

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
NUEVO TIEMPOS NUEVAS IDEAS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÈUTICAS Y BIOQUÌMICA



TESIS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA
CORTEZA DEL BELLACO CASPI (*Himatanthus tarapotensis*) EN
CULTIVOS DE “*Staphylococcus aureus*” ESTUDIO IN VITRO**

Para optar el Título Profesional Químico Farmacéutico Y Bioquímico

TESISTAS:

Bach: POSITO MEGO MARIBEL

Bach: CHIPANA HUAUYA NORMA MARIBEL

ASESOR:

Mg. QF. CARLOS ALFREDO CANO PEREZ

Lima- Perú

2018

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA
CORTEZA DEL BELLACO CASPI (*Himatanthus tarapotensis*) EN
CULTIVOS DE “*Staphylococcus aureus*” ESTUDIO IN VITRO**

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a Dios por haberme dado lo más valioso; la alegría de vivir, guiarme todos los días por su bondad y su amor mostrando una naturaleza sabía que lo podemos encontrar en las plantas. A mi familia, por su apoyo inagotable su amor y cariño, a mi madre HERMINDA MEGO VÁZQUEZ que me cuida desde el cielo, por sus consejos y sabias palabras que hoy me llenan de orgullo, fortaleza y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

MARIBEL

A Dios, por guiarme en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente A mi madre Juana Huauya, por creer en mí, por apoyarme y guiarme cuando lo necesitaba, a mi padre Cirilo desde el cielo siempre me iluminaras, te agradezco por tus enseñanzas. A mis dos hermosas hijas Jhunet y Myrella, mi motivo y mi fuerza. A mis hermanos, y en especial a mi hermana ROSA por su comprensión y el apoyo infinito que me brindaste para concluir mi carrera profesional. Agradezco a todas las personas, a mis profesores, por sus enseñanzas muy valiosas que compartieron conmigo en esta etapa de preparación como profesional.

NORMA MARIBEL

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, por habernos aceptado, ser parte de ella y abrirnos la puerta del saber científico para poder desarrollar nuestras capacidades, conocimientos científicos y formarnos profesionalmente con valores para enfrentar nuevos retos, así mismo a todos nuestros docentes quienes formaron parte de nuestra vida estudiantil, por compartir sus conocimientos y experiencias.

A nuestro asesor de Tesis Mg. Carlos A. Cano Pérez, por su dedicación, orientación y compromiso; por compartir su experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo de tesis.

Al Mg. Pedro Jacinto Hervías, quien nos guio con su experiencia y nos dio las pautas necesarias para complementar nuestro proyecto de tesis.

A mis profesores, a quienes debo gran parte de mis conocimientos, con su experiencia y paciencia nos enseñaron durante todo el desarrollo de nuestra carrera profesional gracias por prepararnos para un futuro competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como mejores personas y a todos aquellos que, en general, estuvieron involucrados con la realización de este proyecto, nuestro más sincero agradecimiento.

INDICE

DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Identificación y formulación del problema	4
1.2.1. Problema General.....	4
1.2.2. Problemas Específicos.....	4
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Justificación y viabilidad de la investigación	5
1.5. Delimitación de la investigación	6
1.5.1. Delimitación espacial:.....	6

1.5.2.	Delimitación temporal:	6
1.5.3.	Delimitación del universo:	6
1.5.4.	Delimitación del Contenido:	6
1.6.	Limitaciones de la investigación.....	7
1.6.1.	Limitación interna:	7
1.6.2.	Limitación externa:	7
CAPITULO II		8
MARCO TEÓRICO		8
2.1.	Antecedentes de la investigación.....	8
2.1.1.	Antecedentes Nacionales	9
2.1.2.	Antecedentes Internacionales	11
2.2.	Bases teóricas	13
2.2.1	Métodos de obtención de extractos vegetales.	13
2.2.2	Etnobotánica	20
2.2.3	Terpeno Bioactivo Plumericina	23
2.2.4	Staphylococcus aureus	37
2.2.5	Patogenia Microbiana	30
2.2.6	Tipos de Infecciones Cetáneas y enfermedades	32

2.2.7	Via Transmisión	36
2.2.8	Taxonomía de Staphylococcus aureus	37
2.2.9	Medios de Cultivo	39
2.3.	Formulación de la hipótesis	46
2.3.1.	Hipótesis general	46
2.3.2.	Hipótesis específicas	46
2.4.	Operacionalización de variables e indicadores	47
2.4.1.	Variables	47
2.4.2.	Dimensiones	47
2.4.3.	Indicadores	48
2.5.	Definición de términos básicos	49
CAPITULO III		52
METODOLOGÍA		52
3.1.	Tipo y nivel de investigación	52
3.2.	Diseño de investigación:	52
3.3.	Población y muestra de la investigación:	52
3.3.1.	Vegetal	52
3.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	54

3.4.1	Técnica de recolección de datos	54
3.4.2	Instrumentos de recolección de datos	54
3.4.3	Validación de Instrumentos.....	55
3.5.	Diseño experimental:	55
3.5.1.	Muestra vegetal.	55
3.5.2.	Muestra biológico.....	56
3.5.3.	Material de Vidrio y otros.....	56
3.5.4.	Otros Material	56
3.5.5.	Equipos e Instrumentos.....	57
3.5.6.	Reactivos e insumos.....	57
3.5.7.	Reactivos.....	57
3.5.8.	Medios de cultivo.....	58
3.5.9	Material de bioseguridad	58
3.6.	Procedimiento Experimental	58
3.6.1.	Recolección de la muestra vegetal.	58
3.6.2.	Identificación de la muestra vegetal	58
3.6.3.	Procesamiento de la muestra vegetal	59
3.6.4.	Molienda de la muestra vegetal.....	59

3.6.5. Obtención del extracto etanólico	59
3.6.6. Almacenamiento del extracto etanólico	60
3.6.7. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)	60
3.6.8. Obtención de las muestras biológicas	65
3.7. Flujograma de Investigación	67
3.8. Preparación de las concentraciones del extracto de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)	67
3.9. Desarrollo del Metodo	67
3.10. Técnica de procesamiento de datos	75
3.10.1 Procesamiento de datos	75
3.10.2 Materiales para la recolección y procesamiento de datos .	75
3.10.3 Normas de bioseguridad en el laboratorio.....	76
3.10.4 Protección de los derechos humanos	76
CAPITULO IV	77
RESULTADOS	77
4.1. Resultados de la investigación	77
4.1.1 Obtención de Extractos vegetales.	77

4.2. Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.	79
4.3. Prueba de Solubilidad <i>Himatanthus tarapotensis</i>	80
4.4. Actividad antibacteriana de <i>Himatanthus tarapotensis</i> “bellaco caspi”	81
4.4.1 Lectura de Resultados de diámetro de Halos (mm).	81
4.5. Discusión de resultados.....	86
CAPITULO V.....	90
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
5.1. Conclusiones	90
5.2 Recomendaciones	91
BIBLIOGRAFIA	92

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- De la especie de <i>Himatanthus tarapotensis</i> .	21
FIGURA 2.- Características macroscópicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	39
FIGURA 3.- Medios de cultivos líquidos	40
FIGURA 4.- Agar _Agar	43
FIGURA 5.- Determinación del efecto antibacteriano del extracto etanólico Del <i>Himatanthus tarapotensis</i> “Bellaco Caspi”	82

INDICE DE TABLA

TABLA 1.- Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides	23
TABLA 2.- Operacionalización de variables	48
TABLA 3.- Protocolo de evaluación para placas Petri	71
TABLA 4.- Rendimiento del extracto etanólico de La corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>).	77
TABLA 5.- Tamizaje Fitoquímico del extracto etanolico Bellaco Caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)	79
TABLA 6.- Prueba de solubilidad del extracto etanolico Bellaco Caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)	80
TABLA 7.- Distancias inhibidoras	81
TABLA 8.- Estadística descriptivas	82
TABLA 9.- Prueba de homogeneidad de varianzas	83
TABLA 10.- ANOVA de un factor	84
TABLA 11.- Comparaciones múltiples	84
TABLA 12.- Prueba de subconjuntos de Tukey	86

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de productos naturales de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) y en los laboratorios de microbiología de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; las muestras de ***Himatanthus tarapotensis*** (Bellaco caspi) fueron recolectadas en Quistococha ubicado a 5Km de la carretera Iquitos- Nauta en el distrito de San Juan, de la ciudad de Iquitos. El principal objetivo del estudio fue determinar la actividad antibacteriana in Vitro del extracto etanólico de ***Himatanthus Tarapotensis*** (bellaco caspi) mediante el método Cilindro - Placa (Difusión en agar). Las cepas utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Como control positivo se usó el antibiótico amoxicilina y como control negativo una solución de suero a concentración 1:1 (50%). El tamizaje fotoquímico del extracto etanólico de ***Himatanthus tarapotensis*** (Bellaco caspi) evidenció la presencia de triterpenos y esteroides, fenoles y taninos, alcaloides, lactonas, cumarinas y flavonoides. Con respecto a la actividad antibacteriana del extracto etanólico, frente a ***Staphylococcus aureus***, la concentración al 100% presentó un halo de inhibición de 15.87 mm en promedio, mientras que en la concentración de 50% presentó un halo de 13.80mm, en promedio finalmente a 25% presento un halo de inhibición de 12.20 mm en promedio.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, Extracto etanólico, inoculación, ***Staphylococcus aureus***.

ABSTRACT

The present work was carried out in the laboratories of natural products of the National University of the Peruvian Amazon (UNAP) and in the microbiology laboratories of the Inca Garcilaso de la Vega University; samples of *Himatanthus tarapotensis* (Bellaco caspi) were collected in Quistococha located 5 km from the Iquitos-Nauta highway in the San Juan district of the city of Iquitos. The main objective of the study was to determine the *in vitro* antibacterial activity of the ethanolic extract of *Himatanthus Tarapotensis* (bellaco caspi) by the Cylinder - Plate method (agar diffusion). The strains used were: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. As a positive control, the antibiotic amoxicillin was used and, as a negative control, a serum solution at a concentration of 1: 1 (50%). The photochemical screening of the ethanolic extract of *Himatanthus tarapotensis* (Bellaco caspi) showed the presence of triterpenos and steroids, phenols and tannins, alkaloids, lactones, curmarines and flavonoids. With respect to the antibacterial activity of the ethanolic extract, against *Staphylococcus aureus*, the concentration at 100% presented an inhibition halo of 15.87 mm on average, while at the concentration of 50% it presented a halo of 13.80mm, on average at 25% presented an inhibition halo of 12.20 mm on average.

Key words: Antibacterial activity, Ethanolic extract, inoculation, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación trata de establecer la efectividad de la corteza de bellaco caspi como agente antibacteriano, ya que en el Perú como en otras partes del mundo la especie ***Himatanthus tarapotensis*** (Bellaco caspi) es una planta medicinal utilizada por lo general como alternativa en la cura de diversas enfermedades, debido a sus propiedades medicinales.

En los últimos años se ha vuelto a las plantas en busca de nuevos principios activos, con el fin de determinar su eficacia y evaluar su potencial como fuentes de nuevas drogas, ya que es de suma importancia descubrir nuevos compuestos que están más eficaces y de menor toxicidad. Los diferentes tipos de infecciones producidas por agentes bacterianos son cada vez más frecuentes para el ser humano y con mayor intensidad en cada ocasión.

“Se afirma que la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la corteza del ***Himatanthus tarapotensis*** (Bellaco caspi) se deba a la presencia de metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos, Cumarinas, entre otros” (2)

Asimismo la bacteria utilizada en la presente investigación: ***Staphylococcus aureus*** “está involucrada en infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel, las cuales persisten en la comunidad como una causa fundamental de morbimortalidad y cuya gravedad es mayor en la población infantil, radicando la importancia de este microorganismo en la resistencia a antimicrobianos de uso común en el tratamiento de las afecciones respiratorias y de la piel. (1)

Teniendo en cuenta que la mayoría de la población requiere de alternativas medicamentosas de costo reducido y alto beneficio para el tratamiento de infecciones bacterianas que la haría accesible a poblaciones de menores recursos económicos. Por ello, este estudio se sustenta en la siguiente pregunta: ¿El extracto etanólico de la corteza ***Himatanthus tarapotensis*** (Bellaco caspi) tendrá efectos antibacterianos frente a cepas de “***Staphylococcus aureus***” en estudio in vitro?

El desarrollo de investigación comprende: Capítulo I planteamiento y formulación del problema, Capítulo II se presentan los antecedentes internacionales y nacionales y las bases teóricas que corresponden a las variables del estudio. En el Capítulo III se plantea la metodología, técnica e instrumentos de recolección de datos, procesamiento y los análisis estadísticos. En el Capítulo IV la discusión de resultados y finalmente el Capítulo V donde se propone las conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

CETRÁNGOLO, O., et al (2013)¹¹. En la actualidad, el sistema de salud de nuestro país se caracteriza por ser muy deficiente, con una amplia limitación de cobertura de las demandas de la comunidad y zonas rurales más alejadas del estado peruano, cabe mencionar también la falta de centros de salud en los lugares alejados como en zonas rurales, asimismo el cuidado de la salud de la población en general se agravan cada vez más, ya que estas comunidades no cuentan con recursos necesarios, y a la vez la dotación de medicamentos es insuficiente, de modo que se convierte en un problema de salud pública.

Según **ESSALUD** en 2013, Actualmente se destaca la importancia de una adecuada nutrición, ya que forma parte de uno de los ejes principales para prevenir distintas patologías o enfermedades. De acuerdo a muchos estudios e investigaciones afirman que una mala alimentación se relaciona directamente con el desarrollo de múltiples patologías, provocando cada vez un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad.

MADIGAN, M. et al. (2004)¹² Se considera que las bacterias son microorganismos con alto grado de patogenicidad; ya que es un agente patógeno causante de innumerables infecciones y enfermedades en todo el ámbito; tanto en la comunidad como a nivel hospitalario.

Convirtiéndose así cada vez más en un problema de salud pública, ya que si las infecciones no son tratadas a tiempo; las cuales agravan el estado patológico inicial, y en algunos casos tratamientos incompletos, como consecuencia se produce resistencia bacteriana. Comprobándose que si es posible la utilización de especie vegetal

como alternativa natural. Nace la inquietud a partir de los, mismos pobladores de utilizar la planta vegetal bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) como un antibacteriano, por ello se plantea la siguiente pregunta de investigación. ¿El extracto etanólico de la corteza bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) tendrá efectos antibacterianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro?, por lo que en esta investigación lo que se quiere encontrar son alternativas con tratamientos Fito terapéuticos para la población que no cuenta con fácil acceso a medicamentos y dar un aporte al conocimiento científico en la investigación.

1.2. Identificación y formulación del problema.

El desarrollo demográfico mundial expresadas en necesidades, carencias y demandas en educación, economía y salud, esta última representa una de las más alarmantes en países en vías de desarrollo como el nuestro por ello el sistema de salud pública se halla con limitaciones de cobertura en la dotación de medicamentos, por lo cual muchas personas recurren a las plantas medicinales como primera alternativa de tratamiento acogiéndose a prácticas ancestrales.

1.2.1. Problema General.

¿El extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) tendrá efectos antibacterianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro?

1.2.2. Problemas Específicos.

¿Qué tipo de metabolitos presentará el extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)?

¿En qué concentración el extracto etanólico bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) posee efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano en cepas de ***Staphylococcus aureus*** en el extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (***Himatanthus tarapotensis***) en estudio in vitro.

1.3.2. Objetivos específicos

Identificar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (***Himatanthus tarapotensis***).

Determinar la concentración del extracto etanólico de bellaco caspi (***Himatanthus tarapotensis***) que posee efecto antibacteriano frente a cepas de ***Staphylococcus aureus*** en estudio in vitro.

1.4. Justificación y viabilidad de la investigación

Guevara, J. (2012)¹ El siguiente proyecto de investigación tiene como propósito dar a conocer si el extracto etanólico de la corteza bellaco caspi (***Himatanthus tarapotensis***) tiene propiedades antibacterianas ya que la bacterias es un problema social que limita mucho en el desarrollo de sus actividades de las personas, las plantas medicinales son valiosas con recursos para tratar muchas enfermedades, por lo cual merecen un interés especial y con esto contribuir a la sociedad y al país para su uso adecuado.

Este estudio será viable, puesto que, si bien la planta bellaco caspi (***Himatanthus tarapotensis***) crece en La ciudad de Iquitos es la capital del departamento de Loreto, provincia de Maynas, está ubicada en pleno corazón de la selva nororiental del Perú.

1.5. Delimitación de la investigación

Este proyecto solo se limita al experimento in vitro que se realizará respetando los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y cálculos recomendados por la OMS y por parámetros que obliga DIGESA.

1.5.1. Delimitación espacial:

La presente investigación se realiza en el:

- Departamento de Loreto capital de Iquitos, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonia (LIPNAA) - Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- Departamento de Lima, en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

1.5.2. Delimitación temporal:

La investigación se llevará a cabo en durante los meses de Abril-Mayo.

1.5.3. Delimitación del universo:

Se realizó selección de la muestra aleatoria, ya que se considera dentro del estudio a toda la población de estudio. Para la recolección de la muestra se contará con una hoja de datos en el cual se registró la fecha, especie recolectada y lugar de muestreo.

1.5.4. Delimitación del Contenido:

Se busca determinar la Actividad Antibacteriana del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) en estudio in vitro.

1.6. Limitaciones de la investigación.

1.6.1. Limitación interna:

Los resultados son válidos solo para la muestra en estudio, no para extender a otras muestras sin previo control de las variables.

1.6.2. Limitación externa:

Carencia de información bibliográfica, la falta de instrumentación para las mediciones técnicas, falta de las cepas antibacterianas certificadas por la universidad. Limitación en cuanto a reactivos brindados por el centro de estudio.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Vivot, E., et al. (2012)²³. En la actualidad el hombre ha acumulado conocimientos de los usos, efectos terapéuticos, reacciones adversas e información científica de plantas medicinales que han aportado en la mejora de la salud y disminuir las causas para evitar las enfermedades. Sin embargo, todavía hay plantas sin estudiar, también hay plantas poco estudiadas, siendo necesaria un enfoque distinto y buscando otros efectos que poseen esta planta de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*). Barquero A. (2007)²¹ Esta práctica está asociada al empirismo en muchos casos faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma irrefutable los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables. No hay que olvidar que el 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizados a partir de sustancias halladas en la investigación fitoquímica. Se observó que no existe una patente hasta ahora con la especie de esta planta Solo hay estudio de caracterización anatómica y estudio ecológico y bioquímico de *Himatanthus tarapotensis* (Bellaco caspi). Este estudio será útil para el desarrollo moderno de drogas y servir al propósito de desarrollar una curación y tratamiento de enfermedades y para probar clínica de seguridad, fiabilidad y eficacia. Esta planta puede utilizarse como una fuente barata de productos terapéuticos activos. Estudios realizados sobre *Himatanthus tarapotensis* (Bellaco caspi). Respecto a *Himatanthus tarapotensis* (Bellaco caspi), aún no se reportan estudios en diversas actividades biológicas y/o farmacológicas, solo se evidencian estudios realizados en *Himatanthus succuba*, especie vegetal perteneciente a la familia Apocynaceae.

2.1.1. Antecedentes Nacionales

GUEVARA, J. (2012)¹, artículo, realizó el estudio de “**ACCIÓN IN VITRO DE DIEZ PLANTAS MEDICINALES SOBRE DIEZ CEPAS DIFERENTES DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**”, PERÚ. El objetivo del investigador fue determinar la efectividad de diez plantas medicinales frente a *Streptococcus pneumoniae*. Los extractos de 10 plantas medicinales fueron puestos en contacto in vitro con 10 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, los resultados de Actividad de las plantas medicinales sobre las cepas de *Streptococcus pneumoniae* son el almendro y Bellaco caspi fueron las únicas plantas que dieron pequeño halo de inhibición con algunas cepas; “con almendro se inhibió dos cepas y con Bellaco caspi, se inhibió siete cepas y tres resultaron resistentes”. Estos resultados no tuvieron relación con el serotipo de neumococo ni con los antibióticos utilizados en los antibiogramas realizados previamente. “su conclusión es que el Bellaco caspi podría ser una alternativa para atacar al neumococo en la nasofaringe”. Pero, por haber presentado resistencia a tres cepas de *Streptococcus pneumoniae*, antes de usarlo sería conveniente desarrollar un antibiograma de los neumococos contra las plantas medicinales.

FLORES, F. (2015)², tesis para optar título profesional de químico farmacéutico, Hizo el estudio de “**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL BELLACO CASPI (*Himatantus sucuuba*) Y LA CONGONA (*peperomia galioides*)**”, LIMA, PERÚ. El Resumen de este trabajo “se determinó in vitro la actividad antibacteriana de la corteza de *Himatanthus sucuuba*”, una especie nativa de la Amazonia peruana y hojas-tallos del *Peperomia galioides* proveniente de Huaraz. Sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus* del Hospital Essalud Angamos. Se preparó los extractos hidroalcohólicos al 25, 50, 75 y 100 % P/V y para evaluar la actividad se utilizó el método por difusión en discos Kirby – Bauer. “Los resultados demuestran que los extractos hidroalcohólicos de las muestras tienen acción antimicrobiana frente de la cepa, se obtuvo

halos de inhibición de crecimiento bacteriano con una mejor actividad al 100 % de concentración y en comparación de ambos extractos de los halos de mayor diámetro fueron del *Himatantus sucuuba*, dicha actividad probablemente se deba a la presencia de alcaloides en el extracto alcohólico de la corteza”.

CENTURION, J. (2017)⁵⁴, tesis para titulación **“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Laurus nobilis* “LAUREL” SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”**, TRUJILLO, PERÚ. El objetivo de la investigación fue demostrar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sus material y método: investigación tipo experimental in vitro, para lo cual se empleó cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mantenida en el cepario de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, los resultados que se demostró fue el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para lo cual se realizó el estudio con tres concentraciones 25%, 50%, 100%. El aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) posee efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En base a los resultados obtenidos durante la investigación, los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 100% tuvieron una media de 15.1 mm comparado con la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es muy sensible para esta concentración, así como los halos de inhibición obtenidos a la concentración de 50% tuvieron una media de 10.1 mm comparado con la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible para esta concentración mientras que los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 25% tuvieron una media de 5.1 mm comparado con la escala de Duraffourd esta es nula. En conclusión si existe efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.1.2. Antecedentes Internacionales

NEGRETE, M. Et al. (2015)⁵⁵, artículo, realizado fue en “**ESTUDIO IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE LA HOJA DE COCA (*Erythroxyllum coca Lam*) FRENTE A BACTERIAS ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa***”, universidad cristiana de Bolivia. El objetivo fue Comprobar la actividad antibacteriana del macerado de la hoja de coca (*Erythroxyllum coca Lam*) proveniente de los departamentos de Cochabamba y La Paz, Posteriormente se prepararon macerados con tres solventes: Solución fisiológica, Alcohol (absoluto) y Cloroformo. Luego se determinó la actividad antibacteriana del macerado frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los diferentes extractos alcohólicos que se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana de la hoja de coca (*Erythroxyllum coca Lam*) seca y fresca presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus*. No se ha demostrado actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con los tres solventes utilizados. Diferentes investigaciones corroboran la acción antibacteriana de la hoja de coca (*Erythroxyllum coca Lam*) en preparados de solución alcohólica frente a bacterias Gram positivas.

Mosquera T. (2014)¹⁷ Tesis para optar el título de magister en ciencias y tecnologías cosméticas “**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA ANTIBACTERIANA DE UNA MEZCLA DE PARABENOS FRENTE AL ACEITE DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis Lamiaceae*) UTILIZADOS COMO CONSERVANTES EN UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA**”, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, QUITO. Hizo una investigación con el objetivo de comparar la eficiencia antibacteriana entre parabenos frente al aceite esencial de romero, para lo cual desarrolló cinco fórmulas de champús en las que varía únicamente el ingrediente de acción conservante: una fórmula de conservante comercial, corresponde a una mezcla de parabenos al 0.7% concentración aceptada por regulaciones internacionales como COLIPA, tres utilizando el aceite esencial del romero al 1.5% y 2.5%, y la quinta sin ninguno de los ingredientes antibacterianos. Aplicó el método de

eficiencia Preservante ISO 11930:2012 de la regulación europea 1223/2009. “Concluyendo que los resultados fueron que el aceite esencial del romero incorporado a una concentración cosmética desde una concentración de 1% genera una eficacia similar a la que presenta un conservante comercial constituido por una mezcla de parabenos incorporado a una formulación en una concentración de 0.7%. El aceite esencial puede ser considerado un sistema conservante aceptable. Con los resultados se confirma la hipótesis planteada en el estudio”.

Ramos A. (2013)¹⁰, tesis para optar título de MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES E HIDROSOLES DE *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS**”, Colombia. Realizó este trabajo, con el objetivo de observar y determinar el efecto antimicrobiano de aceites esenciales e hidrosoles a partir de dos especies vegetales: *Rosmarinus officinalis*.L y *Taraxacum officinale* contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, proporcionadas por el cepario de bacterias de la facultad de Ciencias de Pontificia Universidad Javeriana. El aceite esencial obtenido del romero, se extrajo a partir de hojas de la planta mediante el uso de un aparato de Clevenger, y el hidrosol como subproducto de la destilación; para diente de león se realizó el mismo procedimiento por hidrodestilación, encontrando únicamente hidrosol. Se realizó la evaluación de densidad como parámetro. Complementaria a estas evaluaciones, se realizó la técnica de extracción por micro gota, y a través de un cromatógrafo de gases acoplado a masas, se determinaron los compuestos presentes en el hidrosol que se encuentran en el solvente. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana tanto del aceite esencial como de los hidrosoles, se realizó por difusión de disco en agar, se realizó la lectura por halos de inhibición. La actividad antimicrobiana no se evidenció con las concentraciones evaluadas. Finalmente se “concluye que no hay aceite esencial en las hojas de diente de león. La técnica de microgota es una gran opción para la identificación de compuestos naturales, y su composición química; encontrando que en 30

comparación entre los dos solventes el diclorometano, tiene una mayor capacidad de extracción a las condiciones dadas en el ensayo y por los componentes que se encuentran en dicho extracto. Respecto a la actividad antimicrobiana, mediante las concentraciones de ensayo a las que se sometieron los microorganismos, no hay una respuesta de inhibición”.

2.2. Bases teóricas

2.2.1 Métodos de obtención de extractos vegetales.

2.2.1.1 Extracción

Carrión A. (2010)¹⁰ Los extractos de las plantas aromáticas medicinales de nuestra selva se pueden obtener de varias formas, se pueden emplear varios métodos. Como por ejemplo en nuestra investigación se empleó el siguiente.

a) Extracción por solución.

Precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, “además de obtenerse prácticamente todos los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos. Carrión A.”¹⁰

Por otra parte, precisa de equipos de vacío para poder obtener los aceites absolutos, con altos costes operativos en comparación con los de extracción por arrastre o EFS. “Y sobre todo es necesario utilizar disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres. Carrión A.”¹⁰

También conlleva necesariamente establecer etapas adicionales de purificación si la esencia o el producto se van a destinar al consumo o la higiene humana. “Esta

restricción ha implicado tener que buscar nuevas soluciones y optimizar al máximo su recuperación, pero también ha elevado su coste y su aplicación.

Carrión A.”¹⁰

Para ello se lleva a cabo una extracción con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura.

Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, no soluble en agua, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato.¹⁰

Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua. “La extracción puede ser sólido – líquido o líquido – líquido en función del estado de la muestra. Carrión A.”¹⁰

b) Extractos fluidos.

De lo indicado por CETRÁNGOLO, O., Et al (2013)¹¹. Se obtienen por percolación con alcohol de 70° y posterior concentración a vacío y estandarización hasta 1:1. Generalmente, se realiza en primer lugar una extracción exhaustiva en la que se obtiene el 80% como

líquido y luego el resto se concentra a vacío hasta la consistencia de blando y se mezclan estandarizándose hasta 1:1.

2.2.1.2 Factores que intervienen en un procedimiento de extracción

En la extracción se tiene en cuenta los siguientes factores:

- Naturaleza de la droga: Características propias del material, como dureza (semillas), si la droga es fresca o seca, comportamiento de la misma frente al menstuo (hinchamiento).
- Características del menstuo: Deberá ser lo más selectivo posible para los p. a. que se desean extraer a fin de lograr su total disolución, y que la proporción de principios inactivos que arrastre sea la menor posible.
- Es preferible utilizar menstuos con propiedades antimicrobianas, dado que las soluciones extractivas, por provenir de drogas animales o vegetales, son fácilmente atacadas por microorganismos.
- Según el tipo de producto final que se desee, la selección del menstuo se encontrará condicionada en mayor o menor medida. Ej. para el caso de tinturas o extractos líquidos, el mismo deberá ser inocuo, no tóxico, sin acción farmacológica propia; mientras que para el caso de los extractos secos la gama de disolventes para elegir es más amplia.
- Otro factor importante en la elección es el económico.

Los solventes más utilizados son el agua, el alcohol y las mezclas hidroalcohólicas:

A. Agua

La ventaja del agua es que es un solvente natural y se utiliza para la extracción de sustancias hidrófilas, siendo además económica, sin embargo, no es muy selectiva, también fácilmente alterable por la acción de microorganismos.

Disuelve:

Glicósidos

- Sales de alcaloides
- Gomas
- Mucílagos
- Sales minerales
- Saponinas
- Carbohidratos
- Pectinas
- Proteínas, etc.

No disuelve:

- Alcaloides
- Grasas
- Resinas
- Aceites esenciales, etc.²⁹

2.2.1.3 Recolección y tratamiento de las drogas vegetales

Es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de salud. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo. La obtención de las drogas

vegetales se realiza a partir de las plantas medicinales, las cuales se pueden clasificar en silvestres y cultivadas.³⁰

2.2.1.4 Selección

La selección de las plantas se realiza según el contenido del principio activo en las diferentes drogas, así también, que permita su fácil recolección y manipulación. Se pueden describir “dos tipos de selección: Aquella que nos permite seleccionar las mejores plantas de cada cosecha.

Selección que consiste en modificar genéticamente a una planta en particular, para obtener plantas con características deseadas.”³⁰

2.2.1.5 Recolección:

El proceso de la recolección de las especies vegetales depende de las características propias de cada especie, y la recolección se realiza de forma manual o mecanizada. “Existen ciertos factores que pueden afectar la concentración de sus principios activos tales como:

- La edad de la especie vegetal: no solo influye en la cantidad total de principio activo, sino también en la proporción de los componentes de la mezcla activa.
- La época del año: el clima y la época del año influye en la cantidad de principio activo.
- Hora del día: se ha evidenciado que existe una variación del día a la noche, en los metabolitos vegetales secundarios”.³⁰

2.2.1.6 Conservación:

El autor Añazco K. (2010)³⁰ Las causas de alteración pueden ser internas y externas:

A. CAUSAS INTERNAS

- Reacciones enzimáticas.
- Autooxidaciones.
- Reacciones entre diferentes componentes de la droga.

B. CAUSAS EXTERNAS

- Calor
- Humedad
- Radiaciones
- Microorganismos
- Insectos, etc.³⁰

2.2.1.7 Procedimientos para eliminar el agua:

El secado de las plantas es muy importante ya que inmediatamente después de ser recolectadas no pueden ser sometidas de forma inmediata a maceración o destilación, lo que el secado nos permite evitar el deterioro del material vegetal y la pérdida de aceites y propiedades farmacológicas.³¹

Se tiene las siguientes formas de secado

- 1. Desección: Muñoz F** La desecación puede realizarse de manera lenta cuando es necesario estimular la acción enzimática, o puede ser rápida cuando se quiere evitar la misma. El proceso de desecación lo podemos dividir en³²:

- 1.1. Desección natural:** es un proceso lento, económico. Se pueden emplear cobertizos, bandejas, telas metálicas galvanizadas, papeles extendidos sobre un armazón de madera, etc.
- 1.2. Desección artificial:** permite un control de la temperatura, de la humedad y del tiempo que tarda el proceso. Es generalmente el más adecuado, de corta duración, útil en donde la humedad es muy elevada. Para la desección artificial se puede utilizar: túneles de secado, torres de secado, estufa al vacío, etc. “La desección artificial contribuye a que las flores y hojas conserven su color y las drogas aromáticas su aroma, pero la temperatura empleada en cada caso ha de ajustarse en función de los componentes y la naturaleza física de la droga. Como regla general, las hojas, sumidades y flores deben secarse entre 20 y 40 ° C y las cortezas y raíces de 30 a 65 ° C” (Evans, 1991) “Con la desección artificial se debe tener siempre presente determinar el punto exacto de desección; debido a que si las drogas delicadas se desecan en exceso se tornan quebradizas, tendiendo a romperse durante el transporte.”¹⁵
- 1.3. Secado bajo vacío:** Este secado se lleva a cabo a bajas temperaturas que oscila entre 20 a 25 °C, este secado es un proceso de laboratorio.¹⁵
- 1.4. Secado por rayos infrarrojos:** Este tipo de secado es utilizado para legumbres y frutos deshidratados lo que no es aconsejable para plantas medicinales ya que se alterarían sus principios activos³².

2.2.1.8 Pérdidas de peso en el secado:

De acuerdo a lo señalado por Muñoz F (1996)³², El recolector o investigador debe tener pleno conocimiento de las plantas, ya que en su estado fresco tienen un peso diferente considerable, que varía durante el proceso de desecación y que el rendimiento de las recolecciones varía con las especies, los órganos y la época de recolección. Así tenemos:

- 1 kg de raíces se obtienen, en general, de 250 a 350g de droga sea.
- 1 kg de cortezas frescas se obtienen, en general, de 300 a 400g de droga seca.
- 1 kg de hojas frescas, se obtiene en general, de 150 a 250g de droga seca.
- 1 kg de flores frescas se obtienen de 100 a 200g de droga seca.”³²

2.2.2 Etnobotánica

LÓPEZ C, et al. Afirman que el hombre ha utilizado las plantas durante los últimos 5000 años. Los egipcios escribieron sobre las hierbas en el 2000 aC., y las primeras fechas de los herbarios chinos se remontan 1000 años más. En el bajo imperio Romano, las hierbas y las especias fueron tan valoradas que se utilizaron como moneda. En la biblia se dice que el anís, el comino y la menta eran pagos del impuesto aceptables durante el primer siglo de nuestra era. Plinio el viejo menciona las hierbas como parte del conocimiento humano. En la época medieval el conocimiento de las hierbas era tan importante para la salud y la felicidad que se guardó celosamente en los monasterios (“Herbals manuscrito”). Del conocimiento de la medicina tradicional la ciencia moderna ha

encontrado las pistas para el descubrimiento de innumerables productos farmacológicamente importantes.⁸

2.2.2.1 Bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

2.2.2.2 Descripción Bellaco caspi

Himatanthus tarapotensis que pertenece a la familia Apocynaceae conocido en Perú como "bellaco caspi", es un árbol distribuido en una gran cantidad de hábitat de la Amazonía Peruana, llega a medir hasta 30 m. y es muy utilizado en la medicina tradicional de las zonas rurales para el tratamiento de varias dolencias y tiene un sabor amargo.⁴



FIGURA 1. La especie de ***Himatanthus tarapotensis***.³

2.2.2.3 Características de la especie de *Himatanthus tarapotensis*.

La Muestra fértil son las hojas y flores de ***Himatanthus tarapotensis***.

Las hojas generalmente son de forma alternadas lanceoladas, tallo redondeado Sus frutos son dos folículos coriáceos de forma elíptica, y el ápice agudo a acuminado. Presenta flores con el cáliz pequeño y

reducido, de color blanco. Y el número de venas secundarias puede variar de 12 a 24. Las corolas miden entre 35 a 45 mm de longitud, los lóbulos de la corola son simples y el tubo y la cabeza del estilo no tiene vello. El tamaño de los folículos contribuye a la Diferenciación de especies, que mide 12.5-25.5 cm de longitud en *H.tarapotensis*.⁷

Clasificación taxonómica de la Himatanthus tarapotensis

(Bellaco caspi)

Taxonomía botánica

Clase:	EQUISETOPSIDA
Subclase:	MAGNOLIIDAE
Superorden:	ASTERANAE
Clase:	EQUISETOPSIDA
Orden:	GENTIANALES
Familia:	APOCYNACEAE
Género:	<i>Himatanthus</i>
Especie:	<i>Himatanthus tarapotensis</i>
Nombre común:	“BELLACO CASPI”.

2.2.2.4 Hábitat natural.

Al principio **GUEVARA, J. (2012)**¹ Dice que se encuentra a lo largo de los ríos, se adapta muy bien a suelos aluviales bien drenados en la selva tropical de Loreto.

2.2.2.5 Floración y Fructificación.

LOPÉZ, R. et al. (2005).⁶¹ De acuerdo al material de herbario, el florecimiento ocurre a partir de noviembre hasta junio, siendo el pico de floración entre febrero y abril los frutos se encuentran desde noviembre, pero

maduran entre marzo y mayo. Las semillas son dispersadas por el viento.

2.2.2.6 Composición química del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

AMASIFUEN, C., (2016)⁷ Las propiedades medicinales de especies *Himatanthus* están relacionados, en particular, a la presencia de terpenos bioactivo Plumericina.

2.2.3 Terpeno Bioactivo Plumericina ⁸.

LÓPEZ C., Et al (2012)⁸ afirma que los terpenos o isoprenoides se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímico más difundido. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-buta-dieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono.

Los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales.

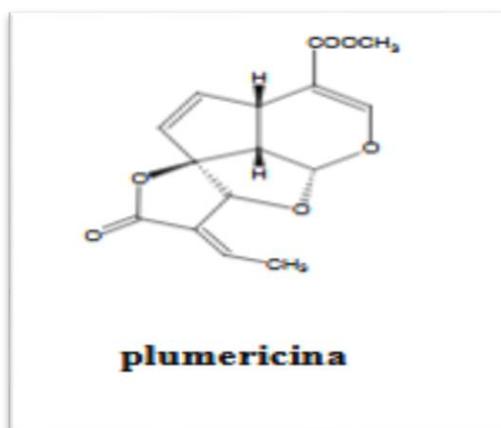
Tabla 1.- Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides⁸

FITOQUÍMICOS		PROPIEDADES
TERPENOS	Iridoides	Amebicida Inflamatoria Antimicrobiana
	Saponinas	Anticancerígena Antiinflamatoria Hipocolesterolemiantes
	Carotenoides	Antioxidante Prevención de degradación macular Prevención de enfermedades cardiovasculares

2.2.3.1 Actividad biológica de los iridoides

AMASIFUEN, C., (2016)⁷ Después de mucho tiempo los iridoides no se consideraron farmacológicamente importantes. Pero como hemos visto estaban presentes en un gran número de tónicos, sedativos, febrífugos, antitusivo, remedios para las heridas y desordenes de la piel y como hipotensivos. Y los secoiridoides glucosilados están presentes en muchas preparaciones para el tratamiento de dolencias de estómago. Recientes investigaciones han revelado su amplio espectro de bioactividades y su potencial farmacológico.

2.2.3.2 Afirma **AMASIFUEN, C., (2016)⁴** la fórmula de la **Plumericina**



2.2.3.3 Usos medicinales del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

AMASIFUEN, C. (2016)⁴; MEJIA, K., .et al (2000)²² afirman que tradicionalmente las Poblaciones rurales de la amazonia peruana utiliza el látex para tratar enfermedades como la leishmaniasis, Malaria, parásitos intestinales, úlceras, infecciones, procesos inflamatorios, tumores, la fiebre, antimalárico, los dolores lumbares, Su madera es utilizada como leña o como carbón para las

cocinas rurales. Su madera es utilizada en construcciones rurales tradicionales.

2.2.3.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

1. Concepto

Bajo la denominación de Villar (2010)³³, un agente “antimicrobiano inhibe o mata la replicación de microorganismos; si lo produce otro microorganismo entonces hablamos de antibiótico. Las sulfonamidas y quinolonas por tanto no son antibióticos. Aquellos compuestos inorgánicos que matan la mayoría de micro-organismos (excluyendo las esporas) y que pueden usarse en piel se les conocen como antisépticos. Los desinfectantes son antimicrobianos muy fuertes (agentes corrosivos o caústicos) que no se pueden usar sobre tejidos vivos y se emplean para tratar superficies y utensilios de cirugía.

- Antimicrobiano = inhibe o mata bacterias
- Antibiótico = lo produce un microorganismo e inhibe o mata bacterias.
- Antiséptico = antimicrobiano inorgánico que si pueden usarse en piel. Desinfectante = antimicrobiano de uso en objetos inanimados”.³³

2. Principios de terapia antimicrobiana

- Mantener concentraciones plasmáticas por “encima” de MIC durante varios días después de la remisión de síntomas. De lo contrario, existe gran riesgo de que se creen resistencias. Cambiar terapia si no hay mejoría en 72 horas.
- La limpieza de heridas y abscesos es crítica para facilitar la acción de los antimicrobianos
- Usar agentes bactericidas si existe neutropenia

- Si no disponemos de un antibiograma, emplear el antimicrobiano de elección basado en el tipo de bacteria que normalmente causa infección en dicho órgano/tejido afectado y especie animal (ver tablas adjuntas al final*)
- 5) Si se han de combinar antimicrobianos, que actúen por distintos mecanismos y tengan sinergia.

3. Diferencias gram (+) y gram (-)

Villar V. establece que las “diferencias básicas entre bacterias Gram (+) y Gram (-): Por regla general y con varias excepciones importantes, las bacterias Gram negativas son más patógenas que las (+) por su estructura de membrana.”³³

- Las Gram (-):** Estas “tienen lipopolisacáridos en su membrana externa que actúan como endotoxinas cuyo efecto es inespecífico activando los procesos de inflamación que en su grado extremo se manifiesta como el shock endotóxico (también llamado séptico)”.³³
- Las Gram (+):** Estas bacterias más bien “suelen producir exotoxinas, que son proteínas con un efecto mucho más específico. Por ejemplo, el *Clostridium tetani* produce una exotoxina que actúa a nivel del SNC provocando la parálisis de las motoneuronas. Puesto que la toxicidad de ambos grupos de bacterias es ejercida por sus toxinas, a continuación se muestra una tabla que indica las principales diferencias entre ambas toxinas”.³³

4. Según su efecto los antimicrobianos se clasifican en:

- Bacteriostático, Villar V (2010)**³³ fungistático “detiene” la proliferación pero no matan (inhibidores de la síntesis de proteínas). Limitan que se expanda la infección mientras que el sistema inmune se encarga de inmovilizar y eliminar el patógeno.

B. Bactericida, Villar V (2010)³³ fungicida “matan” los microorganismos aunque a veces solo actúan sobre los que se multiplican (β -lactámicos).

5. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Villar V (2010)³³ La potencia viene dada por la concentración mínima inhibitoria (MIC-“mínimum inhibitor y concentration”) o la concentración mínima bactericida.

i. Concentración mínima inhibitoria (CMI):

Villar V (2010)³³ Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10⁵ bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

ii. Concentración mínima bactericida (CMB):

Villar V (2010)³³ Es la menor concentración capaz de destruir o matar.

10⁵ bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

2.2.4. Staphylococcus Aureus

Sánchez L. (2006)³⁴ “El S. aureus es un microorganismo coagulasa positivo, fermenta el manitol, desarrolla colonias color oro y es catalasa positiva. Es un miembro constante de la flora microbiana en el 10 al 20% de la población”. Las bacterias de S. aureus se acumulan en cavidades como fosas nasales (35%), perineo e inglés (20%), axilas (5 a 10%), ombligo y manos (13%). Se halló en personas con dermatitis atópicas que tiene estas bacterias en los espacios subungueales distales de las uñas, con una frecuencia 5 y 10 veces mayor que en los individuos normales. “Niños y adultos con dermatitis atópica tienen entre el 78 y 100% de las lesiones eccematosas colonizadas por S. aureus. Las

infecciones suelen ocurrir a causa de las secreciones y por el arrastre de los mismos por los dedos y a través de los vestidos”. Este género de bacteria es muy agresivo, originando muchos componentes celulares y productos extracelulares que contribuyen a su patogenicidad. Siendo así los componentes celulares que conforman la estructura de la bacteriana consisten en:

- Peptidoglicanos. Poseen importantes actividades biológicas: inducción de IL-1, atracción de polimorfonucleares, activación del complemento e inducción de anticuerpos opsónicos.³⁴
- Ácido teicoico. Juega un papel importante en la adherencia de la bacteria.³⁴
- Proteína A. Es parte de la porción externa de la capa de peptidoglicano siendo capaz de unir la fracción Fc de las IgG evitando la fagocitosis.³⁴
- Cápsula. “Algunas cepas la poseen, tendría un rol antifagocítico. Los componentes extracelulares (factores de virulencia no estructurales) se refieren a enzimas y toxinas producidas por la bacteria”.³⁴

A. ENZIMAS: SÁNCHEZ L. (2006)³⁴:

1. **Catalasa:** Previene la acción de los radicales tóxicos al degradar el peróxido de hidrógeno provocado durante la fagocitosis.
2. **Coagulasa:** Convierte el fibrinógeno en fibrina al unirse a la protrombina, favoreciendo la formación de coágulos, durante la infección, al interior de este coágulo quedan atrapados células fagocíticas, detritus celular y bacterias, originando abscesos”.

3. **Otras:** Hialuronidasa, lipasa y ADN asa.

B. TOXINAS: SANCHEZ L. (2006)³⁴

1. **Leucocidinas:** Provoca de granulación y destrucción de los granulocitos.
2. **Exfoliativa:** Toxina que causa la descamación de la piel y forma ampollas intra epidérmicas en la piel.
3. **Toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1):** “Está codificada a nivel cromosomal y pertenece a la familia de los súper antígenos”. Ejecutan su efecto formando un puente o unión inespecífica entre las moléculas MHC II de las células presentadores de antígeno y los receptores de las células T.

Esto provoca la activación gran cantidad de linfocito T, liberándose una cantidad excesiva de citoquinas.

Gil M. (2000)³⁵, refiere que la “especie de bacteria *Staphylococcus aureus* es un agente etiológico de numerosas enfermedades, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario, etc. Por su ubicuidad y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se otorga especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales”.

2.2.5. PATOGENIA MICROBIANA

Soriano E (2006). La capacidad que tiene un microorganismo para producir una enfermedad depende del grado de patogenicidad y ésta, a su vez, depende de la facilidad y medio con que consigue hallar un huésped sensible, obtener acceso a un tejido diana adecuado y sobresalieron los mecanismos de defensa del huésped. “La capacidad de un microorganismo para producir efectos nocivos en un huésped se denomina virulencia. La patogenia de los microbios depende de múltiples factores, que pueden resultar modificados por influencias genéticas y medioambientales”. En las bacterias idóneas para producir infección de las heridas, ciertas características estructurales, de producción de enzimas y de productos metabólicos aportan tanto a la virulencia como a la patogenia. Las cápsulas (p. ej., *Pseudomonasa aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) protegen a las bacterias frente a la destrucción mediada por los fagocitos o por la activación del complemento. “La presencia de finos apéndices superficiales (pili) que se proyectan en muchas bacterias (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) favorece su adherencia a las células del huésped y éste es, en muchos casos, el primer paso del proceso de la infección”. Los polisacáridos que conforman algunas paredes bacterianas (p. ej., *Staphylococcus* y *Streptococcus*) provocan su fácil adhesión a los componentes de la matriz extracelular del tejido objetivo, como son la fibronectina y el colágeno.

Hay mayor posibilidad en las heridas, la infección extracelular es más frecuente que la intracelular ya que muchos patógenos dependen de la producción de

enzimas extracelulares para invadir los tejidos profundos del huésped.³⁶

“La lesión del huésped también puede estar causada por la producción de toxinas microbianas”, Producirán exotoxinas las bacterias que son viables, mientras que los componentes fundamentales de la pared celular están formados por las endotoxinas que se liberan con la muerte y por efecto la destrucción de la célula microbiana. Los efectos dependen de las concentraciones de las toxinas que a su vez son sistémicos o también locales, siendo la más tóxica las exotoxinas a comparación que las endotoxinas y dañando células diana específicas.³⁶

Los microorganismos son capaces de detectar y responder al entorno con rapidez. “De igual modo, pueden combatir los intentos planteados por las defensas del huésped durante la infección a través de la regulación de la expresión de genes que codifican los determinantes de la virulencia”. Las densidades de la población de estos microorganismos dependen de algunos mecanismos de adaptación por el cual cuando esta población es poca, los genes que se encargan de codificar la virulencia no se expresan, cuando el número es mayor en este caso si lo hacen, por consiguiente, mayor virulencia del germen.

Conociéndose como autoinducción a este fenómeno. La dinámica de estas interacciones “no se conoce aún por ahora muy bien. Una complicación adicional es la posibilidad de que las comunidades poli microbianas residentes en las heridas formen biofilms. Esto se ha demostrado en modelos de heridas animales. Como las biofilms se habían asociado ya a la persistencia de las

heridas humanas, su presencia en las lesiones crónicas podría asociarse a una mala cicatrización”.³⁶

2.2.6. Tipos de infecciones cutáneas y enfermedades

A. Impétigo:

Saavedra J. (2008)³⁷ Es una infección de la capa superficial de la piel (epidermis), y es la infección cutánea más frecuente en los niños. Su incidencia demanda más entre la edad de 2-5 años. Este tipo de infección se relaciona a la escasa higiene y hacinamiento, y se contagia con gran facilidad, por lo que el lavado de manos y otras medidas de prevención son muy importantes para evitar el contagio y brotes.

B. Foliculitis:

Esta es un tipo de infección superficial “del folículo pilo sebáceo, que se encuentra ubicadas principalmente en el cuero cabelludo, nalgas o extremidades, producido generalmente por *S. aureus*. Al inicio es una pápula eritematosa que va desarrollarse hasta una pústula centrada por un pelo. Algunos factores que p

redisponen son la falta o poca higiene, humedad, oclusión o uso prolongado de antibióticos como en el caso del acné. En ocasiones puede estar producido por *Cándida*, *Malassezia* o *P. aeruginosa*. El tratamiento es similar al impétigo. Puede haber resolución espontánea tras resolverse los factores que predisponen”.³⁷

C. Hidrosadenitis:

La Hidrosadenitis es una “inflamación crónica y supurativa de las glándulas apocrinas, que se localiza por lo general en la región de axila y región ano-genital. Suele producirse siempre con mayor frecuencia en la adolescencia o juventud, y evolucionar de forma crónica, con recaídas y remisiones parciales durante varios años. Empieza con nódulos solitarios o múltiples, suelen ser dolorosos y eritematosos, son abscesos profundos de las zonas afectas”.³⁷

D. Paroniquia:

Saavedra J. (2008)³⁷ Esta denominación corresponde a una infección de la “zona del pliegue cutáneo ungueal secundario a una lesión por succión, mordeduras de la uñas o pliegues cutáneos, o poca higiene. Las zonas de los pliegues laterales se encuentran calientes, eritematosos, y dolorosos, donde se ve la aparición de sustancia supurativa. En la mayoría de los casos existe una flora mixta oro faríngeo. Si la zona de afectación es superficial, el drenaje quirúrgico local y antisépticos o antibióticos tópicos en el tratamiento son suficientes. En una afectación profunda el tratamiento sería necesariamente con antibióticos sistémicos. En caso de afectación profunda puede ser necesario el tratamiento antibiótico sistémico. Las paroniquias bacterianas deben diferenciarse de las producidas por Cándida o herpes simple. Y la diferenciación debe tenerse en cuenta por las producidas por cándida o herpes simple”.

E. Celulitis:

Esta inflamación de la piel corresponde, cuando es afectada o se detecta la presencia de inflamación en una zona de la piel, en particular de la dermis y tejido celular subcutáneo al cual se reconoce por el edema, eritema y dolor de la zona afectada. Los bordes laterales suelen ser poco diferenciados dada la profundidad de la zona de infección. Los microorganismos que más se implican son *S. pyogenes* y *S. aureus*, aunque en algunas circunstancias neumococo, *Salmonella* o *Enterobacterias* también pueden producir la infección. La celulitis originada en el pie tras punción a través del zapato se origina principalmente por *P. aeruginosa*".

"En caso de mordedura, *Pasteurellas* anaerobios podrían estar implicados, y si la celulitis se relaciona con inmersión en agua, *Aeromonas* (agua dulce) o *Vibrio* (agua salada) podrían ser agentes responsables", en este caso habría que trabajar con un aminoglucósido o quinolonas al tratamiento antibiótico habitual. "La celulitis puede producirse por contigüidad por otro tipo de infección, como impétigo, o como consecuencia de una bacteriemia". A demás puede producir complicaciones como artritis, osteomielitis, tromboflebitis, bacteriemia o fascitis necrotizante. "El diagnóstico etiológico puede conseguirse en un 25% de los casos con hemocultivo (5%) o cultivo de aspirado de la zona de máxima inflamación".³⁷

F. Piomiositis:

Saavedra J. (2008)³⁷ La Piomiositis del psoas también es una entidad clínica característica de la infancia-adolescencia. El dolor abdominal o de espalda son síntomas característicos, que se irradia al hombro. La miositis por *S. pyogenes* también se observa con mayor frecuencia en la actualidad debido al carácter de invasividad del microorganismo. Se ha relacionado con el antecedente de varicela y puede progresar a un cuadro de shock tóxico. El tratamiento de la piomiositis consiste en antibioterapia empírica con penicilina anti estafilocócica, y en caso de haber absceso, drenaje. La piomiositis por *S. pyogenes* suele necesitar drenaje quirúrgico o aseo quirúrgico acompañado al tratamiento antibacteriano que consiste en un betalactámicos y clindamicina.

G. Ectima:

Saavedra J. (2008)³⁷ La ectima corresponde a una “infección bacteriana tiene forma de ampolla de la piel similar al impétigo, pero más profundamente invasivo que éste, caracterizado clínicamente por una vesícula o pústula que evoluciona hacia la formación de una úlcera de bordes como de una costra amarillenta, de curso crónico y que cura en forma lenta”.

H. Erisipela:

La erisipela es una infección bacteriana infecciosa aguda de la capa externa de la piel y parte superior del tejido celular subcutáneo, Se caracteriza por placas eritematosas y edematosas bien de-limitadas, acompañadas de malestares generales. El responsable de la infección es el estreptococo beta-hemolítico del grupo A, algunas veces es ocasionada

por el S. aureus, y menos frecuentemente por estreptococos de los grupos B, C y G".³⁷

I. Enfermedades:

- Acné, Forúnculos y ántrax.
- Síndrome de piel escaldada o dermatitis exfoliativa generalizada, impétigo.
- Lesiones profundas.
- Infección de herida postoperatoria.
- Infección asociada a cateterismo.
- Infección transmitida por alimentos contaminados o envenenamiento alimenticio estafilocócico. ^(10, 27)

2.2.7 Vía Transmisión

- Secreción nasal.
- Contacto directo con piel (acné, furúnculos) o fómites contaminados por mal higiene.
- Alimentos contaminados como embutidos, carnes frías, también papas, ensaladas y platillos cremosos.²⁶

2.2.7.1. Signos y síntomas de infecciones cutáneas

- **Eritema:** Presencia de un enrojecimiento de la piel, con presencia de exudación o simplemente congestivo.³⁸
- **Ulceración:** "Es una lesión de la piel, producida por un proceso de isquemia, que puede afectar y necrosar aquellas zonas de la epidermis, dermis, tejido subcutáneo y músculo donde se asientan, también pudiendo afectar hasta las articulaciones y huesos".³⁹
- **Fiebre:** En lo mencionado por Alpizar L. (1998), "Se señala la importancia del

hipotálamo en el control de la temperatura corporal y las diversas formas de medir la fiebre, para lo cual se usan valores normativos o referenciales para nuestro medio”.⁴⁰

- **Sensibilidad de la zona:** “Es el proceso del dolor se inicia con la activación y sensibilización periférica donde tiene lugar la transducción por la cual un estímulo nociceptivo se transforma en impulso eléctrico”. La fibra nerviosa estimulada involucra reflejos a un impulso nervioso denominado potencial de acción conectada hasta la segunda neurona que se encuentra en el asta dorsal de la médula.⁴¹
- **Edema:** La Hinchazón por el aumento de volumen del líquido en el intersticio que se caracteriza al oscultamiento de un hoyuelo al ejercer presión sobre la piel”.⁴²

2.2.8 Taxonomía de *Staphylococcus aureus*

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Firmicutes</i>
CLASE	<i>Bacilli</i>
ORDEN	<i>Bacillales</i>
FAMILIA	<i>Staphylococcaceae</i>
GENERO	<i>Staphylococcus</i>
ESPECIE	<i>Staphylococcus .aureus</i> Rosenbach 1884

2.2.8.1 CARACTERÍSTICAS:

SOCORRO, G., et al. (2014). Estos autores dan la gran importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también el contacto de persona a persona.²⁵

El *Staphylococcus aureus* es un patógena de las más de 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus aureus* que forman parte de su género *S. aureus* fue observado por primera vez por Koch y Pasteur. En 1880 el cirujano Sir Alexander Ogston él lo nombra estafilococos por primera vez. Son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva.^{20 9}

En los últimos años, la incidencia de bacteriemia por *Staphylococcus A* ha aumentado significativamente, ya que una especie de esta familia bacteriana ha aumentado su frecuencia de aparición; se trata de la especie *Staphylococcus aureus*, que se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones ocasionadas por alimentos.²⁴

Sin embargo, *Staphylococcus aureus* es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos.¹³



FIGURA 2. El investigador Socorro, G., et al. Sus representaciones características macroscópicas del ***Staphylococcus aureus***.

2.2.9 MEDIOS DE CULTIVO.

MADIGAN, M. et al. Es una preparación sólida o líquida empleada para cultivar, transportar y almacenar microorganismos. Para ser efectivo, el medio debe contener todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse.

Los medios especializados son esenciales en el aislamiento y en la identificación de microorganismos, en ensayos de sensibilidad a antibióticos, análisis de alimentos y de agua, microbiología industrial, y otras actividades.¹²



FIGURA 3.- El investigador Madigan, M. et al. Lo representa a los medios de cultivos líquidos.¹²

2.2.9.1 Tipos químicos y físicos de medios de cultivo

Un medio del cual conocemos todos sus componentes químicos se denomina medio definido o sintético, puede existir en forma líquida (caldo) o solidificada por la adición de un agente como el agar. Los medios definidos suelen usarse para cultivar autótrofos Fotolitótrofos, como las cianobacterias y los protistas fotosintéticos.

Estos organismos pueden ser cultivados en medios relativamente sencillos, conteniendo CO.

Como fuente de carbono (a menudo añadido en forma de carbonato o bicarbonato de sodio); nitrato o amoníaco como fuente de nitrógeno; sulfato, fosfato y varios minerales.

Muchos heterótrofos Quimioorganótrofos también pueden ser cultivados en medios definidos, con glucosa como fuente de carbono y una sal de amonio como fuente de

nitrógeno. Los medios definidos se usan frecuentemente en la investigación, pues suele ser interesante saber qué compuestos están metabolizando los microorganismos en un experimento dado.

Los medios que contienen algunos ingredientes de composición química desconocida son los medios complejos. Estos medios son muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer completamente las necesidades nutricionales de un microorganismo, y por tanto no se puede diseñar un medio definido. Esto ocurre, por ejemplo, con muchas bacterias exigentes que presentan requerimientos inusuales de cultivo o nutricionales: pueden incluso necesitar un medio conteniendo sangre o suero.

Los medios complejos contienen componentes no definidos como peptonas, extracto de carne y extracto de levadura. Las peptonas son hidrolizados de proteínas que se obtienen mediante digestión proteolítica parcial de carne, caseína, harina de soja, gelatina y otras fuentes de proteínas, sirven como fuentes de carbono, energía y nitrógeno, los extractos de ternera y de levadura de cerveza, respectivamente, el extracto de ternera contiene aminoácidos, péptidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales, el extracto de levadura es una fuente excelente de

vitaminas del grupo B, y de compuestos con nitrógeno y carbono; tres medios complejos de uso común son el caldo nutritivo, caldo trípico de soja y agar Mac Conkey.

Aunque tanto los medios sólidos como los líquidos usados rutinariamente en los laboratorios microbiológicos, los medios sólidos pueden usarse para separar unos microorganismos de otros, con el fin de establecer cultivos puros. Tanto los medios definidos como los complejos pueden ser solidificados con la adición de agar a una concentración entre 1% y 2%: lo más común es emplearlo al 1.5%. El agar es un polímero sulfatado compuesto principalmente por D-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y ácido D-glucurónico; generalmente es extraído de algas rojas.

El agar es un buen agente solidificante por varias razones: una razón es que se funde a unos 90°C, pero, una vez fundido, no se endurece hasta que alcanza los 45°C aproximadamente.

Por eso, después de ser fundido, en agua hirviendo, puede ser enfriado hasta una temperatura tolerable para las manos humanas y para los microorganismos, además, los microorganismos pueden ser cultivados en un medio con agar en un amplio rango de temperaturas. Finalmente, el agar es un excelente agente endurecedor

porque la mayoría de los microorganismos no pueden degradarlo.

A veces se emplean otros agentes solidificante; por ejemplo, se usa gel de sílice para cultivar bacterias autótrofas en medios sólidos en ausencia de sustancias orgánicas, y para determinar las fuentes de carbono de bacterias heterótrofas, suplementando el medio con varios compuestos orgánicos.¹²



FIGURA 4.- El investigador Madigan, M. et al. Lo representa a los Agar-agar.¹²

2.2.9.2 Tipos funcionales de medios de cultivo

Algunos medios, como el caldo trípico de soja y el agar trípico de soja, son útiles para cultivar muchos microorganismos diferentes, y se les denomina medios generales o de mantenimiento, para facilitar el crecimiento de microbios exigentes, se puede añadir sangre y otros nutrientes especiales a un medio de uso general. Estos medios especialmente fortalecidos (p. ej., agar sangre) reciben el nombre de medios enriquecidos.

Los medios selectivos favorecen el crecimiento de microorganismos determinados.

Las sales biliares y los colorantes como la fucsina básica y el cristal violeta favorecen el crecimiento de bacterias Gram negativas, debido a que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. El agar Endo, el agar eosina-azul de metileno, y el agar Mac Conkey son tres medios muy usados para la detección de E. coli y bacterias relacionadas, por ejemplo, en muestras procedentes del suministro de agua, estos medios contienen colorantes que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas.

El agar Mac Conkey contiene además sales biliares, las bacterias también pueden ser seleccionadas mediante la incubación con ciertos nutrientes que sólo pueda usar un grupo específico de microorganismos, aquel medio que sólo contenga celulosa como fuente de carbono y de energía es muy efectivo para el aislamiento de bacterias que digieren celulosa. Las posibilidades de selección son infinitas, y se emplean docenas de medios selectivos diferentes.

2.2.9.3 Control de calidad de medios de cultivo

Una vez que se ingresa un medio de cultivo al laboratorio se debe identificar con una clave, registrar la fecha de recepción, la de apertura y la de caducidad, el almacenamiento debe realizarse según las condiciones especificadas por el fabricante.

Los envases deben estar herméticamente cerrados, especialmente cuando se trate de medios deshidratados. No es recomendable utilizar medios deshidratados que presenten apelmazamiento o un cambio de color¹¹.

Se debe verificar que los medios de cultivo y diluyentes preparados por el laboratorio tengan las características adecuadas con respecto ha:

- **Esterilidad**
- **Propiedades físicas:** pH, color
- **Productividad o promoción de crecimiento:** Recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés.
- **Selectividad:** Inhibición de los microorganismos no deseados.
- **Porcentaje de recuperación bacteriana.** Es el rendimiento o recuperación de un microorganismo que se espera que se desarrolle en el medio de cultivo.¹²

2.2.9.4 Almacenamiento de medios de cultivo

Madigan, M. et al (2004)¹² Los medios de cultivo deshidratados se deben almacenar en envases sellados bajo las condiciones que señale el fabricante. Generalmente se almacenan en un lugar fresco (entre 15 y 25°C), con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor.

Los medios de cultivo deshidratados son higroscópicos. Cuando los envases de estos medios de cultivo deshidratados son abiertos para su uso

inicial, se debe tener la precaución de cerrarlos tan pronto como sea posible y mantenerlos bien cerrados para prevenir la entrada de humedad. La absorción de agua produce cambios de pH, formación de grumos, de coloraciones del 12polvo, etc., lo cual indica que deben ser descartados porque pueden haber sufrido cambios químicos o estar contaminados.

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado, puede almacenarse a temperatura ambiente por un periodo máximo de 2 semanas protegido de la luz, o por periodos mayores a 12 -15° C. Sin embargo, almacenados bajo refrigeración entre 2 y 8°C se prolonga la vida útil de los mismos, (nunca por debajo de 0° C porque se destruye la estructura del gel).

Los medios de cultivo se deben mantener en recipientes bien cerrados para evitar su deshidratación y cuando se usa tapón de algodón, se debe colocar por encima una envoltura de papel.

2.3. Formulación de la hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

El extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) posee efectos antibacterianos en cepas *Staphylococcus aureus* en estudios in vitro.

2.3.2. Hipótesis específicas

El extracto de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) contiene tipos de metabolitos relacionados con el efecto antibacteriano.

El extracto de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) tiene efectos antibacterianos frente al

Staphylococcus aureus en estudio in vitro a diferentes concentraciones.

2.4. Operacionalización de variables e indicadores

2.4.1. Variables

La operacionalización de variables consiste en determinar el método a través del cual las variables serán medidas o examinada. La definición operacional radica en definir las operaciones que permiten medir los indicadores observables.

2.4.1.1. Variable independiente.

Extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

2.4.1.2. Variable dependiente.

Efecto Antibacteriano de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*).

2.4.1.3. Variable Interviniente.

Número de las bacterias *Staphylococcus aureus*.

2.4.2. Dimensiones

2.4.2.1. Dimensión de la variable independiente.

Efecto Terapéutico.

2.4.2.2. Dimensión de la variable dependiente.

Microbiológico en cepas *Staphylococcus aureus*.

2.4.2.3 Dimensión de la variable interviniente.

Magnitud.

2.4.3. Indicadores

2.4.3.1. Indicador de la variable independiente.

- Concentración del extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensi*)
- Identificación de metabolitos secundarios (Flavonoides, Cumarinas, Taninos, Saponinas, Alcaloides, Antocianidinas)

2.4.3.2. Indicador de la variable dependiente.

- Diámetro de halo de inhibición

TABLA 2.- Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	ASPECTO	INDICADORES	ESCALA
INDEPENDIENTE Extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)	El bellaco caspi un árbol de la selva tropical. La corteza y látex del árbol de bellaco-caspi tiene una larga historia de uso entre las indias amazónicas, se usa como analgésico y antiinflamatorio para la artritis, dolores de espalda y lesiones musculares	Componentes activos	Concentración del extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) identificación de metabolitos secundarios (Flavonoides, Cumarinas, Taninos, Saponinas, Alcaloides, Antocianidinas)	25% 50% 100%
DEPENDIENTE Efecto Antibacteriano	sustancia antibacteriana a diferentes concentraciones con propiedades beneficiosas para la salud del cuerpo	Cepa de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	- Halos de inhibición.	Milímetros de diámetro

2.5. Definición de términos básicos

- a) **Actividad Antibacteriana:** Es la capacidad de matar, inhibir, y/o inactivar microorganismos, impedir su proliferación, y/o impedir su acción patógena.⁴⁴

- b) **Antibiograma:** Son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.⁴⁴

- c) **Antimicrobiano:** Es una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintéticos, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos”.⁴⁵

- d) **Cepas ATCC:** “Es un material biológico de referencia certificado por American Type Culture Collection. Rockville, EU”.⁴⁶

- e) **Cultivo microbiológico:** Consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada los microorganismos”.⁴²

- f) **Droga Vegetal:** Se denomina droga vegetal todo producto natural utilizado en terapéutica y no sometido a ninguna preparación farmacéutica. Puede tratarse de una planta entera o parte de una planta (hoja, raíz, corteza, fruto). Puede ser el jugo o látex (opio).¹⁵

- g) **Extracto Vegetal:** Un extracto vegetal es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología, a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos.¹⁴

- h) Extractos Etanólico:** Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. ¹⁹
- i) Flora bacteriana:** Agrupación de microorganismos que se encuentran localizados en contacto con el exterior. ⁴⁷
- j) Halo de inhibición:** Zona alrededor de un disco que contiene el extracto o antibiótico colocado en un antibiograma en el cual no se produce el crecimiento antibacteriano". ⁴⁸
- k) Invasidad:** Capacidad de invadir tejidos celulares del huésped. ⁴⁷
- l) In Vitro:** Es una técnica que consiste en realizar un experimento ya sea en un tubo de ensayo o en un ambiente controlado (laboratorio).
- m) Mueller Hinton Agar:** Es un medio que carece de inhibidores, sustancia gelatinosa que se usa como medio de cultivo para el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos y hongos.
Recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad. Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.
- n) Metabolito secundario:** Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo.
- o) Medios de cultivo:** Casado c. (2012)⁴² Son nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares".

- p) Multiplicación patógena:** Capacidad de un determinado microorganismo para reproducirse su número de colonias.⁴⁹
- q) Planta medicinal:** Según la OMS, es todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son los precursores de hemisíntesis farmacéutica.¹⁵
- r) Principios activos:** Son las sustancias responsables de la acción farmacológica.¹⁶
- s) Percolación:** Se refiere al paso lento de fluidos a través de materiales porosos.
- t) pH:** Indica el grado de acidez o basicidad de una solución, éste se mide por la concentración del ión hidrógeno; los valores de pH están comprendidos en una escala de 0 a 14, el valor medio es 7.
- u) Staphylococcus aureus:** Es un agente etiológico de diversas patologías incluyendo infecciones de piel y tejido blando”.⁵⁰
- v) Tóxico:** Sustancia que es venenoso o que puede causar trastornos o la muerte a consecuencia de las lesiones debidas a un efecto químico.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Estudio

Esta investigación por su alcance es de tipo explicativo: Se denomina descriptivo, puesto que se explicó los efectos que se encuentren a través de procedimientos.

El nivel que se empleó en esta investigación es Aplicado: se denomina aplicado, puesto que para los hallazgos de resultados en nuestra investigación se aplicó instrumentos de medición donde se reportaron los indicadores que se medirán por variables.

3.2. Diseño de la investigación

Esta investigación por su diseño es experimental porque es posible la manipulación ex profesa de la variable independiente.

3.3. Población y muestra de la investigación:

3.3.1. Vegetal

3.3.1.1. Población vegetal.

La población vegetal que se utilizó en la investigación estuvo constituida por tres kilogramos de cortezas, empleando el método aleatorio, extraídos de una población de tres plantas de la especie vegetal de *Himatanthus tarapotensis* (Bellaco caspi).

3.3.1.2. Muestra Vegetal

- **Variable independiente**
Está constituida por 1 kg *Himatanthus tarapotensis* (Corteza seca)
- **Variable dependiente**

La investigación planificada será llevada a cabo en una muestra representativa de la población de estudio obtenidas de forma probabilística, en un tamaño muestral mínimo. Para la determinación del tamaño muestral se hará uso de la fórmula por delta estandarizado.

$$\Delta E = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_e}{S_c}$$

DÓNDE:

- ΔE = Delta Estandarizado o Diferencia clínica.
- Media del Grupo Control.
- Media del Grupo Experimental.
- S_c = Desviación Estándar del Grupo Control.

$$\Delta E = \frac{15.5 - 9.0}{1.4}$$

DONDE:

- ΔE = ?
- c = 15.5⁽¹⁾
- e = 9.0⁽¹⁾
- S_c = 1.4⁽¹⁾
- ΔE = 4.64

$$\Delta E = 1.4$$

Considerando un nivel de significancia a dos colas de 0.05, bajo un valor estimado de delta de 1.50, y un $\beta=0.2$, se estableció:

n = 4 placas por cada grupo

Considerando la posibilidad que existan placas que puedan echarse a perder durante el desarrollo de la

investigación, se recalculó el tamaño muestral por grupo en base a una tasa de pérdida de 10%.

$$n_c = n \frac{1}{1-R}$$

DÓNDE:

- n_c = Tamaño Muestral Corregido a Pérdidas.
- n = Tamaño Muestral no Corregido a Pérdidas.
- R = Tasa Estimada de Pérdida.

$$n_c = 9 \frac{1}{1-0.1}$$

DÓNDE:

- $n_c = ?$
- $n = 4$
- $R = 10\% = 0.1$

n=10 placas

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Técnica de recolección de datos

La técnica empleada en la presente investigación fue la de observación de tipo estructurada ya que nuestro estudio es de investigación concluyente de precisión y objetividad, no participante, colectivo llevado a cabo en el laboratorio.

3.4.2 Instrumentos de recolección de datos

El instrumento de recolección de datos empleado en la presente investigación:

Ficha de observación AD-HOC de recolección de datos efecto de la aplicación del extracto del bellaco caspi” (*Himatanthus tarapotensis*) en la “reducción bacteriana” en cultivos de “*staphylococcus aureus*” estudio in vitro.

Ficha de observación AD-HOC de screening fitoquímico de efecto antibacteriano del extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) en cultivos de “*staphylococcus aureus*” estudio in vitro.

Ficha de observación AD-HOC de prueba de solubilidad efecto antibacteriano del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) en cultivos de “*Staphylococcus aureus*” estudio in vitro.

Fue diseñada para los fines específicos de la investigación, la cual está conformada por ítems abiertos y cerrados acorde a los indicadores de las variables operacionales izadas. La mencionada ficha fue aplicada únicamente por el investigador, todas las mediciones fueron llevadas a cabo bajo las mismas circunstancias (físicas, emocionales y procedimentales). Además, se utilizó el paquete de datos SPSS versión 22 para Windows, los cuales nos permitieron elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular los datos estadísticos necesarios para el estudio.

Se presentó el análisis estadístico descriptivo de acuerdo a los datos obtenidos del estudio como son: Desviación típica, dispersión (varianza). Gráficos (histogramas, barras, etc.)

3.4.3 Validación de Instrumentos.

Para la recolección de los datos se empleó fichas previamente elaboradas, en las cuales se consideraron la disminución del crecimiento de las bacterias, como resultado a la investigación.

3.5. Diseño experimental:

Muestras, Materiales, Equipos, Reactivos e Insumos.

3.5.1. Muestra vegetal.

Extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*).

3.5.2. Muestra biológico.

Cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus*.

3.5.3. Material de Vidrio y otros

Material	Usos
Frasco ambar	Para maceración de las muestras
Viales de vidrio	Es un pequeño vaso, botella o frasco destinado a contener medicamentos inyectables, del cual se van extrayendo las dosis convenientes.
Pipetas	Se utilizó en el screenig fitoquímico
Pinza punta plana	Es una herramienta simple cuyos extremos se aproximan para sujetar algo.
Baguetas	Se usó en la prueba de solubilidad.
Embudo de vidrio	Para filtrar el macerado
Placas Petri	Para realizar el secado de la muestra
Asa de drigalsky	Se emplea para transportar, arrastrar, trasvasar inóculos (pequeño volumen que contiene microorganismos en suspensión) desde la solución de trabajo también llamada "solución madre" al medio de cultivo (sólido o líquido) o de un medio a otro (resiembra).
Fiola	Para realizar diluciones
Vaso de precipitados	Para calentar en el screening.
Tubos esteriles con tapa rosca	Se utiliza en los laboratorios para contener pequeñas muestras líquidas o sólidas.
Frascos esteriles	Para guardar las muestras deluidas.
Capilares	Para realizar el sembrado
Costales	Para recolección de las plantas.
Papel filtro	Para filtrar el macerado
Gasa	Para realizar el primer filtro.
Luna de reloj	Para realizar el secado en el screenig.
Soporte universal	Para preparar la fase móvil en el tamizaje.
Pera de bromo	Para realizar la mezcla de la fase móvil.
Papel kraft	Para conservar el materia fresca.
Mascarillas	Para el screening y todo el proceso en lab.
Pipetas de plástico	Para cada reactivo.
Jeringa	Para extraer las muestras.
Matraz Erlenmeyer	Para las diluciones
Piceta	Para el lavado del material.

3.5.4. Otros Material

- Algodón COPPON
- Detergente Ariel
- Guantes quirúrgicos 7 ½ family Doctor
- Mascarillas Family Doctor
- Papel aluminio B&T
- Papel de despacho B&T

- Papel secante B&T
- Plumón marcador ARTESCO

3.5.5. Equipos e Instrumentos

Equipos	Usos
Incubadora 35°C	Es un dispositivo que sirve para mantener y hacer crecer cultivos microbiológicos o cultivos celulares.
Autoclave vertical digital	Autoclave vertical de uso polivalente para esterilizar sólidos o líquidos.
Baño maria	El baño de María es un equipo que se utiliza en el laboratorio para realizar pruebas serológicas y procedimientos de incubación, aglutinación, inactivación, biomédicos, farmacéuticos y hasta industriales.
Mechero bunsen	Es in Instrumento utilizado en laboratorios científicos para calentar o esterilizar muestras o reactivos químicos.
Balanza analítica	Se realizó el peso de la materia prima, peso del extracto seco.
Estufa	Es un equipo que se utiliza para secar y esterilizar recipientes de vidrio y metal en el laboratorio.
Rotavapor	Para eliminar el agua y alcohol del macerado.
Cocinilla eléctrica	Se usó en el screening fitoquímico
Lámpara UV	Para observar la cromatografía realizada.
Espectrofotómetro	Para realizar la lectura de los flavonoides totales.
Campana de extracción	Para evitar los peligros de los solventes y reactivos de laboratorio.
Micrómetro digital	Para la medición en las diluciones.

3.5.6. Reactivos e insumos

Medios De Cultivo	Muestra
<ul style="list-style-type: none"> • Agar nutritivo (Agar Muller Hinton4 Marca Scharlau) • Suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto etanólico de corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) Al 100%, 50% y 25%

3.5.7. Reactivos

- Etanol 96°
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Shinoda (magnesio + ácido clorhídrico concentrado)
- Hidróxido de sodio al 5% (Reacción de Bortranger)

- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Fehling A
- Agua destilada Estéril

3.5.8. Medios de cultivo

- Agar Mueller Hinton. MH – OXOID
- Caldo Nutritivo.
- Caldo Mueller Hinton. MH - OXOID

3.5.9 Material de bioseguridad

- Mandiles de laboratorio. MEDIC
- Gorro, Mascarilla N 78.
- Guantes quirúrgicos descartables N°7,7 ½.
- Lentes de protección. B&T

3.6. Procedimiento Experimental

3.6.1. Recolección de la muestra vegetal.

La especie del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) fue recolectada a las 10: 00 a.m., el 14 de octubre del 2017 se trabajó un aproximado de 3 kilos de corteza, escogiendo al azar las plantas que contienen la corteza en estudio, de La laguna de Quistococha que se encuentra aproximadamente unos 20 minutos de viaje en mototaxi, en el kilómetro 7 de la carretera de Iquitos – Distrito Nauta, a 104 MSNM. La muestra recolectada se envolvió en papel kraff para mantener su conservación.

3.6.2. Identificación de la muestra vegetal

La identificación taxonómica de la especie recolectada fue realizada teniendo en cuenta el nombre científico, familia, nombre vulgar. En el HERBARIUM AMAZONENSE AMAZ, CIRNA-UNAP, con la asesoría del botánico responsable, el cual determinó la categoría taxonómica empleando

descriptores morfológicos, claves de identificación y bibliografía especializada. Obteniéndose el documento de certificación de la muestra por dicho lugar (HERBARIUM AMAZONENSE). Ver imagen N° 03 En Anexos

3.6.3. Procesamiento de la muestra vegetal

La muestra vegetal de *Himatanthus tarapotensis*, se procesó siguiendo los procedimientos de lavado, secado, selección, maceración y la extracción de la muestra, en el laboratorio de Fitoquímica (FIA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, posteriormente los extractos fueron llevados al laboratorio de Microbiología de la universidad Inca Garcilaso de la Vega donde realizamos los ensayos de nuestra investigación (solubilidad, marcha fitoquímica y la evaluación de la Actividad Antibacteriana), estos laboratorios se encuentran dentro de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y bioquímica de la universidad Inca Garcilaso de la Vega ubicado en la Av. Bolívar Nro. 165 – Pueblo Libre – Lima- Perú.

3.6.4. Molienda de la muestra vegetal

La materia prima fue molida lo suficientemente pequeña, luego fue envasada en un frasco ámbar de boca ancha para ser cubierto por etanol 96°C por un periodo de 15 días y con agitación de cada 12 horas. Su almacenamiento fue en un lugar seco, fresco y protegido de la luz y calor para su posterior conservación de la droga.

3.6.5. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico se obtuvo por maceración de las muestras de *Himatanthus tarapotensis*, con etanol al 96°C durante 7 días repitiendo el proceso 3 veces consecutivos hasta agotamiento de la muestra con su respectiva filtración con papel filtro, obteniendo una muestra líquida para ser llevado al Rotavapor.

Para cada extracción se maceró 1000gr respectivamente de cada materia vegetal Véase Tabla 06 (porcentaje de rendimiento). De *Himatanthus tarapotensis*, en 700 ml de etanol al 96% para cada muestra vegetal, durante 7 días por agotamiento. La concentración del extracto se realizó eliminando el disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 60°C y a una presión de 690 mmHg. Por espacio de 3 horas aproximadamente, cada muestra, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por un lapso de 4 a 6 días, donde se obtuvo la suficiente cantidad de extractos, con el cual se realizó los ensayos, tanto para las pruebas de marcha fitoquímica, solubilidad y Método cilindro-placa (Ver fotos N° 16, 20, 31, 34 .En Anexos).

3.6.6. Almacenamiento del extracto etanólico

La droga macerada fue almacenada y protegida en un frasco ámbar de boca ancha, en un mes y medio aproximadamente se izó renovación de solvente en 15 días el cual se realizó 3 extracciones y se filtró con papel filtro, obteniendo una muestra líquida para ser llevado al Rotavapor.

3.6.7. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

Para la identificación de metabólicos secundarios se realizó la marcha fitoquímica del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), de la siguiente manera.

1. Identificación de carbohidratos:

- a) **Reactivo mollish:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo mollish y finalmente se agregó 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se dejó en

reposo, un resultado positivo formaría un anillo violáceo.

2. Identificación de azúcares:

- a) **Reactivo Benedict:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo Benedict se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo formaría un precipitado color amarillo.

- b) **Reactivo Fehling A + Fehling B:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo Fehling A, más 5 gotas del reactivo Fehling B se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo daría un precipitado color rojo ladrillo.

- c) **Reactivo Tollens:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo Tollens se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo formaría un espejo de plata.

3. Identificación compuestos fenólicos: En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo de tricloruro férrico al 5 % (FeCl₃ 5%), un resultado positivo daría cambio de coloración verde.

4. Identificación de cumarinas: En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 2 gotas del reactivo de hidróxido de sodio al 10 % (NaOH 10 %), un resultado positivo daría un color amarillo intenso.

5. Identificación de taninos: En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo de gelatina más 3 gotas de cloruro de sodio al 10 % (NaCl 10 %), un resultado positivo observándose un precipitado blanco denso (coloide).

6. Identificación de saponinas: En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de H₂O destilada y se agitó por dos minutos, un resultado positivo se formara espuma.

7. Identificación de flavonoides:

a) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Pb (CH₃ COO) 2 y finalmente 3 gotas del reactivo de Shinoda, un resultado positivo daría un color rojo.

8. Identificación de alcaloides:

a) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Dragendorff en

zona, un resultado positivo daría un precipitado naranjado.

- b) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Mayer en zona, un resultado positivo daría un precipitado blanco.
- c) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Bertrand en zona, un resultado positivo daría un precipitado blanco.
- d) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Wagner en zona, un resultado positivo daría un precipitado marrón.

Identificación de alcaloides:

9. Identificación de esteroides y triterpenoides:

- a) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Lieberman-Bouchard en zona, un resultado positivo cambiando de color marrón intenso a color negro.

10. Identificación glucósidos:

- a) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo de Vainilla sulfúrica en zona, un resultado positivo de color rojizos violáceo con un anillo de interface.

11. Identificación de aminoácidos y proteínas

- a) En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 5 gotas del reactivo de Ninhidrina en zona, un resultado positivo de un color violáceo.

12. Prueba de solubilidad:

- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), muestra patrón.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de, luego bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), se agregó 1 ml de cloroformo.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de ciclohexano.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de metanol.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de butanol.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de éter dietílico.

- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de agua destilada.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de alcohol 96°.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de diclorometano.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de acetona.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), luego se agregó 1 ml de benceno.

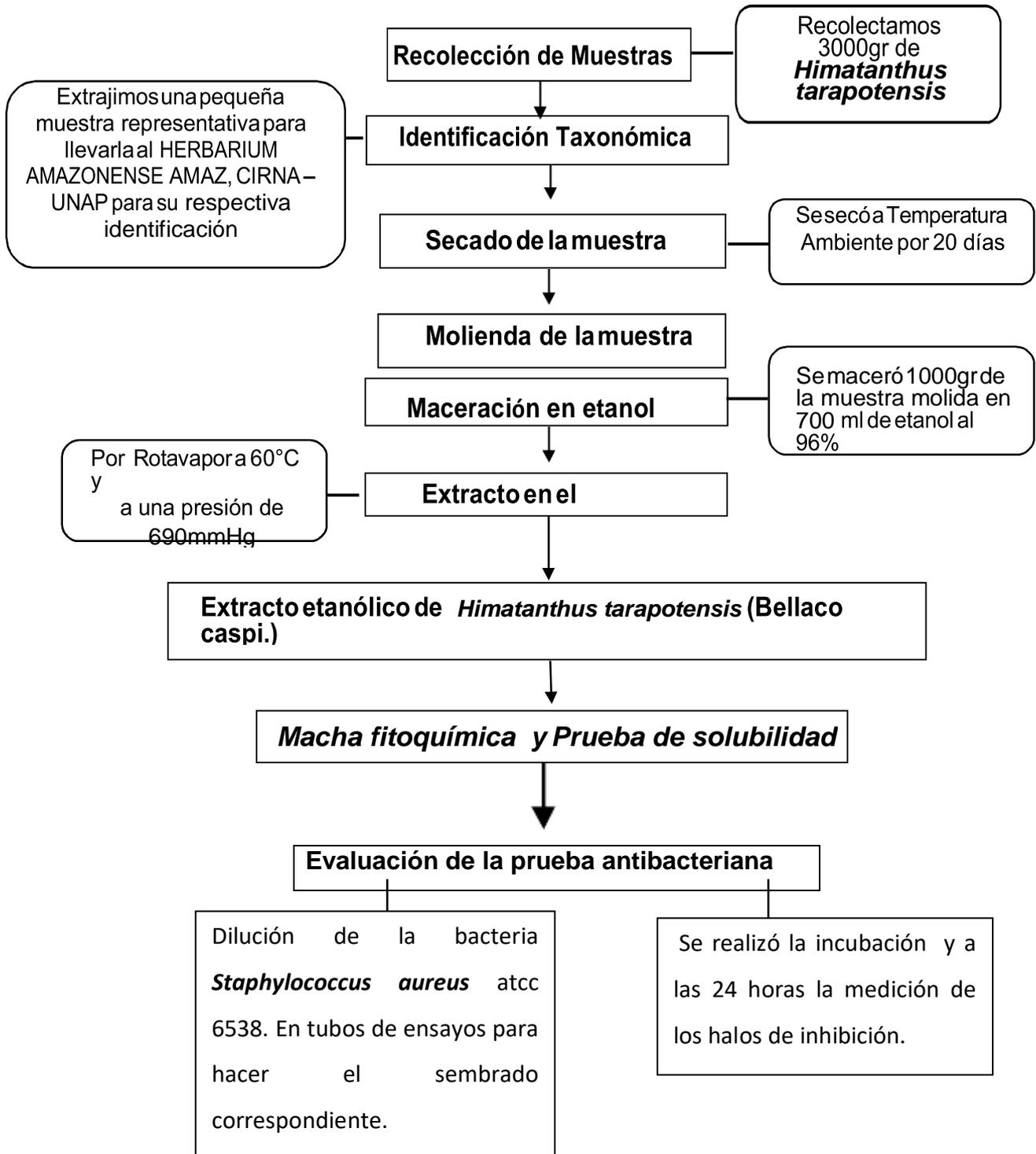
3.6.8. Obtención de las muestras biológicas

Siendo un trabajo experimental el tamaño de la muestra está constituido por 5 placas Petri obtenidas del laboratorio microbiológico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la ciudad de Lima, la cual a cada una de ellas contiene especie de bacterias de *Staphylococcus aureus* siendo del tipo ATCC 3568 para el respectivo estudio.

3.7. Flujograma de la Investigación

Esquema N° 1

Obtención del extracto Etanólico de la corteza *Himatanthus tarapotensis* (bellaco caspi).



3.8. Preparación de las concentraciones del extracto de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

La muestra se encontraba en forma de extracto alcohólico del cual se preparó diluciones al 100%, 50% y 25% con agua destilada. Las muestras fueron diluidas en viales de 5 mL.

La preparación de las diluciones se realizó de la siguiente manera:

- Se vertió en un tubo de ensayo, 5mL de extracto etanólico que representa al 100%, en otro tubo de ensayo se agregó 2.5mL del extracto y 2.5mL de cloruro de sodio para obtener la concentración de 50% y en otro tubo de ensayo se añadió 1.25mL del extracto y 3.75mL de cloruro de sodio para obtener la concentración de 25%.
- También se agregó cloruro de sodio 5ml en un tubo de ensayo para utilizarlos como control negativo.
- También se preparó amoxicilina 0.25g como control positivo y se disolvió en 5mL de cloruro de sodio.

3.9. Desarrollo del método

3.9.1. Método cilindro-placa (Método de difusión en agar).

Para la determinación de la prueba antibacteriana bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) se utilizó el Método de validación cilindro-placa, empleando las cepas ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538. se utilizaron placas de Petri de plástico esterilizadas (aproximadamente de 20x100mm) con cubiertas de un material adecuado y cilindros de acero inoxidable con las siguientes dimensiones, cada una de las cuales tiene una tolerancia de $\pm 0,1\text{mm}$: diámetro externo 8mm, diámetro interno 6mm y longitud 10mm.USP(2009)⁵⁶.

3.9.2. Preparación del Agar Mueller Hinton

El agar Mueller - Hinton se preparó con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del "fabricante". Autoclavar el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar dejar enfriar en Baño María a 45 - 50°C. Una vez templado verter el preparado fresco y tibio a placas Petri de vidrio estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25 - 30 ml para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar debe dejarse enfriar a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar Mueller Hinton debe tener un pH entre 7,2 - 7,4. Esta medición puede realizarse sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

3.9.3 Preparación de los inóculo bacterianos

A partir de colonias puras del microorganismo ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538 utilizó una cierta cantidad de colonias y se diluyó en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que la solución resultante tenga una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de Mac Farland el cual corresponde a una concentración de 3×10^8 ufc/ml. A partir de esta última solución realizar una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada tomar 3 ml y diluirlo a un volumen total de 9 ml con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, todos los materiales usados deben ser estériles y también el área de trabajo. La solución resultante tendrá una concentración de 1×10^8 ufc/ml.

Bajo las mismas condiciones se preparó una dilución de 1 en 100 añadiendo 0.1 ml de la solución anterior a un tubo con 9.9 ml de suero fisiológico, la solución resultante fue de una concentración de 1×10^6 ufc/ml. Por lo tanto al final obtuvimos un

tubo de ensayo con una solución de 1×10^6 ufc/ml de ***Staphylococcus aureus***.

3.9.4. Inoculación de las placas

Agregar 100 uL del inóculo bacteriano preparado (1×10^6 ufc/ml) a 5 placas Petri con agar Mueller Hinton ya solidificado (3 para las muestras y dos para los controles) y con la ayuda de una espátula de Drigalsky esparcir el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se desliza el asa en la placa en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más.

Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas. Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los cilindros.

3.9.6 Procedimiento del método de valoración cilindro - placa o difusión en agar:

Los cilindros estériles fueron colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se presionó los cilindros levemente para que queden adheridos al mismo. Se colocó a más de 15 mm del borde de la placa y se distribuyeron de tal manera que no hubo superposición de los halos de inhibición. Los cilindros fueron colocados de la siguiente manera:

- En cada placa inoculada con los microorganismos se colocó cinco cilindros de tal manera que se obtengan resultados quintuplicados.
- Al estar listo las placas con los inóculos bacterianos se procedió agregar las concentraciones respectivas como control positivo (amoxicilina), negativo (alcohol) y las

muestras al 25%, 50% y 100% de *Himatanthus tarapotensis*.

- Luego de obtener las placas se procedió a incubarse a 35-37°C durante 24 horas. La placa se colocó en forma invertida.

3.9.7. Determinación de la actividad antimicrobiana

Después de 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes fueron uniformemente casi circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa fueron medidos en milímetros, pasando por el centro de los discos. La medición se realizó con un vernier digital, se realizaron cinco mediciones por cada disco y el promedio se reportó como resultado. Los valores de las mediciones promedio de los cinco discos deben compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por los antibióticos.

TABLA 3.- PROTOCOLO DE EVALUACIÓN PARA PLACAS PETRI

PLACA N°01

Grupo	Criterio de evaluación	Concentración
Cilindro 1: Metanol Control (-)	Cloruro de sodio	100ul
Cilindro 2: Amoxicilina Control (+)	solución de amoxicilina	10 ug/mm
cilindro 3: Extracto de bellaco caspi DOSIS 1	Extracto etanólico de bellaco caspi	25% (100ul x disco)
cilindro 4: Extracto de bellaco caspi DOSIS 2	Extracto etanólico de bellaco caspi	50% (100ul x disco)
cilindro5: Extracto de bellaco caspi DOSIS 3	Extracto Etanólico de bellaco caspi	100%(100ul x disco)

PLACA N° 02

Grupo	Criterio de evaluación	Concentración
Cilindro 1: Metanol Control (-)	Cloruro de sodio	100ul
Cilindro 2: Amoxicilina Control (+)	solución de amoxicilina	10 ug/mm
cilindro 3: Extracto de bellaco caspi DOSIS 1	Extracto etanólico de bellaco caspi	25% (100ul x disco)
cilindro 4: Extracto de bellaco caspi DOSIS 2	Extracto etanólico de bellaco caspi	50% (100ul x disco)
cilindro5: Extracto de bellaco caspi DOSIS 3	Extracto Etanólico de bellaco caspi	100%(100ul x disco)

PLACA N° 03

Grupo	Criterio de evaluación	Concentración
Cilindro 1: Metanol Control (-)	Cloruro de sodio	100ul
Cilindro 2: Amoxicilina Control (+)	solución de amoxicilina	10 ug/mm
cilindro 3: Extracto de bellaco caspi DOSIS 1	Extracto etanólico de bellaco caspi	25% (100ul x disco)
cilindro 4: Extracto de bellaco caspi DOSIS 2	Extracto etanólico de bellaco caspi	50% (100ul x disco)
cilindro5: Extracto de bellaco caspi DOSIS 3	Extracto Etanólico de bellaco caspi	100%(100ul x disco)

PLACA N°04

Grupo	Criterio de evaluación	Concentración
Cilindro 1: Metanol Control (-)	Cloruro de sodio	100ul
Cilindro 2: Amoxicilina Control (+)	solución de amoxicilina	10 ug/mm
cilindro 3: Extracto de bellaco caspi DOSIS 1	Extracto etanólico de bellaco caspi	25% (100ul x disco)
cilindro 4: Extracto de bellaco caspi DOSIS 2	Extracto etanólico de bellaco caspi	50% (100ul x disco)
cilindro5: Extracto de bellaco caspi DOSIS 3	Extracto Etanólico de bellaco caspi	100%(100ul x disco)

CILINDRO 1: Se vertió una solución de Cloruro de sodio.

CILINDRO 2: Se vertió solución de amoxicilina a una concentración de 10ug/mm.

CILINDRO 3: Se vertió solución de extracto de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) a una concentración de 25%.

CILINDRO 4: Se vertió solución de extracto de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), a una concentración de 50%

CILINDRO 5: Se vertió solución de extracto de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*), a una concentración de 100%.

Al cabo de 24 horas de incubación de las placas Petri a temperatura de 37°C se evaluó las medidas con el instrumento vernier a cada grupo de siembra con las diferentes concentraciones para determinar el halo de inhibición correspondiente demostrándose así el efecto de la corteza del bellaco caspi tuvo su efecto antibacteriano y cuantificar los resultados al 100%.

3.10. Técnica de procesamiento de datos

Al cabo de 24 horas de incubación de las placas petri a temperatura de 37°C se evaluó las medidas con el instrumento vernier a cada grupo de siembra con las diferentes concentraciones para determinar el halo de inhibición correspondiente demostrándose así el efecto de la corteza del bellaco caspi tuvo su efecto antibacteriano y cuantificar los resultados al 100%.

3.10. Técnica de procesamiento de datos

3.10.1 Procesamiento de datos

La recolección de los datos se llevó a cabo de manera secuencial según la disposición de los indicadores, ello se realizó a cabo evaluando cada unidad muestral de forma individual. Para lograr los objetivos planificados se llegarán a cabo los siguientes pasos de manera secuencial.

3.10.2 Materiales para la recolección y procesamiento de datos

- Fichas de recolección de datos y lápices
- Programa estadístico SPSS
- Computadora

3.10.3 Normas de bioseguridad en el laboratorio

Un exitoso programa de seguridad en el laboratorio abarca un proceso continuo de reconocimiento, evaluación y mitigación de riesgos, asociado a acciones que aseguran que el proceso sea sostenible en el tiempo. El riesgo de las exposiciones, las infecciones adquiridas en el laboratorio y la liberación no intencionada de agentes o materiales para el medio ambiente, se debe reducir al garantizar la competencia de los técnicos, profesionales y auxiliares de laboratorio en todos los niveles.

La competencia es un factor medible y documentable que involucra no sólo las habilidades que pueden ser enseñados y desarrollados, sino también el juicio y la capacidad de reconocer las limitaciones del entorno de trabajo y las habilidades propias y de las otras personas en el laboratorio. La gestión del riesgo biológico consiste en un sistema o conjunto de procesos orientado a controlar los riesgos asociados a la manipulación, almacenamiento, eliminación de agentes biológicos y toxinas en el laboratorio. Estos procesos fueron realizados a cabalidad en el presente trabajo cumpliendo con las normas establecidas.⁵¹

3.10.4 Protección de los derechos humanos

En los laboratorios del área de microbiología donde se realizaron los ensayos experimentales del estudio, constituyen un medio de trabajo especial ya que el personal de trabajo, y los que se encuentran alrededor de las áreas de trabajo, lo constituye el ser humano, por ende se presenta riesgos de enfermedades infecciosas, y de lesiones, es por ello que se tomaron estrictas medidas de bioseguridad, con la finalidad de salvaguardar la integridad del personal humano, respetando, guiándonos y cumpliendo con las medidas y estipulaciones que enmarcan la protección de los derechos humanos.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Resultados de la investigación

Después de haber realizado la marcha fotoquímica se concluye que el *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi” tiene presencia de carbohidratos y metabolitos como, flavonoides, poca presencia de esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos y alcaloides, siendo las ultimas muy importantes porque tienen la actividad antibacteriana.

Los Taninos son conocidos por sus efectos astringentes y antibacterianas teniendo efecto como antibacteriano.

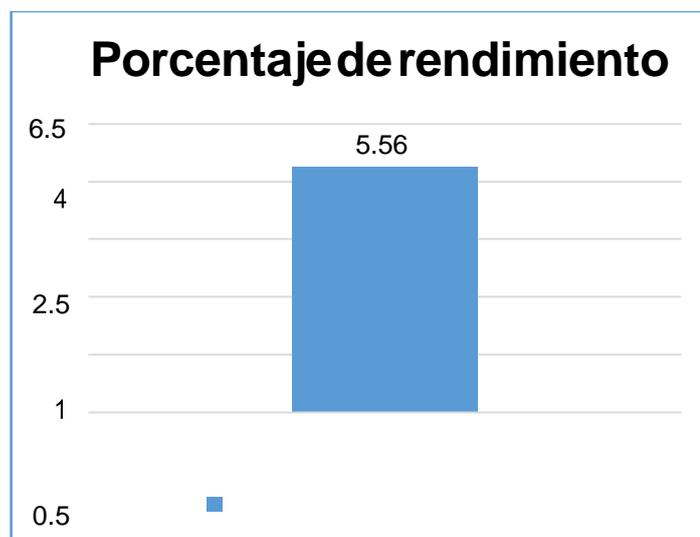
4.1.1 Obtención de Extractos vegetales.

4.1.1.1 Determinación del Rendimiento de bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

TABLA 4.- Rendimiento del extracto etanólico de La corteza de Bellaco Caspi (*Himatanthus tarapotensi*).

Parte de planta	Cantidad de Muestra Corteza (g.)	Cantidad Muestra seca para Maceración (g.)	Cantidad de Extracto Etanólico (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Corteza	3000	1000	55.6	5.56

Grafico N°01: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de *Himatanthus tarapotensis*.



La Tabla 8 y el Grafico N°01, representan el rendimiento en porcentaje, de la planta utilizada *Himatanthus tarapotensis*, obtenidas por el equipo Rotavapor. En la Tabla N°08, se determinó el rendimiento de la planta entera y se obtuvo un 5.56% de 1000 g. de muestra seca.

4.2. Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.

Tabla 5.- Tamizaje Fitoquímico del extracto etanolico bellaco caspi
(*Himatanthus tarapotensis*)

Grupo de compuestos	Ensayos	Interpretación	Resultados
Carbohidratos	RVO. MOLISH + HSO	Resultado positivo forma un anillo violáceo.	(+)
Azucares	RVO. BENEDICT	Precitado color amarillo	(0)
	RVO. FEHLING A+ FEHLING B	Coloración de rojo ladrillo	(+++)
	RVO. TOLLENS	Forma espejo de plata	(++)
Compuestos Fenólicos	RVO. TRICLORURO FERRICO	Coloración verde	(+++)
Cumarinas	RVO. HIDROXIDO DE SODIO AL 10%	Coloración amarillo intenso	(++)
Taninos	RVO. DE GELATINA – SAL+ NAOH 10%	Formación de coloide	(++)
Saponinas	H2O DESTILADA + AGITACION	Formación de espuma	(+)
Flavonoides	RVO. SHAINODA	coloración rojo	(+++)
Esteroides y Terpenos		Color negro	(0)
Glicósidos	RVO. VAINILLA SULFÚRICO	Rojizo violáceo en anillo de interface	(++)
Identificación de aminoácidos y proteínas	RVO. NINHIDRINA	color violáceo (baño maria 10min)	(+)
Alcaloides	RVO. DRAGENDORF	Presencia de precipitado anaranjado	(+++)
	RVO. MAYER	Presencia de precipitado blacon	(+)
	RVO. PERTRAND	Presencia de precipitado blanco	(+)
	RVO. WAGNER	Presencia de Precipitado marrón	(+++)

Leyenda				
(+++) Abundante;	(++) Moderado	(+) Leve	(-) Ausente	No realizada (0)

4.3. PRUEBA DE SOLUBILIDAD *Himatanthus tarapotensis*

TABLA 6. Prueba de solubilidad del extracto etanolico Bellaco Caspi
(*Himatanthus tarapotensis*)

MARCHA DE SOLUBILIDAD			
Número	Solvente	Interpretacin	Resultados
1	ACETONA	+	POCO SOLUBLE
2	ALCOHOL 96°	+	POCO SOLUBLE
3	AGUA DESTILADA	++	SOLUBLE
4	COLORFORMO	+	POCO SOLUBLE
5	CICLOHEXANO	-	INSOLUBLE
6	DICLOROMETANO	-	INSOLUBLE
7	METANOL	+	POCO SOLUBLE
8	BENCENO	-	INSOLUBLE
9	ETER DIETÍLICO	-	INSOLUBLE
10	L- BUTANOL	+	POCO SOLUBLE

INSOLUBLE (-)	POCO SOLUBLE (+)	SOLUBLE (++)
---------------	------------------	--------------

Este estudio de las propiedades de la solubilidad y su comportamiento a las reacciones de color pueden determinar la clasificación o tipo de compuesto orgánico²⁸

El extracto etanólico bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) fue sometido al ensayo de solubilidad; para lo cual se hizo uso de un grupo de solventes ordenados de acuerdo a su polaridad.

4.4. Actividad antibacteriana de *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi”

4.4.1 Lectura de Resultados de diámetro de Halos (mm).

El extracto etanólico analizado de *Himatanthus tarapotensis* presenta efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de bacterias de *Stahylococcus aureus* en las placas Petri estudiadas, a las concentraciones de 25, 50 y 100% de muestra en discos.

TABLA 7.- Distancias inhibitoras en mm de diámetro de Halos en las concentraciones de control y experimentales.

Microorganism o	CONTROLES				MUESTRA			
	HALO DE INHIBICIÓN(mm)				EXTRACTO ALCOHÓLICO			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	AMOXICILINA 10 ug				100%			
	48,35	47,45	46,5	47,1	16,12	15,95	16,02	15,40
					50%			
					14,12	13,90	14,01	13,20
	Cloruro de sodio				25%			
0	0	0	0	12,40	11,90	12,60	11,90	

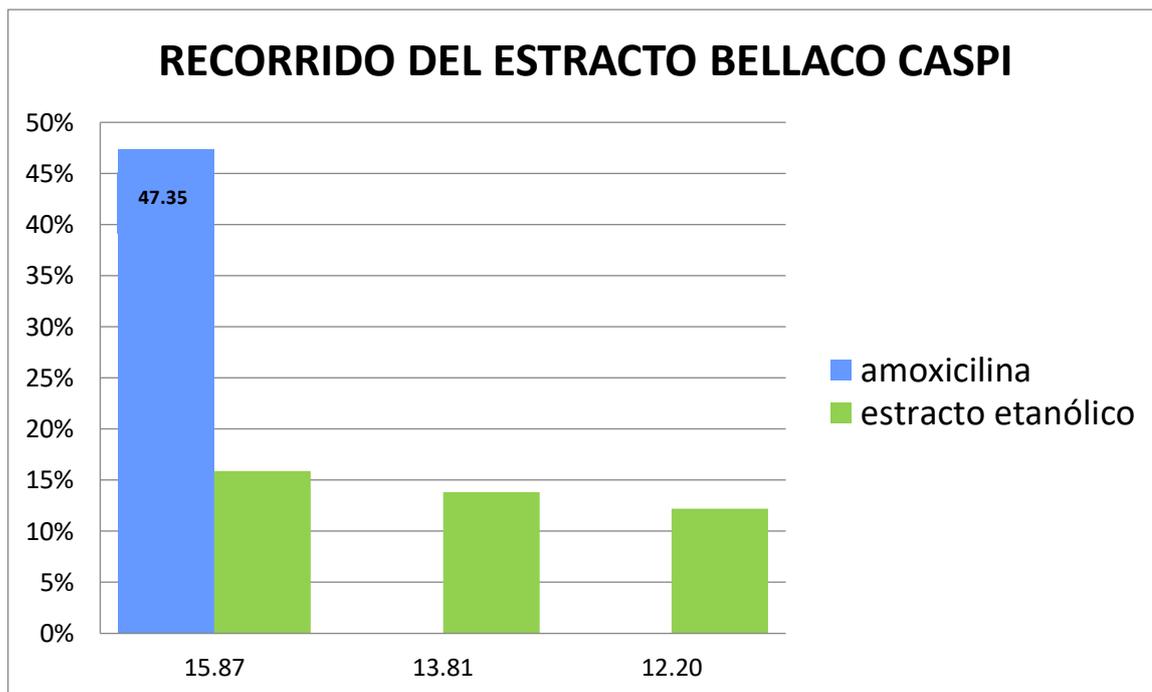


FIGURA 5.- Determinación del efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Himatanthus tarapotensis* "Bellaco Caspi"

Se realizó la medición de los halos de inhibición formados en las placas Petri con vernier.

Recolección de datos: Se recolectó las mediciones de los halos de inhibición en fichas A-DOC.

TABLA 8.- Estadísticas descriptivas para los halos obtenidos de cada extracto etanólico aplicado.

Descriptivos								
Diámetro de Halos (mm)								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media			
					Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
1,00	4	47,3500	,77352	,38676	46,1192	48,5808	46,50	48,35
2,00	4	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
3,00	4	15,8725	,32263	,16132	15,3591	16,3859	15,40	16,12
4,00	4	13,8075	,41484	,20742	13,1474	14,4676	13,20	14,12
5,00	4	12,2000	,35590	,17795	11,6337	12,7663	11,90	12,60
Total	20	17,8460	16,16883	3,61546	10,2788	25,4132	,00	48,35

Leyenda:

- a) Control positivo (Amoxicilina)
- b) Control negativo cloruro de sodio
- c) Extracto alcohólico al 100%
- d) Extracto alcohólico al 50%
- e) Extracto alcohólico al 25%
- f) N: Numero de muestras (Placas Petri)

En la tabla No 2, observamos los valores de límite superior e inferior para cada uno de los tratamientos, observando que la media o promedio de cada tratamiento se encuentra dentro de los límites establecidos.

TABLA 9.- Prueba de homogeneidad de varianzas

Diámetro de Halos (mm)			
Estadístico de			
Levene	gl1	gl2	Sig.
4,749	4	15	,048

Dónde:

Ho: (Hipótesis nula) = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos ($P < 0.05$)

Ha: (Hipótesis nula) = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos ($P > 0.05$)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado.

Observamos que $p < 0.05$, por lo tanto, se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, aceptando la hipótesis nula. Al determinado ello, podemos deducir diferentes tipos de pruebas estadísticas, que en este caso será ANNOVA oneway o de un factor y la prueba de Tukey.

TABLA 10.- ANOVA de un factor

Diámetro de Halos (mm)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4964,189	4	1241,047	6197,902	,000
Dentro de grupos	3,004	15	,200		
Total	4967,192	19			

Dónde:

Ho: No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (P>0.05)

Ha: Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (P<0.05)

La prueba ANNOVA oneway nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la medida de cada uno de ellos. Al observar el resultado ($p < 0.05$) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Si deseamos determinar que medidas son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de Tukey.

TABLA 11.- Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Diámetro de Halos (mm)
HSD Tukey

(I) Extracto alcohólico aplicado	(J) Extracto alcohólico aplicado	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	47,35000*	,31641	,000	46,3729	48,3271
	3,00	31,47750*	,31641	,000	30,5004	32,4546
	4,00	33,54250*	,31641	,000	32,5654	34,5196
	5,00	35,15000*	,31641	,000	34,1729	36,1271
2,00	1,00	-47,35000*	,31641	,000	-48,3271	-46,3729
	3,00	-15,87250*	,31641	,000	-16,8496	-14,8954
	4,00	-13,80750*	,31641	,000	-14,7846	-12,8304
	5,00	-12,20000*	,31641	,000	-13,1771	-11,2229

3,00	1,00	-31,47750 [*]	,31641	,000	-32,4546	-30,5004
	2,00	15,87250 [*]	,31641	,000	14,8954	16,8496
	4,00	2,06500 [*]	,31641	,000	1,0879	3,0421
	5,00	3,67250 [*]	,31641	,000	2,6954	4,6496
4,00	1,00	-33,54250 [*]	,31641	,000	-34,5196	-32,5654
	2,00	13,80750 [*]	,31641	,000	12,8304	14,7846
	3,00	-2,06500 [*]	,31641	,000	-3,0421	-1,0879
	5,00	1,60750 [*]	,31641	,001	,6304	2,5846
5,00	1,00	-35,15000 [*]	,31641	,000	-36,1271	-34,1729
	2,00	12,20000 [*]	,31641	,000	11,2229	13,1771
	3,00	-3,67250 [*]	,31641	,000	-4,6496	-2,6954
	4,00	-1,60750 [*]	,31641	,001	-2,5846	-,6304

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Leyenda:

- a) Control positivo (Amoxicilina)
- b) Control negativo
- c) Extracto alcohólico al 100%
- d) Extracto alcohólico al 50%
- e) Extracto alcohólico al 25%
- f) La prueba de Tukey es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente homogéneas. En el cuadro adjunto observamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 – 2 3 – 4 y 5. Por ello se debe aplicar la prueba de subconjuntos de Tukey para identificar las diferencias antes mencionadas.

**TABLA 12.- Prueba de subconjuntos de Tukey
Diámetro de Halos (mm)**

HSD Tukey^a

Extracto alcohólico aplicado	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
2,00	4	,0000				
5,00	4		12,2000			
4,00	4			13,8075		
3,00	4				15,8725	
1,00	4					47,3500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

En la tabla N° 13, podemos observar que todas las medias de los tratamientos aplicados son distintos (se observa en forma de escalera), por lo tanto, el extracto alcohólico de Bellaco Caspi al 100% presenta mejor inhibición de efecto bacteriano.

4.5. Discusión de resultados

En el presente estudio se evaluó, la actividad antibacteriana del extracto etanólico de frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, mediante el método de Difusión en disco “Kirby – Bauer”.

Para la preparación de los extractos vegetales, se utilizaron la corteza, los cuales fueron cortados, molidos y secados a temperatura ambiente; el método escogido para la extracción del extracto etanólico, fue mediante la técnica de maceración en frío a una presión atmosférica y temperatura ambiental (37°C) Después de la maceración en frío por una semana, se filtró utilizando papel filtro para concentrarlo en el rotavapor a una temperatura de 40° C y una presión de 690 mm Hg, por espacio de 3 horas obteniendo extracto etanólico de *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi”.

Los resultados obtenidos en el estudio respecto al rendimiento del extracto de la corteza de planta *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi” fue de 5.56%, con el cual se puede deducir que, por cada 1000g de la corteza del vegetal, se puede obtener aproximadamente 55.6 g. de extracto etanólico.

La presunción exitosa de los metabolitos secundarios de la especie vegetal depende de gran medida del tipo solvente utilizado en el procedimiento de extracción, los nativos y curanderos utilizan principalmente agua como disolvente, pero en nuestro estudio se utilizó un solvente orgánico (etanol). El argumento principal para utilizar etanol como solvente es por los términos de la polaridad de los compuestos o metabolitos secundarios extraídos por este disolvente y, además de su bioactividad intrínseca, por su capacidad para disolver y extraer los probables metabolitos secundarios con actividad antibacteriana. Parekh J., Jadeja D., Chanda S.⁵²

El estudio de las características farmacognósticas del extracto etanólico de la planta entera de *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi”, se realizaron mediante protocolo descritas por Corral A et al.⁵³

El trabajo microbiológico de inhibición de bacterias en placas petri es un modelo farmacológico preclínico que nos permite sustentar la hipótesis de que un extracto de una planta determinada tiene efecto antibacteriano.

Los resultados de la investigación muestran la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 25%, 50% y 100% lo cual en los resultados se demuestra que esta bacteria es susceptible al extracto de *Himatanthus tarapotensis* “bellaco caspi”. Desde 25% de concentración obteniendo un halo de inhibición promedio de 12.20mm de diámetro, a una concentración de 50% se obtuvo un halo de inhibición promedio de 13.81 mm de diámetro, mientras que a 100% de concentración se obtuvo un halo de inhibición de 15.87mm de

diámetro, estos resultados señalan que el efecto antibacteriano depende de la concentración del extracto, por lo tanto, a concentraciones mayores el efecto antibacteriano aumenta. Así mismo este efecto del extracto de ***Himatanthus tarapotensis*** “bellaco caspi”. Puede atribuirse a los compuestos fenólicos, cumarinas y alcaloides ya que existe información que indica sus propiedades con actividad antibacteriana. Cowan MM Clin Microbiol Rev. 1999 relata que las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, como taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, que se han encontrado in vitro con propiedades antimicrobianas.

Esta revisión intenta resumir el estado actual de los esfuerzos de detección botánica, así como estudios in vivo de su efectividad y toxicidad. La estructura y las propiedades antimicrobianas de los fitoquímicos también se abordan.

En la presente investigación en relación al control positivo de amoxicilina base con efecto de 90%, se observó que también inhibió el crecimiento de las bacterias de ***Staphylococcus aureus*** con un halo de inhibición en promedio de 48.35 mm de diámetro, mientras que el control negativo (Cloruro de sodio) no se encontraron ningún efecto antibacteriano lo que nos valida que el efecto antibacteriano del extracto de ***Himatanthus tarapotensis*** “bellaco caspi”. Se debe al 100% a propiedades de la planta y no del vehículo con el que se maceró.

Nuestro resultado se decidió comparar con un control positivo para ello elegimos la amoxicilina pura, ya que en la actualidad generalmente se usa como antibacteriano de primera elección también se utilizó el alcohol 96° como el control negativo para asegurar la eficacia del extracto de ***Himatanthus tarapotensis*** “bellaco caspi”. Los resultados obtenidos del extracto de bellaco caspi es de 12.20mm a 15.87mm frente a los resultados de control de la amoxicilina 47.35mm se ve que son menores, datos por el cual se tiene en cuenta que la muestra de la amoxicilina se usó como patrón referencial siendo la cantidad usada de 10 ug patrón por el cual se trabaja en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega en

Facultad de Farmacia y Bioquímica en los laboratorios de especialidad. Cabe destacar la importancia de ajustar la concentración del patrón positivo al extracto de ***Himatanthus tarapotensis*** para acercar el resultado de efecto que obtuvimos con el extracto de Bellaco caspi, siendo así los resultados de este estudio son prometedores, ya que también muestran la importancia de las aplicaciones terapéuticas del ***Himatanthus tarapotensis*** (bellaco caspi) como método alternativo y su bajo costo en la prevención de las patologías infecciosas. De esta manera pasaría a formar una nueva alternativa económica y de fácil acceso para la población que es lo que se busca en el sector farmacéutico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- a) Los metabolitos presentes en el extracto etanólico de la corteza de *Himatanthus tarapotensis* (bellaco caspi) fueron flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, esteroides y terpenos, azúcares, taninos, glicósidos y saponinas de los cuales los esteroides y terpenos presentan actividad antibacteriana .⁸

- b) El extracto etanólico de *Himatanthus tarapotensis* (bellaco caspi) tuvo efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro a las concentraciones de 25%, 50% y 100%, siendo la concentración del 100% la que tuvo mayor actividad antibacteriano.

5.2 Recomendaciones

- a) Trabajar con mayor número de concentraciones para aumentar la efectividad antibacteriana.
- b) Continuar con el estudio, a partir del efecto antimicrobiano en otros modelos de estudio a fin de determinar la dosis adecuada como efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de la corteza de **Himatantus tarapotensis** (bellaco caspi).
- c) Debido a su composición de flavonoides cuya propiedad es de antioxidante puede ser de importancia y apoyo para aplicación y/o estudios posteriores para la formulación de productos antioxidantes.
- d) Desarrollar otros ensayos para corroborar la sensibilidad antimicrobiana de **Himatantus tarapotensis** (bellaco caspi), y así validar los resultados obtenidos.
- e) Realizar diseños de ensayos antibacterianos con diferentes controles positivos como amoxicilina, penicilina, eritromicina, etc., con el objetivo de profundizar los estudios.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS

1. Guevara J. et al. “Acción in vitro de diez plantas medicinales sobre diez cepas diferentes de *Streptococcus pneumoniae*”, Lima – Perú, 2012.
[Disponible:http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832012000400003]
2. Flores F. tesis de “Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico del bellaco caspi (*himathantus sucuuba*) y la congona (peperomia galioides)” Universidad Alas Peruanas, Lima, Perú, 2015.
[http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/560/2/Flores_Zurita-Resumen.pdf]
3. Ugarte, J. Tesis de “caracterización anatómica de 9 especies forestales de la concesión industrial maderera zapote en Loreto” Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, 2009.
4. Amasifuen, C. Artículo de “Estudio ecológico y bioquímico de himatanthus tarapotensis (*Apocynaceae*): Patrones de producción y papel en la interacción planta-insecto de plumericina, en el ambiente Amazónico “Montpellier, Francia, 2016.
[file:///F:/investigaciones%20de%20bellaco%20caspil/estudio%20ecol%3%B3gico%20y%20bioqu%3ADmico%20de%20Himatanthus%20tarapotensis%20(Apocynaceae).html]
5. Medrano, A. Shahuano, I. Tesis “Actividad antimalárico in vitro por citometría de flujo de extractos de especies vegetales de la familia Apocynaceae de la región Loreto, LIPNAA, Iquitos-peru Disponible:[http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNAP_4adf1862b8226eb645719eda843da747]
6. López, R., montero, M. libro “Manual de identificación de especies forestales en bosques naturales con manejo certificable por comunidades” publicación del instituto amazónico de las investigaciones

científicas Sindhi y la fundación chemonics. 1^{ra} .Ed. Bogotá, Colombia, 2005.

Disponible:<https://books.google.com.pe/books?id=fj5vawaaqbaj&pg=pt96&dq=bellaco+caspi&hl=es&sa=x&ved=0ahukewjwk7lj8fzahxrt1mkhywd9kq6aeisjag#v=0nepage&q&f=true>]

7. Hernández J. tesis. “Estudio y funcionalización quimioenzimática de los componentes químicos de *jasminum odoratissimum*”; Universidad de la Laguna–España,2001.Disponible <ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp145.pdf>
8. López Carreras, et al. Artículo. “propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud”; Universidad Complutense de Madrid- España, 2012. Disponible: <http://revista.nutricion.org/pdf/propiedades.pdf>.
9. Uchuya H. Tesis “presencia de *staphylococcus aureus* resistente a meticilina en crianza porcina de traspatio del departamento de tumbes”; Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 2015. Disponible: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4611/Uchuya_dh.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
10. Ramos A. tesis “evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* frente a microorganismos patógenos”, Bogotá, Colombia, 2013.
11. Cetrángolo, O., Bertranou F., Casanova L., Casalí P. artículo. “El sistema de Salud del Perú” Primera edición. 2013 disponible: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/2401.pdf>.
12. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. Libro “biología de los microorganismos” décima edición. Madrid, España, 2004. disponible en: <https://es.scribd.com/doc/128794514/Biologia-de-los-Microorganismos-Brock-10ed-pdf>.

13. Socorro, G., et al. Artículo "Microbiología general de Staphylococcus aureus: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación". universidad de la ciénega del estado de michoacán de ocampo, México, 2014.
14. Cowan M. Productos antimicrobial agents. 1999; 12 (4):564.
Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515903>.
15. Carrio, V., Garcia, c. "preparación de extractos vegetales: determinación de eficacia de metódica". tesis previa a la obtención del título de bioquímica y farmacéutica. universidad de cuenca, facultad de ciencias químicas. ecuador, 2010.
16. Lock, O. Libro "Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales". Segunda edición 19994; p3-8, 2013.
17. Mosquera T. Tesis "Estudio comparativo de la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite de romero (Rosmarinus officinalis Lamiaceae) utilizados como conservantes en una formulación cosmética", Universidad Politécnica Salesiana, Quito.2014.
18. Velásquez, Sh. tesis "Actividades desarrolladas en el laboratorio de servicios a la comunidad e investigación (lasaci) de la Universidad Nacional de Trujillo, durante el año 2015." Universidad Nacional de Trujillo – Perú. 2016. Disponible: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5006/Velasquez%20Arevalo%20Sharon.pdf?sequence=1>.
19. Gonzalez, A. Trabajo obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas Universidad Nacional de Colombia sede Manizales Departamento de Ingenieria Quimica. 2004. Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>

20. Wray C. & Wray A. eds., (2000). *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 2013.
21. Barquero A.: Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Rev. Quím Viva* 6:19–35, 2007. Disponible:
<http://www.redalyc.org/pdf/863/86360203.pdf>
22. Mejía, K., Rengifo, E. Libro “Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana” Lima, Agencia Española de Cooperación Internacional. Primera edición: 1995, Segunda edición corregida y aumentada: setiembre 2000. 286 p.; il.; 23 cm. 2000.
23. Vivot, E., Sánchez, C., Cacik, F., Sequin, CH. Artículo actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina), proyecto de investigación p i d-u n e r 2110, radicado en Facultad de Ciencias Agropecuarias –f c a–, Universidad Nacional de Entre Ríos –u n e r–, Oro Verde (Entre Ríos, Argentina); recibido en abril 2012, admitido en setiembre 2012.
24. Gaona, M., Ríos, D., Peña, M., Pineda, A., Ibáñez, M., Germán, G. Artículo Variación del estado de portador de *Staphylococcus aureus* en una población de estudiantes de medicina - *Salud. Bogotá (Colombia)* 7 (1): 37-46, enero-abril de 2009/ 37. 2009.
25. Socorro, G., Avalos H., Soto M. Artículo Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación - Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. 2014.
26. Bustos, J., Hamdan, A., Gutiérrez, M. *Revista de Atención a la Salud*, Depto. de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. México, D.F., México. 2006.
27. Antoinette, M., Moraga, F., Bartolomé, R., Larrosa, N., Campins, M., Roman, Y., Vindel, A., Figueras, C. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 28, Issue 10, Pages 672-674. 2010.

28. Lock. O investigación fitoquímica métodos en el estudio de productos naturales. 3ra edición. Lima: K&G soluciones graficas; 2016. 200-562 pp.
29. Bague. AJ. Tecnología farmacéutica. 1a Ed. Cuba: Club universitario; 2012. 370p.
30. Añazco. Ka., Suarez Ef. Tesis "Determinación de las condiciones óptimas en la extracción de glicósidos diterpenoides a partir de Stevia rebaudiana Bertoni en un digestor". Ecuador: 2015. 184p.
31. Ortuño MF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España. 1a ed. ediciones Aiyana; 2006. 271p.
32. Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas. 2da ed. Mundi-prensa; 1996. 365p.
33. Villar D. Farmacología de antimicrobianos. 2010. 1-4.
34. Sanchez L, Saenz E. Infecciones cutáneas bacterianas. Servicio de Dermatología Hospital Militar. 2006; 16(1).
35. Gil M. Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chil Infect. 2000; 17(2): 145-152.
36. Soriano Ev, Salgado C, Sarez F, Trigo F. Patogenia microbiana: Conceptos básicos en la interacción hospedero-microorganismo. researchgate. 2006 jun; 37(4):1-10.
37. Saavedra J, Santos M, González F, Hernández T, Navarro ML. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. 160-179. 2007.
38. Pommier L. Dictionnaire Homeoparthyqued" urgence. 2da ed. Barcelona: Paidrotivo; 2002.

39. Blanco J. Definición y clasificación de las úlceras por presión. Hospitals Vallid' Hebron. 2003; 23(4): 194-98.
40. Alpizar L, Medina E. La fiebre conceptos básicos. Rev Cubana Pediatría. 1998; 70(2): 79-83.
41. López A, Iturralde F, Clerencia M, Galindo J. Dolor. Tratado de geriatría para residentes. 2014.
42. Flores V, Flores I, Larcano M. Edema. Enfoque clínico. Hospital General de Cuernavaca. 2014; 30: 51-55.
43. Seija V, Bignoli r. Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica. 2002.
44. Montoya M. Las cepas atcc. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. 2002.
45. Casado C, González G, Medina M. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Laboratorio files wordpress. 2012.
46. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del Amazonas. Universidad nacional de Colombia. 2004; 1-100.
47. Cisterna R. Microbiología. Hospital de Basurto. 2007.
48. Pedraza PN, Castellanos HJ. estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. pontifica universidad javeina. 2009; 1-07.
49. Mayor de San Marcos; 2013. 97p.

50. Soriano EV, Salgado c, Sarez F, Trigo F. Patogenia microbiana: Conceptos básicos en la interacción hospedero-microorganismo. 2006
51. Rodríguez M, Zevallos F. Actividad antibacteriana in vitro del fruto de *Morinda citrifolia* L. y planta entera de *Notholaena nivea* (Poir) Desv, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, Imet- Essalud 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.
52. Parekh J., Jadeja D., Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk J Biol* 2005; 29: 203-210.
53. Corral A, De la Paz J, Concepción E, Hernández R, López D. Tamizaje, Tecnología, control de calidad y farmacología del extracto fluido de *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Rev Cubana Plant Med.* 1997; 2 (2): 19-25. Disponible: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3_2_98/pla09298.pdf
54. Centurion, J. Tesis para titulación “Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “Laurel” Sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923” Universidad Privada Antenor Orrego. 2017.
55. Negrete, M. Et al. Artículo, realizado fue en “Estudio in vitro de la capacidad antibacteriana de la hoja de coca (*Erythroxylum coca* Lam) frente a bacterias ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*”, universidad cristiana de Bolivia. 2015.
56. USP 32 (2009). Farmacopea de los estados unidos Mexicanos. Cap. 81. NF 27. VOL. 1.

CAPITULO VI

ANEXOS

Anexo 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi de (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) en cultivos de “ <i>Staphylococcus aureus</i> ” estudio in vitro.						
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA
<p>GENERAL: ¿El extracto etanólico de la corteza bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) tendrá efectos antibacterianos frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en estudio in vitro?</p> <p>ESPECIFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Identificar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>). - Determinar la concentración del extracto etanólico de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) que posee efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en estudio in vitro. 	<p>GENERAL: Determinar el efecto antibacteriano en sepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en el extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) en estudio in vitro.</p> <p>ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Identificar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>). - Determinar la concentración del extracto etanólico de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) que posee efecto antibacteriano frente a cepas de <i>staphylococcus aureus</i> en estudio in vitro. 	<p>GENERAL. El extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) posee efectos antibacterianos en cepas <i>staphylococcus aureus</i> en estudios in vitro.</p> <p>ESPECIFICAS</p> <ul style="list-style-type: none"> - El extracto de la corteza del bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) contiene tipos de metabolitos relacionados con el efecto antibacteriano. - El extracto de la corteza del bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>) tiene efectos antibacterianos frente al <i>Staphylococcus aureus</i> en estudio in vitro a diferentes concentraciones. 	<p>VI: Extracto etanólico de la corteza de bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)</p> <p>VD: Efecto Antibacteriano del bellaco caspi (<i>Himatanthus tarapotensis</i>)</p>	<p>VI: Microbiológico en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>VD: Antibacteriana</p>	<p>VI: -Flavonoides -Cumarinas -Taninos -Saponinas -Alcaloides -Antocianidinas</p> <p>VD: - Halo de inhibición</p>	<p>DISEÑO: Experimental</p> <p>TIPO DE ESTUDIO: Explicativo.</p> <p>NIVEL: Aplicado.</p> <p>TÉCNICA: Se realizara mediante la observación minuciosa del cultivo microbiano.</p> <p>INSTRUMENTO: Lapiceros, cámara fotográfica, multimedia portátil, cuaderno de apuntes Procesamiento y análisis de datos: Programa estadístico, SSPP, Excel, Word y se aplicara el análisis ANOVA, se realizara el paquete estadístico spssv.</p>

ANEXO 3: Certificado botánico



Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 120-HA-CIRNA-UNAP

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ - CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama fértil), recibida de **Maribel Pocito Mego**, Bachiller de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Inga Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: *H. tarapotensis* (K. Schum. ex Markgr.) Plumel, tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de clasificación APG IV (2016).

Clase: Equisetopsida Novák ex Takht.

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Gentianales Juss. ex Bercht. & Presl.

Familia: Apocynaceae

Género: *Himatanthus* Willd. ex Schult.

Especie: *H. tarapotensis* (K. Schum. ex Markgr.) Plumel

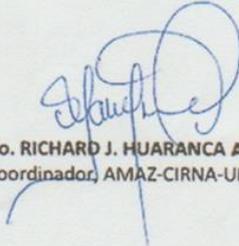
Nombre vulgar: “bellaco caspi”

Determinados por: A.J.M. Leeuwenberg (WAG), 1997.

Se expide la presente constancia, a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 13 de Abril del 2018

Atentamente,


Bigo. RICHARD J. HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP



ANEXO 4: Certificado de la extracción en el Rotavapor



UNAP

CONSTANCIA

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

Ficha de observación AD-HOC del proceso de destilación a presión reducida del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatantus tarapotensi*).

"Efecto antibacteriano (*Staphylococcus aurey*) del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatantus tarapotensi*) estudio in vitro"

El Dr. Wilfredo Ruiz Mesía, investigador del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonia (LIPNAA).

Hace constar: Que la bachiller Maribel Pósito Mego egresada de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, ha desarrollado el proceso de concentrado del extracto etanólico por destilación a presión reducida, en forma eficiente, manipulando correctamente el rotavapor controlando la presión y temperatura adecuada.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines que estime conveniente.

Iquitos 13 de Abril del 2018

DR. WILFREDO RUIZ MESÍA
INVESTIGADOR LIPNAA

ANEXO 5: Certificado Microbiológico

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: S. aureus ssp aureus ATCC 6538 PK/5
Lot Number: 633937

Product Number: R4607016
Expiration Date: 2019-09-30
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description.
Traditional staining is performed.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

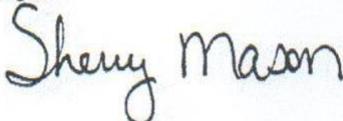
Gram Reaction: Gram Positive Cocci

Biochemical Profile: Vitek 2C GP

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

ANEXO 6: Certificado Microbiológico



CERTIFICADO DE ANALISIS

I.- INFORMACIÓN DEL PRODUCTO:

NOMBRE DE PRODUCTO	:	AGAR MUELLER HINTON
FORMA DE PRESENTACION	:	100 ML
LOTE N°	:	180310
VENCIMIENTO	:	03/2020
TIPO DE ENVASE	:	VIAL DE VIDRIO DE 100 ML

II.- USO

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

III.- RESULTADO

Reacción Positiva : El medio produce colonias diminutas de color ambar

Reacción Negativa: No crecimiento en el medio

III.- CONSERVACION

Almacenar de 10 – 35 C°

V.- PRECAUCIONES

Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.

Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio



ANEXO 7: Instrumento de recolección de datos

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS
EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO DEL BELLACO CASPI” (*Himatanthus tarapotensis*) EN LA “REDUCCIÓN BACTERIANA” EN CULTIVOS DE “*Staphylococcus aureus*”**

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático. Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación. Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea. FECHA:

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> POR EL METODO DE KIRBY BAUER					
Nº DE PLACA	CONCENTRACION (%) DEL EXTRACTO ETANOLICO <i>Himatanthus tarapotensis</i> (<i>Bellaco caspi</i>)			CONTROLES	
				AMOXICILINA ug	Cloruro de sodio
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICION (mm)				
	25%	50 %	100 %	10 ug	100ul
PLACA 1					
PLACA 2					
PLACA 3					
PLACA 4					
PLACA 5					



ANEXO 9. SCREENING FITOQUÍMICO

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA
FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE SCREENING FITOQUIMICO
EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA CORTEZA
BELLACO CASPI (*Himatanthus tarapotensis*) EN CULTIVOS DE “*Staphylococcus*
***aureus*” ESTUDIO INVITRO**

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático. Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad. En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

Leyenda: (+ +) Moderado, (+ + +) Abundante, (-) Ausente

SCREENING FITOQUIMICO				
	REACTIVO	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS	MOLISH	2ml extracto+ 5 gotas del Rvos Molish+ 10 gotas H2SO3 C se dejó en reposo	Formación de un anillo violáceo.	
IDENTIFICACION DE AZUCARES	BENEDICT	2ml extracto + 5 gotas de reactivo, Agitamos, luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formación de un Precipitado color amarillo	
	FEHLING A+ FEHLING B	2ml extracto + 5 gotas de Fehling A +Fehling B, agitar luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formación de una Coloración rojo ladrillo	
	TOLLENS	2ml extracto + 3 gotas del RvoTollens, Agitamos, luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formation espejo de Plata	
IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS	TRICLORURO FERRICO	2ml extracto + 5 gotas del reactivo	Coloración Verde	
IDENTIFICACION DE CUMARINAS	HIDROXIDO DE SODIO AL 10%	2ml extracto + 2 gotas del reactivo	Coloración Amarillo intenso	
IDENTIFICACION DE TANINOS	GELATINA – SAL+ NAOH 10%	2ml extracto + 5 gotas del reactivo +3 gotas de NaCl 10%	Formacion de coloide	
IDENTIFICACION DE SAPONINAS	H2O DESTILADA + AGITACION	2ml extracto + 1ml de H2O destilada agitación por 2 minutos	Formación de espuma	
IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES	SHAINODA	2ml extracto + 7 gotas del reactivo (agitar) colocar 1º gotas de HCl	Cambio de color marrón intenso a una coloración rojo	
IDENTIFICACION DE	Lieberman-Bouchard	2 ml extracto + S.R. de Lieberman-Bouchard, 5 gotas de cloroformo + 5	Cambio de	

ESTEROIDES Y TRITERPENOIDES		gotas de anhídrido Acético + 5 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado	color marrón intenso a Color negro	
IDENTIFICACION DE GLICÓSIDOS	VAINILLA SULFÚRICO	2ml extracto + 5 gotas de Vainilla	Un color Rojizo violáceo con un anillo de interface	
IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS	NINHIDRINA	2 ml extracto + 5 gotas Ninhidrina + calor BM 10 minutos	Cambio de color marrón intenso a color violáceo	
IDENTIFICACION DE ALCALOIDES	DRAGENDORF	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Presencia de precipitado anaranjado	
	MAYER	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Presencia de precipitado blanco	
	BERTRAND	2 gotas de extracto + 3 gotas de S.R. Bertrand	Presencia de precipitado Blanco	
	WAGNER	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Presencia de precipitado marrón	

ANEXO 9. FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTOS



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO
DE LA VEGA FACULTAD DE
CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

N°:

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA CORTEZA DEL BELLACO CASPI
(*Himatanthus tarapotensis*) EN CULTIVOS DE "*Staphylococcus aureus*" ESTUDIO
INVITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS DE 50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... () () () () () (X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?..... () () () () () (X)
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... () () () () () (X)
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?..... () () () () () (X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?..... () () () () () (X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?..... () () () () () (X)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

.....
.....

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

.....
.....

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....
.....

Fecha: 08-05-2018

Validado por: Dr. A.F. Nesquen Tasayco Yataco.

Firma:



ANEXO 10. Prueba de solubilidad

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA CORTEZA DEL
BELLACO CASPI (*Himatanthus tarapotensis*) EN CULTIVOS DE
"Staphylococcus aureus ESTUDIO IN VITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

Reactivos	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
Acetona	1ml extracto + 1ml del reactivo	Poco soluble	
Alcohol 96°	1ml extracto + 1ml del reactivo	POCO SOLUBLE	
AGUA DESTILADA	1ml extracto + 1ml del reactivo	SOLUBLE	
CLOROFORMO	1ml extracto + 1ml del reactivo	POCO SOLUBLE	
CICLOHEXANO	1ml extracto + 1ml del reactivo	INSOLUBLE	
DICLOROMETANO	1ml extracto + 1ml del reactivo	INSOLUBLE	
METANOL	1ml extracto + 1ml del reactivo	POCO SOLUBLE	
BENCENO	1ml extracto + 1ml del reactivo	INSOLUBLE	
ETER DIETÍLICO	1ml extracto + 1ml del reactivo	INSOLUBLE	
L- BUTANOL	1ml extracto + 1ml del reactivo	POCO SOLUBLE	

**ANEXO 10. FICHA DE VALIDACIÓN POR
JUICIO DE EXPERTOS**



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE SCREENING FITOQUIMICO

N°:

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA CORTEZA DEL
"BELLACO CASPI" (*Himatanthus tarapotensis*) EN CULTIVOS DE
"Staphylococcus aureus" ESTUDIO INVITRO**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

	MENOS DE					
	50	60	70	80	90	100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....	()	()	()	()	()	(X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los items están referidas a los conceptos del tema?.....	()	()	()	()	()	(X)
3. ¿Qué porcentaje de los items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....	()	()	()	()	()	(X)
4. ¿En qué porcentaje estima que los items del instrumento son de fácil comprensión?.....	()	()	()	()	()	(X)
5. ¿Qué porcentaje de los items considera usted que siguen una secuencia lógica?.....	()	()	()	()	()	(X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?.....	()	()	()	()	()	(X)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué items considera usted que deberían agregarse?

.....
.....

2. ¿Qué items estima que deberían eliminarse?

.....
.....
.....

3. ¿Qué items considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....
.....

Fecha: 08-05-2018

Validado por: Dr. A. F. Nesquen Tasayco Yataco.

Firma:

ANEXO 11. TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS (FUENTES DE ELABORACIÓN PROPIA).

a. Recolección, selección, secado, pesado y procedimiento del extracto etanólico.

FOTO N°01 y 02 Extrayendo de la planta la corteza del bellaco caspi
(*Himatanthus tarapotensis*)



FOTO N°3 LA CORTEZA DEL BELLACO CASPI (*Himatanthus tarapotensis*)



Foto N°04 Selección de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*).



Foto N°05 pesando de la corteza caspi (*Himatanthus tarapotensis*) y luego se procede a realizar el secado de forma natural.



A. Foto N° 06 El Macerado del Extracto etanólico de la corteza bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) fue triturado y molido de forma mecánica (molivo), y colocada en un frasco ámbar de boca ancha, para luego ser cubierto por etanol 96 °C por un periodo de 15 días y con agitación de cada 12 horas, protegido de la luz y calor.



Foto N°0 7 El Proceso de Filtración del Macerado del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*).



Foto N°08 El proceso del Vaciado del extracto etanólico al matraz del Rotavapor para luego continuar con el procedimiento correspondiente.



Foto N°09 Obtención del extracto etanólico del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) en el instrumento del Rotavapor a presión reducida.



Foto N°10 y 11. Muestra del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*)

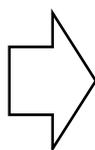
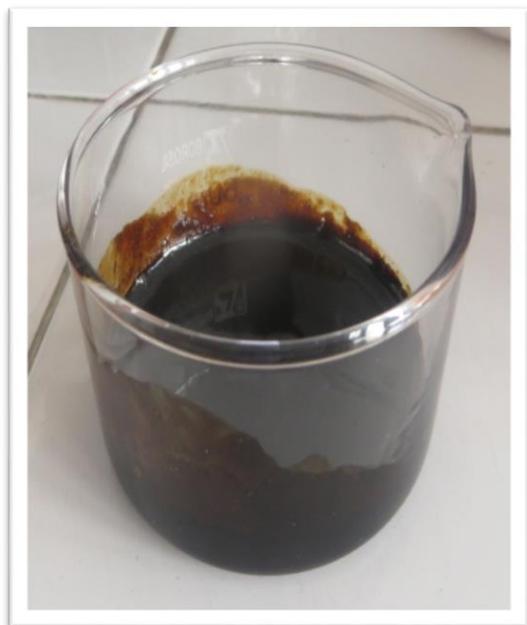


Foto N° 12 y 13 Haciendo Pesado de la Muestra del extracto etanólico de la corteza del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*) para su respectivo cálculo de rendimiento.

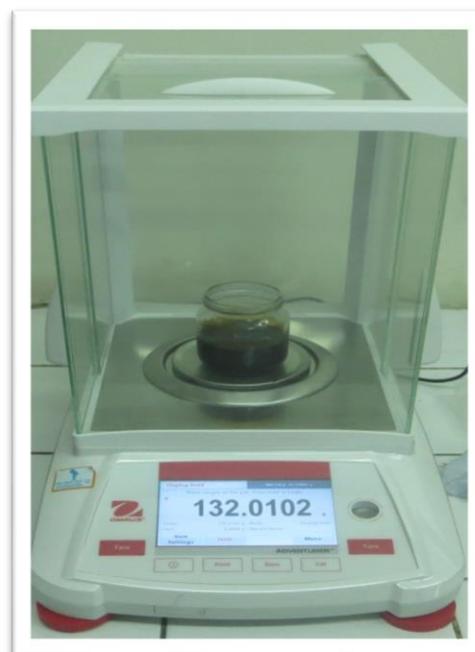
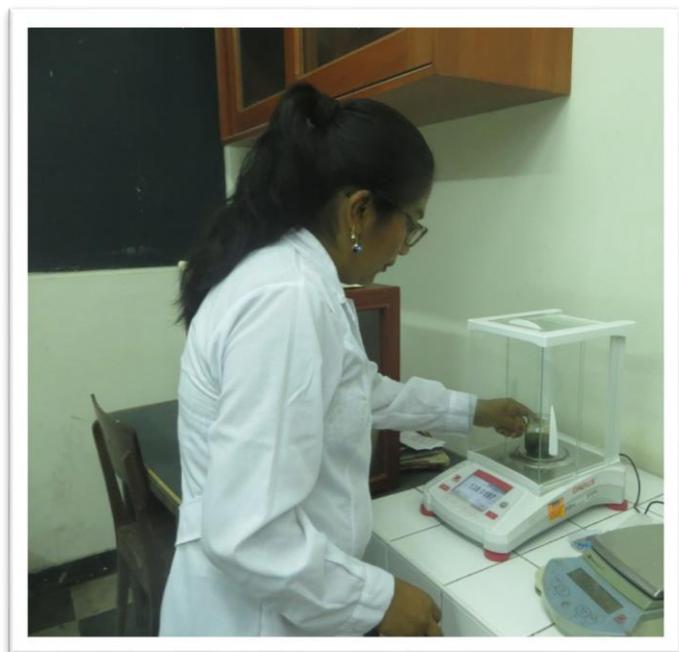


Foto N°14 y 15 REACTIVOS QUE SE UTILIZARON.

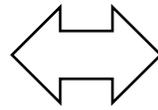


Foto N°16 y 17 Preparación de las diluciones del extracto del *Himatanthus tarapotensis* en tubos de ensayo para las respectivas reacciones químicas.



Foto N° 18 Resultados de la marcha fitoquímica del Extracto Etanólico de *Himatanthus tarapotensis*.

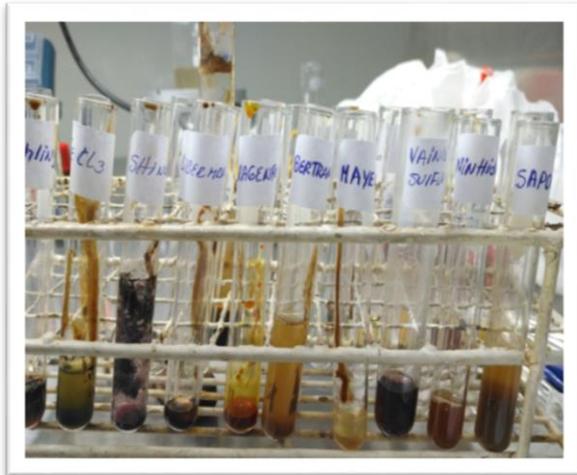


Foto N° 19 Resultados de la prueba de solubilidad del Extracto Etanólico de *Himatanthus tarapotensis*.



Foto N° 20 fin de la prueba de solubilidad y marcha fitoquímica del bellaco caspi (*Himatanthus tarapotensis*).



b. **POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA**

Foto N° 21 Bacteria de
Staphylococcus aureus ATCC 6538

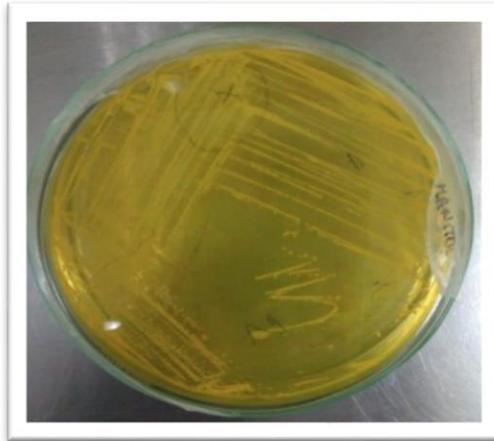


Foto N° 22 Presentación del
AGAR MUELLER HINTON.



Foto N° 23 PREPARACION DEL Agar Mueller Hinton en la
cocinilla baño maría.



Foto N°24 Procedimiento con las Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio.



Foto N°25 Diluyendo la amoxicilina como control positivo y el cloruro de sodio como control negativo.

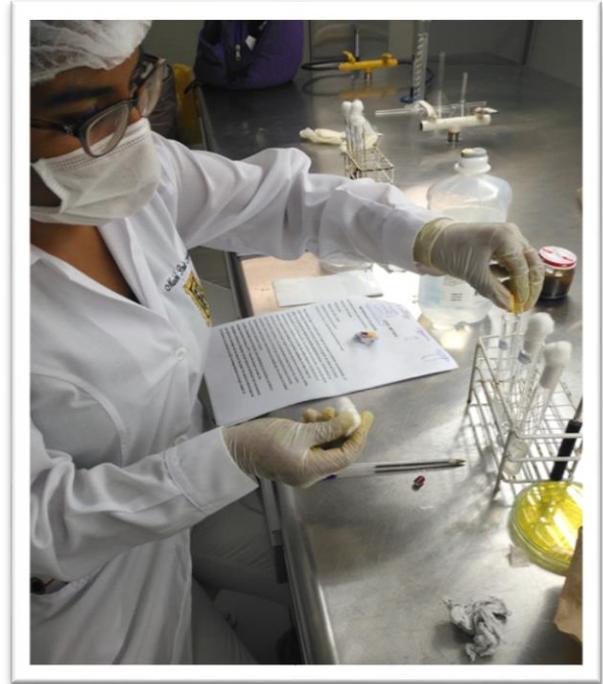


Foto N°26 procedimiento en el vaciado del Agar Mueller Hinton en las placas Petri esterilizadas.



Foto N°27 Siembra de las bacteria con un hisopo estéril en las placas con Agar Mueller Hinton.



Foto N°28 Enumeración de las placas con Agar Mueller Hinton.



Foto N°29 Preparación de las placas con Agar Mueller Hinton Para los ensayos con las concentraciones al 25%, 50% y 100%.



FOTO N°30 Agregando las diluciones del extracto (25%,50% y100%) con 100 uL y 200 uL.



FOTO N°31 Siembra terminada de la prueba Antibacteriana.



Foto N°32 antes de ser llevado a la autoclave.

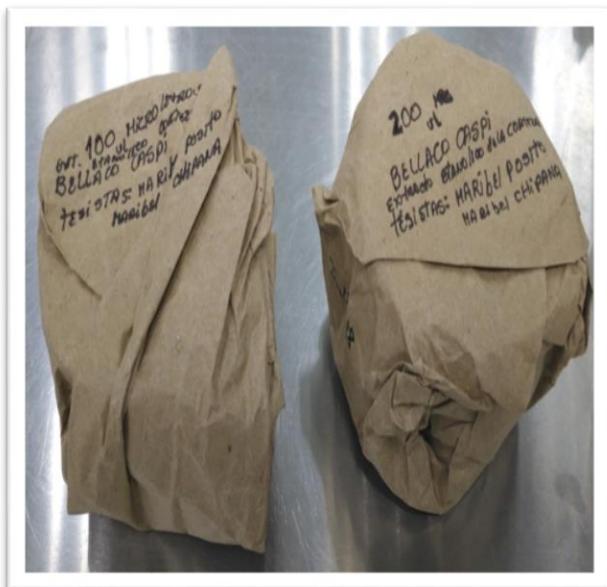


Foto N°33 se coloca en la estufa durante 12 y 24 horas.



C. MEDICIÓN DE LOS HALO DE INHIBICIÓN POR CADA DISCO DE DILUCIÓN (25%, 50%, 100%, CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO).

Foto N°34 El resultado blanco con el cloruro de sodio no presenta inhibición. Crecimiento total.

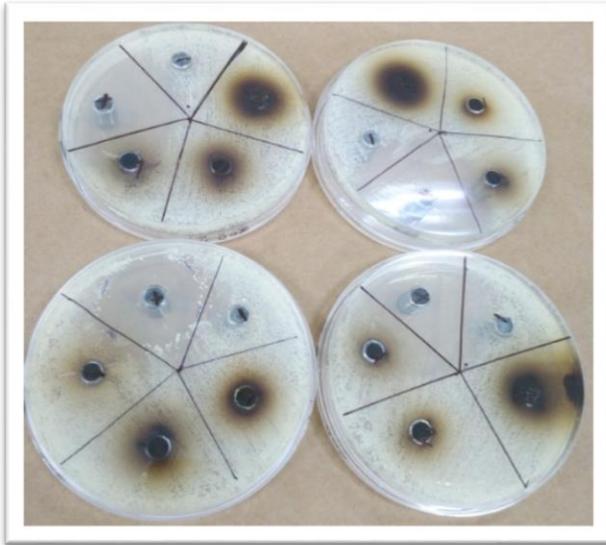


Foto N°35 El resultado. Control (amoxicilina 10ug). Disco 1. 48,35mm; Disco 2. 47,45mm; Disco 3. 46,5mm; Disco 4. 47,1mm.



Foto N°36 Resultado. Disolución 25%. Disco 1. 12,40mm; Disco 2. 11,90mm; Disco 3. 12,60mm; Disco 4. 11,90mm.

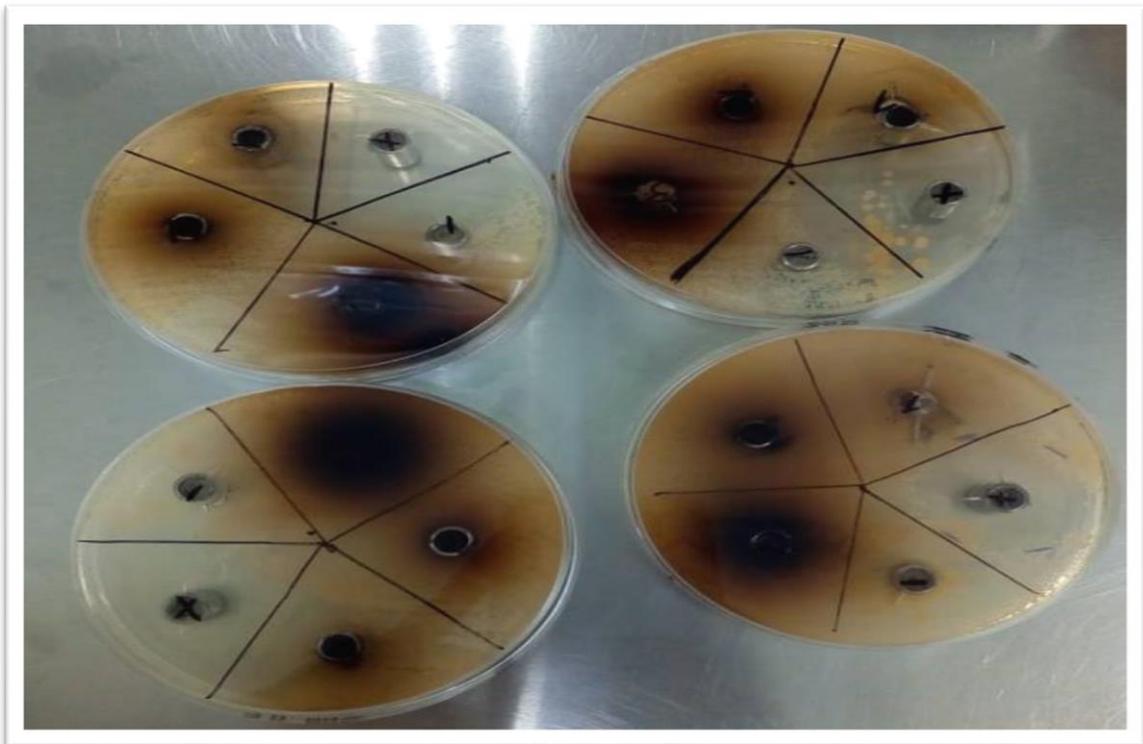


Foto N°37 Resultado. Disolución 50%. Disco 1. 14,90mm; Disco 2. 13,90mm; Disco 3. 14,01mm; Disco 4. 13,20mm.

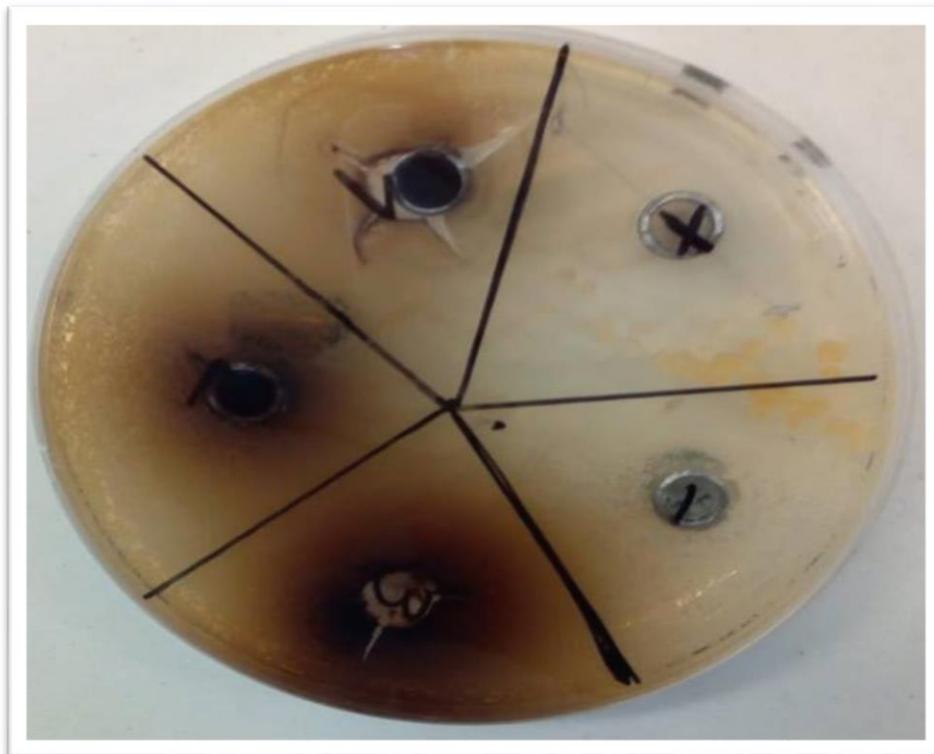


Foto N°38 Resultado. Disolución 100%. Disco 1. 16,12mm; Disco 2. 15,95mm; Disco 3. 16,02mm; Disco 4. 15,40mm.

