual nos permite saber si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N° 28; en esta tabla podemos observar los halos de inhibición obtenidos para la Clindamicina y Oxacilina que fueron de 23.98 mm y 30.21 mm, respectivamente. De acuerdo a estos resultados la cepa ATCC 25932 de *Staphylococcus aureus* es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” presento un halo de inhibición promedio máximo de 21.17 mm a una concentración de 20 mg/50uL estando cercano al patrón Clindamicina y menor al patrón Oxacilina. Con estos datos podemos concluir que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible al extracto de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS), con lo que podemos concluir que este extracto presenta actividad antibacteriana frente *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 de la actividad antibacteriana por **Mendoza, C., 2003**²⁹ en su estudio sobre actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y clorofórmicos.

TABLA N° 30
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR
CHONQ’A” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON LAS
CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO (mg/50uL)	N°	MEDIA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA AL 95%		MÍNIMO	MÁXIMO
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR		
0.050	3	7,29	0,14	0,08	6,94	7,63	7,15	7,43
0.100	3	7,90	0,34	0,19	7,06	8,73	7,57	8,24
0.150	3	9,25	0,14	0,08	8,91	9,59	9,09	9,34
0.200	3	9,40	0,28	0,16	8,70	10,09	9,09	9,64
0.250	3	9,81	0,25	0,15	9,18	10,43	9,54	10,04
0.300	3	10,36	0,25	0,14	9,75	10,97	10,18	10,64
0.350	3	11,87	0,09	0,05	11,66	12,08	11,78	11,95
0.400	3	11,96	0,17	0,10	11,54	12,37	11,77	12,09
0.450	3	12,02	0,23	0,13	11,46	12,59	11,76	12,16
0.500	3	12,15	0,39	0,22	11,18	13,11	11,81	12,57
1.000	3	12,80	0,15	0,08	12,44	13,16	12,66	12,95
1.500	3	13,04	0,49	0,28	11,83	14,26	12,48	13,37
2.000	3	13,24	0,19	0,11	12,78	13,70	13,05	13,42
2.500	3	13,90	0,18	0,10	13,46	14,33	13,70	14,04
5.000	3	16,59	0,49	0,28	15,37	17,82	16,26	17,16
10.000	3	18,31	0,20	0,12	17,80	18,81	18,09	18,49
15.000	3	18,33	0,59	0,34	16,87	19,80	17,79	18,96
20.000	3	21,17	0,64	0,37	19,58	22,77	20,50	21,78
Oxacilina 1 ug	3	30,21	1,25	0,72	27,11	33,32	28,80	31,17
Clindamicina 2 ug	3	23,98	2,00	1,15	19,02	28,94	21,77	25,65
TOTAL	60	14,18	5,70	0,74	12,71	15,65	7,15	31,17

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N° 30 se observan los resultados descriptivos para la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923. Donde la medida del diámetro de mayor actividad fue de 21.17 mm a una concentración de 20 mg/50uL y la medida del diámetro de menor actividad fue de 7.15 mm a una concentración de 0.05 mg/50uL. El menor error típico se muestra en la concentración 0.35 mg/50uL con un diámetro de 11.87 mm, las desviaciones son menores a 1 lo cual indica la semejanza de los halos de inhibición en una determinada concentración.

TABLA N° 31
ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE
Oenothera rosea Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A CEPAS DE
Staphylococcus aureus ATCC 25923 CON LAS CONCENTRACIONES
ESTANDARIZADAS

ANOVA	SUMA DE CUADRADOS	GI	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.
Inter-grupos	1899,82	19,00	99,99	266,49	,00
Intra-grupos	15,01	40,00	,38		
Total	1914,82	59,00			

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

LEYENDA:

GI.= grados de libertad

F= distribución de Fisher

Sig.= significancia

Sig.= > 0.05, no existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

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

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Según los resultados del análisis de la varianza ANOVA, en la tabla N° 31 se observa que el valor de la significancia es de 0.000, un valor que está dado por debajo de 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, es decir existen diferencias significativas de grupos entre los halos de inhibición formados por el extracto etanólico de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” lo que significa que presenta diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

TABLA N° 32
PRUEBA POST HOC DE SCHEFFE PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Oenothera rosea*
Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON
LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO DE YAWAR CHONQ'A (mg/50uL)	N°	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.050	3	7,29									
0.100	3	7,90	7,90								
0.150	3	9,25	9,25	9,25							
0.200	3	9,40	9,40	9,40							
0.250	3	9,81	9,81	9,81							
0.300	3		10,36	10,36	10,36						
0.350	3			11,87	11,87	11,87					
0.400	3			11,96	11,96	11,96					
0.450	3			12,02	12,02	12,02					
0.500	3			12,15	12,15	12,15					
1.000	3				12,80	12,80					
1.500	3				13,04	13,04					
2.000	3				13,24	13,24					
2.500	3					13,90	13,90				
5.000	3						16,59	16,59			
10.000	3							18,31	18,31		
15.000	3							18,33	18,33		
20.000	3								21,17	21,17	
Clindamicina 2ug	3									23,98	
Oxacilina 1 ug	3										30,21
Sig.		0,22	0,25	0,06	0,07	0,62	0,13	0,85	0,07	0,09	1,00

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

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 medida de los halos de inhibición obteniéndose 10 subgrupos de concentraciones. En cada subgrupo se observa homogeneidad ya que el valor de la significancia es mayor a 0.05. A excepción del subgrupo 10 porque solo se encuentra conformado por la medida de los halos frente a Oxacilina pero es comparable con clindamicina.

GRÁFICO N° 2: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A”



FUENTE: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el gráfico N° 2 podemos observar que el extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” presenta un aumento del diámetro de los halos de inhibición directamente proporcional a las concentraciones del extracto, donde el halo menor es de 7.3 mm, llegando hasta un punto máximo de inhibición de 21.2 mm, lo cual no es comparable a los patrones Oxacilina y Clindamicina con halos de inhibición de 30.2 mm y 24 mm respectivamente.

4.6.3.2 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO AL 70 % DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

TABLA N° 33
HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.150	7.36	7.36	7.59	7.44
2	0.250	9.17	8.70	9.38	9.08
3	0.350	11.38	11.38	11.81	11.52
4	0.500	12.55	11.20	11.82	11.86
5	1.000	12.62	12.84	13.02	12.83
6	1.500	13.19	13.64	13.78	13.54
7	2.000	18.65	18.93	19.19	18.92
8	2.500	18.64	19.11	19.11	18.95
9	5.000	22.91	22.74	20.53	22.06
10	7.500	24.18	24.54	23.82	24.18
11	10.000	24.87	25.52	23.80	24.73
12	12.500	24.65	24.78	24.78	24.74
13	15.000	25.88	24.35	25.96	25.40
14	17.500	26.72	27.18	24.64	26.18
15	20.000	27.10	26.64	26.64	26.79
16	25.000	26.08	28.60	26.31	27.00
17	30.000	28.64	27.13	27.15	27.64
18	35.000	27.96	28.32	27.08	27.79
19	40.000	28.03	28.98	28.98	28.66
22	Oxacilina 1 ug	31.17	30.67	28.80	30.21
23	Clindamicina 2 ug	24.52	25.65	21.77	23.98

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

LEYENDA:

- IG:** Primer grupo de halos
- IIG:** Segundo grupo de halos
- IIIG:** Tercer grupo de halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 33 se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

De acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS), 2000 los diámetros críticos para *Staphylococcus aureus* son:

TABLA N° 34
HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Staphylococcus aureus*

		Zona de Diámetro de Interpretación Crítica (mm)		
FARMACO	CONCENTRACIÓN	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Clindamicina	2 ug	≥ 21	15-20	≤14
Oxacilina	1 ug	≥ 22	15-21	≤14

La tabla N° 34 nos muestra los halos de inhibición para discos de sensibilidad de Clindamicina 2 ug y oxacilina 1 ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). Estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana, lo cual nos permite saber si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N° 33; en esta tabla podemos observar los halos de inhibición obtenidos para la Clindamicina y Oxacilina que fueron de 23.98 mm y 30.21 mm respectivamente de acuerdo a estos resultados la cepa ATCC 25932 de *Staphylococcus aureus* es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presentó un halo de inhibición promedio máximo de 28.66 mm a una concentración de 40 mg/50uL siendo este superior al patrón Clindamicina y estando cercano al patrón Oxacilina. Con estos datos podemos concluir que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible al extracto de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS), con lo que podemos concluir que este extracto presenta actividad antibacteriana frente *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 **Mendoza, C., 2003**²⁹ en su estudio sobre actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y clorofórmicos.

TABLA N° 35
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles
“OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CON LAS
CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO (mg/50uL)	N°	MEDIA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA AL 95%		MÍNIMO	MÁXIMO
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR		
0.150	3	7,44	0,13	0,08	7,11	7,77	7,36	7,59
0.250	3	9,08	0,35	0,20	8,22	9,95	8,70	9,38
0.350	3	11,52	0,25	0,14	10,91	12,14	11,38	11,81
0.500	3	11,86	0,68	0,39	10,18	13,54	11,20	12,55
1.000	3	12,83	0,20	0,12	12,33	13,32	12,62	13,02
1.500	3	13,54	0,31	0,18	12,77	14,30	13,19	13,78
2.000	3	18,92	0,27	0,16	18,25	19,59	18,65	19,19
2.500	3	18,95	0,27	0,16	18,28	19,63	18,64	19,11
5.000	3	22,06	1,33	0,77	18,76	25,36	20,53	22,91
7.500	3	24,18	0,36	0,21	23,29	25,07	23,82	24,54
10.000	3	24,73	0,87	0,50	22,57	26,89	23,80	25,52
12.500	3	24,74	0,08	0,04	24,55	24,92	24,65	24,78
15.000	3	25,40	0,91	0,52	23,14	27,65	24,35	25,96
17.500	3	26,18	1,35	0,78	22,82	29,54	24,64	27,18
20.000	3	26,79	0,27	0,15	26,13	27,45	26,64	27,10
25.000	3	27,00	1,39	0,80	23,54	30,46	26,08	28,60
30.000	3	27,64	0,87	0,50	25,49	29,79	27,13	28,64
35.000	3	27,79	0,64	0,37	26,20	29,37	27,08	28,32
40.000	3	28,66	0,55	0,32	27,30	30,03	28,03	28,98
Oxacilina 1 ug	3	30,21	1,25	0,72	27,11	33,32	28,80	31,17
Clindamicina 2 ug	3	23,98	2,00	1,15	19,02	28,94	21,77	25,65
TOTAL	63	21,12	7,09	0,89	19,33	22,90	7,36	31,17

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 35 se observan los resultados descriptivos de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas, del extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Las desviaciones estándar que se observan de cada concentración evaluada indican que existe homogeneidad entre las tres medidas. Los halos de inhibición van desde 7.59 mm, a una concentración de 0.15 mg/50uL, hasta un diámetro de halo de inhibición en promedio de 28.98 mm a una concentración de 40 mg/50uL sobre cepas

de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la cual es menor a la Oxacilina con halo de inhibición de 31.17 mm, pero es mayor a la Clindamicina con halo de inhibición de 25.65 mm.

TABLA N° 36
ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE
Geranium sessiliflorum Cavanilles “OJOTILLO” CON LAS CONCENTRACIONES
ESTANDARIZADAS

ANOVA	SUMA DE CUADRADOS	gl.	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.
Inter-grupos	3082,58	20,00	154,13	212,12	,00
Intra-grupos	30,52	42,00	,73		
Total	3113,10	62,00			

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

LEYENDA:

Gl.= grados de libertad

F= distribución de Fisher

Sig.= significancia

Sig.= > 0.05, no existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

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

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Según los resultados del análisis de la varianza ANOVA, en la tabla N° 36 se observa que el valor de la significancia es de 0.000, un valor que está dado por debajo de 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, es decir existen diferencias significativas de grupos entre los halos de inhibición formados por el extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” lo que significa que presenta diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones

TABLA N° 37
PRUEBA POST HOC DE SCHEFFE PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium*
***sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC**
25923 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

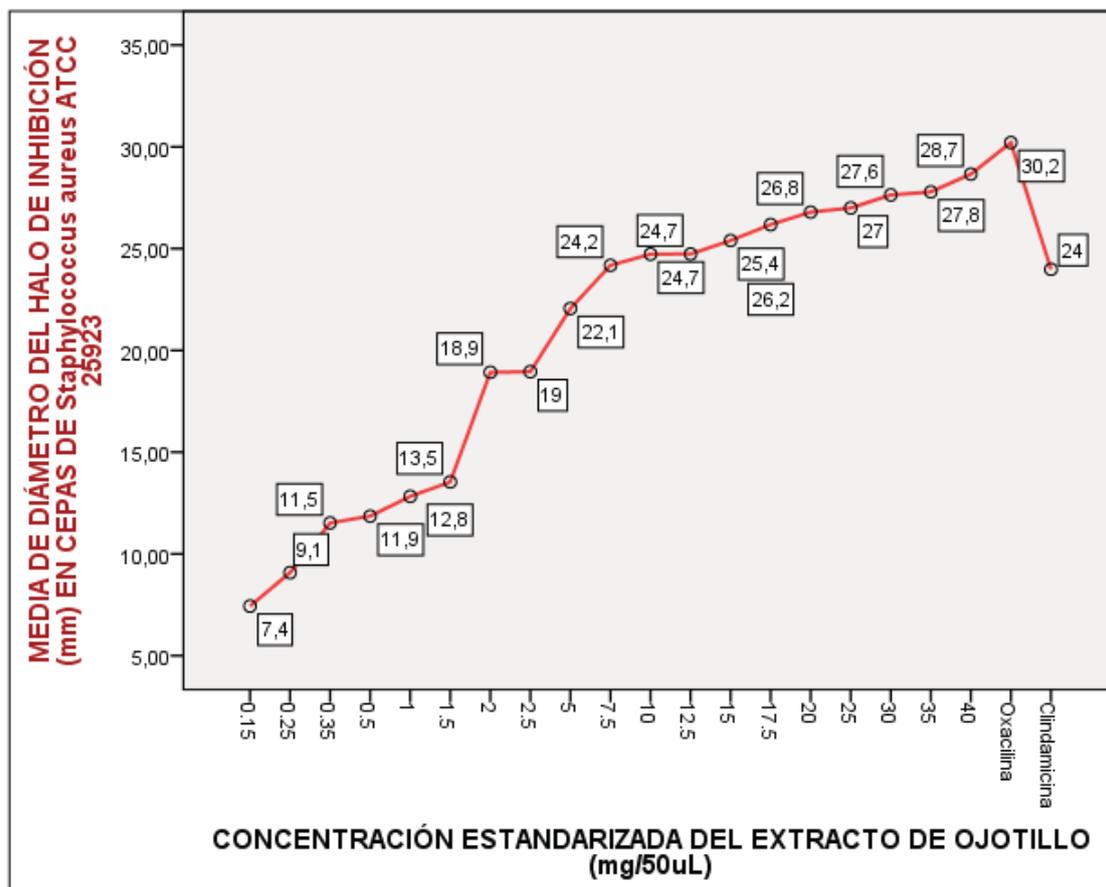
CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO DE OJOTILLO (mg/50uL)	N°	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0.150	3	7,44							
0.250	3	9,08	9,08						
0.350	3	11,52	11,52	11,52					
0.500	3		11,86	11,86					
1.000	3		12,83	12,83					
1.500	3			13,54					
2.000	3				18,92				
2.500	3				18,95				
5.000	3				22,06	22,06			
Clindamicina 2 ug	3					23,98	23,98		
7.500	3					24,18	24,18		
10.000	3					24,73	24,73	24,73	
12.500	3					24,74	24,74	24,74	
15.000	3					25,40	25,40	25,40	
17.500	3					26,18	26,18	26,18	26,18
20.000	3						26,79	26,79	26,79
25.000	3						27,00	27,00	27,00
30.000	3						27,64	27,64	27,64
35.000	3						27,79	27,79	27,79
40.000	3							28,66	28,66
Oxacilina 1 ug	3								30,21
Sig.		,07	,15	,98	,47	,06	,13	,10	,08

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

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 medida de los halos de inhibición obteniéndose 8 subgrupos de concentraciones. En cada subgrupo se observa homogeneidad ya que el valor de la significancia es mayor a 0.05. Además podemos observar que la clindamicina se encuentra dentro de los subgrupos 6 y 7 en cuanto a la oxacilina se encuentra en el subgrupo 8, en donde ambos fármacos patrón presentan homogeneidad significativa en cuanto a la medida de los halos de inhibición del extracto.

GRÁFICO N° 3: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles“OJOTILLO”



FUENTE: Datos Experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el gráfico N° 3 podemos observar que el extracto presenta un aumento del diámetro de los halos de inhibición directamente proporcional a las concentraciones del extracto, donde el halo menor es de 7.4 mm, llegando hasta un punto máximo de inhibición de 28.7 mm, formado por el extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

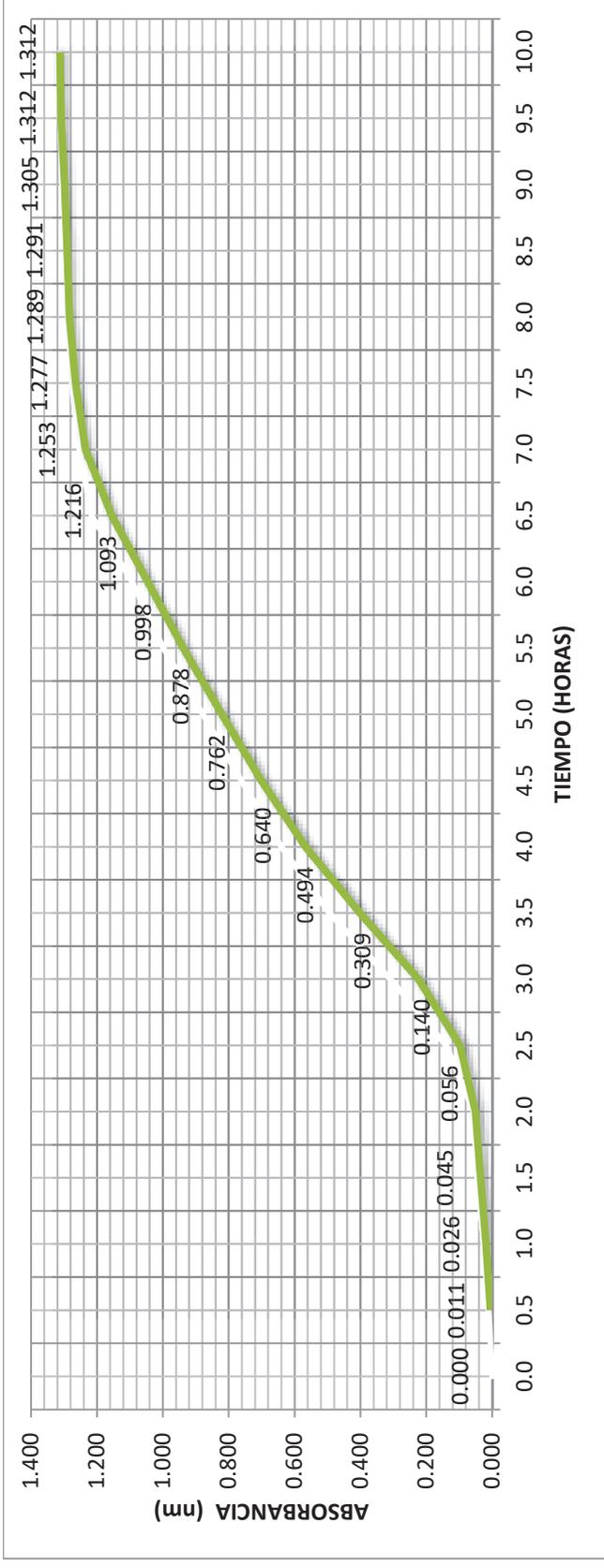
4.6.4 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli* ATCC 35218

TABLA N° 38
ABSORBANCIAS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli* ATCC 35218.

TIEMPO (HORAS)	ABSORBANCIAS (A 623 nm) *
0.5	0.011
1.0	0.026
1.5	0.045
2.0	0.056
2.5	0.140
3.0	0.309
3.5	0.494
4.0	0.640
4.5	0.762
5.0	0.878
5.5	0.998
6.0	1.093
6.5	1.216
7.0	1.253
7.5	1.277
8.0	1.289
8.5	1.291
9.0	1.305
9.5	1.312
10.0	1.312

FUENTE: Elaboración propia a partir de los datos experimentales
(*) = Promedio de dos medidas de absorvancias

GRÁFICO N° 4: CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli* ATCC 35218



FUENTE: Elaboración propia a partir de los datos experimentales

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el gráfico N° 4 se puede observar el desarrollo de la bacteria en estudio *Escherichia coli* ATCC 35218; donde se aprecia la curva de crecimiento celular y se pueden reconocer tres fases del crecimiento como es la fase estacionaria, la fase exponencial y la fase de latencia.

En la cual se observa que la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 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 7 horas, en 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 la acumulación de desechos metabólicos de la bacteria; pudiéndose confrontar. Este gráfico es semejante a la curva de crecimiento típica de una población bacteriana según **Madigan, M., 2003.**³⁴

4.6.5 DEL ENSAYO DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.6.5.1 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218.

TABLA N° 39
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Escherichia coli* ATCC 35218

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.015	+	Crecimiento bacteriano
2	0.020	+	Crecimiento bacteriano
3	0.025	+	Crecimiento bacteriano
4	0.030	+	Crecimiento bacteriano
5	0.035	+	Crecimiento bacteriano
6	0.050	+	Crecimiento bacteriano
7	0.100	+	Crecimiento bacteriano
8	0.150	+	Crecimiento bacteriano
9	0.200	+	Crecimiento bacteriano
10	0.250	+	Crecimiento bacteriano
11	0.300	+	Crecimiento bacteriano
12	0.350	+	Crecimiento bacteriano
13	0.400	+	Crecimiento bacteriano
14	0.450	+	Crecimiento bacteriano
15	0.500	+	Crecimiento bacteriano
16	0.600	+	Crecimiento bacteriano
17	0.700	+	Crecimiento bacteriano
18	0.800	+	Crecimiento bacteriano
19	0.900	+	Crecimiento bacteriano

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Turbidez
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Como se muestra en la tabla N° 39 se evidencia turbidez en todos los tubos, corroborándose con el sembrado en placas de Mueller Hinton en los cuales se obtuvo crecimiento bacteriano positivo para *Escherichia coli* ATCC 35218. Por lo cual se concluye que el extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton no presenta actividad antibacteriana.

4.6.5.1.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE LAS HOJA Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218.

**TABLA N° 40
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218**

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.030	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.040	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.050	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.100	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.150	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.200	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.250	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.500	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.750	0.00	0.00	0.00	0.00
13	1.000	0.00	0.00	0.00	0.00
14	1.500	0.00	0.00	0.00	0.00
15	2.500	0.00	0.00	0.00	0.00
16	5.000	0.00	0.00	0.00	0.00
17	7.500	0.00	0.00	0.00	0.00
18	10.000	0.00	0.00	0.00	0.00
19	12.500	0.00	0.00	0.00	0.00
20	15.000	0.00	0.00	0.00	0.00
21	20.000	0.00	0.00	0.00	0.00
22	25.000	0.00	0.00	0.00	0.00
23	30.000	0.00	0.00	0.00	0.00
24	40.000	0.00	0.00	0.00	0.00
25	50.000	0.00	0.00	0.00	0.00

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- IG:** Primer grupo de halos
- IIG:** Segundo grupo de halos
- IIIG:** Tercer grupo de halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 40 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto del extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton frente a *Escherichia coli* ATCC 35218. En el cual podemos observar que el extracto etanólico no presenta actividad antibacteriana, no formo en ninguna concentración halos de inhibición como se puede evidenciar, por lo cual podríamos concluir que el extracto de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” presenta actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas.

4.6.5.2 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218.

TABLA N° 41
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Escherichia coli* ATCC 35218

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.015	+	Crecimiento bacteriano
2	0.020	+	Crecimiento bacteriano
3	0.025	+	Crecimiento bacteriano
4	0.030	+	Crecimiento bacteriano
5	0.035	+	Crecimiento bacteriano
6	0.050	+	Crecimiento bacteriano
7	0.100	+	Crecimiento bacteriano
8	0.150	+	Crecimiento bacteriano
9	0.200	+	Crecimiento bacteriano
10	0.250	+	Crecimiento bacteriano
11	0.300	+	Crecimiento bacteriano
12	0.350	+	Crecimiento bacteriano
13	0.400	+	Crecimiento bacteriano
14	0.450	+	Crecimiento bacteriano
15	0.500	+	Crecimiento bacteriano
16	0.600	+	Crecimiento bacteriano
17	0.700	+	Crecimiento bacteriano
18	0.800	+	Crecimiento bacteriano
19	0.900	+	Crecimiento bacteriano

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Muy turbio
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Como se muestra en la tabla N° 41 se evidencia turbidez en todos los tubos corroborándose con el sembrado en placas de Mueller Hinton en los cuales se obtuvo crecimiento bacteriano positivo para *Escherichia coli* ATCC 35218. Por lo cual se concluye que el extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” no presenta actividad antibacteriana, podría deberse a que el extracto clorofórmico en la marcha fitoquímica no presentó metabolitos polares (flavonoides y compuestos fenólicos).

4.6.5.2.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218.

TABLA N° 42
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.030	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.040	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.050	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.100	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.150	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.200	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.250	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.500	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.750	0.00	0.00	0.00	0.00
13	1.000	0.00	0.00	0.00	0.00
14	1.500	0.00	0.00	0.00	0.00
15	2.500	0.00	0.00	0.00	0.00
16	5.000	0.00	0.00	0.00	0.00
17	7.500	0.00	0.00	0.00	0.00
18	10.000	0.00	0.00	0.00	0.00
19	12.500	0.00	0.00	0.00	0.00
20	15.000	0.00	0.00	0.00	0.00
21	20.000	0.00	0.00	0.00	0.00
22	25.000	0.00	0.00	0.00	0.00
23	30.000	0.00	0.00	0.00	0.00
24	40.000	0.00	0.00	0.00	0.00
25	50.000	0.00	0.00	0.00	0.00

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- IG:** Primer grupo de halos
- IIG:** Segundo grupo de halos
- IIIG:** Tercer grupo de halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 42 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto de la evaluación del extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton frente a *Escherichia coli* ATCC 35218.

En cual podemos observar que el extracto clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” no presenta actividad bacteriana, como se muestra en la tabla no formo en ninguna concentración halo de inhibición teniendo como resultado valores de 0.00 mm como se puede evidenciar.

4.6.5.3 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218.

TABLA N° 43
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Escherichia coli* ATCC 35218.

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	5.00	+	Crecimiento bacteriano
2	5.25	+	Crecimiento bacteriano
3	5.50	+	Crecimiento bacteriano
4	5.75	+	Crecimiento bacteriano
5	6.00	+	Crecimiento bacteriano
6	6.25	+	Crecimiento bacteriano
7	6.50	+/-	Crecimiento bacteriano
8	6.75	+/-	Crecimiento bacteriano
9	7.00	+/-	Crecimiento bacteriano
10	7.25	+/-	Crecimiento bacteriano
11	7.50	+/-	Crecimiento bacteriano
12	10.00	-	Ausencia
13	12.50	-	Ausencia
14	15.00	-	Ausencia
15	17.50	-	Ausencia
16	20.00	-	Ausencia
17	22.50	-	Ausencia

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Turbidez
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Se utilizó la siguiente fórmula para la determinación de los volúmenes de las concentraciones establecidas a partir de 100mg/1000uL.

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Dónde:

- N_1 = concentración 1
- V_1 = volumen 1
- N_2 = concentración 2
- V_2 = volumen 2

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 18 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en los tubos del 1 al 6 (relacionado al crecimiento bacteriano), en los tubos del 7 al 11 no es muy claro. Hay traslucidez desde el tubo 12 hasta el 17 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 12 ó 13.

Con los datos de esta prueba piloto se puede realizar una nueva prueba y encontrar el valor de la CMI.

Observando la turbidez de manera visual, no podemos determinar exactamente si existe crecimiento bacteriano o no; para poder determinar exactamente esto, se procedió al resembrado de los resultados obtenidos en los tubos, en placas Petri con Agar Muller Hinton. La siembra se incubó a 37 °C por 24 horas, luego se observa y evalúa el crecimiento bacteriano o la ausencia de este. Observándose crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218 en los tubos del 1 al 11, habiendo ausencia de crecimiento a partir del tubo 12 al 17 a la concentración de 10 mg/50uL del extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo". Los controles sin cepa no presentaron crecimiento bacteriano. (Ver fotografía N° 15)

4.6.5.3.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

TABLA N° 44

RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.015	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.150	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.350	0.00	0.00	0.00	0.00
6	1.000	0.00	0.00	0.00	0.00
7	5.000	0.00	0.00	0.00	0.00
8	10.000	0.00	0.00	0.00	0.00
9	11.000	8.49	7.95	8.82	8.42
10	11.500	8.61	8.61	8.33	8.52
11	12.000	8.74	9.28	8.04	8.69
12	13.000	8.85	8.61	8.61	8.69
13	14.000	9.20	8.60	8.58	8.79
14	15.000	9.30	8.69	8.92	8.97
15	16.000	10.34	9.47	8.77	9.53
16	17.000	9.53	9.65	9.56	9.58
17	18.000	10.09	9.51	10.20	9.93
18	19.000	11.28	10.01	11.14	10.81
19	20.000	10.98	10.93	11.20	11.04
20	30.000	12.00	12.21	12.65	12.29
21	40.000	12.92	12.47	12.13	12.51
22	50.000	12.46	13.31	12.45	12.74
23	55.000	13.19	13.10	12.94	13.08
24	60.000	13.13	13.17	13.08	13.13
25	65.000	15.14	14.93	14.42	14.83
26	70.000	15.50	16.18	15.69	15.79
27	75.000	17.18	17.57	16.57	17.11
28	80.000	12.60	12.21	11.80	12.20
29	90.000	11.80	11.80	10.75	11.45
30	100.000	10.15	11.50	10.25	10.63

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- 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° 44 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto de la evaluación del extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218.

En la tabla podemos observar que el extracto etanólico presenta un halo mínimo de inhibición de 8.42 mm en promedio a una concentración de 11 mg/50uL., a menores concentraciones no se logró tener halos de inhibición, como se puede observar en el esquema, las demás concentraciones los halos de inhibición son valores de 0.00 como se puede evidenciar.

El halo máximo promedio que se obtuvo fue de 17.11 mm en promedio a una concentración de 75 mg/50uL., a concentraciones mayores los halos de inhibición son menores lo cual indica que el extracto empieza a perder actividad frente a la cepa, e incluso a mayores concentraciones se observó una sobresaturación del extracto en los pozos.

De esta manera se evidencia que el extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” posee actividad antibacteriana in vitro sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA PILOTO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

TABLA N° 45
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

CONCENTRACIONES PILOTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO (mg/50uL)	N°	MEDIA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA AL 95%		MÍNIMO	MÁXIMO
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR		
0.005	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.015	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.035	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.150	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0.350	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.000	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5.000	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10.000	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11.000	3	8,42	0,44	0,25	7,33	9,51	7,95	8,82
11.500	3	8,52	0,16	0,09	8,12	8,92	8,33	8,61
12.000	3	8,69	0,62	0,36	7,14	10,23	8,04	9,28
13.000	3	8,69	0,14	0,08	8,35	9,03	8,61	8,85
14.000	3	8,79	0,35	0,20	7,92	9,67	8,58	9,20
15.000	3	8,97	0,31	0,18	8,20	9,74	8,69	9,30
16.000	3	9,53	0,79	0,45	7,57	11,48	8,77	10,34
17.000	3	9,58	0,06	0,04	9,42	9,74	9,53	9,65
18.000	3	9,93	0,37	0,21	9,01	10,85	9,51	10,20
19.000	3	10,81	0,70	0,40	9,08	12,54	10,01	11,28
20.000	3	11,04	0,14	0,08	10,68	11,39	10,93	11,20
30.000	3	12,29	0,33	0,19	11,46	13,11	12,00	12,65
40.000	3	12,51	0,40	0,23	11,52	13,49	12,13	12,92
50.000	3	12,74	0,49	0,29	11,51	13,97	12,45	13,31
55.000	3	13,08	0,13	0,07	12,76	13,39	12,94	13,19
60.000	3	13,13	0,05	0,03	13,01	13,24	13,08	13,17
65.000	3	14,83	0,37	0,21	13,91	15,75	14,42	15,14
70.000	3	15,79	0,35	0,20	14,92	16,66	15,50	16,18
75.000	3	17,11	0,50	0,29	15,85	18,36	16,57	17,57
TOTAL	81,00	7,94	5,63	0,63	6,70	9,19	0,00	17,57

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N° 45 se observan los resultados descriptivos de la prueba piloto de la evaluación del extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218. Donde se interpreta que las desviaciones estándar son aceptables y establecen que existe precisión en cuanto a las medidas de los halos de una misma concentración.

4.6.5.4 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218.

TABLA N° 46
PRUEBA PILOTO DE LAS DILUCIONES CRECIENTES DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A UN VOLUMEN ESTANDAR DE *Escherichia coli* ATCC 35218.

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	0.05	+	Crecimiento bacteriano
2	0.10	+	Crecimiento bacteriano
3	0.15	+	Crecimiento bacteriano
4	0.20	+	Crecimiento bacteriano
5	0.25	+	Crecimiento bacteriano
6	0.30	+	Crecimiento bacteriano
7	0.35	+	Crecimiento bacteriano
8	0.40	+	Crecimiento bacteriano
9	0.45	+	Crecimiento bacteriano
10	0.50	+	Crecimiento bacteriano
11	1.00	+	Crecimiento bacteriano
12	1.50	+	Crecimiento bacteriano
13	2.00	+	Crecimiento bacteriano
14	2.50	+	Crecimiento bacteriano
15	3.00	+	Crecimiento bacteriano
16	3.50	+	Crecimiento bacteriano
17	4.00	+	Crecimiento bacteriano
18	4.50	+	Crecimiento bacteriano
19	5.00	+	Crecimiento bacteriano
20	10.00	+	Crecimiento bacteriano

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

- (+) = Muy turbio
- (+/-) = Ligeramente turbio
- (-) = Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Como se muestra en la tabla N° 46 se evidencia turbidez en todos los tubos corroborándose con el sembrado en placas de Mueller Hinton en los cuales se obtuvo crecimiento bacteriano positivo para *Escherichia coli* ATCC 35218. Por lo cual se concluye que el extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles no presenta actividad antibacteriana.

4.6.5.4.1 RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” OBTENIDOS EN LA PRUEBA PILOTO FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

TABLA N° 47
RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” Y DETERMINACIÓN DE LA CMI FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/50uL)	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.010	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.015	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.020	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.035	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.045	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.050	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.150	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.250	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.500	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.750	0.00	0.00	0.00	0.00
13	1.000	0.00	0.00	0.00	0.00
14	1.500	0.00	0.00	0.00	0.00
15	2.500	0.00	0.00	0.00	0.00
16	5.000	0.00	0.00	0.00	0.00
17	7.500	0.00	0.00	0.00	0.00
18	10.000	0.00	0.00	0.00	0.00
19	12.500	0.00	0.00	0.00	0.00
20	15.000	0.00	0.00	0.00	0.00
21	20.000	0.00	0.00	0.00	0.00
22	25.000	0.00	0.00	0.00	0.00
23	30.000	0.00	0.00	0.00	0.00
24	40.000	0.00	0.00	0.00	0.00
25	50.000	0.00	0.00	0.00	0.00

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

LEYENDA:

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° 47 se muestran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto de la evaluación del extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles frente a *Escherichia coli* ATCC 35218. En cual podemos observar que el extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles no presenta actividad antibacteriana, como se muestra en la tabla no formo en ninguna concentración halo de inhibición teniendo como resultado valores de 0.00 mm como se puede evidenciar, podría deberse a que el extracto clorofórmico en la marcha fitoquímica no presentó metabolitos polares (flavonoides y compuestos fenólicos).

4.6.6 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.6.6.1 RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE LA RAIZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

TABLA N° 48
HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

N° DE DISCO	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (mg/50uL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	11.000	8.49	7.95	8.82	8.42
2	11.500	8.61	8.61	8.33	8.52
3	12.000	8.74	9.28	8.04	8.69
4	12.500	8.85	8.61	8.61	8.69
5	13.000	9.20	8.60	8.58	8.79
6	13.500	9.30	8.69	8.92	8.97
7	14.000	10.34	9.47	8.77	9.53
8	14.500	9.53	9.65	9.56	9.58
9	15.000	10.09	9.51	10.20	9.93
10	17.500	11.28	10.01	11.14	10.81
11	20.000	10.98	10.93	11.20	11.04
12	25.000	12.00	12.21	12.65	12.29
13	30.000	12.92	12.47	12.13	12.51
14	35.000	12.46	13.31	12.45	12.74
15	40.000	13.19	13.10	12.94	13.08
16	45.000	13.13	13.17	13.08	13.13
17	50.000	15.14	14.93	14.42	14.83
18	65.000	15.50	16.18	15.69	15.79
19	75.000	17.18	17.57	16.57	17.11
22	Amikacina 30 ug	25.41	23.82	24.32	24.52
23	Ciprofloxacino 5 ug	26.49	25.20	27.04	26.24

FUENTE: Ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición

LEYENDA:

- IG:** Primer grupo de halos
- IIG:** Segundo grupo de halos
- IIIG:** Tercer grupo de halos

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N° 48 se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218. De acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS), 2000 los diámetros críticos para *Escherichia coli* son:

TABLA N° 49
HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Escherichia coli*

FARMACO	CONCENTRACIÓN	Zona de Diámetro de Interpretación Crítica (mm)		
		SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Ciprofloxacino	5 ug	≥ 21	16-20	≤15
Amikacina	30 ug	≥17	15-16	≤14

FUENTE: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS)

La tabla N° 49 nos muestra los halos de inhibición para discos de sensibilidad de Ciprofloxacino 5 ug y Amikacina 30 ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). Estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana, lo cual nos permite saber si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N° 48; en esta tabla podemos observar los halos de inhibición obtenidos para la Ciprofloxacino y Amikacina que fueron de 26.24 mm y 24.52 mm respectivamente de acuerdo a estos resultados la cepa ATCC 35218 de *Escherichia coli* es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presento un halo de inhibición promedio máximo de 17.11 mm a una concentración de 75 mg/50uL siendo este cercano al patrón Ciprofloxacino y al patrón Amikacina. Con estos datos podemos concluir que *Escherichia coli* ATCC 35218 es sensible al extracto de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS), con lo que podemos concluir que este extracto presenta actividad antibacteriana frente *Escherichia coli*.

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 **Mendoza, C., 2003**²⁹ en su estudio sobre actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y clorofórmicos.

TABLA N° 50
RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles
“OJOTILLO” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218 CON LAS
CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO (mg/50uL)	N°	MEDIA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA AL 95%		MÍNIMO	MÁXIMO
					LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR		
11.000	3	8,42	0,44	0,25	7,33	9,51	7,95	8,82
11.500	3	8,52	0,16	0,09	8,12	8,92	8,33	8,61
12.000	3	8,69	0,62	0,36	7,14	10,23	8,04	9,28
12.500	3	8,69	0,14	0,08	8,35	9,03	8,61	8,85
13.000	3	8,79	0,35	0,20	7,92	9,67	8,58	9,20
13.500	3	8,97	0,31	0,18	8,20	9,74	8,69	9,30
14.000	3	9,53	0,79	0,45	7,57	11,48	8,77	10,34
14.500	3	9,58	0,06	0,04	9,42	9,74	9,53	9,65
15.000	3	9,93	0,37	0,21	9,01	10,85	9,51	10,20
17.500	3	10,81	0,70	0,40	9,08	12,54	10,01	11,28
20.000	3	11,04	0,14	0,08	10,68	11,39	10,93	11,20
25.000	3	12,29	0,33	0,19	11,46	13,11	12,00	12,65
30.000	3	12,51	0,40	0,23	11,52	13,49	12,13	12,92
35.000	3	12,74	0,49	0,29	11,51	13,97	12,45	13,31
40.000	3	13,08	0,13	0,07	12,76	13,39	12,94	13,19
45.000	3	13,13	0,05	0,03	13,01	13,24	13,08	13,17
50.000	3	14,83	0,37	0,21	13,91	15,75	14,42	15,14
65.000	3	15,79	0,35	0,20	14,92	16,66	15,50	16,18
75.000	3	17,11	0,50	0,29	15,85	18,36	16,57	17,57
Amikacina	3	24,52	0,81	0,47	22,50	26,54	23,82	25,41
Ciprofloxacino	3	26,24	0,94	0,55	23,90	28,59	25,20	27,04
TOTAL	63	12,63	4,87	0,61	11,40	13,86	7,95	27,04

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N° 50 se observan los resultados descriptivos de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas, del extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a cepas de *Escherichia coli* cepa ATCC 35218.

Las desviaciones estándar que se observan de cada concentración evaluada indican que existe homogeneidad entre las tres medidas. Los halos de inhibición van desde 8.42 mm, a una concentración de 11 mg/50uL, hasta un diámetro de halo de inhibición en promedio máximo de 17.11 mm a una concentración de 75 mg/50uL sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, la cual es menor a la Amikacina y Ciprofloxacino con halos de inhibición 24.52 mm y 26.24 mm respectivamente. Por lo cual es comparable a los fármacos Amikacina y el Ciprofloxacino en cuanto a la medida de los halos de inhibición más no a la concentración.

TABLA N° 51
ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE
Geranium sessiliflorum Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A CEPAS DE *Escherichia*
coli ATCC 35218 CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

ANOVA	SUMA DE CUADRADOS	GI	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.
Inter-grupos	1463,89	20,00	73,19	326,66	,00
Intra-grupos	9,41	42,00	,22		
Total	1473,30	62,00			

FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

LEYENDA:

GI.= grados de libertad

F= distribución de Fisher

Sig.= significancia

Sig.= > 0.05, no existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

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

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Según los resultados del análisis de la varianza ANOVA, en la tabla N° 51 se observa que el valor de la significancia es de 0.000, un valor que está dado por debajo de 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, es decir existen diferencias significativas de grupos entre los halos de inhibición formados por el extracto etanólico de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” lo que significa que presenta diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

TABLA N° 52
PRUEBA POST HOC DE SCHEFFE PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium*
sessiliflorum Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 35218
CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS

CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO DE OJOTILLO (mg/50uL)	N°	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
11.000	3	8,42						
11.500	3	8,52	8,52					
12.000	3	8,69	8,69					
12.500	3	8,69	8,69					
13.000	3	8,79	8,79	8,79				
13.500	3	8,97	8,97	8,97				
14.000	3	9,53	9,53	9,53				
14.500	3	9,58	9,58	9,58				
15.000	3	9,93	9,93	9,93				
17.500	3		10,81	10,81	10,81			
20.000	3			11,04	11,04			
25.000	3				12,29			
30.000	3				12,51	12,51		
35.000	3				12,74	12,74		
40.000	3				13,08	13,08		
45.000	3				13,13	13,13		
50.000	3					14,83	14,83	
65.000	3						15,79	
75.000	3						17,11	
Amikacina 30 ug	3							24,52
Ciprofloxacino 5 ug	3							26,24
Sig.		,74	,06	,08	,05	,05	,07	,48

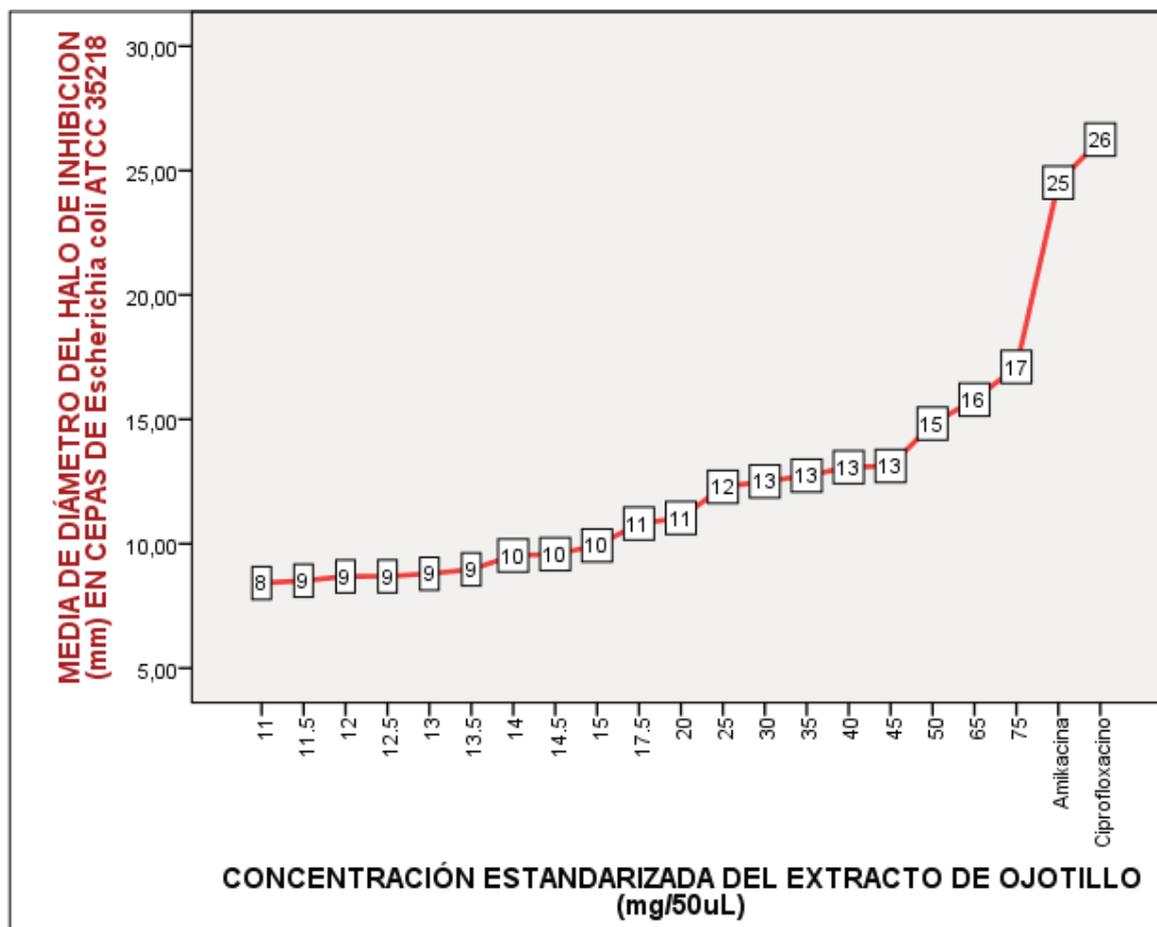
FUENTE: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO:

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 medida de los halos de inhibición obteniéndose 7 subgrupos de concentraciones. En cada subgrupo se observa homogeneidad ya que el valor de la significancia es mayor a 0.05.

Por lo que se concluye que *Geranium sessiliflorum* si presenta actividad antibacteriana pero este no es comparable a los fármacos patron debido a que estos mismos se ubican en otro sub-grupo.

GRÁFICO N° 5: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”



FUENTE: Datos experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el gráfico N° 5 podemos observar que el extracto presenta un aumento del diámetro de los halos de inhibición directamente proporcional a las concentraciones del extracto, donde el halo menor es de 7.3 mm, llegando hasta un punto máximo de inhibición de 21 mm, formado por el extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

4.7 DE LA COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA ENTRE AMBAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

TABLA N° 53
DE LA DIFERENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 %			
<i>Oenothera rosea</i> Aiton “YAWAR CHONQ’A”		<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “OJOTILLO”	
CONCENTRACIÓN (mg/50uL)	MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	CONCENTRACIÓN (mg/50uL)	MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)
0.050	7.29	0.150	7.44
0.100	7.90	0.250	9.08
0.150	9.25	0.350	11.52
0.200	9.40	0.500	11.86
0.250	9.81	1.000	12.83
0.300	10.36	1.500	13.54
0.350	11.87	2.000	18.92
0.400	11.96	2.500	18.95
0.450	12.02	5.000	22.06
0.500	12.15	7.500	24.18
1.000	12.80	10.000	24.73
1.500	13.04	12.500	24.74
2.000	13.24	15.000	25.40
2.500	13.90	17.500	26.18
5.000	16.59	20.000	26.79
10.000	18.31	25.000	27.00
15.000	18.33	30.000	27.64
20.000	21.17	35.000	27.79
		40.000	28.66

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

TABLA N° 54
ESTADÍSTICOS DE GRUPO PARA LA DIFERENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ESTADÍSTICOS DE GRUPO	Concentración	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Medida de los Halos de Inhibición	<i>Oenothera rosea</i> Aiton "Yawar Chong'a"	18	12.7439	3.77916	.89076
	<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "Ojotillo"	19	20.4900	7.18440	1.64821

FUENTE: Datos estadísticos del estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 54 se observa que la media de promedios es 12.74 para *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y la media de promedios para *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” es 20.49

La desviación típica para *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” es 3.77 y para *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” es 7.18, estos resultados son la varacion de los datos en relación al promedio.

TABLA N° 55
PRUEBA T – STUDENT PARA LA DIFERENCIA DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE
Oenothera rosea Aiton “**YAWAR CHONQ’A**” Y DE *Geranium sessiliflorum*
Cavanilles “**OJOTILLO**” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

PRUEBA DE MUESTRAS INDEPENDIENTES	Prueba T para la igualdad de medias		
	T	GI	Sig. (bilateral)
Medida de los Halos de Inhibición	4.135	27.561	.000

FUENTE: Datos estadísticos del estudio

LEYENDA:

GI.= grados de libertad

Sig. Bilateral = significancia

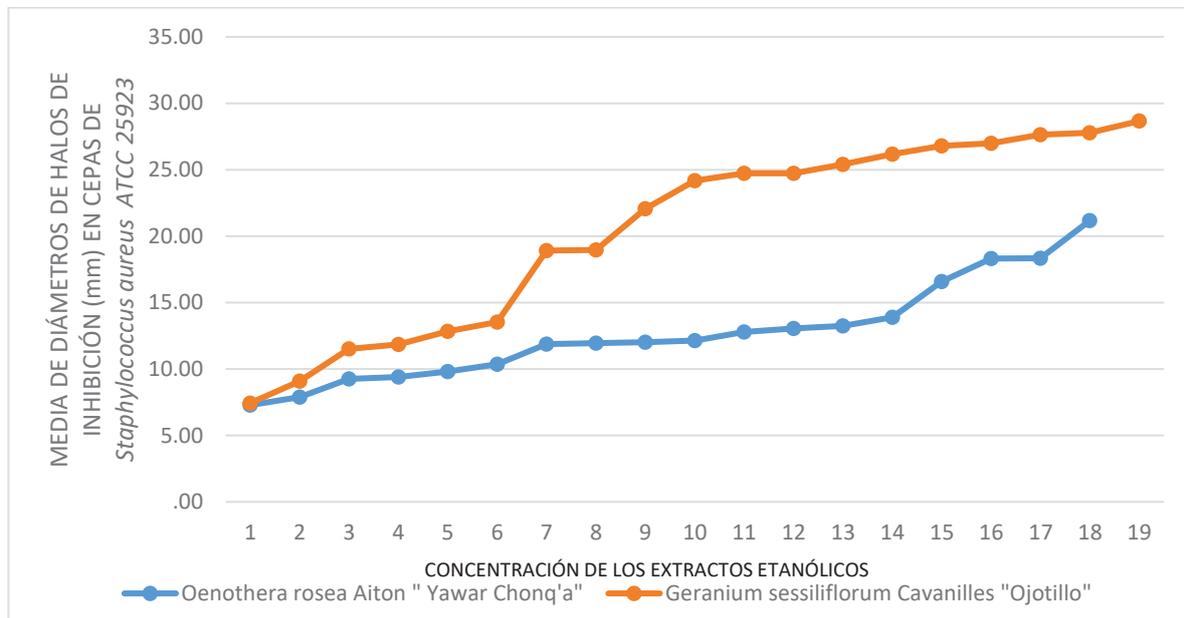
Sig.= > 0.05, no existe diferencia significativa entre dos halos de inhibición.

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

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Según los resultados de la prueba T - Student, en la tabla N° 55 se observa que el valor de la significancia bilateral es de 0.000, un valor que está por debajo de 5 % = 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, es decir existen diferencias significativas de grupos entre el promedio de halos de inhibición formados por los extractos etanólicos al 70 % de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” lo que significa que presentan diferente actividad antibacteriana en sus diferentes concentraciones.

GRÁFICO N° 6: DIFERENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



FUENTE: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el gráfico N° 6 podemos observar que al inicio ambos extractos presentan un aumento del diámetro de los halos de inhibición casi semejantes a medida que aumenta la concentración de ambos (directamente proporcional).

El extracto etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” se puede observar que presenta actividad antibacteriana ligeramente mayor con respecto al extracto etanólico al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” en donde la actividad antibacteriana va en incremento según la concentración.

4.8 DE LA TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL

Al realizarse esta prueba se contó con 12 ratas albinas “Rattus norvegicus” hembras de 1 mes y medio de edad, con pesos promedios entre 80 g a 110 g distribuidos al azar de acuerdo al método de la OCDE 425 o método del Sube y Baja.

TABLA N° 56
DOSIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQÁ” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

Extracto etanólico de <i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”				
N° de Rata	Peso (g)	Dosis administrado (mg/kg)	Volumen del extracto suministrado (mL/Kg/ Rata)	Volumen máximo suministrado (mL)
Control	80.5	-----	-----	1mL de H ₂ O _(d)
R1	81.2	2000	0.812	0.85
R2	85.5	2000	0.855	0.85
R3	93.0	2000	0.930	0.95
R4	99.5	2000	0.995	1.00
R5	105.2	2000	1.052	1.05
Extracto etanólico de <i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”				
N° de Rata	Peso (g)	Dosis administrado (mg/kg)	Volumen del extracto suministrado (mL/Kg/ Rata)	Volumen máximo suministrado (mL)
Control	95.3	-----	-----	1mL de H ₂ O _(d)
R1	94.5	2000	0.945	0.95
R2	99.0	2000	0.990	1.00
R3	99.4	2000	0.994	1.00
R4	99.5	2000	0.995	1.00
R5	105.4	2000	1.054	1.05

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

TABLA Nº 57
OBSERVACIÓN DE SIGNOS DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS EN EL
ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR VIA ORAL

SIGNOS	TIEMPO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % YAWAR CHONQ'A (2000 mg/kg)						EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE OJOTILLO (2000 mg/kg)					
		C1	R1	R2	R3	R4	R5	C2	R1	R2	R3	R4	R5
Lagrimo	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Secreción nasal	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivación	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temblores	30 minutos	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micción	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarrea	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dolor	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsiones	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frecuencia respiratoria	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Letargia	30 minutos	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somnolencia	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muerte	30 minutos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 hora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FUENTE: Datos experimentales propios

LEYENDA:

- 0: Sin alteración
- 1: Leve
- 2: Moderado
- 3: Severo

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: Muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos y síntomas de toxicidad incluyendo su comienzo y duración. En la tabla N° 57, nos muestra en resumen los signos y síntomas que se observaron durante las 24 horas del ensayo en los animales de experimentación manteniéndose estables durante los 14 días de observación. Podemos decir que todas las ratas de experimentación tuvieron similar comportamiento al control, sin embargo observamos lo siguiente: en el grupo de Yawar Chonq'a se evidenció la presencia de temblores y letargia en algunos de los animales en un grado leve, en el grupo de Ojotillo algunos de los animales presentaron temblores, letargia y micción en grado leve a la primera hora tras la administración del extracto. Concluyéndose que no se observaron signos y síntomas clínicos moderados ni severos que evidenciaran toxicidad para las especies vegetales *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo", ni durante el periodo total de observación no se evidencio ninguna reacción tanto en el control y en el grupo tratado, durante los 14 días del experimento.

TABLA N° 58
VARIACIÓN EN PORCENTAJE DE PESO DE LOS ANIMALES EN LOS
DIFERENTES DIAS DE OBSERVACIÓN

DÍAS	TRATAMIENTO			
	<i>Oenothera rosea</i> Aiton "YAWAR CHONQ'A" 2000 mg/kg		<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "OJOTILLO" 2000 mg/kg	
	Control	Peso Promedio de las ratas (%)	Control	Peso Promedio de las ratas (%)
Inicial	0.0	0.0	0.0	0.0
1°	0.2	0.1	0.1	0.0
2°	1.4	0.4	1.2	0.1
3°	1.9	0.7	2.0	1.9
4°	2.4	1.1	2.6	3.2
5°	3.0	1.6	3.3	3.9
6°	4.0	3.2	3.9	4.1
7°	4.6	4.1	4.5	4.3
14°	9.3	8.9	9.1	9.2

FUENTE: Datos experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 58 no se observó variación de peso de los animales de experimentación y no existieron diferencias relevantes entre el control y los tratados por lo cual este parámetro de peso aplicado a este grupo no presenta efectos tóxicos en el estudio a la dosis de 2000 mg/Kg de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, no se encontró antecedentes de metabolitos tóxicos para ambas especies en estudio.

TABLA N° 59
RESULTADOS DE LA DL50 DE LA TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL DE LOS
EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR
CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”

EXTRACTOS ETANOLICOS AL 70 %	N° DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	SUPERVIVENCIA	MUERTE
<i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar chonq’a”	Control (1)	6/6	Ninguna
	Grupo experimental (5)		
<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”	Control (1)	6/6	Ninguna
	Grupo experimental (5)		

FUENTE: datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

La toxicidad aguda se realizó para determinar la DL50 de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, en el cual se utilizó una dosis de 2000 mg/Kg de peso por animal de experimentación, obteniéndose los siguientes resultados:

En la tabla N° 59 se observa la supervivencia y muerte de los animales en estudio en donde se obtuvo 6/6 (6 sobrevivientes de los 6 animales empleados) y ninguna muerte.

Por lo cual se concluye **la DL50 > 2000 mg/Kg** de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” cuando tres o más animales sobreviven según la OECD 425. (ANEXO N° 18)

TABLA N° 60

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LOS ÓRGANOS (HÍGADO, ESTÓMAGO Y RIÑÓN) A DOSIS DE 2000 mg/Kg DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Oenothera rosea* Aiton "YAWAR CHONQ'A"

	LAMINAS	CONGESTIÓN	HEMORRAGIA	EDEMA	ESTEATOSIS	EROSIÓN	NECROSIS	OTROS OBS.
CONTROL	Estómago	Leve	No	Escaso	No	No	No	
	Hígado	Escasa	No	No	No	No	No	Bi-nucleación
	Riñón	No	No	No	No	Leve	Leve	
1	Estómago	Leve	Leve	Escaso	No	No	No	
	Hígado	Escasa	No	No	No	No	No	Linfocitos
	Riñón	No	No	No	No	Leve	Leve	
2	Estómago	Escasa	No	No	No	No	No	
	Hígado	Leve	No	No	No	No	No	
	Riñón	Moderada	No	No	No	No	No	
3	Estómago	Escasa	No	No	No	No	No	
	Hígado	Leve	No	No	No	No	No	Bi-nucleación
	Riñón	Moderada	No	No	No	No	No	
4	Estómago	No	No	Escaso	No	No	No	
	Hígado	No	No	No	No	No	No	
	Riñón	Leve	No	No	No	No	Escasa	
5	Estómago	Escasa	Escasa	Leve	No	No	No	
	Hígado	Escasa	No	No	No	No	No	
	Riñón	No	Leve	No	No	No	No	

FUENTE: Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, Hospital Regional Cusco

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el tabla N° 59 se puede observar el estudio histopatológico de las ratas que recibieron extracto de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" (dosis 2000 mg/Kg) en el cual se realizó la técnica histológica y procesamiento de los órganos como son estómago, hígado y riñón, en los cuales se puede observar la presencia de congestión y hemorragia en los tejidos analizados, pudiéndose contrastar con el control del cual se obtuvieron los siguientes resultados: los estómagos, hígados y riñones se encuentran en normalidad con respecto al control. Además de no observarse alteraciones que evidenciarían signos de toxicidad. Por lo que se concluye que el extracto de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" no presentó efecto tóxico. (ANEXO N° 20)

TABLA N° 61

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LOS ÓRGANOS (HÍGADO, ESTÓMAGO Y RIÑÓN) A DOSIS DE 2000 mg/Kg DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "OJOTILLO"

	LAMINAS	CONGESTIÓN	HEMORRAGIA	EDEMA	ESTEATOSIS	EROSIÓN	NECROSIS	OTROS OBS.
CONTROL	Estómago	Leve	No	No	No	No	No	
	Hígado	No	No	No	No	No	No	
	Riñón	Escasa	No	Cortical	No	No	Leve	Linfocitos
1	Estómago	Leve	No	No	No	No	No	
	Hígado	Escasa	No	No	No	No	No	
	Riñón	No	No	No	No	No	Leve	
2	Estómago	Escasa	No	No	No	No	No	
	Hígado	Leve	No	No	No	No	No	
	Riñón	No	No	Cortical	No	No	No	
3	Estómago	Escasa	No	Escasa	No	No	No	
	Hígado	No	No	No	No	No	No	
	Riñón	Moderada	No	No	No	No	No	
4	Estómago	No	No	No	No	No	No	
	Hígado	No	No	No	No	No	No	
	Riñón	Leve	Leve	Escasa	No	No	Escasa	Linfocitos
5	Estómago	Leve	No	No	No	No	No	
	Hígado	No	No	No	No	No	No	
	Riñón	No	No	No	No	No	No	

FUENTE: Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, Hospital Regional Cusco

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el tabla N° 60 se puede observar el estudio histopatológico de las ratas que recibieron extracto de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" (dosis 2000 mg/Kg) en el cual se realizó la técnica histológica y procesamiento de los órganos como son estómago, hígado y riñón, en los cuales se puede observar la presencia de congestión, edema y necrosis en los tejidos analizados, pudiéndose contrastar con el control del cual se obtuvieron los siguientes resultados: los estómagos, hígados y riñones se encuentran en normalidad con respecto al control. Además de no observarse alteraciones que evidenciarían signos de toxicidad, por lo que se concluye que el extracto de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" no presentó efecto tóxico. (ANEXO N° 20)

NOTA:

No se realizó el estudio de toxicidad aguda por vía oral (Observación de signos y síntomas y el estudio histopatológico) de los extractos clorofórmicos de las hojas y tallo de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” por que ninguno de estos dos extractos presentó actividad antibacteriana frente a ninguna de las dos cepas en estudio por lo cual no ameritaba el sacrificio de animales y no se planteo como objetivo del estudio.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos etanólicos al 70 % de las hojas y tallo de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, los cuales tuvieron un rendimiento de 12.93 % y 24.16 %, respectivamente. De los extractos clorofórmicos se obtuvieron un rendimiento de 1.60 % y 0.80 %, respectivamente.
2. Se determinaron los porcentajes de humedad de las hojas y tallo de la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, obteniendo así el 78.34 % y 54.74 %, respectivamente.

En la prueba de solubilidad los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” son totalmente miscibles en solventes polares y parcialmente miscibles en solventes medianamente polares, insolubles en solventes apolares. Los extractos clorofórmicos son miscibles en solventes apolares e insolubles en solventes medianamente polares y polares.

El análisis fitoquímico cualitativo determinó que ambos extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” presentan abundante cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides; en los extractos clorofórmicos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” no se encontraron metabolitos secundarios de naturaleza polar como compuestos fenólicos y flavonoides. Por lo cual se podría concluir que los flavonoides y compuestos fenólicos posiblemente sean los metabolitos que confieren la actividad antibacteriana de las especies vegetales en estudio.

3. Se determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de las hojas y tallo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 21.17 mm a una concentración de 20 mg/50uL, halo ligeramente menor a los fármacos patrón de Oxacilina y Clindamicina que fueron 30.21 mm y 23.98 mm, respectivamente. Mediante la prueba post hot Scheefe se demostró que existe homogeneidad significativa con Clindamicina y heterogeneidad significativa con Oxacilina.

Se determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 28.66 mm a una concentración de 40 mg/50uL, halo casi igual a los fármacos patrón de Oxacilina y Clindamicina que fueron 30.21 mm y 23.98 mm, respectivamente. Mediante la

prueba post hot Scheefe se demostró que existe homogeneidad significativa con Clindamicina y Oxacilina.

4. Se determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" frente a *Escherichia coli* cepa ATCC 35218, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 17.11 mm, a una concentración de 75 mg/50uL, halo ligeramente menor a los fármacos patrón de Amikacina y Ciprofloxacino que fueron 24.52 mm y 26.24 mm, respectivamente. Mediante la prueba post hot Scheefe se demostró que existe heterogeneidad significativa con Clindamicina y Oxacilina.
5. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 los cuales fueron 0.050 mg/50uL y 0.150 mg/50uL, respectivamente.
Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" frente a *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 y fue de 11 mg/50uL.
6. Los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" no presentaron toxicidad aguda por vía oral confirmándose esto mediante el estudio histopatológico.

En la evaluación de signos en el grupo de Yawar Chonq'a se evidenció la presencia de temblores y letargia en algunos de los animales; en grado leve y en el grupo de Ojotillo, algunos de los animales presentaron temblores, letargia y micción: en grado leve, lo cual no es signo de toxicidad. No se observó variación (disminución) de peso de los animales de experimentación, no existieron diferencias relevantes entre el control y los tratados.

7. Se realizó el estudio histopatológico en el grupo de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" se pudo observar la presencia de congestión y hemorragia (leve) en alguno de los tejidos analizados, pudiéndose contrastar con el control y en el grupo de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" se pudo observar la presencia de congestión, edema y necrosis (leve) en los tejidos analizados, pudiéndose contrastar con el control.

SUGERENCIAS

- A las autoridades universitarias, instalar un bioterio Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica debido a que en los trabajos de investigación se emplean un gran número de animales de experimentación.
- Al personal de salud, fomentar el uso de plantas medicinales, con la difusión de revistas, boletines informativos, medios de comunicación, internet, acerca de los trabajos de investigación en la Universidad.
- Continuar con el estudio de la actividad antibacteriana de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a otras cepas bacterianas estándares y cepas nativas, con el fin de determinar su verdadero potencial antibacteriano, usando modelos experimentales desarrollados y validados.
- Realizar estudios de toxicidad crónica de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, con el fin comprobar su inocuidad a largo plazo.
- Continuar con estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes de los extractos de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” para evaluar su actividad individual y en mezclas, mediante cromatografía.
- Realizar estudios sobre las otras propiedades farmacológicas de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”, usando modelos experimentales desarrollados y validados.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Estrada H., Gamboa M., Chavez C., Arias M.** Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger* - Evaluación de su carga microbiológica. Universidad de Costa Rica. Costa Rica 2006
2. **Aricapa D.** Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogenos pontificia universidad javeriana Colombia 2009.
3. **Soria R.** Estudio Farmacobotánico de *Oenothera multicaulis* R&P. Tesis de Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú 1988.
4. **Scott. Katelyn** La Medicina Tradicional y La Medicina Moderna en Cusco. SIT Perú Otoño 2011 *SIT Graduate Institute - Study Abroad*, kscott3@iwu.edu
5. **Musser J, Kapur V.** Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: Association of the Gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination (en inglés). *J Clin Microbiol* 2002; (30): pp. 2058-63.
6. **Pinzón Sánchez J. J.** Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de anís estrellado *Illicium verum* contra *Staphylococcus epidermitis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá 2010
7. **Villena N. Cesar, Arroyo A. Jorge** Efecto Antiinflamatorio del Extracto Hidroalcohólico de *Oenothera Rosea* (Yawar Socco) En Ratas Con Inducción a la Inflamación Aguda y Crónica. Facultad de Medicina - Universidad Nacional Mayor de San Marcos en su Tesis doctoral Lima, Perú 2012.
8. **Vanessa Díaz Hilda, Fuertes R. César, Roque A. Mirtha.** Efecto Antiagregante Plaquetario *In Vivo* Y Fibrinolítico *In Vitro* del Extracto Etanólico de las hojas de *Oenothera rosea Aiton* (Chupasangre). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú 2011
9. **Gonzales Bellido Janet, Lechuga Chacón Ana Mana, Serrano Flores Carlos A.** Estudio Fitoquímico Comparativo de *Oenothera Rosea* Y *Oenothera Multicaulis* (Yawar Chonq'a) Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima 2001. [internet], 2015. [consultada el 5 de abril del 2015]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2001_n17/estudio.htm
10. **Kasay M. I., Huaman J. & Guerrero M.** Estudio Cualitativo y Cuantitativo de Taninos de la *Oenothera rosea* L 'Hér. Ex Aiton. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú 2013
11. **Anunnaki** Investigación del “efecto de los extractos de *tabebuia obscura* (tahuari negro) y *geranium ayavacense* (pasuchaca) sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental” seguro social de salud – ESSALUD Lima-Perú 2013.
12. **Champion C. Mónica, Vásquez R. Rosario.** Actividad Antibacteriana In Vitro Del Extracto Acuoso de Hojas Y Corteza de *Vismia Angusta* (Pichirina) Sobre Agentes Patógenos. Iquitos - Perú, Año 2013

13. **Mamani Curazi, Belden I.** Actividad Antibacteriana de aceite esencial de *mentha spicata* L. sobre flora mixta salival. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú 2013.
14. **Maraví Inga, Gisella Giovanna.** “Efecto Antibacteriano Y Antifúngico del Aceite Esencial De: Menta Piperita (Menta), *Origanum Vulgare* (Orégano) Y *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luisa) Sobre Streptococcus Mutans Atcc 25175, *Lactobacillus Acidophilus* Atcc 10746 Y *Cándida Albicans* Atcc 90028” lima-Perú 2012
15. **Achahuanco C. Miriam, Aragón P. Patricia.** Actividad Antibacteriana in vivo 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 *Propionibacterium acnés*, y su relación con la Actividad antioxidante. Cusco-Perú 2015.
16. **Rosell Cáceres G.** Determinación del contenido total de polifenoles-flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70% de *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a *Staphylococcus aureus* Cepa ATCC 25923. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2014.
17. **Oviedo Licon, Y. Aiquipa, K.** Estudio comparativo in vitro de la Actividad Antibacteriana de los extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de *Spidium guajava* (sahuinto) y *chenopodium ambrosioides* (paico) frente a bacterias que causan infecciones de las vías respiratorias y determinación de la toxicidad aguda en animales de experimentación. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2011.
18. **Castro Sumaria, V.** Actividad Antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *flourenzia polycephala* M. O. Dillon (Phauca) y elaboración de una forma farmacéutica tópica para su evaluación in vivo en infecciones dérmicas por *Staphylococcus aureus* en ratones albinos. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2011.
19. **Quispe Tapia J. Quiroga Zanabria D.** Determinación de la Actividad Antibacteriana sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, y determinación de la toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcoholico al 70 % de la especie vegetal *Psidium guajava* “sahuinto” Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2012.
20. **Lacuta Huanqui, Carlos G.** Determinación del contenido total de Polifenoles-Flavonoides y Actividad Antibacteriana del Extracto Seco Hidroalcoholico Al 70 % de las Hojas de la especie vegetal de *Populus nigra linnaeus* “Alamo negro” sobre Cepas ATCC de *Propionibacterium acnés* Y *Staphylococcus aureus* Causantes principales de Acné. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2012.
21. **Vega Conza Marilyn.** Actividad antimicótica y antibacteriana in vitro del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Junglans neotropica Diels* (Nogal) sobre *Trichophyton rubrum* y *Staphylococcus epidermidis*, microorganismos causantes de infecciones dérmicas. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2010.

22. **Ccori Ccahuata Flor De Maria, Vilcahuaman Mejia Richard H.** Efecto Antibacteriano y antimicótico in vitro de los extractos hidroalcoholicos, acuoso y clorofórmico de la raíz de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Candida albicans* causantes de infecciones del tracto genitourinario. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú 2009.
23. **Iberico Gustavo** Conocimientos Tradicionales de plantas medicinales de Cajamarca-instituto de cuencas wwpdrs.org.pe
24. **Hurtado, Mp;** de la Parte, MA; Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. (HTML). Rev Soc Ven Microbiol (Venezuela: Scielo): Julio 2002; 22 (2): pp. 112-118. ISSN1315-2556. Consultado el 22 de febrero de 2016.
25. **Lowy, Franklin D.** *Staphylococcus aureus* infections (en inglés, PDF). NEJM (Estados Unidos: Massachusetts Medical Society): 20 de agosto 1998; 339 (8): pp. 520-532. Consultado el 7 de febrero de 2016
26. **Boop Ca, Brener Fw, Wells Jg, Strockbine N.** *Escherichia*, Shigella and Salmonella. En: Manual of clinical microbiology. Muray PR. Jo Baron, MA Ptaller, FC Yolken. The Washington, D.C.E. d. ASM. Press. 1999: 459-474.
27. **Le, J. et al.** Infecciones del Aparato Urinario durante el Embarazo, Annal of pharmacotherapy. Oct; 38 (10): 1692-1701; 2004.
28. Pontificia Universidad Católica de Chile. Infección Urinaria, Diagnóstico y Tratamiento. Boletín Escuela de Medicina. 1997; 26: 150-155.
29. **Mendoza Ticona Carlos Alberto** - Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a la meticilina. - *Rev Med Hered* 14 (4), 2003
30. **García López M. V., et al.** Distribución de los patrones de sensibilidad de *Escherichia coli* intrahospitalario y extrahospitalario y los fenotipos de resistencia asociados durante el año 2005
31. **Goodman Y Gilman** Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Médica Panamericana. México 9^{na} Edición. 1996.
32. **Thomson PLM** Diccionario de especialidades farmacéuticas 2008 edición 54 México, Disponible en: www.thomsonplm.com
33. **Rang H. P. Dale M. M Ritter J. M. Y Flower R. J.** Farmacología sexta edición 2003. www.rinconmedico.net
34. **Madigan Michael T.** Brock Biología de los Microorganismos. 10^a edición. España, Prentice Hall, 2003
35. **Urrunaga Ormachea, Mario Jesus,** actividad antibacteriana de la especie vegetal *acicarpha tribuloides* "estrella kiska" frente a *Escherichia coli* y *Pseudomona eruginosa*, gérmenes causantes de infección del tracto urinario, cusco-Perú. UNSAAC 2003
36. Manual de procedimientos para la Determinación de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Bacterias Aisladas de Humanos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS: buenos aires, argentina, 2001.
37. **Negróni M.** Microbiología Espermatología Fundamentos y Guía de Practica. 2^a Edición Argentina, Editorial Médica Panamericana. 2009.

38. **Guersi A.** Método de Análisis Clínicos y su Interpretación 4ª Ed Buenos Aires Argentina. El Ateneo 1989.
39. **Loomis Ted A. Ph. D.** fundamentos de toxicología-universidad de Washington Seattle, escuela de medicina (E.E.U.U.) traducción de la tercera edición norteamericana Editorial acribia zaragoza-España 1982
40. **IQB.ES** principios de toxicología, última actualización 03/01/2012; disponible en: <http://www.iqb.es/cbasica/farma/farma05/tox/tox02.htm>.
41. **Uribe Zuñiga P.** Manual de procedimientos generales “cáncer cérvico de cuello uterino”, centro nacional de equidad de género y salud reproductiva, 2008, [http://www.génerovsaludreproductiva.gob.mx/.../pdf/MANUAL DE LABORATORIO DE PATOLOGIA. PDF](http://www.génerovsaludreproductiva.gob.mx/.../pdf/MANUAL_DE_LABORATORIO_DE_PATOLOGIA.PDF)
42. **Ariños G.** técnica histológica, 2007 [acceso en agosto del 2015]. Disponible en <http://www.dermato101.com.ar/tecnica.pdf>
43. **Villar De Fresno, Angel.** Farmacognosia general editorial síntesis s.a. año 1999.
44. **Farreras R.** Medicina Interna, Editorial Mosby-Doyma, decimo cuarta edición CD-ROM. Barcelona, España; 2005.
45. **O. LOOCK DE UGAZ,** Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales 2º edición Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima-Perú. FONDO EDITORIAL 1994
46. **DIGESA,** Norma Sanitaria sobre Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano, Cusco-Perú, 1999.
47. **Sacsquispe Contreras Rosa Elena, Velasquez Pomar Jorge,** Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión, Instituto Nacional de Salud, 2002
48. **Colivet J., Marcano G., Belloso G., Brito D., Gomez E.** Efecto Antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de alimentos. Venezuela 2012.
49. Clinical and Laboratory Standards Institute 950 West Valley Road, Suite 2500 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement standard@clsi.org
50. Diccionario Medico Oceano Mosby. Medicina, Efermeria y Ciencias de la Salud. (Sitio en Internet). Acceso 23 de Mayo del 2014. Disponible en <http://evct7h.1fichier.com/>.
51. **Tamayo Tamayo, Mario.:** “El Proyecto de investigacion, serie aprender a investigar. [publicación en línea], disponible desde internet en http://hermesott/portal/home_1/rec/arc_1507.pdf. [con acceso el 30 de julio del 2016].
52. **Muena, V., Gonzales, I., y Neeman A.** efectos del encalado y la fertilización nitrogena sobre el desarrollo de *Oenothera offinis* en un suelo afectado por la minería del cobre – Facultad de Agronomia- Univiersidad Catolica del Valparaiso, Chile 2010

- 53. Stubsgarrd, F.** Humedad de semillas y principio de secado. Danida Forest Seed Centre. Lecture Note C-5.CATIE. Serie Tecnica. Manual Tecnico. 1997; N° 24:1-37.
- 54. Cabrera, J.L.** Determinación de Metabolitos Secundarios En Tres Pteridofitos, Plantas Con Interés Medicinal (Tesis de Pregrado). Facultad de Ciencias Biologicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 2014.
- 55.** Guía de Ingeniería Agroforestal. Open Course Ware. Universidad Politécnica de Madrid. Uso Tradicional de Plantas Aromáticas y Medicinales: Tema 6: Los Principios Activos de las Plantas Aromáticas y Medicinales. Sitio en internet: ocv.upm.es/ingeniería-agroforestal-uso-industrial-de-plantas-aromáticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/.pdf (con acceso al 18 de octubre del 2016).

ANEXO N° 1

IDENTIFICACIÓN BOTANICA DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 258156 - 238173 - 222512
- RECTORADO
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 242370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEO INKA
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRÓNOMICO K'AYRA
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

EL QUE SUSCRIBE PROFESOR INVESTIGADOR ASOCIADO AL HERBARIO VARGAS

(CUZ)

C E R T I F I C A .

Que las Señoritas **Yeni Huamán Enriquez** y **Yaneth Roxana Oroche Soto**, Bachilleres de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Físicas, Químicas, Matemáticas, Informática y Farmacia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado a la Dirección del Herbario (CUZ), dos especímenes de plantas herborizadas para su determinación taxonómica, las que al ser diagnosticadas utilizando claves dicotómicas, consultas con bibliografía especializada y comparación con muestras del Herbario, pertenecen a las especies *Oenothera rosea* y *Geranium sessiliflorum*, las mismas que en concordancia con el Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group. APG III - 2009), presentan las siguientes posiciones taxonómicas:

Clase Equisetopsida
Subclase Magnoliidae
Superorden Rosanae
Orden Myrtales
Familia Onagraceae
Género *Oenothera*
Especie *Oenothera rosea* Aiton

Sinonimias: *Oenothera psychrophila* Ball, *Oenothera rubra* Cavanilles, *Oenothera virgata* R. & P., *Xylopleurum roseum* (Aiton) Raimann

Nombres comunes: Yahuar ch'oncca, Yahuar chunca, Puca yahuarch'oncca, Chupa sangre

Clase Equisetopsida
Subclase Magnoliidae
Superorden Rosanae
Orden Geraniales
Familia Geraniaceae
Género *Geranium*
Especie *Geranium sessiliflorum* Cavanilles

Sinonimias: *Geranium caespitosum* Walpers, *G. razuhilcaense* Knuth, *G. sessiliflorum* var. *albatum* J. F. Macbride

Nombres comunes: Ojotilla, Ojotillo, Chile ojotillo.

Se expide la presente certificación para fines de investigación.

Cusco, 22 de julio del 2015.



Prof. Lic. Dr. Carlos E. Vargas
Herbario Vargas (CUZ)

ANEXO N° 2

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

MicroBioLogics® Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release																																																																																										
Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0360 Lot Number: 36076 Reference Number: ATCC® 25923™ Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2016/04		Additional Information Release Information: Quality Control Technologist: Kelly Ehnes Release Date: 2011-06-02 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.																																																																																								
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																																																																																								
Vitek GP <table border="0"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE I</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCURONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>POLYHIXIN B RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td>-</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td>+</td></tr> <tr><td>PULLULAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RAFFINOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>+</td></tr> <tr><td>SALICIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 2</td><td>+</td></tr> <tr><td>OPTOCHIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr> </tbody> </table>		Phenotypic Features	Results	D-AMYGDALIN	-	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	D-XYLOSE	-	ARGININE DIHYDROLASE I	+	BETA-GALACTOSIDASE	-	ALPHA-GLUCOSIDASE	+	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	CYCLODEXTRIN	-	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-	ALPHA-MANNOSIDASE	-	PHOSPHATASE	+	Leucine ARYLAMIDASE	-	L-Proline ARYLAMIDASE	-	BETA GLUCURONIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+	BETA-GLUCURONIDASE	-	Alanine ARYLAMIDASE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	D-SORBITOL	-	UREASE	-	POLYHIXIN B RESISTANCE	+	D-GALACTOSE	-	D-RIBOSE	-	L-LACTATE alkalization	+	LACTOSE	-	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	D-MALTOSE	+	BACITRACIN RESISTANCE	+	NOVOBIOCIN RESISTANCE	-	GROWTH IN 6.5% NaCl	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+	PULLULAN	-	D-RAFFINOSE	-	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	SALICIN	-	SACCHAROSE/SUCROSE	+	D-TREHALOSE	+	ARGININE DIHYDROLASE 2	+	OPTOCHIN RESISTANCE	+	Other Features/Challenges: Results Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive Coagulase (rabbit plasma-tube): positive Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm  AUTHORIZED SIGNATURE
Phenotypic Features	Results																																																																																									
D-AMYGDALIN	-																																																																																									
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-																																																																																									
D-XYLOSE	-																																																																																									
ARGININE DIHYDROLASE I	+																																																																																									
BETA-GALACTOSIDASE	-																																																																																									
ALPHA-GLUCOSIDASE	+																																																																																									
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																									
CYCLODEXTRIN	-																																																																																									
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-																																																																																									
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-																																																																																									
ALPHA-MANNOSIDASE	-																																																																																									
PHOSPHATASE	+																																																																																									
Leucine ARYLAMIDASE	-																																																																																									
L-Proline ARYLAMIDASE	-																																																																																									
BETA GLUCURONIDASE	-																																																																																									
ALPHA-GALACTOSIDASE	-																																																																																									
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+																																																																																									
BETA-GLUCURONIDASE	-																																																																																									
Alanine ARYLAMIDASE	-																																																																																									
Tyrosine ARYLAMIDASE	-																																																																																									
D-SORBITOL	-																																																																																									
UREASE	-																																																																																									
POLYHIXIN B RESISTANCE	+																																																																																									
D-GALACTOSE	-																																																																																									
D-RIBOSE	-																																																																																									
L-LACTATE alkalization	+																																																																																									
LACTOSE	-																																																																																									
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+																																																																																									
D-MALTOSE	+																																																																																									
BACITRACIN RESISTANCE	+																																																																																									
NOVOBIOCIN RESISTANCE	-																																																																																									
GROWTH IN 6.5% NaCl	+																																																																																									
D-MANNITOL	+																																																																																									
D-MANNOSE	+																																																																																									
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+																																																																																									
PULLULAN	-																																																																																									
D-RAFFINOSE	-																																																																																									
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+																																																																																									
SALICIN	-																																																																																									
SACCHAROSE/SUCROSE	+																																																																																									
D-TREHALOSE	+																																																																																									
ARGININE DIHYDROLASE 2	+																																																																																									
OPTOCHIN RESISTANCE	+																																																																																									

ANEXO N° 3

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LA CEPA *Escherichia coli* ATCC 35218

MicroBiologics®		
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release		
Specifications	Additional Information	
Microorganism Name: <i>Escherichia Coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-69 Reference Number: ATCC® 35218™ Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2016/08	Release Information: Quality Control Technologist: Kelly Ehnes Release Date: 2014-08-05 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.	
Performance		
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic.	Medium: SBAP	
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Method: Gram Stain	
Vitek GP	Other Features/Challenges: Results	
Phenotypic Features	Results	Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive Coagulase (rabbit plasma-tube): positive Amikacin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm Gentamicin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm
D-AMYGDALIN	-	
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-	
D-XYLOSE	-	
ARGININE DIHYDROLASE 1	+	
BETA-GALACTOSIDASE	-	
ALPHA-GLUCOSIDASE	+	
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	
CYCLODEXTRIN	-	
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	+	
ALPHA-MANNOSIDASE	-	
PHOSPHATASE	+	
Leucine ARYLAMIDASE	-	
L-Proline ARYLAMIDASE	-	
BETA GLUCURONIDASE	-	
ALPHA-GALACTOSIDASE	+	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	
BETA-GLUCURONIDASE	+	
Alanine ARYLAMIDASE	-	
Tyrosine ARYLAMIDASE	-	
D-SORBITOL	+	
UREASE	-	
POLYMXIN B RESISTANCE	-	
D-GALACTOSE	+	
D-RIBOSE	-	
L-LACTATE alkalization	+	
LACTOSE	-	
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	-	
D-MALTOSE	+	
BACITRACIN RESISTANCE	-	
NOVORIOICIN RESISTANCE	-	
GROWTH IN 6.5% NaCl	-	
D-MANNITOL	+	
D-MANNOSE	+	
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+	
PULLULAN	-	
D-RAFFINOSE	-	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	
SALICIN	-	
SACCHAROSE/SUCROSE	+	
D-TREHALOSE	+	
ARGININE DIHYDROLASE 2	+	
OPTICIN RESISTANCE	+	
		 AUTHORIZED SIGNATURE

ANEXO N° 4

CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO
CERTIFICADO SANITARIO N° 281 - 2015	
Producto : Rata albina	Lote N° : R-11 - 2015
Especie : <i>Rattus norvegicus</i>	Cantidad : 14
Cepa : Holtzman	Edad : 1 mes ½
Peso : 80 a 110 Gr.	Sexo : hembras
G.R. : 032075	Destino : Oroche Soto, Yaneth Roxana Cuzco
Fecha : 24- 04 - 2015	
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández, Coordinador de Bioterio, Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, cuarentena y control Sanitario para animales de experimentación.</p>	
Chorrillos, 25 de Abril del 2015 (Fecha de recojo y emisión del certificado)	
NOTA : El bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.	 Arturo Rosales Fernández. M.V., C.M.V.P. 1586

ANEXO N° 5

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

1. COMPUESTOS FENOLICOS:

A 0.5 ml de extracto agregar 1 o 2 gotas de cloruro férrico al 1 %, la presencia de precipitados o coloraciones azules o verdosas indican prueba positiva para compuestos fenólicos.

2. ALCALOIDES:

Reacción de Dragendorff; a 0.4 ml de solución acida agregar 2 o 3 gotas del reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado naranja o marrón indica la presencia de alcaloides.

3. LACTONAS:

Prueba de hidroxamato Férrico: a 0.5 ml de solución etanólica con 0.5 mg de muestra sólida agregar 0.5 ml de clorhidrato de hidroxalmina 0.5 N en etanol más 0.1 ml de KOH 2N, enfriar y acidular con 3 gotas de HCl 0.5 N, luego se adiciona 3 gotas de cloruro férrico al 1 %, si se observa una coloración violácea es reacción positiva.

4. QUINONAS:

Reacción de Borntrager: a 0.5 ml de extracto agregar 0.5 ml de KOH al 5 %, calentar, filtrar si es necesario, enfriar y acidular, luego extraer con benceno, a la fase de benceno separada agregar 0.5 ml de hidróxido de amonio. La coloración rojo en la fase de amoniaco indica presencia de naftoquinonas y antraquinonas.

5. FLAVONOIDES:

Reacción de Shinoda: a 0.5 ml de extracto agregar unas limaduras de magnesio más 2 a 3 gotas de HCl concentrado, coloraciones rojizas o amarillentas indican prueba positiva.

6. TANINOS:

A 0.5ml de extracto agregar 3 a 5 gotas de la solución de gelatina – NaCl al 1 %, la formación de un precipitado indica reacción positiva.

7. SAPONINAS:

Prueba de la espuma: a un tubo de ensayo que contenga 2 ml de extracto, diluir 5 veces su volumen en agua y agitar vigorosamente por 30 segundos, la formación de espuma persistente por 30 minutos indica prueba positiva.

8. GLICOSIDOS:

A 200mg de extracto se le agrega 2ml de HCl al 1 % refluja por minutos, enfriar y neutralizar con NaOH al 1% la formación de un precipitado rojo ladrillo indica prueba positiva.

FUENTE: O.LOOCK DE UGAZ, investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales 2da edición, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima- Perú, FONDO EDITORIAL, 1994.

ANEXO N° 6

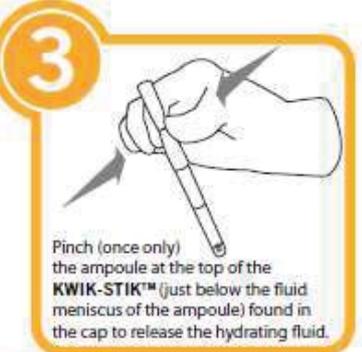
INSTRUCCIONES PARA LA ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS ATCC – KWIK-STIK

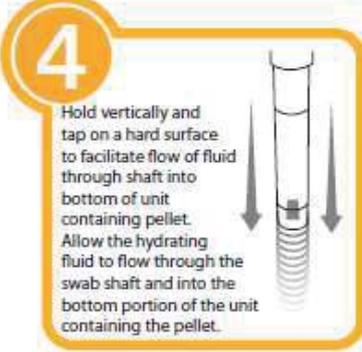
KWIK-STIK™ Instructions for Use

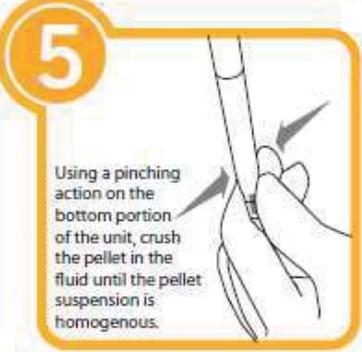
Please add the packaging option to the catalog number when placing an order: P = KWIK-STIK™ 2 Pack, K = KWIK-STIK™ 6 Pack. Example: 0335P, 0335K

- 

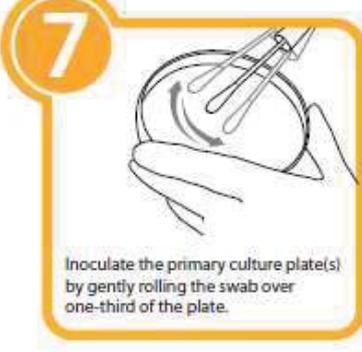
Allow the unopened KWIK-STIK™ pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK™ unit.
- 

Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble the device during hydration.
- 

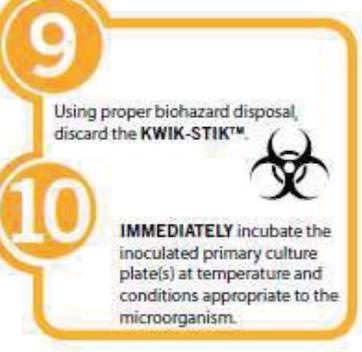
Pinch (once only) the ampoule at the top of the KWIK-STIK™ (just below the fluid meniscus of the ampoule) found in the cap to release the hydrating fluid.
- 

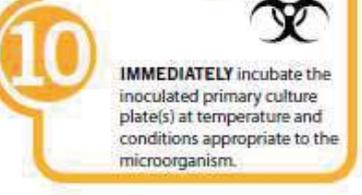
Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet. Allow the hydrating fluid to flow through the swab shaft and into the bottom portion of the unit containing the pellet.
- 

Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the pellet suspension is homogenous.
- 

IMMEDIATELY heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to agar medium.
- 

Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
- 

Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 

Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK™.
- 

IMMEDIATELY incubate the inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

FUENTE: Visit www.microbiologics.com or call 320.253.1640 to place your order!

ANEXO N° 7

AGAR MUELLER HINTON

INDICACIONES:

Para el ensayo de la solubilidad, para ensayo de resistencia de agentes patógenos clínicamente importantes frente a antibióticos y sulfamidas, para realización del ensayo de difusión en placas, para mejorar de forma considerable del crecimiento de microorganismos exigentes, puede añadirse agar sangre al agar Mueller Hinton.

CARACTERÍSTICAS:

La composición de estos medios de cultivo, por una parte condiciones favorables de crecimiento y por otra parte, cuneta con la ausencia, muy considerable de antagonistas de las sulfamidas.

COMPOSICIÓN:

Carne de infusión.....	2.0g
Acido hidrolizado de caseína.....	17.5g
Agar.....	13.0g
Almidón.....	1.5g

pH: 7.4+-0.2 a 25 °C

PREPARACIÓN:

Disolver 34g en 1000ml de agua destilada y esterilizar con cuidado en autoclave durante 15 minutos a 122°C, enfriar eventualmente a 45-50°C posteriormente verter en placas Petri dejar endurecer, para pruebas de control de calidad de la muestra, incubar a 37°C por 24 horas posteriormente queda listo para ser utilizada.

FUENTE: extraído de las etiquetas de cultivo de MERCK

ANEXO N° 8

CALDO DE CEREBRO CORAZON (Brain Heart Infusión)

INDICACIONES:

Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes.

CARACTERISTICAS:

Adecuado para el cultivo de diversas bacterias exigentes. También se utiliza para la preparación de inóculos para el uso de la susceptibilidad a los antimicrobianos.

COMPOSICIÓN:

Caldo de cerebro.....	200mg
Caldo de corazón.....	250mg
Glucosa.....	2.0mg
Cloruro de sodio.....	5.0mg
Hidrogeno fosfato disódico.....	2.5mg

pH: 7.4+-0.2, a 25°C

PREPARACIÓN:

Disolver 37mg en 1000mg de agua destilada y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

FUENTE: extraído de las etiquetas de medios de cultivo MERCK

ANEXO N° 9

TSA: TRYPTICASE SOJA AGAR

INDICACIONES

Es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias, aunque no es medio de elección para anaerobios permite visualizar reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas.

CARACTERISTICAS:

Tiene por base una fuente proteica (digeridos trópticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre.

COMPOSICIÓN:

Digerido pancreático de caseína.....	15.0g
Digerido papaico de haba de soja.....	5.0g
Cloruro sódico.....	5.0g
Agar.....	15.0g
Factores de crecimiento.....	1.5g
Sangre desfibrinada de carnero.....	50.0ml

FUENTE: extraído de las etiquetas de medios de cultivo MERCK

ANEXO N°10

FICHA DE DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

<i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq´a”				
N° DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1				
2				
3				
<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”				
N° DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1				
2				
3				

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N° 11

FICHA DE DATOS PARA EL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

<i>Oenothera rosea</i> Aiton “Yawar Chonq’a”	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles “Ojotillo”	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N° 12

FICHA DE DATOS PARA LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

SOLVENTE	<i>Oenothera rosea</i> Aiton "Yawar Chonq'a"		<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "Ojotillo"	
	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO
Agua destilada				
Solución salina				
Metanol				
Etanol del 40%				
Etanol del 70%				
Etanol del 96%				
Acetona				
Acetato de etilo				
Cloroformo				
Hexano				
Eter de petróleo				

FUENTE: Elaboración propia

LEYENDA:

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

ANEXO N° 13

FICHA DE DATOS PARA EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

TIPO DE PRUEBA	<i>Oenothera rosea</i> Aiton "Yawar Chonq'a"		<i>Geranium sessiliflorum</i> Cavanilles "Ojotillo"	
	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO CLOROFÓRMICO
Alcaloides				
Rvo. Wagner				
Rvo. dragendorf				
Lactonas				
Quinonas				
Compuestos fenólicos				
Flavonoides				
Taninos				
Saponinas				
Glicosidos				
Nucleos esteroideos				

FUENTE: Elaboración propia

LEYENDA:

- Abundante cantidad +++
- Regular cantidad ++
- Poca cantidad +
- Ausencia -

ANEXO N°14

FICHA DE DATOS PARA EL ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS DE LAS RATAS

RATA	CORTES	N° DE LAMINA	CONGESTION	EDEMA	ESTEATOSIS	EROCION	NECROSIS	REACTIVOS
CONTROL	Estómago							
	Hígado							
	Riñón							
G1	Estómago							
	Hígado							
	Riñón							
G2	Estómago							
	Hígado							
	Riñón							
G3	Estómago							
	Hígado							
	Riñón							
G4	Estómago							
	Hígado							
	Riñón							
G5	Estómago							
	Hígado							
	Riñón							

FUENTE: Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, Hospital Regional Cusco

LEYENDA:

- L: Leve
- M: Moderada
- S: Severa

ANEXO N° 15

FICHA DE DATOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS

Lugar:.....

Temperatura ambiente:..... temperatura de incubadora:.....

Tiempo de incubación:.....

Fecha:/...../.....

Hora:.....

Cepa ATCC:

TUBOS	DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (100 mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO
N°1			
N°2			
N°3			
N°4			
N°5			
N°6			
N°7			
N°8			
N°9			
N°10			
N°11			
N°12			
N°13			
N°14			
N°15			
N°16			
N°17			
N°18			
N°19			
N°20			

FUENTE: Elaboración propia

LEYENDA:

(+) = Muy turbio

(+/-) = Ligeramente turbio

(-) = Sin turbidez

ANEXO N° 16

FICHA DE DATOS PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Lugar:.....

Temperatura ambiente:..... temperatura de incubadora:.....

Tiempo de incubación:.....

Fecha:/...../.....

Hora:.....

Cepa ATCC:

N°	Concentración del extracto en (mg/50uL)	Diámetro de los halos de inhibición (mm) para <i>Cepa</i> ATCC			
		I	II	III	Promedio
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

FUENTE: Elaboración propia

Observaciones:.....

Responsables:.....

ANEXO N° 17

FICHA DE DATOS DE SIGNOS DEL ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

SIGNOS	TIEMPO	EXTRACTO YAWAR CHONQ'A 2000 mg/kg						EXTRACTO DE OJOTILLO 2000 mg/kg					
		C1	R1	R2	R3	R4	R5	C2	R1	R2	R3	R4	R5
Lagrimeo	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Secreción nasal	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Salivación	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Temblores	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Micción	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Diarrea	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Dolor	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Convulsiones	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Frecuencia respiratoria	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Letargia	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Somnolencia	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												
Muerte	30 minutos 1 hora 4 horas 24 horas												

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO N° 18

OCDE PARA VERIFICACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS TOXICIDAD ORAL AGUDA UP-AND-DOWN-PROCEDIMIENTO (UDP)

1. Directrices de la OCDE para los ensayos con productos químicos son revisados periódicamente a la luz de la información científica el progreso o el cambio de las prácticas de evaluación. El concepto del enfoque de las pruebas de arriba a abajo fue el primero descrito por Dixon y Mood. En 1985, Bruce propone utilizar un procedimiento de arriba a abajo (UDP) para la determinación de la toxicidad aguda de los productos químicos. Existen varias variaciones de la upand-down diseño experimental para la estimación de una DL50. Esta guía se basa en el procedimiento de Bruce aprobado por la ASTM en 1987 y revisado en 1990. Un estudio que compara los resultados obtenidos con el UDP, la prueba DL50 convencional y el método de dosis fija (FDP, OECD TG 420) fue publicado en 1995. Desde principios de los papeles de Dixon y Mood, trabajos han continuado apareciendo en el biométrica y la literatura aplicada, el examen de las mejores condiciones para el uso del enfoque. Sobre la base de las recomendaciones de varias reuniones de expertos en 1999, se considera una revisión adicional oportuna debido a que:

- Se ha llegado a un acuerdo internacional sobre los valores límite de DL50 armonizado para la clasificación de las sustancias químicas.
- Las pruebas en un sexo (normalmente hembras) se considera generalmente suficiente.
- A fin de que una estimación puntual para ser significativa, hay una necesidad de estimar la confianza intervalos (CI).

2. El procedimiento de ensayo descrito en la presente orientación es de valor para reducir al mínimo el número de animales requieran para estimar la toxicidad oral aguda de una sustancia química. Además de la estimación de la DL50 y los intervalos de confianza, la prueba permite la observación de signos de toxicidad. Revisión de TG 425 se llevó a cabo simultáneamente con la revisión de las directrices de examen 420 y 423.

3. Guía para la selección del método de ensayo más adecuado para un propósito determinado se puede encontrar en el Documento de orientación sobre Ensayos de la Toxicidad Oral. Este documento guía contiene también información complementaria sobre la realización e interpretación de la Directriz 425.

4. Las definiciones utilizadas en el contexto de la presente pauta se establecen en el anexo 1.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. El laboratorio de ensayo debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia de ensayo antes de la realización del estudio. Dicha información incluirá

la estructura de la identidad y la química de la prueba sustancia; sus propiedades físico-químicas; los resultados de cualquier otra in vitro o en ensayos de toxicidad in vivo en el sustancia; los datos toxicológicos de sustancias estructuralmente relacionadas o mezclas similares; y la esperada utilizar de la sustancia. Esta información es útil para determinar la pertinencia de la prueba para la protección de la salud humana y el medio ambiente, y ayudará en la selección de una dosis inicial adecuada.

6. El método permite la estimación de un LD50 con un intervalo de confianza y los resultados permiten una sustancia que va a ordenar y clasificar de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado para la clasificación de los productos químicos que causan toxicidad aguda.

7. Cuando no hay información disponible para hacer una estimación preliminar de la DL50 y la pendiente de la curva dosis-respuesta, los resultados de las simulaciones por ordenador han sugerido que comienza cerca de 175 mg / kg y el uso de unidades de medio de registro (que corresponde a una progresión dosis de factor 3.2) entre las dosis producirá la mejor resultados. Esta dosis inicial debe ser modificada si la sustancia es probable que sea altamente tóxico. El medio-log espaciado prevé un uso más eficiente de los animales, y aumenta la precisión en la predicción de la LD50 valor. Debido a que el método tiene un sesgo hacia la dosis inicial, es esencial que la dosis inicial se produce a continuación la DL50 estimado. (Véanse el párrafo 32 para la discusión de las secuencias de dosis y el inicio valores). Sin embargo, para los productos químicos con gran variabilidad (es decir, poco profundas laderas de dosis-respuesta), el sesgo puede seguir siendo introducido en las estimaciones de letalidad y la DL50 tendrá un gran error estadístico, similar a otra aguda métodos de toxicidad. Para corregir esto, la prueba principal incluye una regla de parada introducido a las propiedades de la estimar en lugar de un número fijo de observaciones del ensayo (véase el apartado 33).

8. El método es más fácil de aplicar a los materiales que producen la muerte dentro de uno o dos días. El método no sería práctico utilizar la muerte cuando un retraso considerable (cinco días o más) se puede esperado.

9. Las computadoras se usan para facilitar los cálculos de animal por animal que establecen secuencias de prueba y proporcionar estimaciones finales.

10. Las sustancias de ensayo, a dosis que se sabe que causa dolor y angustia marcada debido a la corrosión o severamente las acciones irritantes, no tienen por qué ser administrados. Los animales moribundos o animales claras de dolor o mostrando signos de sufrimiento intenso y continuo se mató con humanidad, y se consideran en el interpretación de los resultados de las pruebas de la misma manera como los animales que murieron en la prueba. Criterios para tomar la decisión de matar a moribundos o gravemente sufren los animales, y la guía para el

reconocimiento de predecible o la muerte inminente son objeto de un documento de la OCDE orientativo.

11. Una prueba de límite puede ser utilizado eficientemente para identificar productos químicos que son propensos a tener baja toxicidad.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA DE LÍMITE

12. El ensayo límite es una prueba secuencial que utiliza un máximo de 5 animales. Una dosis de prueba de 2000 o excepcionalmente, se puede utilizar 5000 mg / kg. Los procedimientos para realizar pruebas en 2000 y 5000 mg / kg son un poco diferente (véanse los párrafos 23-25 para ensayo límite a 2000 mg / kg y los párrafos 26-30 de ensayo límite a 5000 mg / kg). La selección de un plan de prueba secuencial aumenta el poder estadístico y también se ha hecho para sesgar intencionalmente el procedimiento hacia el rechazo de la prueba de límite para los compuestos con DL50 cerca del límite dosis; es decir, a errar por el lado de la seguridad. Como con cualquier protocolo de prueba de límite, la probabilidad de correctamente la clasificación de un compuesto disminuirá a medida que la DL50 real más cerca se asemeja a la dosis límite.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA PRINCIPAL

13. La prueba principal se compone de una sola dosis progresión ordenada en la que se dosifican los animales, de una en una tiempo, en un mínimo de intervalos de 48 horas. El primer animal recibe una dosis de un paso por debajo del nivel de los mejores niveles de estimación de la DL50. Si el animal sobrevive, la dosis para el siguiente animal se incrementa por [un factor de] 3,2 veces la dosis inicial; si muere, la dosis para el siguiente animal se reduce en una progresión dosis similar. (Nota: 3.2 es el factor por defecto que corresponde a una progresión de la dosis de la mitad unidad de registro Párrafo 32. proporciona orientación adicional para la elección del factor de separación dosis.) Cada animal debe observarse atentamente los hasta 48 horas antes de tomar una decisión sobre si y cuánto dosificar el siguiente animal. Esa decisión se basa en el patrón de supervivencia de 48 horas de todos los animales hasta ese momento. (Véanse los párrafos 31 y 35 de elección del intervalo de dosificación). Una combinación de criterios de parada se utiliza para mantener el número de animales bajos mientras se ajusta el patrón de dosificación para reducir el efecto de un valor de partida pobres o baja pendiente (véase el párrafo 34). La dosificación se detuvo cuando uno de estos criterios se cumple (véanse los párrafos 33 y 41), momento en el cual una estimación de la DL50 y un intervalo de confianza se calculan para el ensayo basado en el estado de todo el animales en extinción. Para la mayoría de las aplicaciones, las pruebas se completarán con sólo 4 animales después de la inicial reversión en el resultado animal. La DL50 se calcula utilizando el método de máxima verosimilitud (Véanse los párrafos 41 y 43.)

14. Los resultados del procedimiento de prueba principal sirven como punto de partida para un procedimiento de cálculo de proporcionar una estimación del intervalo de

confianza cuando sea posible. Una descripción de la base de este CI se describe en el párrafo 45.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de especies animales

15. Las especies de roedores preferidos es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se utilizan ratas hembra. Esto se debe a que la bibliografía sobre los ensayos convencionales de DL50 muestra que por lo general hay poca diferencia en la sensibilidad entre los sexos, pero en aquellos casos en que se observen diferencias, hembras son generalmente un poco más sensible. Sin embargo, si el conocimiento de la toxicológica o toxicocinéticos propiedades de las sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que los hombres tienden a ser más sensibles este sexo debe ser utilizado. Cuando la prueba se llevó a cabo en los machos, deberá justificarse adecuadamente previsto.

16. Deben emplearse 16 animales adultos jóvenes de cepas de laboratorio de uso común. Saludables. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Al inicio de su dosificación, cada animal debe ser entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo de $\pm 20\%$ del medio inicial de peso de los animales previamente tratados.

Alojamiento y alimentación

17. La temperatura en la sala de experimentación ha de ser de 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Aunque la relativa. La humedad debe ser al menos 30% y preferiblemente no exceda del 70%, salvo durante limpieza de la habitación, el objetivo debe ser 50 a 60%. La iluminación debe ser artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales se alojan individualmente. Para la alimentación, las dietas de laboratorio de roedores convencionales se pueden usar con un suministro ilimitado de agua potable.

Preparación de los animales

18. Los animales son seleccionados al azar, se marcan para permitir la identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de la dosificación para permitir su aclimatación a las condiciones de laboratorio. Al igual que con otros diseños de pruebas secuenciales, se debe tener cuidado para asegurarse de que los animales están disponibles en el tamaño adecuado y rango de edad para todo el estudio.

Preparación de las dosis

19. En las sustancias de ensayo generales debe administrarse en un volumen constante en el rango de dosis de ser probado mediante la variación de la concentración de la preparación de la dosificación. Cuando un producto final líquido o mezcla es a ensayar, sin embargo, el uso de la sustancia de ensayo sin diluir, es decir, a una concentración constante, puede ser más relevante para la evaluación del riesgo posterior de esa sustancia, y es un requisito reglamentario de algunas autoridades.

En cualquier caso, no se debe sobrepasar el volumen máximo de dosis para la administración. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal de ensayo. En roedores, el volumen no debe exceder de 1 ml / 100 g de peso corporal; sin embargo, en el caso de las soluciones acuosas, 2 ml / 100g de peso corporal pueden ser consideradas. Con respecto a la formulación de las preparaciones, se recomienda siempre que sea posible el uso de una solución / suspensión / emulsión acuosa, seguido en orden de preferencia por una solución / suspensión / emulsión en aceite (aceite de maíz, por ejemplo) y luego, posiblemente, disolución en otros vehículos. Para los vehículos distintos del agua, las características toxicológicas del vehículo debe ser conocido. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que la estabilidad del preparado durante el período durante el cual es conocido y demostrado ser aceptable se va a utilizar.

PROCEDIMIENTO

La administración de dosis

20. La sustancia de ensayo se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o una adecuada cánula de intubación. En la circunstancia inusual que una sola dosis no es posible, la dosis se puede administrar de fracciones más pequeñas durante un período no superior a 24 horas.

21. Los animales deben estar en ayunas antes de la administración (por ejemplo, con la rata, comida, pero no deben tomar agua durante la noche; con el ratón, comida, pero no deben tomar agua durante 3-4 horas). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán y la sustancia de ensayo administrada. El peso corporal de ayuno cada animal es determinado y la dosis se calcula según el peso corporal. Después de que la sustancia tiene ha administrado, podrá continuarse el ayuno durante unas 3-4 horas en ratas o ratones en 1-2 horas. Cuando una dosis se administra en fracciones durante un período de tiempo, puede ser necesario proporcionar a los animales con comida y agua dependiendo de la longitud del período.

Ensayo límite y principal de la prueba

22. El ensayo límite se utiliza principalmente en situaciones en las que el experimentador tiene información que indica que el material de ensayo es probable que sea no tóxico, es decir, que tiene toxicidad por debajo de las dosis límite de regulación. Información acerca de la toxicidad del material de prueba puede ser adquirida a partir del conocimiento sobre compuestos similares sometidos al ensayo o mezclas o productos similares sometidos a ensayo, teniendo en cuenta la identidad y el porcentaje de componentes se sabe que son de importancia toxicológica. En aquellas situaciones donde hay poca o ninguna información acerca su toxicidad, o en el que se espera que el material de prueba a ser tóxico, la prueba principal se debe realizar.

PRUEBA LÍMITE - PRUEBA LÍMITE A 2000 MG / KG

23. Dosis un animal a la dosis de prueba. Si el animal muere, llevar a cabo la prueba principal para determinar la DL50. Si el animal sobrevive, la dosis cuatro animales adicionales secuencialmente de modo que un total de cinco animales se probado. Sin embargo, si hay tres animales mueren, el ensayo límite se termina y se realiza el examen principal. La DL50 es mayor que 2000 mg / kg, si tres o más animales sobreviven. Si un animal muere inesperadamente altas horas de la estudian, y hay otros sobrevivientes, es apropiado para detener la dosificación y observar todos los animales para ver si otra animales también morirán durante un período de observación similar (véase el apartado 31 para el período de observación inicial). Las muertes tardías deben contarse lo mismo que otras muertes. Los resultados se evalúan de la siguiente manera (O = supervivencia, X = muerte).

24. El LD50 es menor que la dosis de prueba (2,000 mg / kg) cuando tres o más animales mueren.

O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

Si un tercer animal muere, llevar a cabo el ensayo definitivo.

25. Prueba de cinco animales. La DL50 es mayor que la dosis de prueba (2,000 mg / kg) cuando tres o más animales sobreviven.

O OO OO
O OO XO
O OO OX
O OO XX
O XO XO
O OO XO / X
O OX XO
O OX OO / X
O OO XX

PRUEBA LÍMITE A 5000 MG / KG

26. Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, el uso de una dosis a 5000 mg / kg pueden ser considerados (véase el anexo 4). Por razones de bienestar de los animales, las pruebas de los animales en GHS Categoría 5 (2000-5000mg / kg) se desalienta y sólo deben ser considerados cuando hay una fuerte probabilidad de que los resultados de esta prueba tienen una relevancia directa para la protección de la salud humana o animal o para el ambiente.

27. Dosis un animal a la dosis de prueba. Si el animal muere, llevar a cabo la prueba principal para determinar la DL50. Si el animal sobrevive, la dosis de dos animales

más. Si ambos animales sobreviven, la DL50 es mayor que se termina la dosis límite y la prueba (es decir, llevada a la plena observación de 14 días sin dosificación de más animales).

28. Si uno o ambos animales mueren, entonces la dosis otros dos animales adicionales, uno a la vez. Si un animal inesperadamente muere tarde en el estudio, y hay otros sobrevivientes, es apropiado para detener la dosificación y observar todos los animales para ver si otros animales también morirán durante un período de observación similar (véase el párrafo 10 para el período de observación inicial). Las muertes tardías deben contarse lo mismo que otras muertes. Los resultados son evaluado de la siguiente manera (O = supervivencia, X = muerte, y U = innecesario).

29. El LD50 es menor que la dosis de prueba (5,000 mg / kg) cuando tres o más animales mueren.

O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

30. El LD50 es mayor que la dosis de prueba (5,000 mg / kg) cuando tres o más animales sobreviven.

O OO
O XO XO
O O XO
O OX XO
O O OX
O OO XX

De la prueba Principal

31. animales individuales se dosifican en secuencia por lo general a las 48 h intervalos. Sin embargo, los intervalos de tiempo entre la dosificación se determina por la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de un animal en la siguiente dosis debe retrasarse hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados. El tiempo intervalo puede ser ajustado según el caso, por ejemplo, en caso de respuesta concluyente. La prueba es más simple de poner en práctica cuando se usa un solo intervalo de tiempo para la toma de decisiones de dosificación secuenciales. Sin embargo, es No es necesario volver a calcular la dosificación o la verosimilitud de los coeficientes si el intervalo de tiempo cambia midtest. Para seleccionar la dosis inicial, toda la información disponible, incluida la información sobre las sustancias y estructuralmente relacionados resultados de cualesquiera otras pruebas de toxicidad en el material de ensayo, se deben utilizar para aproximar la DL50, así como la pendiente de la curva de dosis-respuesta.

32. El primer animal se dosifica un paso por debajo de la mejor estimación preliminar de la DL50. Si el animal sobrevive, el segundo animal recibe una dosis más alta. Si el primer animal muere o parece moribundo, el segundo animal recibe una dosis más baja. El factor de progresión dosis debe ser elegido para ser el antilogaritmo de $1 /$ (la estimado pendiente de la curva de dosis-respuesta) y debe permanecer constante durante toda la prueba (una progresión de 3,2 corresponde a una pendiente de 2). Cuando no hay información sobre la pendiente de la sustancia a ensayar, se utiliza un factor de progresión dosis de 3,2. Utilizando el factor de progresión predeterminada, se seleccionan las dosis de la secuencia de 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 2000 (o 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000 de las necesidades reglamentarias específicas). Si no hay una estimación de la letalidad de la sustancia está disponible, la dosis se debe iniciado a 175 mg / kg. En la mayoría de los casos, esta dosis es sub-letal y por lo tanto sirve para reducir el nivel de dolor y el sufrimiento. Si se espera que las tolerancias de los animales a la sustancia química que ser muy variables (es decir, las pistas están espera que sea inferior a 2,0), se debe considerar la posibilidad de aumentar el factor de progresión de la dosis más allá del defecto 0,5 en una escala de dosis de registro (es decir, factor de 3,2 progresión) antes de comenzar la prueba. Similar, el caso de sustancias que se sabe que tienen pendientes muy empinadas, la progresión de la dosis factores más pequeño que el valor por defecto debe ser elegido. (Anexo 2 incluye una tabla de progresiones de dosis para pendientes de números enteros que van desde 1 a 8 con la dosis de partida 175 mg / kg).

33. La dosificación continúa dependiendo del intervalo de tiempo fijo (por ejemplo, 48 horas) los resultados de todos los animales hasta ese momento. La prueba se detiene cuando la primera se cumple uno de los criterios de frenado siguientes:

- (A) 3 animales sobreviven consecutivos en el límite superior;
- (B) 5 reversiones ocurren en cualquier 6 animales probados consecutivos;
- (C) al menos 4 animales han seguido la primera inversión y la probabilidad de los coeficientes especificados exceder el valor crítico. (Véase el apartado 44 y el Anexo 3. Los cálculos se hacen en cada dosificación, siguiendo el cuarto animal después de la primera inversión). Para una amplia variedad de combinaciones de DL50 y de las pistas, parando regla (c) estará satisfecho con 4 a 6 animales después de la reversión de prueba. En algunos casos, para las sustancias químicas con las curvas de dosis-respuesta de pendiente poco profunda, pueden ser necesarios los animales adicionales (hasta un total de quince probado).

34. Cuando se han alcanzado los criterios de parada, la DL50 estimado debe calcularse a partir de la animales de los resultados al final del ensayo utilizando el método descrito en los párrafos 40 y 41.

35. Los animales moribundos sacrificados por razones compasivas se considerarán de la misma forma que los animales que murieron en la prueba. Si un animal muere inesperadamente tarde en el estudio y hay otros sobrevivientes en esa dosis o por

encima, que es conveniente dejar de dosificación y observar todos los animales para ver si otros animales también morirán durante un similar período de observación. Si los sobrevivientes posteriores también mueren, y parece que todos los niveles de dosis superiores a la DL50 se sería el más apropiado para iniciar el estudio de nuevo comenzando por lo menos dos pasos de abajo con la dosis más baja muertes (y aumentando el periodo de observación) ya que la técnica es más precisa cuando la dosis de inicio está por debajo de la DL50. Si los animales posteriores sobreviven en o por encima de la dosis del animal que muere, no es necesario cambiar la progresión dosis ya que la información del animal que ahora ha muerto será incluida en los cálculos como una muerte en una dosis más baja que los sobrevivientes posteriores, tirando hacia abajo la DL50.

OBSERVACIONES

36. Se observan los animales de forma individual al menos una vez durante los primeros 30 minutos después de la dosificación, periódicamente durante las primeras 24 horas (con especial atención durante las primeras 4 horas), y diariamente a partir de entonces, para un total de 14 días, salvo en los casos que necesitan para ser retirado del estudio y eutanasiados por razones de bienestar animal se encuentran muertos o. Sin embargo, la duración de la observación no debe fijarse rígidamente. Se debe determinar por las reacciones y el tiempo de inicio y la duración del período de recuperación tóxica, y lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Los tiempos en los que aparecen signos de toxicidad y desaparecer son importantes, especialmente si hay una tendencia a que los signos tóxicos que ser retrasado. Todas observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales para cada animal.

37. Las observaciones adicionales serán necesarios si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Las observaciones deben incluir cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, y también las vías respiratorias, circulatorio, autonómico y el sistema nervioso central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Debe prestarse atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Los principios y criterios resumidos en el Humane Endpoints Guidance Document, deben ser tomados en consideración. Animales que se encuentran en un estado moribundo y animales que presenten graves dolor o signos duraderos de angustia severa deben ser sacrificados. Cuando los animales son matados para la integridad personal razones o hallados muertos, el momento de la muerte debe registrarse con la mayor precisión posible.

Peso corporal:

38. El peso de cada animal debe determinarse poco antes de la sustancia de ensayo es administrado y al menos semanalmente a partir de entonces. Los cambios de peso deben calcularse y registrarse. En el final de la prueba, los animales supervivientes se pesarán antes de sacrificarse de forma humanitaria.

Patología:

39. Todos los animales (incluidos los que mueren durante la prueba o se retira del estudio los animales por razones de bienestar) deben ser sometidos a necropsia macroscópica. Todos los cambios patológicos deben ser registrados para cada animal. El examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica en los animales sobrevivir a 24 o más horas después de la dosificación inicial puede también ser considerado, ya que puede producir útil información.

Datos e informes – Datos:

40. deben proporcionar datos sobre animales individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma de tabla forma que indique, para cada prueba de la dosis el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de Toxicidad, el número de animales encontrados muertos durante la prueba o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte individual de los animales, una descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad y la necropsia recomendaciones. Una razón fundamental para la dosis de inicio y la progresión de la dosis y los datos utilizados para apoyar esta elección debe ser proporcionada.

Cálculo de la DL50 para la prueba principal:

41. La DL50 se calcula utilizando el método de máxima verosimilitud, excepto en lo excepcional los casos descritos en el párrafo 42. Los siguientes datos estadísticos pueden ser útiles en la aplicación de los cálculos de máxima verosimilitud sugeridos (con una sigma asumida). Todas las muertes, ya sea inmediata o muertes tardías o humanas, se incorporan a los efectos del análisis de máxima verosimilitud. Siguiendo Dixon (4), la función de probabilidad se escribe como sigue:

$$L = L_1 L_2 \dots L_n,$$

Dónde

L es la probabilidad de que el resultado experimental, dado μ y σ , y n el número total de animales probado.

$L_i = 1 - F(Z_i)$ si el animal sobrevivió i-ésima, o

$L_i = F(Z_i)$ si el animal murió i,

Dónde

F = distribución normal estándar acumulativa,

$Z_i = [\log(d_i) - \mu] / \sigma$

D_i = dosis dada al animal i-ésimo, y

σ = desviación estándar en las unidades de registro de la dosis (que no es la desviación estándar de registro).

Una estimación de la verdadera LD50 está dada por el valor de μ que maximiza la probabilidad L (véase el párrafo 43).

Una estimación de sigma de 0,5 se utiliza menos que un mejor valor genérico o específico para cada caso está disponible.

42. En algunas circunstancias, el cálculo estadístico no será posible o probable dará resultados erróneos, medios especiales para determinar / Indicar un LD50 están disponibles para estas circunstancias como sigue:

(A) Si la prueba dejó de basarse en el criterio (a) en el párrafo 33 (es decir, una dosis límite se puso a prueba repetidamente), o si la dosis límite superior terminó la prueba, a continuación, la DL50 es informado de que por encima de la límite superior. La clasificación se completa sobre esta base.

(B) Si todos los animales muertos tienen dosis más altas que todos los animales vivos (o si tienen todos los animales vivos dosis más altas que todos los animales muertos, aunque esto es prácticamente poco probable), entonces el LD50 es entre las dosis para el vivo y los animales muertos. Estas observaciones dan no más lejos información sobre el valor exacto de la LD50. Aún así, una estimación de máxima verosimilitud puede ser DL50. Hecho cumpliendo con un valor de sigma. Criterio de parada (b) en el párrafo 33 describe una tal circunstancia.

(C) Si los animales vivos y muertos tienen una sola dosis en común y todos los demás animales muertos tienen dosis más altas y las dosis de todos los demás animales vivos inferiores, o viceversa, a continuación, la DL50 es igual a su dosis común. Si una sustancia estrechamente relacionada se prueba, las pruebas deben proceder con una dosis más pequeña progresión. Si se produce ninguna de las situaciones anteriores, a continuación, la DL50 se calcula utilizando el método de máxima verosimilitud.

43. cálculo de máxima verosimilitud se puede realizar utilizando cualquiera de SAS (14) (por ejemplo, PROC NLIN) o BMDP (15) (por ejemplo, AR programa) paquetes de programas de ordenador como se describe en el Apéndice 1D en la Referencia 3. Otros programas de ordenador también se pueden usar, instrucciones típicas para estos paquetes se dan en apéndices de la norma ASTM E 1163-87. [El sigma habitual en el programa básico en (6) necesitará que modificarse para reflejar los parámetros de este OCDE 425 Orientación.] La salida del programa es una estimación de log (DL50) y su error estándar.

44. La regla de parada razón de verosimilitud (c) En el apartado 33 se basa en tres medidas de progreso de la prueba, que son de la forma de la probabilidad en el párrafo 41 con diferentes valores para μ . Se hacen comparaciones después de cada animal después de la sexta prueba que aún no cumple el criterio (a) o (b) del párrafo 33. Las ecuaciones para los criterios de la razón de verosimilitud se proporcionan en el Anexo 3. Estas comparaciones son más fácilmente realizado de una manera automatizada y puede ser ejecutado varias veces, por ejemplo, por una rutina de hoja de cálculo como la que también figura en el Anexo 3. Si se cumple el criterio, la prueba se detiene y la DL50 se puede calcular por el método de máxima verosimilitud.

Cálculo de intervalo de confianza:

45. Después de la prueba principal y el cálculo estimado de LD50, puede ser posible calcular el intervalo de confianza para el DL50. Cualquiera de estos intervalos de confianza proporciona información valiosa sobre la fiabilidad y la utilidad de la prueba principal que se llevó a cabo. Un amplio intervalo de confianza indica que hay más incertidumbre asociada a la DL50 estimado. La fiabilidad de la DL50 estimada es baja y la utilidad de la DL50 estimado puede ser marginal. Un intervalo estrecho indica que hay relativamente poca incertidumbre asociada a la DL50 estimado. La fiabilidad de la LD50 es alta y la utilidad de la DL50 estimado es buena. Esto significa que si la prueba principal se repitiera, el nuevo estimado DL50 debe estar cerca de la DL50 estimado original y ambas de estas estimaciones deben estar cerca a la verdadera DL50.

46. Dependiendo del resultado de la prueba principal, uno de dos tipos diferentes de estimaciones del intervalo de la verdadera DL50 se calcula.

- Cuando al menos tres dosis diferentes han sido probados y la dosis media tiene al menos una animal que sobrevivió y un animal que murió, un cálculo basado en el perfil de verosimilitud procedimiento se utiliza para obtener un intervalo de confianza de que se espera que contenga el verdadero LD50 95% del tiempo. Sin embargo, ya que se espera un pequeño número de animales que se utilizará, el nivel real de confianza en general, no es exacta. La regla de parada al azar mejora la capacidad de la prueba general para responder a las diversas condiciones subyacentes, sino que también hace que el informaron nivel de confianza y el nivel real de confianza para algo diferentes.
- Si todos los animales sobreviven en o por debajo de un nivel determinado de dosis y todos los animales mueren cuando se dosifica en el siguiente nivel de dosis más alta, un intervalo se calcula que tiene como límite inferior de la dosis más alta donde sobreviven probado todos los animales y tiene como límite superior el nivel de dosis en todo el animales murieron. Este intervalo se etiqueta como "aproximada". El nivel de confianza exacta asociado con este intervalo no se puede determinar específicamente. Sin embargo, ya que este tipo de la respuesta sólo tendrá lugar en la respuesta a la dosis es empinada, en la mayoría de los casos, el verdadero DL50 se espera que esté contenida dentro del intervalo calculado o estar muy cerca de ella. Este intervalo será relativamente estrecho y suficientemente preciso para el uso más práctico.

47. En algunos casos, los intervalos de confianza son reportados como infinito, mediante la inclusión de cero como su extremo inferior o infinito como su extremo superior, o ambas cosas. Tales intervalos, por ejemplo, se puede producir cuando todos los animales o mueren todos los animales viven. La implementación de este conjunto de procedimientos requiere cómputo especializado que es ya sea mediante el uso de un programa dedicado a estar disponible a partir de la USEPA o la OCDE o desarrollado siguiendo detalles técnicos disponibles de la USEPA o la OCDE. Cobertura alcanzada de estos intervalos y propiedades del programa específico se describen en los informes también disponibles a través de la USEPA.

ANEXO N° 19

MEDIA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN PARA LOS FÁRMACOS PATRÓN SEGÚN EL COMITÉ NACIONAL DE ESTÁNDARES DE LABORATORIO

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Staphylococcus aureus*

		Zona de Diámetro de Interpretación Crítica (mm)		
FARMACO	CONCENTRACIÓN	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Clindamicina	2 ug	≥ 21	15-20	≤14
Oxacilina	1 ug	≥ 22	15-21	≤14

HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Escherichia coli*

		Zona de Diámetro de Interpretación Crítica (mm)		
FARMACO	CONCENTRACIÓN	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Ciprofloxacino	5 ug	≥ 21	16-20	≤15
Amikacina	30 ug	≥17	15-16	≤14

FUENTE: Comité Nacional de Estándares de Laborstorio

ANEXO N° 20

FICHA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS



"UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO"

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

FICHA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN



I. DATOS GENERALES:

Título del trabajo de investigación:

"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* "YAWAR CHONQ'A" Y *Geranium sessiliflorum* "OJOTILLO" FRENTE A *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC Y *Escherichia coli* CEPA ATCC Y DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL"

Nombre de los instrumentos:

Formato N° 1: Para la determinación de porcentaje humedad. (Quim. Ciro)

Formato N° 2: Para el porcentaje de extracción. (Quim. Ciro)

Formato N° 3: Para las pruebas de solubilidad. (Quim. Ciro)

Formato N° 4: Para el análisis fitoquímico cualitativo. (Quim. Ciro)

Formato N° 5: Para la estandarización de la concentración antibacteriana de los extractos. (Blga. Doris)

Formato N° 6: Para los halos de inhibición. (Blga. Doris)

Formato N° 7: Para los signos y síntomas del ensayo de toxicidad aguda por vía oral. (Q.F. Carlos)

Formato N° 8: Para el análisis histopatológico de los principales órganos de las ratas. (Dra. Valmi)

Investigadores: Yaneth Roxana Oroche Soto
Yeni Human Enriquez

Crterios	Indicadores	Descripción	Deficiente	Regular	Bueno	Muy Bueno	Excelente
FORMA	Redacción	Los indicadores e ítems están redactados los elementos necesarios			X		
	Claridad	Esta formulado con un lenguaje apropiado				X	
	Objetividad	Esta expresado en conductas observables			X		

CONTENIDO	Actualidad	Es adecuado al avance de la ciencia y tecnología			X		
	Suficiencia	Los ítems son adecuados en cantidad y profundidad				X	
	Intencionalidad	El instrumento mide en forma pertinente al comportamiento de las variables de investigación					X
ESTRUCTURA	Organización	Existe una organización lógica entre todos los elementos básicos de la investigación				X	
	Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la investigación en el campo de la salud				X	
	Coherencia	Existe coherencia entre los ítems (indicadores, variables)				X	
	Metodología	La estrategia de investigación responde al propósito de investigación					X

II. DATOS DE LOS EXPERTOS:

Nombre y Apellido: Quím. Ciro Tomaylla Cruz
Cargo: Jefe de Prácticas del Área de Bioquímica
Lugar y Fecha: Laboratorio de Fitquímica de la UNSAAC

Nombre y Apellido: Blga. Lilia Doris Gutierrez Moreno
Cargo: Segunda Especialidad en Laboratorio de Análisis Biológicos
Lugar y Fecha: Laboratorio de Ciencias Clínicas y Farmacéuticas de la UNSAAC

Nombre y Apellido: Q.F. Carlos Moreyra Pachas
Cargo: Docente del Área de Toxicología Farmacéutica
Lugar y Fecha: Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la UNSAAC

Nombre y Apellido: Med. Valmi M. Luna Flores
Cargo: Jefe del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional del Cusco
Lugar y Fecha: Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Regional del Cusco

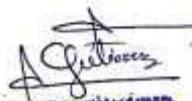
III. OBSERVACIONES:

IV. LUEGO DE REVISADO EL INSTRUMENTO:

Procede su aplicación

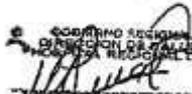



Ciro Tomaylla Cruz
QUIMICO
COP. 888



LILIA DORIS GUTIERREZ MORENO
BIÓLOGO
B.P. N° 5009


CARLOS ALBERTO MORZYRA PACHAS
Docente UNSAAC


GOBIERNO REGIONAL CUSCO
DIRECCIÓN DE SALUD CUSCO
HOSPITAL REGIONAL DEL CUSCO
Valmi M. Luna Flores
PATOLOGA
OIMP: 22411 NNU. 17830

ANEXO N° 21

PREGUNTAS REALIZADAS PARA LA SELECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

1. ¿Cuál o cuáles de las plantas medicinales presenta mayor demanda en el mercado?

.....
.....
.....

2. ¿Qué uso tradicional tiene o para que se usa?

.....
.....
.....

3. ¿Dónde puedo encontrar esta planta o dónde crece?

.....
.....
.....

4. ¿Qué parte de la planta se utiliza?

.....
.....
.....

5. ¿De qué forma se usa?

.....
.....
.....

FUENTE: Elaboración propia

LEYENDA:

1. Se entrevisto a 5 personas que realizan la venta de plantas medicinales en el Jr. Vigil, Av. 2 de Mayo del Distrito de Sicuani de la Provincia de Canchis del Departamento de Cusco.
2. Se entrevisvo a 8 personas que realizan la venta de plantas medicinales en el mercado San Pedro del Distrito de Santiago del Departamento de Cusco.

FOTOGRAFÍA N° 1

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS ESPECIES INVESTIGADAS.



Se observan el pesaje de las especies vegetales para la determinación del porcentaje de humedad. A = Yawar Chonq'a y B = Ojotillo

FOTOGRAFÍA N° 2

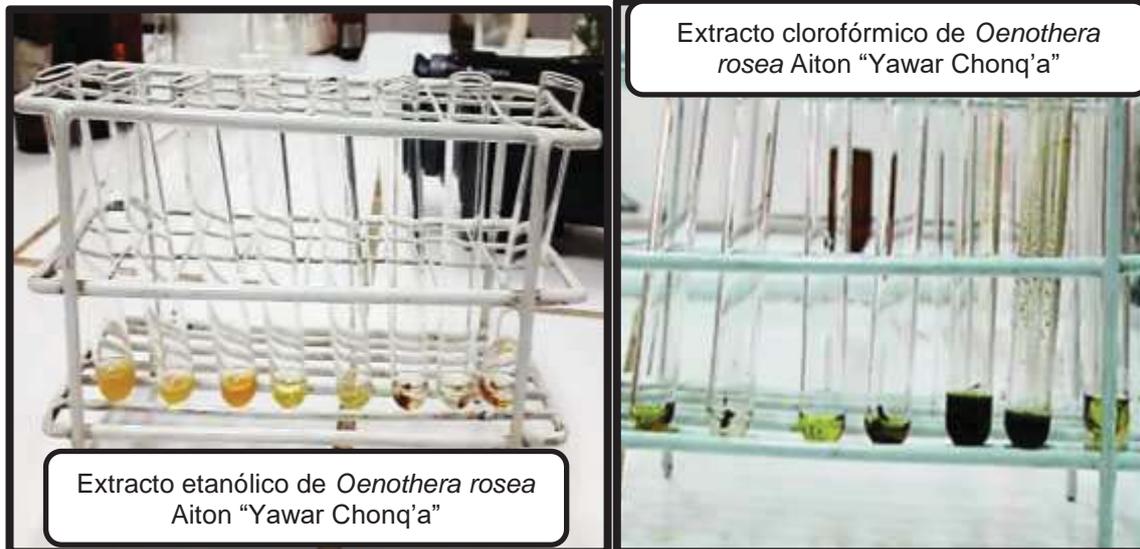
PROCESO DE MACERACIÓN DE LAS HOJAS Y TALLO DE *Oenothera rosea* Aiton "YAWAR CHONQ'A" Y DE LA RAÍZ DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "OJOTILLO".



Se observa el macerado de las hojas de la especie vegetal en estudio, en etanol de 70% y en cloroformo, por un periodo de un mes y medio con agitación frecuente.

FOTOGRAFÍA N° 3 y 4

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES



Prueba de solubilidad que se realizaron al extracto Etanólico y clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a" con solventes de mayor y menor polaridad de derecha a izquierda.



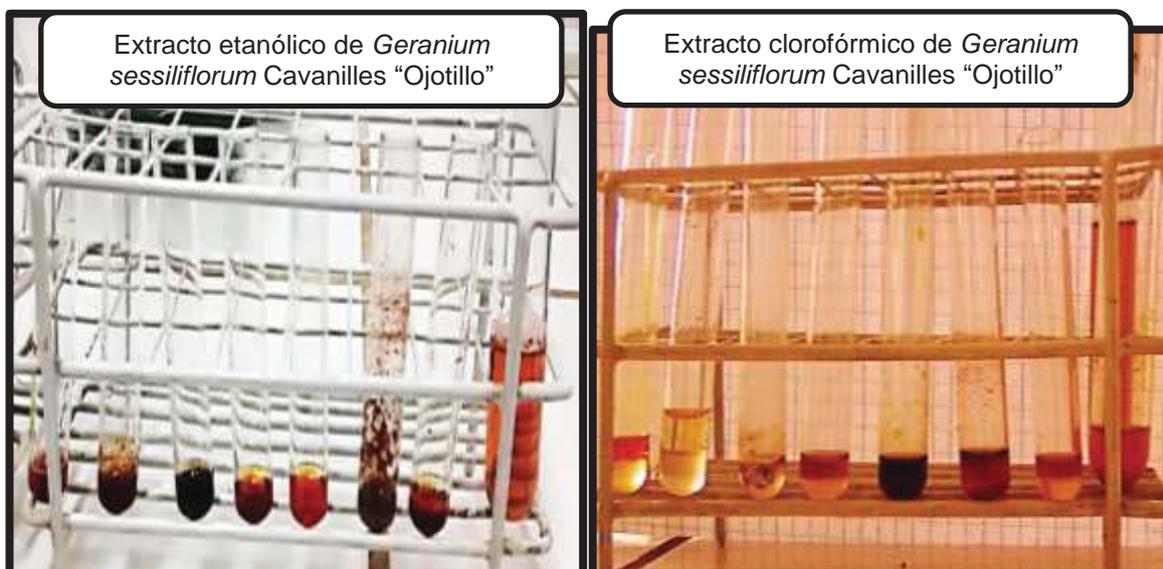
Prueba de solubilidad que se realizaron al extracto Etanólico y clorofórmicos *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" con solventes de mayor y menor polaridad de derecha a izquierda.

FOTOGRAFÍA N° 5 y 6

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES



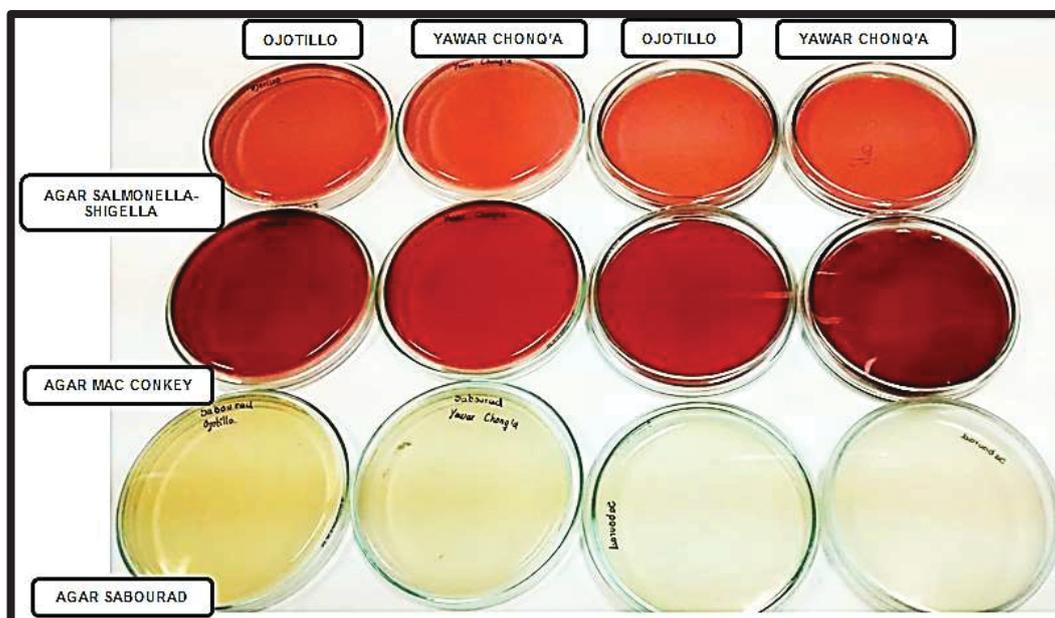
En esta fotografía se observa el análisis fitoquímico realizado para la especie vegetal *Oenothera rosea* Aiton "yawar chonq'a" de izquierda a derecha se observan: alcaloides, lactonas, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, glicosidos y núcleos esteroideos.



En esta fotografía se observa el análisis fitoquímico realizado para la especie vegetal *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo" de izquierda a derecha se observan: alcaloides, lactonas, quinonas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, glicósidos y núcleos esteroideos.

FOTOGRAFÍA N° 7

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO



En la fotografía podemos observar la prueba microbiológica de los extractos secos hidroalcohólico y clorofórmico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” y los extractos secos hidroalcohólico y clorofórmico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

FOTOGRAFÍA N° 8

CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218



En esta fotografía se observan a las cepas patrón que se utilizaron en el análisis microbiológico. En la izquierda se observa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en la derecha se observa a *Escherichia coli* ATCC 35218.

FOTOGRAFÍA N° 9

ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218



En esta fotografía se observan la activación de las cepas liofilizadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218 en medio de Agar Trypticase Soja

FOTOGRAFÍA N° 10 y 11

PRUEBA PILOTO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)



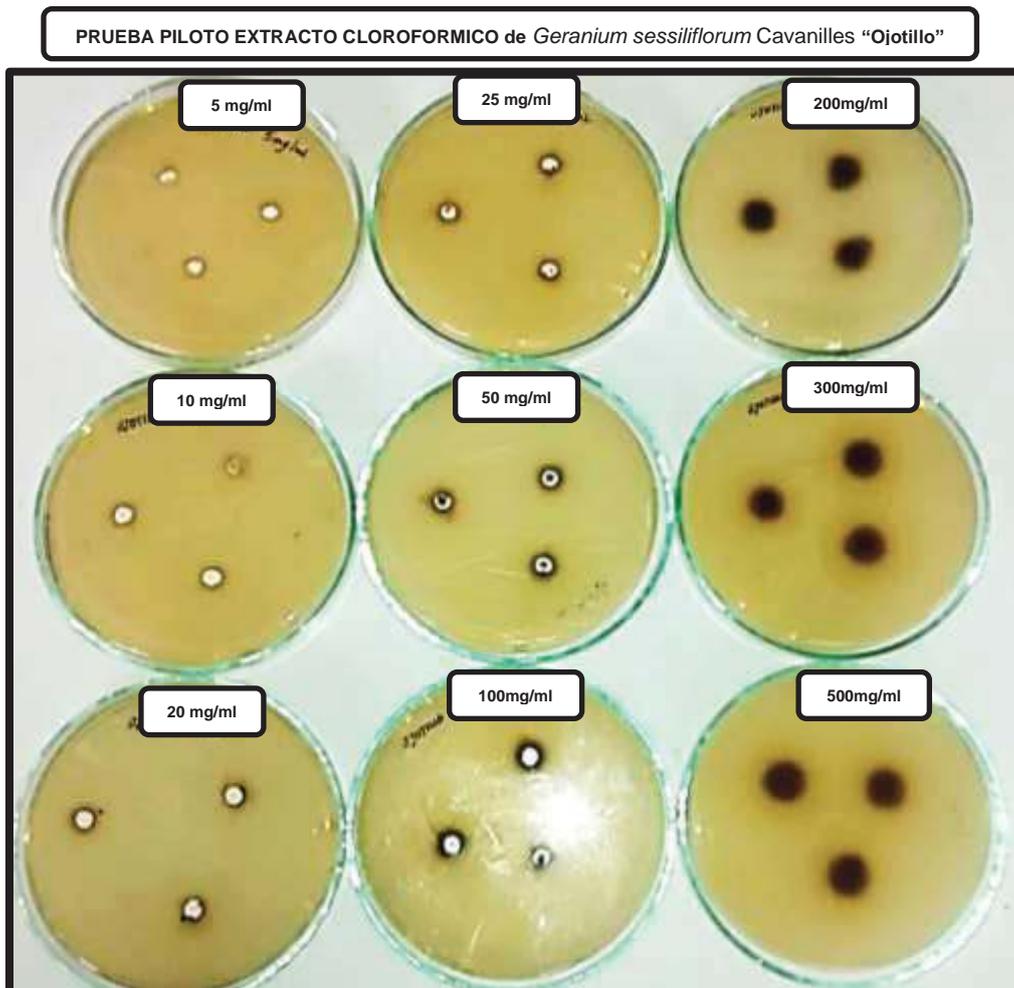
En esta fotografía pertenece a la prueba piloto para la Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de dilución de Yawar Chonq'a.



En esta fotografía pertenece a la prueba piloto para la Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de dilución de Ojotillo.

FOTOGRAFÍA N° 12

PRUEBA PILOTO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "OJOTILLO"



FOTOGRAFÍA N° 13, 14 y 15

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)



En la fotografía se observan los tubos empleados de acuerdo al rango en el que se encuentra la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a” para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, al lado derecho, se observa las placas con el CMI correspondiente al tubo de inhibición.



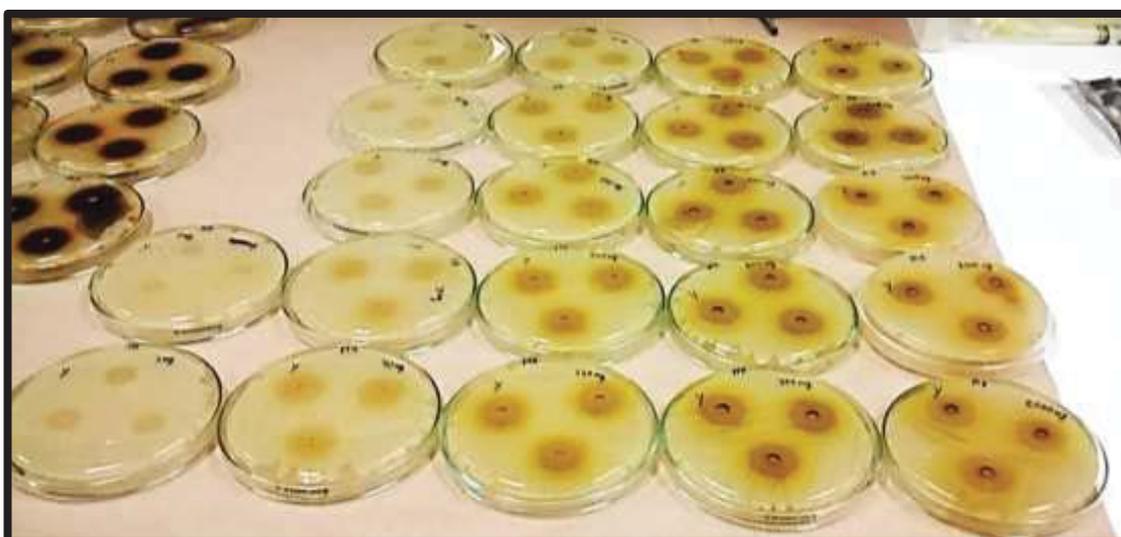
En la fotografía se observan los tubos empleados de acuerdo al rango en el que se encuentra la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, al lado derecho, se observa las placas con el CMI correspondiente al tubo de inhibición.



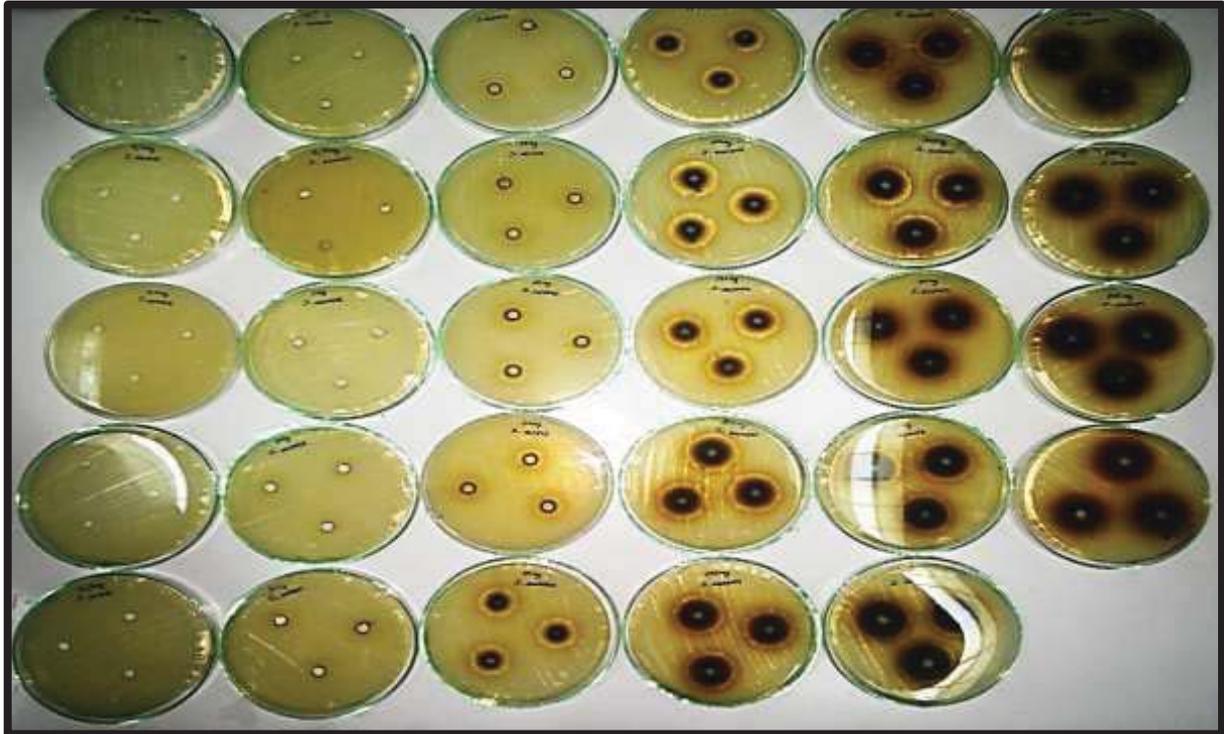
En la fotografía se observan los tubos empleados de acuerdo al rango en el que se encuentra la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, al lado derecho, se observa las placas con el CMI correspondiente al tubo de inhibición.

FOTOGRAFÍA N° 16 y 17

HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS EN EL ENSAYO MICROBIOLÓGICO CON *Oenothera rosea* Aiton “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “OJOTILLO”



En la fotografía se observa los halos de inhibición formados para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 después de la incubación, desde la placa 1 hasta la 32, por triplicado, donde se observa los diferentes diámetros de inhibición para *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”.



En la fotografía se observa los halos de inhibición formados para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 después de la incubación, desde la placa 1 hasta la 29, por triplicado, donde se observa los diferentes diámetros de inhibición para *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo".

FOTOGRAFÍA N° 18

SUMINISTRACIÓN ORAL DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS EN RATAS



En la fotografía se aprecia la suministración por vía oral de los extractos etanólicos de ambas especies a una concentración de 2000mg/kg en las ratas de experimentación

FOTOGRAFÍA N° 19

EXTRACCIÓN DE LOS ÓRGANOS PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO



Se aprecia el sacrificio (eutanasia) de cada rata para evaluar el grado de toxicidad mediante el estudio histopatológico, aislando así los órganos como: estómago, hígado y riñón

FOTOGRAFÍA N° 20 y 21

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LOS ÓRGANOS DE LAS RATAS DE EXPERIMENTACIÓN



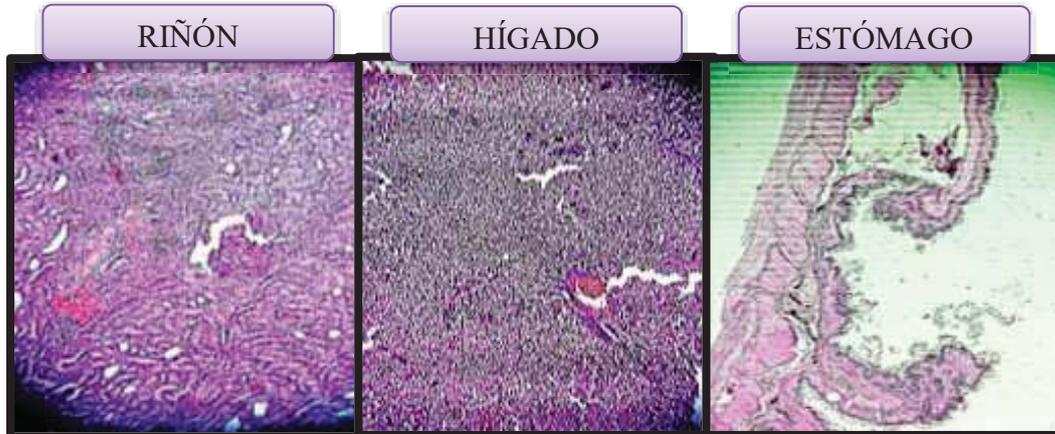
Se aprecia el estudio histopatológico de cada órgano perteneciente a las ratas de experimentación como son estómago, hígado y riñón pertenecientes al grupo de *Oenothera rosea* Aiton “Yawar Chonq’a”



Se aprecia el estudio histopatológico de cada órgano perteneciente a las ratas de experimentación como son estómago, hígado y riñón pertenecientes al grupo de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles “Ojotillo”.

FOTOGRAFÍA N° 22 y 23

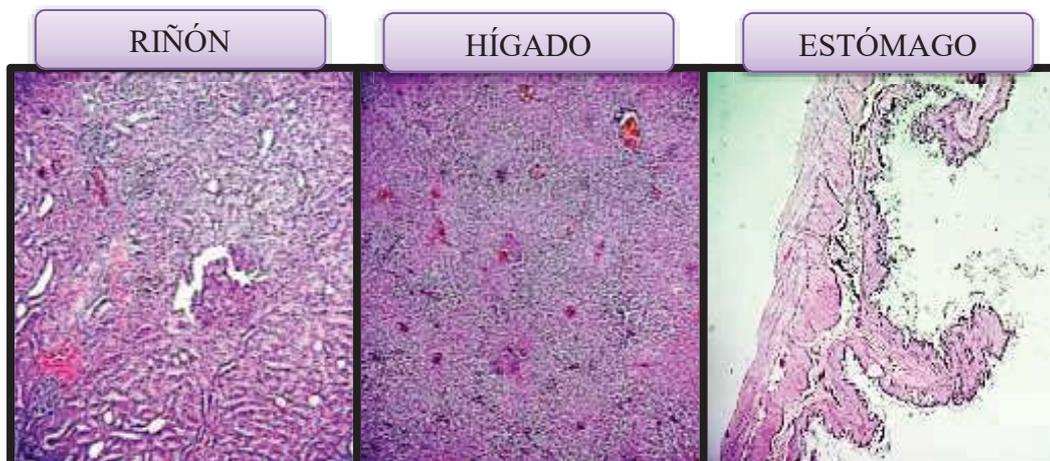
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS ÓRGANOS PROCESADOS



Fotografías donde se observa el riñón, el hígado y el estómago del grupo control.



la fotografía se observó al microscopio el tejido del riñón, hígado y estomago vistas al microscopios de las ratas hembras que recibieron dosis de 2000 mg/kg de extracto Etanólico de *Oenothera rosea* Aiton "Yawar Chonq'a"



En la fotografía se observó el tejido del riñón, hígado y estomago vistas al microscopios de las ratas hembras que recibieron dosis de 2000 mg/kg del extracto Etanólico de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo"