

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIBACTERIANO, *IN VITRO*, DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (COL MORADA)
EN CEPAS DE *Shigella flexneri*”**

TESISTA : ALEXANDRA ESTEFANY CRUZAT CAMPOS

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico

ASESOR: Mg. Carlos Moisés Casana Vargas

Lima - Perú

2 0 1 8

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado principalmente a Dios, por brindarme su fuerza, amor y bendición todos los días de mi existencia.

A mi madre Zenaida campos y mi tía Felicita Campos, por brindarme su amor incondicional, confianza y apoyo durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Alma Mater “Universidad Inca Garcilaso de la Vega” por enseñarme conocimientos y habilidades que me permitirán desarrollar investigaciones al beneficio de la salud en la población.

A mi Asesor de tesis Mg. Carlos Moisés Casana Vargas, por su apoyo y conocimientos brindados en esta investigación, guiándome en el desarrollo hasta la culminación de este trabajo.

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla N°1 Contenido de nutrientes en 100 gramos del vegetal fresco..... | 17 |
| Tabla N°2 Ejemplos de actividad antibacteriana del sulforafano y mecanismo de acción..... | 20 |
| Tabla N° 3 Actividad antimicrobiana de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada) contra patógenos bacterianos en mm..... | 20 |
| Tabla N°4 Antibióticos recomendados para el tratamiento de la shigelosis..... | 30 |
| Tabla N°5 Operacionalización de variables e indicadores..... | 32 |
| Tabla N°6 Distribución de muestras..... | 45 |
| Tabla N°7 Prueba de solubilidad del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L..... | 49 |
| Tabla N°8 Resultados de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 50 |
| Tabla N°9 Resultados de la cromatografía en capa fina analítica del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 51 |
| Tabla N°10 Antibióticos y diámetros críticos para Enterobacterias..... | 52 |
| Tabla N°11 Distancias inhibitorias en mm de diámetro de halos en las concentraciones de los controles y extractos etanólicos al 50% y 100%..... | 52 |
| Tabla N°12 Estadísticas descriptivas para los halos de inhibición obtenidos de cada concentración del extracto etanólico aplicado..... | 54 |
| Tabla N°13 Prueba de LEVENE de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Tabla N°14 Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. (col morada)..... | 56 |
| Tabla N°15 Comparaciones múltiples de la Variable dependiente: Diámetro de Halos (mm) - HSD Tukey..... | 57 |
| Tabla N°16 Prueba de subconjuntos de Tukey..... | 58 |
| Tabla N°17 Estadísticas de muestra única N°1..... | 60 |
| Tabla N°18 Estadísticas de muestra única N°2..... | 61 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura N°1 Formas de las cabezas a pella de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L..... | 14 |
| Figura N° 2 <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L..... | 15 |
| Figura N° 3 Estructuras glucosinoladas, biosíntesis e hidrólisis..... | 19 |
| Figura N°4 Agliconas flavonoides encontrados en <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L..... | 21 |
| Figura N° 5 Bacteria <i>Shigella</i> spp..... | 26 |
| Figura N° 6 Estrategia de invasión de <i>Shigella flexneri</i> | 28 |
| Figura N°7 Determinación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 53 |
| Figura N°8 Obtención del material vegetal | 80 |
| Figura N°9 Selección, molienda y pesado de la muestra vegetal | 81 |
| Figura N°10 Maceración, filtrado por bomba al vacío, secado en estufa y almacenamiento | 82 |
| Figura N°11 Prueba de solubilidad..... | 83 |
| Figura N°12 Fase móvil y fase estacionaria de la cromatografía en capa fina analítica..... | 86 |
| Figura N°13 Visualización en la cámara Uv 254 nm..... | 87 |
| Figura N°14 Los halos de inhibición en concentración del extracto al 100%..... | 88 |
| Figura N°15 Los halos de inhibición en concentración del extracto al 50%..... | 88 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo N°1 Matriz de consistencia..... | 77 |
| Anexo N°2 Certificación taxonómica de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 78 |
| Anexo N°3 Protocolo de análisis de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 79 |
| Anexo N°4 Recolección del material vegetal..... | 80 |
| Anexo N°5 Obtención del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. (col morada)..... | 81 |
| Anexo N°6 Prueba de solubilidad..... | 83 |
| Anexo N°7 Marcha fitoquímica..... | 84 |
| Anexo N°8 Cromatografía en capa fina analítica..... | 86 |
| Anexo N°9 Análisis microbiológico..... | 88 |
| Anexo N°10 Ficha de recolección de datos..... | 89 |

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| Dedicatoria | i |
| Agradecimiento | ii |
| Índice de tablas | iii |
| Índice de figuras | v |
| Índice de anexos | vi |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| Introducción..... | 1 |
| CAPÍTULO I : PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 3 |
| 1.1 Descripción de la realidad problemática..... | 3 |
| 1.2 Formulación del problema | 5 |
| 1.2.1 Problema general..... | 5 |
| 1.2.2 Problemas específicos | 5 |
| 1.3 Objetivos de la investigación | 6 |
| 1.3.1Objetivo general..... | 6 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 6 |
| 1.4 Justificación de la investigación | 7 |
| CAPITULO II : MARCO TEORICO | 8 |
| 2.1 Antecedentes de la investigación | 8 |
| 2.1.1 Antecedentes nacionales | 8 |
| 2.1.2 Antecedentes internacionales | 11 |
| 2.2 Bases Teóricas..... | 13 |
| 2.2.1 <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L (col morada) | 13 |
| 2.2.1.1 Descripción botánica..... | 13 |
| 2.2.1.2 Taxonomía | 16 |
| 2.2.1.3 Usos medicinales de <i>Brassica oleracea</i> var.capitata L. | 16 |
| 2.2.1.4 Composición nutricional..... | 17 |
| 2.2.1.5 Composición química..... | 18 |
| 2.2.1.6 Técnicas recomendadas de extracción..... | 23 |
| 2.2.2 Enfermedades diarreicas | 24 |
| 2.2.2.1 Definición | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.2.2 Clasificación | 24 |
| 2.2.3 Shigelosis..... | 26 |
| 2.2.3.1 Definición | 26 |
| 2.2.3.2 Patogénesis | 27 |
| 2.2.3.3 Diagnóstico | 29 |
| 2.2.3.4 Tratamiento..... | 30 |
| 2.3 Formulación de hipótesis..... | 31 |
| 2.3.1 Hipótesis general | 31 |
| 2.3.2 Hipótesis específicas | 31 |
| 2.4 Operacionalización de variables e indicadores | 32 |
| 2.5 Definición de términos básicos..... | 33 |
| CAPÍTULO III : METODOLOGIA..... | 35 |
| 3.1 Tipo y nivel de investigación..... | 35 |
| 3.2. Diseño de investigación..... | 35 |
| 3.3 Población y Muestra | 35 |
| 3.3.1 Población | 35 |
| 3.3.2 Muestra | 35 |
| 3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos..... | 36 |
| 3.4.1Técnica | 36 |
| 3.4.2 Instrumentos | 36 |
| 3.5. Equipos, materiales y reactivos | 36 |
| 3.5.1 Medios de cultivo | 36 |
| 3.5.2 Materiales de bioseguridad..... | 36 |
| 3.5.3 Materiales de laboratorio | 36 |
| 3.5.4 Instrumentos de laboratorio | 37 |
| 3.5.5 Reactivos | 38 |
| 3.6. Procedimiento experimental | 39 |
| 3.6.1 Obtención de la especie vegetal..... | 39 |
| 3.6.2 Limpieza..... | 39 |
| 3.6.3 Obtención del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L.(col morada)..... | 39 |
| 3.6.4 Análisis fisicoquímico | 40 |
| 3.6.4.1 Prueba de solubilidad | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6.4.2 Marcha fitoquímica..... | 40 |
| 3.6.4.3 Cromatografía en capa fina analítica | 43 |
| 3.6.5 Análisis microbiológico..... | 44 |
| 3.6.5.1 Obtención de concentraciones al 50% y 100%..... | 44 |
| 3.6.5.2 Método Kirby Bauer | 44 |
| 3.7. Técnicas para el procesamiento de datos | 48 |
| CAPÍTULO IV : RESULTADOS | 49 |
| 4.1 Presentación de resultados | 49 |
| 4.1.1 Resultados de prueba de solubilidad | 49 |
| 4.1.2 Resultados de marcha fitoquímica | 50 |
| 4.1.3 Resultados de cromatografía en capa fina analítica | 51 |
| 4.1.4 Resultados del análisis microbiológico | 52 |
| 4.2 Contratación de hipótesis | 54 |
| 4.3 Discusión de resultados | 62 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 67 |
| 5.1 Conclusiones..... | 67 |
| 5.2 Recomendaciones..... | 68 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| ANEXOS | 76 |

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*. La muestra fue recolectada en el distrito de Santa Anita, departamento de Lima, Perú. El método en la investigación utilizado fue de tipo experimental y de nivel transversal. Se determinó los metabolitos mediante la marcha fitoquímica, se hallaron principalmente flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y antocianinas. Se realizó la cromatografía en capa fina del extracto etanólico, confirmando cualitativamente la presencia de flavonoides como Quercetina. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el Método de Kirby Bauer, as concentraciones aplicadas del extracto etanólico fueron de 50% y 100%, en los resultados se obtuvo que, solo la concentración al 100% demostró un promedio de 9.33 mm en halos de inhibición en cepas de *Shigella flexneri*, en la concentración al 50% no se observó halos de inhibición, además, estos resultados fueron comparados con Gentamicina 10µg/mL. En conclusión, el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) en concentración al 100% influye ligeramente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri* y su efecto antibacteriano es menor en comparación con Gentamicina 10µg/mL.

Palabras Clave: *Brassica oleracea* var. capitata L, extracto etanólico, *Shigella flexneri*, efecto antibacteriano, halo de inhibición.

ABSTRACT

The main objective of this investigation was the antibacterial effect of the ethanolic extract of *Brassica oleracea* var. capitata L. (red cabbage) on strains of *Shigella flexneri*, in vitro. The sample was collected in the district of Santa Anita, department of Lima, Perú. The research method used was experimental and transverse. The metabolites were determined by phytochemical analysis, it founded flavonoids, phenolic compounds, tannins and anthocyanins, were showed presence of high amount. Thin layer chromatography of the ethanolic extract was performed; it confirmed qualitatively the presence of flavonoids such as Quercetin. The antibacterial activity was evaluated by Kirby Bauer Method. The applied diverse concentrations of the red cabbage ethanolic extract were 50% and 100%, this study obtained only positive results of the ethanolic extract to 100% because It demonstrated zones of inhibition of 9.33 mm. In conclusion, the ethanolic extract of *Brassica oleracea* var. capitata L. (red cabbage) at 100% concentration has slightly influences in the antibacterial effect on strains of *Shigella flexneri* and its antibacterial effect is lower compared to Gentamicin 10µg / mL.

Key words: *Brassica oleracea* var. capitata L, ethanolic extract, *Shigella flexneri*, antibacterial effect, zone of inhibition.

INTRODUCCIÓN

La segunda principal causa de muerte en niños menores de cinco años en el mundo, son las enfermedades diarreicas, estas originan unos 1700 millones de casos en cada año. En años anteriores, la deshidratación grave y la pérdida de líquidos eran las primordiales causas de muerte por diarrea, actualmente, es posible que otras causas, como las infecciones bacterianas septicémicas, sean consecuentes de una proporción cada vez superior de muertes relacionadas con la diarrea, frecuentemente en países en vías de desarrollo; asimismo, el tratamiento con antibióticos de estas enfermedades ha generado el incremento de patógenos resistentes a estos⁽¹⁾.

En el Perú, las enfermedades diarreicas, continúan siendo causa importante de morbilidad en la niñez en nuestro país, especialmente en la población con menor acceso a servicio de agua potable e inadecuada eliminación de excretas, así como la incorrecta práctica de higiene. En nuestro país Baca et al (2014) “Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* aisladas en un instituto de salud pediátrico de Lima, Perú entre enero y julio 2013”, dando como resultado que *Shigella flexneri* es uno de los serotipos del género *Shigella* causante frecuente de disentería bacilar o enfermedad diarreica, debido a que esta bacteria posee un alto índice de transmisibilidad⁽²⁾⁽³⁾.

La familia botánica *Brassicaceae* (incluye especies como brócoli, col, rabanito, nabo, etc). No solo poseen importancia económica, ecológica y su potencial de uso en nuestra alimentación, sino también se investigan las propiedades terapéuticas frente a diversas patologías. Se destacan, por ejemplo, sus metabolitos secundarios como glucosinolatos y compuestos fenólicos que, según estudios realizados, demuestran efectos antibacterianos, anti cancerígenos, antioxidantes, antiulcerosos, etc⁽⁴⁾.

En el presente trabajo, se investigó el efecto antibacteriano de una de las especies de la familia *Brassicaceae*, específicamente *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada), frente a bacterias patógenas como *Shigella flexneri*, se consideró diversas concentraciones y el potencial terapéutico ante esta bacteria.

El Capítulo I presenta el planteamiento del problema, en donde se identifica la realidad problemática, formulación del problema general y específicos, objetivo general y específicos, asimismo, justificación de la investigación. El Capítulo II desarrolla el marco teórico, detallando los antecedentes nacionales e internacionales, bases teóricas, hipótesis general y específicas, operacionalización de variables e indicadores, incluyéndose en este capítulo la definición de términos básicos de la investigación. El Capítulo III explica la metodología, tipo, nivel y diseño de la investigación, se especifica la población, muestra, técnicas e instrumentos de recolección de datos, en este capítulo se describe el procedimiento experimental realizado y técnicas para el procesamiento de datos. El Capítulo IV presenta, interpreta y analiza los resultados obtenidos de la investigación, contrastación de hipótesis y discusión de resultados. El Capítulo V menciona las conclusiones y recomendaciones formuladas según los resultados obtenidos durante la investigación. Se presentan las referencias bibliográficas correspondientes y anexos al finalizar la investigación.

CAPÍTULO I

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La Organización Mundial de la Salud (2017) “informó sobre los principales patógenos resistentes a los antibióticos en donde se engloba las 12 familias de bacterias de mayor amenaza para la salud humana”. “Se pone de notoriedad básicamente el peligro que evidencian las bacterias gram-negativas resistentes a diversos antibióticos. Estas bacterias poseen la suficiencia innata de descubrir nuevas maneras de resistir a los antibióticos, consiguiendo propagar su material genético y hacer posible que otras bacterias sean fármaco resistentes, destacando entre estas a *Shigella* spp (resistente a las fluoroquinolonas) como bacteria de prioridad 3: Media”⁽⁵⁾.

La shigelosis, o disentería bacilar, “es una patología con síntomas que consiguen evolucionar desde una infección entérica suave hasta síntomas severos como fiebre alta, disentería, perforación intestinal y fallo renal. Es originada por cuatro especies de bacterias: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. Estos microorganismos se propagan por la vía fecal-oral, específicamente de una persona a otra o por medio de agua o alimentos contaminados. Solo se necesita un número muy bajo de estos microorganismos para adquirirla, lo que favorece su difusión de la misma”⁽⁶⁾.

De acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, “las enfermedades diarreicas son causantes principales de mortalidad (aproximadamente 525 000 niños menores de cinco años cada año) y morbilidad de infantes alrededor del mundo, consecuencia directa al consumo de alimentos o agua contaminados”⁽¹⁾.

Las enfermedades diarreicas “están directamente relacionadas con las temperaturas altas, es decir, en el inicio del verano, las diarreas presentan una alta incidencia. Además, las altas temperaturas y la escasez de agua influyen en la aparición y transmisión del patógeno causante, facilita el desarrollo bacteriano y, si la persona practica inadecuados procedimientos de higiene, promueven que el individuo sea expuesto al patógeno”⁽²⁾.

En el Perú, en el año 2015, el Ministerio de Salud, mediante su Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológico en Salud Pública, informó sobre el “incremento de 9,8% de Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) disintéricas en niños menores de 5 años en temporada de altas temperaturas, asimismo, en el 2015, se registraron 10 860 casos de EDA, observándose un incremento en el 2016 a 11 730 casos, en la misma temporada”⁽²⁾.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

¿El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) poseerá efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Qué tipos de metabolitos estarán presentes en el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada)?
2. ¿Cómo influirán las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*?
3. ¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) comparado con Gentamicina 10µg/mL en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) sobre cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar los tipos de metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada).
2. Determinar si las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.
3. Comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) con el efecto antibacteriano de Gentamicina 10µg/mL sobre cepas *Shigella flexneri*, *in vitro*.

1.4 Justificación de la investigación

Esta investigación es de mucha importancia, ya que la proliferación cosmopolita de la bacteria *Shigella flexneri* y su cada vez creciente resistencia a antibióticos, hace que el valor económico del tratamiento sea cada vez más alto, además, se ha incrementado la duración de las hospitalizaciones, y puede causar la muerte de los pacientes, especialmente en niños, por ello, con este estudio se presenta una alternativa natural para el tratamiento.

Esta investigación se realiza basándose en el potencial de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) como efecto antibacteriano sobre el *Shigella flexneri*. Esta especie vegetal posee principios activos capaces de hostilizar a esta bacteria de manera efectiva y segura, pues al aplicar este vegetal como fitoterapia ante esta bacteria, se pueden obtener reacciones adversas mínimas y son de bajo costo por ser antibióticos de origen natural.

En el Perú, la *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) es de común cultivo y consumo, pero son escasos los estudios que validen su uso en tratamientos de diferentes enfermedades. Por eso con este estudio, se contribuirá a beneficiar a la población con Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) causada por *Shigella flexneri*, considerando que, en nuestro país, “la predisposición de los casos de EDA, en los últimos años, manifiesta una lenta tendencia al descenso, particularmente durante la temporada de verano”⁽²⁾.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

2.1.1 Antecedentes nacionales

Choquenaira, R, et al (2013)⁽⁷⁾ En su tesis “Extracción del aceite de las semillas de *Curcubita máxima Dutch* var. Macre y var. Zambo, determinación de los ácidos grasos insaturados libres (ácido oleico, ácido linoleico y ácido α -linolénico) y de su efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*”, realizó la obtención del aceite mediante la extracción Soxhlet empleando Diclorometano, de las semillas de *Cucurbita máxima Dutch* var. Macre y var. Zambo (Zapallo), asimismo, se efectuaron análisis fisicoquímicos y organolépticos del aceite. Los ácidos grasos insaturados libres de la variedades (Zambo y Macre) se hallaron en concentraciones de 0,34 mg/mL y 0,28 g/mL de ácido α - linolénico; 1,08 mg/mL y 1,28 mg/mL de ácido linoleico, correspondientemente de cada una. El ácido oleico se descubrió en concentraciones < a 0,1 mg/mL en ambas variedades. Asimismo, se estudió la actividad antibacteriana de la cucurbitacina, la cual se ejecutó mediante dos métodos dilución en caldo y hoyo-placa, y se consiguió resultados negativos frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*⁽⁷⁾.

Castilla, C, (2016)⁽⁸⁾ En su Tesis “Determinación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de hojas de *Carica pubescens* L (*Caricaceae*) Papaya Arequipeña frente a bacterias patógenas”. Se determinó el efecto antimicrobiano del extracto de hojas secas y pulverizadas de *Carica pubescens* L “Papaya Arequipeña”, extraídos en diferentes solventes (acuoso, etanólico y etéreo) frente a patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella sp.* y *Pseudomona aeruginosa*. Los extractos etanólico y acuoso presentaron actividad contra *Salmonella typhi* tuvieron una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 50 y 80 mg/mL consecutivamente; asimismo, el extracto etanólico mostró efecto bacteriostático contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto de éter de petróleo no manifestó ninguna acción antibacteriana. Finalmente, se ejecutó un bioensayo con *Artemia sp* para establecer la dosis letal media DL50 de los extractos acuoso y etanólico y se obtuvo que estos extractos son levemente tóxicos en el ser humano⁽⁸⁾.

Baca, C, et al (2013)⁽³⁾ En su estudio “Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* aisladas Instituto de Salud Pediátrico de Lima, Perú entre enero y julio 2013”. Evaluó la frecuencia de serogrupos y serotipos y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella sp.*, muestreadas en el Instituto Nacional de Salud del Niño en una población compuesta por 85 aislamientos de *Shigella sp.*. Se identificó los serogrupos: 62,3% al serogrupo B (*Shigella flexneri*), 32,9% al grupo D (*Shigella sonnei*) y 4,8% al grupo C (*Shigella boydii*), ningún aislamiento se relacionó al grupo A (*Shigella dysenteriae*). En los serotipos, se encontraron grupo B (46% 1b, 36% 2a y 18% variante) y en el grupo C (C4 y en el grupo D todos de Fase I). La estimación del perfil de susceptibilidad reveló que el 100% de las cepas fueron no fueron resistentes a: aztreonam, ácido nalidíxico y ciprofloxacina; entre 80% y 90% resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina y tetraciclina. Concluyendo que el serogrupo B (*Shigella flexneri*) fue el frecuente, y no se evidenció presencia de *Shigella dysenteriae*⁽³⁾.

Rondón, A, (2014)⁽⁹⁾ En su tesis “Patrones de sensibilidad de cepas de *Shigella sp* Hospital I Carlos Alcántara Butterfield 2014”. Se determinó el perfil de sensibilidad y resistencia de 72 cepas de *Shigella* aisladas del servicio de Emergencia Pediatría mediante el método de difusión en agar (Kirby Bauer). Se establecieron los patrones de sensibilidad para once antibióticos: aztreonam, ácido nalidixico, ciprofloxacino, ceftazidime, cloranfenicol, amoxicilina/ácido clavulánico, sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina, tetraciclina, furazolidona y gentamicina. Como resultado obtuvo que el 98.6% fueron sensibles a aztreonam, 97.2% a ácido nalidixico 97.2 % a ceftazidima (94.1%) y 95.8% a ciprofloxacino, además de una alta resistencia a tetraciclina, ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol. No se evidenciaron betalactamasas de espectro extendido en los aislamientos de *Shigella*. Concluyó que el 81.4 % de cepas resisten a más de tres antibióticos, incluyéndose un elevado nivel de resistencia a sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina y tetraciclina⁽⁹⁾.

2.1.2 Antecedentes internacionales

Pacheco-Cano, R, et al (2018)⁽¹⁰⁾ En su investigación “Extractos crudos de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) con efecto de actividad inhibitoria contra bacterias y levaduras patógenas de importancia en salud humana y hongos fitopatogenos”, determinó que los extractos proteicos de florete y tallo de brócoli poseen una actividad inhibitoria frente a cepas patógenas Gram positivas y Gram negativas, como *Bacillus cereus* 186, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosum*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus*. Asimismo, reveló actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Candida albicans*. Analizó, mediante actividad en gel contra *Staphylococcus xylosum* del extracto de florete semipurificado mediante exclusión molecular, el cual indicó cierta actividad inhibitoria ante la bacteria antes mencionada⁽¹⁰⁾.

Satya, M, et al (2015)⁽¹¹⁾ En su “Estudio comparativo del análisis fitoquímico y la actividad antimicrobiana *in vitro* de tres hortalizas (*Brassica oleracea* Var. *capitata* (col), *Brassica oleracea* var. *Botrytis* (Coliflor), y *R. sativus* var. *longipinnatus* (rábano blanco) importantes de la familia *Brassicaceae*”, realizó extracciones con diferentes solventes como etanol, metanol y acuoso; determinó la presencia de fitometabolitos y una destacable actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi* y *Staphylococcus epidermis*. Entre estos extractos, los que fueron extraídos con etanol manifestaron una mayor cantidad de metabolitos secundarios y superior actividad antimicrobiana, especialmente ante *Bacillus subtilis*⁽¹¹⁾.

Szabó Sz, et al (2014)⁽¹²⁾ En su estudio “Efecto antibacteriano de brotes contra patógenos que afectan al ser humano, *in vitro*”, determinó los efectos antimicrobianos de 55 diferentes brotes homogeneizados, los cuales fueron investigados con el método difusión de pozos de agar frente a bacterias que afectan la salud del ser humano. Los resultados expusieron que en rábanos, colinabo y brotes de col morada, causó zonas inhibitorias alrededor de los pocillos realizados en las placas de agar inoculadas. En mostaza, calabacín, manzanilla, el fenogreco picante y los brotes de frijol, mostraron un menor efecto antimicrobiano, mientras que los otros veintinueve vegetales no revelaron actividad antibacteriana contra patógenos. Se concluyó que los brotes de rábano posee mayor actividad antibacteriana, entre todos los vegetales estudiados⁽¹²⁾.

Ayshwarya, M, et al (2015)⁽¹³⁾ En su estudio “Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Brassica oleracea* var. capitata rubra”. Investigó el potencial antibacteriano de este vegetal contra bacterias Gram positivas y Gram negativas seleccionadas, con los extractos de etanol, metanol, acetona, cloroformo y agua. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión de disco en agar. La actividad antimicrobiana se analizó en patógenos comunes como Gram negativas (*Proteus vulgaris*, *Serratia marsecens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) y gram positivas (*Micrococcus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*). Se concluyó que los extractos metanólicos manifestaron un mayor efecto sobre el crecimiento de todos los microorganismos en comparación con los demás extractos⁽¹³⁾.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Brassica oleracea* var. capitata L (Col Morada)

2.2.1.1 Descripción Botánica

Sistema radicular

Posee ramificaciones radicales muy delgadas en abundancia y gran cantidad de pelos absorbentes y descrita como moderadamente superficial, alcanza una profundidad entre 45 a 60 cm, el 90% están concentradas en los primeros 20 a 30 cm del suelo⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Tallo

En el inicio del ciclo vegetativo (desde la germinación hasta la aparición de la cabeza), comúnmente, el tallo es no-ramificado, corto (hasta el segundo ciclo, en donde se alarga antes de formar inflorescencia), erecto y grueso. Al madurar, este vegetal puede conseguir una altura de 40 a 60 cm⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Sobre su tallo, entre las axilas de las hojas están ubicadas las yemas laterales, que en las primeras fases del ciclo vegetativo se hallan en etapa de reposo, y es, únicamente, la yema apical la activa⁽¹⁵⁾.

Hojas

Pueden variar de sésiles hasta de pedúnculo corto, grandes, de limbo redondeado o elipsoidal, con una coloración que incluye desde verde claro hasta intensamente violáceo, sin pelos y cubiertas de una capa cerosa que da resistencia a la sequía⁽¹⁵⁾.

Formación de cabeza o pella

La roseta que generan las hojas poseen un diámetro que cambia según la variedad (entre 50 cm a 100 cm). El número de hojas que tienen las rosetas es entre 10-15 en las precoces, 20-25 en las medias y 25 – 30 en las tardías. Al final de la fase en la formación de la roseta de hojas, genera el inicio al nacimiento de la cabeza de la col⁽¹⁵⁾.

Esta cabeza es una inmensa yema compuesta y está conformada por un tallo interior, hojas muy arrugadas, cerradas, yema apical y yemas laterales ubicadas en el tallo sobre las axilas de las hojas. Aparecen hojas nuevas, posteriormente de la formación las rosetas, estas no se abren, sino que crecen dentro de la col⁽¹⁵⁾.

La col aumenta su tamaño y se hace compacta, debido a la actividad de la yema apical y las particularidades del desarrollo de las diversas partes, específicamente de los nervios y tejidos parenquimatosos⁽¹⁵⁾.

Las cabezas pueden ser de forma redonda, puntiaguda, bulbo o plana, de superficie crespa o lisa, y la coloración violeta debido a la presencia de un pigmento llamado antocianina⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.



Figura N° 1: Formas de las cabezas a pella de *Brassica oleracea*
var. capitata L.

Fuente: Zamora E, Universidad de Sonora, Departamento de agricultura y ganadería, "El Cultivo De Repollo", México; Febrero – 2016⁽¹⁶⁾.

Flores

En el segundo ciclo vegetativo (fase continua al crecimiento de la cabeza de la col), el tallo se extiende y se ramifica, se desarrolla inflorescencia de tipo racimosa, incluyéndose flores en racimos de 12.5 cm de largo, de coloración que varía entre amarilla o blancuzco, con cáliz estrecho, y pétalos y cuatro sépalos opuestos, los que forman una cruz⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Fruto y semilla

Su fruto, similar al forma de una vaina, es una silicua dehiscente (8cm de longitud y 3 mm de diámetro). En su interior, posee alrededor de 10 a 30 semillas por fruto⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Las semillas son diminutas (1 ó 2 mm de diámetro), con superficie levemente irregular, redondas y con una coloración color marrón oscura⁽¹⁵⁾.



Figura N° 2: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

Fuente: Sargent F, "Plants And Their Uses - An Introduction To Botany", New York ;1913 – 69 p⁽¹⁷⁾.

2.2.1.2 Taxonomía

División: MAGNOLIPHYTA

Clase: MAGNOLIOPSIDA

Sub-Clase: DILLENIIDAE

Orden: CAPPARALES

Familia: BRASSICACEAE

Género: *Brassica*

Especie: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

Nombre Vulgar: Col Morada

ANEXO N° 2

2.2.1.3 Usos Medicinales de *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

Dentro de los usos medicinales, se encuentran el antiinflamatorio, se coloca pasta de col cruda dentro de otra hoja de col y se envuelve alrededor del área afectada para reducir la incomodidad, es utilizado para aliviar el dolor de mamas durante la lactancia; además, es usado como terapia adyuvante en padecimientos en las vías respiratorias como el papilomatosis⁽¹⁸⁾.

Muchas investigaciones han resaltado el importante potencial de los vegetales pertenecientes al género *Brassica*, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacterianas; la col tiene un uso relacionado con el tratamiento de síntomas asociados con patologías gastrointestinales (gastritis, úlceras pépticas y duodenales, síndrome del intestino irritable); asimismo, en heridas (cortadas menores) y mastitis⁽¹⁹⁾.

2.2.1.4 Composición Nutricional

Según la Base de Datos Nacional de Nutrientes del Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la col morada está compuesta por numerosos nutrientes como se observa en la siguiente tabla:

Tabla N°1: Contenido de nutrientes en 100 gramos del vegetal fresco

| Nutriente | valor |
|---|----------|
| Agua | 90.39 % |
| Energía | 31 Kcal |
| Proteína | 1.43 g |
| Grasas totales | 0.16 g |
| Carbohidratos | 7.37 g |
| Fibra | 2.1 g |
| Azúcares totales | 3.83 g |
| Ácidos grasos, saturados totales | 0.021 g |
| Ácidos grasos, monoinsaturados totales | 0.012 g |
| Ácidos grasos, poliinsaturados totales | 0.08 g |
| Calcio | 45 mg |
| Fosforo | 30 mg |
| Fierro | 0.8 mg |
| Magnesio | 16 mg |
| Sodio | 27 mg |
| Potasio | 243 mg |
| Vitamina A | 1,116 IU |
| Vitamina B1 | 0.064 mg |
| Vitamina B2 | 0.069 mg |
| Vitamina B3 | 0.418 mg |
| Vitamina C | 57.0 mg |

Fuente: Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Abril- 2018⁽²⁰⁾.

2.2.1.5 Composición Química

La familia *Brassicaceae* produce específicamente tres grupos de metabolitos secundarios importantes: fenoles, terpenoides y compuestos orgánicos que incluyen nitrógeno o azufre (cianogénicos, glucosinolatos o alcaloides); además, se destaca en su composición química a las antocianinas (cianidina)⁽⁴⁾⁽²¹⁾.

Los glucosinolatos son tioglucósidos, característicos en los vegetales de orden Capparales, específicamente la familia *Brassicaceae*. El porcentaje de glucosinolatos varía en cada especie e interviene de forma directa el tipo de tejido del vegetal⁽²²⁾⁽²³⁾.

Los glucosinolatos comparten la organización del núcleo que comprende residuos β -D-glucopiranosas enlazadas mediante un átomo de azufre (S) a un éster de sulfato de -N-hidroxiimino y se diferencian entre sí por un grupo de variables R provenientes de diversos aminoácidos (origen alifático derivados de metionina, indol o indólico de fuente de triptófano, y aromáticos establecidos a partir de fenilalanina). Estos, se agrupan como S-glucósidos (constituidos por enlaces de un azúcar reductor y de un azufre que no posee estructura de hidrato de carbono y es reconocida como aglucona, asimismo los glucosinolatos son solubles en agua, debido a su molécula de glucosa tiene propiedades hidrofílicas); por sus características no son volátiles⁽²³⁾⁽²⁴⁾.

Los glucosinolatos se hidrolizan en el momento que el tejido del vegetal se fragmenta como consecuencia de un daño mecánico, seguidamente la enzima tioglucosidasa o mirosinasa entra en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa, de bisulfato y de la propia aglucona; a continuación, esta última confronta una modificación intramolecular que produce isotiocianatos, nitrilos, metilisotiocianatos, metilnitrilos y tiocianatos, cada uno de bajo peso molecular. Los glucosinolatos íntegros poseen acción biológica limitada, pero incrementan su actividad mediante su hidrolización a isotiocianatos, y es el isotiocianato sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) uno de los más estudiados⁽²⁵⁾ (Figura N° 3).

Es importante destacar que, el Sulforafano [1-isotiocianato- (4R) - (metilsulfinil) butano] es un compuesto natural considerablemente investigado desde los 80's dado que posee cualidades quimioterapéuticas (antiproliferativo y anti-angiogénicas). Actualmente, las investigaciones se han focalizado en su efecto contra patologías significativas en cerebro, riñón, hígado, corazón y músculo, incluyéndose en la reducción de niveles de glucosa⁽²⁶⁾.

La actividad antimicrobiana de los isocianatos es investigada principalmente contra bacterias con fenotipos de resistencia a numerosos fármacos⁽²²⁾⁽²⁷⁾. Esto se puede observar en la tabla N° 2 y tabla N° 3.

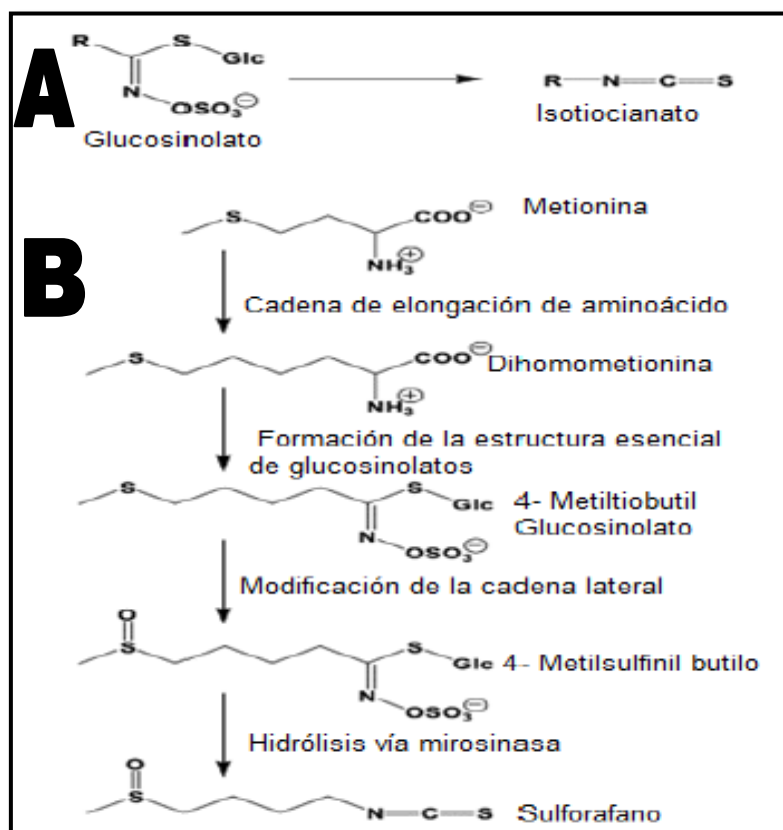


Figura N° 3: Estructuras glucosinoladas, biosíntesis e hidrólisis.

(A) Estructuras básicas de glucosinolatos e isotiocianatos. **(B)** Esquema de la biosíntesis de glucosinolatos e hidrólisis que muestra el camino dando lugar al isotiocianato, sulforafano, un potente agente anticancerígeno.

Fuente: Falk K, et al. **Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*; Apr 2004⁽²⁵⁾.**

Tabla N°2: Ejemplos de Actividad Antibacteriana del Sulforafano y mecanismo de acción.

| Isocianato | Fuente del Isocianato | Bacteria sensible | Mecanismo de Acción |
|-----------------|--------------------------------|--|--|
| Sulforafano SFN | Extracto de semilla de brócoli | <i>H.pylori</i> | N.A |
| Sulforafano SFN | sintético | <i>P. aeruginosa</i> , EHEC <i>E.coli</i> . <i>S aureus</i> | SFN inhibe la detección del quórum bacteriano, afecta la producción de piocianina y ejerce una actividad anti-biopelícula contra <i>P. aeruginosa</i> . SFN inhibe la producción de <i>E. coli</i> Shiga toxina EHEC . |

Fuente: Romeo L, et al. Isothiocyanates: An Overview of Their Antimicrobial Activity against Human Infections; Mar 2018⁽²⁷⁾.

Tabla N° 3: Actividad antimicrobiana de *Brassica oleracea* var capitata L(col morada) contra patógenos bacterianos en mm .

| Patógenos | Extractos | | | | | | | | | | Estándar (5 µg) |
|-------------------------------|-----------|----|---------|----|---------|----|------------|----|------|----|-----------------|
| | Etanol | | Metanol | | Acetona | | Cloroformo | | Agua | | |
| | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 8 | 2 | 7 | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 | 6 | 4 | 4 |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 4 | 8 | 5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 5 | 3 | 3 |
| <i>Serratia marsecens</i> | 3 | 2 | 10 | 9 | 2 | 1 | - | - | 5 | 3 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 4 | 2 | 7 | 5 | 6 | 3 | 4 | - | 6 | 5 | 3 |

Concentración: T1-200µg, T2-100µg estándar : Ampicilina

Fuente: Ayshwarya M, et al. Antimicrobial activity of the plant extracts of *Brassica oleracea* var. capitata rubra; Nov 2015⁽¹³⁾.

Estudios han comprobado la existencia de compuestos fenólicos en diversos cultivos de *B. oleracea*. El conjunto más amplio y variado de polifenoles, específicamente en las especies de *Brassica*, son los flavonoides (flavonoles y antocianinas) y los ácidos hidroxicinámicos, los cuales se dividen de modo diferente según el cultivo y la parte del vegetal evaluado. Además, posee actividad antioxidantes y antimicrobianas; asimismo, se ha estudiado ampliamente su propiedad para disminuir el riesgo de patologías cardiovasculares⁽²²⁾⁽²⁸⁾.

En la especie *B. oleracea*, se descubrió que en la *var. capitata*, posee más de veinte compuestos primordialmente kaempferol, Quercetina y composiciones de diversos ácidos hidroxicinámico⁽²⁸⁾.

Las antocianinas en el género *Brassica* muestran estructuras anormalmente complejas con uno o más ácidos cinámicos. Las antocianinas reconocidas en *Brassica oleracea var. capitata* (col morada) son cianidina 3-O- (sinapoil) (feruloil) diglucósido-5-O-glucósido y cianidina 3-O- (sinapoil) (sinapoil) diglucósido 5-O-glucósido⁽²⁸⁾.

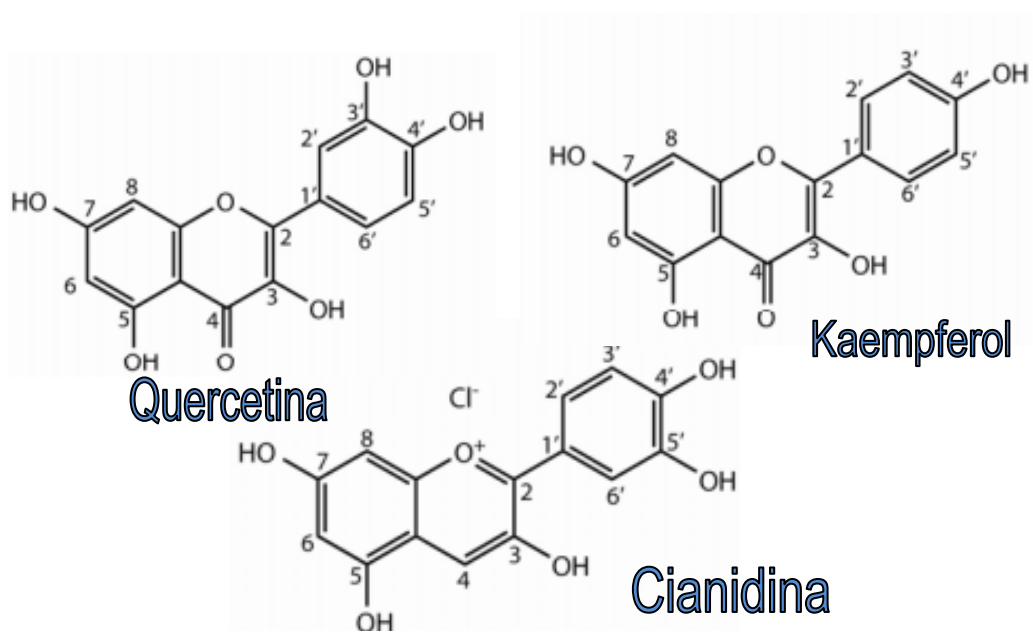


Figura N° 4: Agliconas flavonoides encontrados en *Brassica oleracea var. capitata*.

Fuente: Cartea M, et al. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables; Dic 2010⁽²⁸⁾.

Estudios epidemiológicos han hallado una unión positiva entre la ingestión de Kaempferol y un menor riesgo de desarrollar afecciones cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Numerosas investigaciones, *in vitro* y en animales, confirman el papel de Kaempferol en la prevención y/o como tratamiento terapéuticos de estos y demás patologías como neurodegenerativas, infecciosas, diabetes, osteoporosis, ansiedad, alergias e inflamación; no obstante, numerosos de estos estudios se han ejecutado a dosis elevadas a las recomendadas en humanos y, por ende, se dificulta la predicción a partir de los resultados obtenidos. Del mismo modo, la mayoría de las investigaciones *in vitro* se realizaron con concentraciones considerables más allá de las alcanzadas en plasma y tejidos luego de la administración oral de Kaempferol, es decir, que cierta actividad biológica y algunos efectos tóxicos inducidos por Kaempferol *in vitro*, pueden ser irrelevantes *in vivo* cuando este flavonoide se administre por vía oral⁽²⁹⁾.

Las características útiles de la Quercetina, según investigaciones, se refieren principalmente a su estructura química y se condicionan según la concentración en que se administren; algunas propiedades asociadas a su consumo son la reducida incidencia de enfermedades cardiovasculares, antioxidantes, acción antiviral, etc⁽³⁰⁾.

2.2.1.6 Técnicas recomendadas de extracción

La extracción es el método de separación de sustancias activas (metabolitos secundarios) de una mezcla por medio de una acción mecánica o química, como destilación o presión. Esta separación se ejecuta con la asistencia de la disolución de una o más de los compuestos en un disolvente en el que sean muy solubles y se dividen en función de sus características físicas y químicas. Generalmente, la maceración se efectúa a una temperatura de 15-20 °C durante 3-5 días o hasta que se disuelva la materia soluble⁽³¹⁾.

Brassica oleraceae está compuesta por diversos metabolitos como antocianinas, polifenoles, glucosinolatos, vitaminas, etc. Por lo tanto, la maceración es el procedimiento más eficiente para extraer todos los constituyentes activos que son termolábiles en su condición completa sin desnaturalización⁽³¹⁾.

Entre los solventes mayormente utilizados, son los alcoholes alifáticos de hasta tres carbonos o combinación de estos con agua. Estos solventes pueden extraer la mayoría de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, glicosidos cardiotónicos y los terpenos. Asimismo, los glucosinolatos son solubles en agua por la molécula de glucosa que comparte sus características hidrofílicas, en contraste con los isotiocianatos que presentan características hidrofóbicas⁽²⁴⁾⁽³²⁾.

2.2.2 Enfermedades Diarreicas

2.2.2.1 Definición

Es definida como tres o más deposiciones líquidas o semilíquidas en 24 horas o al menos con alguna existencia de elementos irregulares (moco, sangre o pus), pudiéndose acompañar de calentura, escalofrío, náusea, vómito o cólicos abdominales, durante dos semanas como máximo ⁽³³⁾.

A nivel fisiopatológico, la diarrea se define como una pérdida enorme de líquidos y electrolitos en las deposiciones, a consecuencia de un abastecimiento intestinal irregular de los solutos, en especial del sodio, los cloruros y la glucosa⁽³³⁾.

2.2.2.2 Clasificación

Según tiempo de evolución⁽³³⁾:

- Enfermedad diarreica aguda: denominada a la diarrea de menos de catorce días de evolución.
- Enfermedad diarreica persistente: es la diarrea de catorce días o más de evolución. Inicialmente, se presenta con un episodio agudo de diarrea líquida o disentería, en ciertas ocasiones con disminución de peso y generalmente no se puede determinar el agente etiológico. Se puede observar un daño considerable en la vellosidad, la mucosa intestinal puede estar aplanada y la absorción de nutrientes presenta inconvenientes.
- Enfermedad diarreica crónica: es la diarrea persistente, de evolución mayor a un mes. Es comúnmente observada en personas con sensibilidad al gluten, fibrosis quística o trastornos metabólicos hereditarios.

Según Etiología⁽³³⁾:

- Infecciosa: Este tipo incluye virus, bacterias y protozoos. El agente comúnmente aislado es el Rotavirus (específicamente grupo A serotipos G1 y G3). La bacterias que se encuentran con cierta constancia son: *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y enterotoxigénica (ECET), *Campylobacter jejuni*, *Shigella sp* y *Salmonella sp*. Las formas de transmisión para enteropatógenos fecales son: vía fecal-oral, a través de vómitos y secreciones nasofaríngeas por vía aérea.
- No Infecciosa: Se encuentran alteración de la osmolaridad o modificaciones en la microbiota intestinal del paciente, originadas por dieta y/o medicaciones. Algunos antibióticos producen diarrea por un proceso irritativo de la mucosa digestiva, debido a que una pobre absorción, estos se mantienen en la luz intestinal, por ejemplo: eritromicina (actúa sobre el colon) y algunos macrólidos en menor grado, amoxicilina/ácido clavulánico (actúa sobre el tracto digestivo proximal y distal) y ceftriaxona (produce alteración en la microbiota intestinal).

Según síndromes clínicos⁽³³⁾:

- Diarreas secretoras: en casos agudos están generadas por toxiinfecciones alimentarias o por bacterias creadoras de toxinas. Se limita el deterioro al intestino delgado, las evacuaciones son líquidas, por ende, una excesiva pérdida de agua, electrolitos y es persistente.
- Diarreas invasivas o inflamatorias: es originada por invasión y pérdida de células del epitelio intestinal (nivel del colon), generando inflamación y ulceración de la mucosa. La diarrea suele está conformada por moco y sangre, fiebre y variación del estado general. En el microscopio se visualizan las deposiciones con leucocitos y hematíes.

2.2.3 Shigelosis

2.2.3.1 Definición

La shigelosis o disentería bacilar es definida como una infección bacteriana aguda focalizada en el intestino grueso y la porción distal del intestino delgado. Se caracteriza por diarrea que incluye fiebre, náusea y ciertas veces vómitos, cólicos y tenesmo. Comúnmente, las deposiciones tienen sangre y moco (disentería), debido a la confluencia de microabscesos generados por microorganismos invasores, aunque se presenta inicialmente como diarrea acuosa, la infección suele tener una duración promedio de cuatro a siete días. La disentería bacilar se transmite generalmente por vía fecal-oral directa o indirecta de un paciente o de un portador⁽³⁴⁾.

Es generada por bacterias del género *Shigella* y de familia Enterobacteriaceae (Figura N°5). Es un bacilo gramnegativo no encapsulado, anaerobio facultativo, inmóvil, oxidasa negativo y fermentador de glucosa. Se distinguen cuatro especies: *Shigella dysenteriae* (serogrupo A), *Shigella flexneri* (serogrupo B), *Shigella boydii* (serogrupo C) y *Shigella sonnei* (serogrupo D)⁽³⁴⁾.



Figura N° 5: Bacteria *Shigella* spp.

Fuente: Rettner R. Drug-Resistant Stomach Bug Increasing in US; New York- Abr 2015⁽³⁵⁾.

2.2.3.2 Patogénesis

Es determinada por la gran virulencia de un plásmido de 214 kb(kilobase) que posee aproximadamente 100 genes, de estos, 25 codifican un mecanismo de secreción tipo III que se implanta en la célula, específicamente en la membrana del hospedador, permiten que los efectores recorran del citoplasma bacteriano al citoplasma celular. Por ende, las bacterias tiene la capacidad de invadir las células del epitelio intestinal puesto que inducen su propia captación luego de atravesar por primera vez la pared epitelial cruzando las células M (tras locación de células epiteliales específicas en el folículo, correspondidas con los ganglios linfáticos del epitelio que envuelve la mucosa). Las bacterias generan la apoptosis de los macrófagos subepiteliales residentes, ubicados en el interior del citoplasma de las células del epitelio intestinal. Los efectores de *Shigella* originan modificaciones citoesqueléticas precisas para guiar la captación de la bacteria en los interiores de las células epiteliales⁽³⁶⁾.

Posteriormente, las vacuolas que poseen a *Shigella* se destruyen rápidamente y liberan el microorganismo en el interior del citosol. Después, la *Shigella* intracelular utiliza los elementos del citoesqueleto para trasladarse dentro de la célula infectada; en el momento que la bacteria en movimiento y la membrana de la célula hospedadora se unen, se generan protrusiones celulares que son incorporadas en las células vecinas. Estos fenómenos permiten la proliferación de una bacteria a otra. Las citocinas liberadas por el incremento de células epiteliales intestinales infectadas captan un aumento de células inmunitarias (específicamente leucocitos polimorfonucleares [PMN]) al área de la infección, seguidamente, se desequilibra la barrera epitelial, se extiende la inflamación, y ocasiona la colitis aguda característica de la shigelosis. Investigaciones actuales señalan que ciertos efectores inyectados del mecanismo de secreción tipo III pueden dirigir la extensión de la inflamación, lo que promueve y facilita la persistencia de la bacteria⁽³⁶⁾.

La toxina de Shiga, producida por *S. dysenteriae* tipo 1, incrementa la proliferación de la infección. Esta toxina corresponde a un tipo de toxinas proteínicas A1-B5, cuya subunidad B se acopla al receptor globotriaosilceramida en la zona superficial de la célula efectora, y su subunidad catalítica A es interiorizada por endocitosis inducida por el receptor, la cual se interrelaciona con la maquinaria subcelular para inhabilitar la síntesis proteínica al mostrar acción de N-glucosidasa de RNA(ácido ribonucleico) en el RNA 28S ribosómico. Este proceso finaliza con la inhibición de la asociación de amino-acilo-tRNA a la subunidad ribosómica 60S y, asimismo, se genera una supresión general en la célula de la biosíntesis de proteína. Las toxinas de Shiga son trasladadas del intestino a la circulación. Luego de la unión de las toxinas y las células efectoras en el riñón, las modificaciones fisiopatológicas consiguen originar el síndrome hemolítico-urémico⁽³⁶⁾. (Figura N°6)

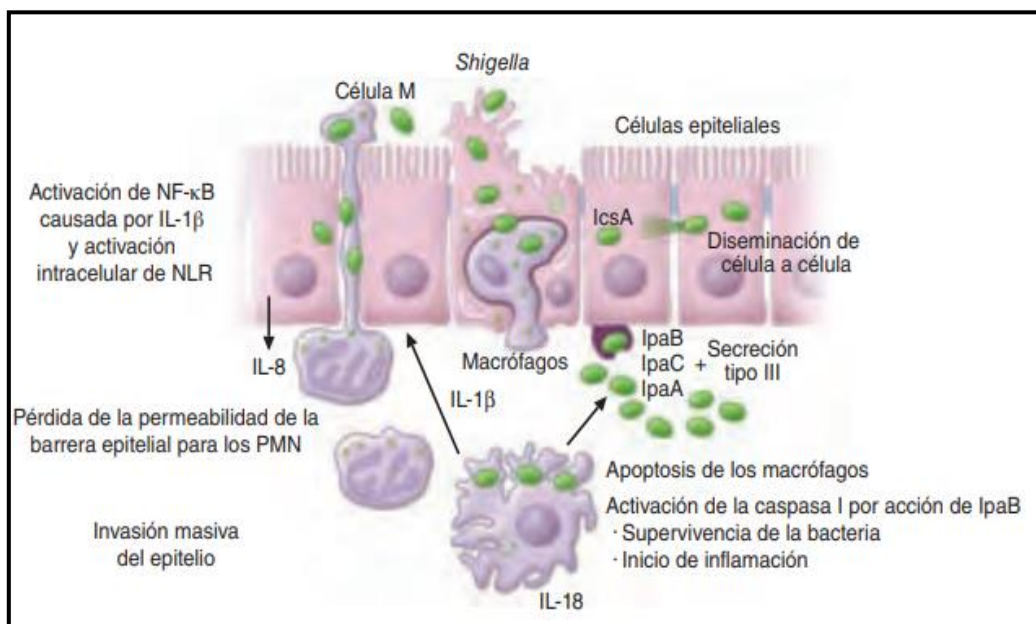


Figura N°6: Estrategia de invasión de *Shigella flexneri*

IL(interleucina) NF-κB(factor nuclear κB) NLR(receptor similar a NOD) PMN(leucocitos polimorfonucleares) **Fuente: Kasper D, et al. Harrison Principios de Medicina Interna; México - 2015⁽³⁶⁾.**

2.2.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico ideal para shigelosis o disentería bacilar es el aislamiento e identificación de la bacteria en las deposiciones. Si las muestras (deposiciones) poseen una composición más alta de material sanguinolento o mucopurulento, la probabilidad de aislamiento de la bacteria es mayor⁽³⁶⁾.

Las muestras en fresco con hisopo muestran un porcentaje de éxito alto en el aislamiento durante la fase aguda de la infección. Los cultivos obtenidos son efectivos en <5% de los casos y conviene realizarse solamente cuando el paciente manifiesta septicemia grave. Además, el uso de diversos medios de cultivo amplía la probabilidad de conseguir el aislamiento adecuado: un medio no selectivo (agar de lactosa con púrpura de bromocresol), un medio de baja selectividad (agar de MacConkey o con eosina-azul de metileno), así como un medio de alta selectividad (agar de Hektoen, *Salmonella-Shigella* o agar de xilosalisina-desoxicolato)⁽³⁶⁾.

Posterior a la incubación en estos medios de cultivo entre 12 a 18 h a 37°C, surge el desarrollo de *Shigella* en forma de colonias (no fermentadoras de lactosa), midiendo de 0.5 a 1mm de diámetro y que posee un área superficial convexa, translúcida y lisa. Las colonias conseguidas en medios no selectivos o de baja selectividad pueden cultivarse una vez más en medios de elevada selectividad previamente a la identificación específica, o pueden someterse a la caracterización directa, los cuales son sistemas comerciales estándar con cuatro características importantes: positividad para glucosa (por lo general, sin producción de gas), negatividad para lactosa, negatividad para H₂S y falta de motilidad. Asimismo, las cuatro especies de *Shigella* (A-D) son diferenciadas por otras características y métodos serológicos⁽³⁶⁾.

2.2.3.4 Tratamiento

La shigelosis, por ser una infección enteroinvasora, obliga el uso antibióticos. No obstante, desde mediados de la década de 1960, se presenta una predominante resistencia en el tratamiento a múltiples fármacos. Actualmente, las tasas elevadas de resistencia a los clásicos antibióticos de primera elección, como amoxicilina o ciprofloxacina, ha hecho que se cambie rápidamente al uso de quinolonas como ceftriaxona, azitromicina, pivmecilinam y algunas quinolonas de quinta generación⁽³⁶⁾. Tabla N°4

La infección por *Shigella* raramente genera deshidratación importante. La rehidratación debe realizarse por vía oral, con excepción de un paciente en estado coma o en shock. Una mejor efectividad de la solución de rehidratación oral de baja osmolaridad (especialmente en niños con EDA no relacionada con cólera) ha hecho que la Organización Mundial de la Salud y la UNICEF (Fondo de las Naciones Unidas para la infancia) recomienden una solución estándar con 245 mOsm/L (sodio, 75 mmol/L; cloruro, 65 mmol/L; glucosa [anhidra] 75 mmol/L; potasio, 20 mmol/L; citrato, 10 mmol/L)⁽³⁶⁾.

Tabla N° 4: Antibióticos recomendados para el tratamiento de la shigelosis

| Antimicrobiano | Esquema de tratamiento | | Limitaciones |
|-------------------------|--|------------|--|
| | En niños | En adultos | |
| Primera elección | | | |
| Ciprofloxacina | 15mg/kg C/12h x 3 días, Vía oral | 500 mg | ----- |
| Segunda elección | | | |
| Ceftriaxona | 50-100mg/kg una vez al día Intramuscular x 2-5 días | ----- | Eficacia no validada Se administra por inyección |
| Azitromicina | 6-20mg/kg una vez al día x 1-5 días, Vía oral | 1-1.5g | Surge resistencia con rapidez |

Fuente: Kasper D, et al. Harrison Principios de Medicina Interna; México - 2015⁽³⁶⁾.

2.3 Formulación de Hipótesis

2.3.1 Hipótesis general

El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) tiene presencia de diversos tipos de metabolitos.
2. Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.
3. El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) tiene mayor efecto antibacteriano comparado con Gentamicina 10µg/mL sobre cepas *Shigella flexneri*, *in vitro*.

2.4 Operacionalización de variables e indicadores

Tabla N°5: Operacionalización de variables e Indicadores

| | VARIABLES | INDICADOR |
|----------------------|--|---|
| Independiente | Extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. (col morada) | Metabolitos secundarios Concentración del extracto al 50 % Concentración del extracto al 100% |
| Dependiente | Efecto antibacteriano en <i>Shigella flexneri</i> | Medida de los halos de inhibición (inhibición de crecimiento) unidad de medida mm de diámetro |
| Control | Gentamicina (Concentración 10µg/mL) | Medida de los halos de inhibición (inhibición de crecimiento) unidad de medida mm de diámetro |

Fuente: Elaboración propia, 2018

2.5 Definición de términos básicos

1. Brassicaceae Es un grupo de angiospermas. Se encuentran bien definido por la estructura característica de su flor, a cual se distingue por presentar cuatro pétalos dispuestos de manera diagonalmente opuesta, dentro de esta se encuentran brócoli, coliflor, repollo ,rábanos, etc⁽¹⁹⁾.

2. Extracto etanólico Se define como una solución con olor particular, obtenida a partir de materia vegetal deshidratada, mediante maceración o percolación en contacto con alcohol etílico, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico⁽³⁷⁾.

3. Metabolitos primarios Son sustancias requeridas en el crecimiento, desarrollo y reproducción. Se encuentran en grandes cantidades en el vegetal⁽³⁸⁾.

4. Metabolitos secundarios Son las sustancias que tienen funciones ecológicas importantes como defensa o atracción de polinizadores, también pueden ser aprovechados por los humanos para su propio beneficio, pero se encuentran en pequeñas cantidades en el vegetal⁽³⁸⁾.

5. Antibacteriano Se refiere a cualquier agente que interfiera con el crecimiento y la actividad de bacterias. Se clasifica en Bactericida (agente que elimina las bacterias) y Bacteriostático (agente que produce la supresión del desarrollo de las bacterias solamente mientras el agente esté en contacto con ellas)⁽³⁹⁾.

6. Cepa Término que hace referencia a las características individuales de los microorganismos contenidos en una sola colonia de un cultivo bacteriano⁽³⁹⁾.

7. Shigella flexneri Es el serotipo B la bacteria de género Shigella (gramnegativa que no forma esporas, no es móvil, no produce gases de azúcares, no genera descarboxilato de lisina, ni hidroliza la arginina)⁽³⁶⁾.

9. Halos de inhibición bacteriana Indica sensibilidad, mediante la inhibición del crecimiento de la bacteria de prueba al agente expuesto⁽⁴⁰⁾.

10. *in vitro* Se refiere a un estudio o experimento médico que se realiza en el laboratorio dentro de los límites de un tubo de ensayo o plato de laboratorio⁽⁴¹⁾.

11. UFC Término que se emplea para estimar el número de bacterias mediante el recuento de colonias sobre un medio sólido. Una bacteria se considera igual a una colonia, pero el empleo del término UFC tienen cuenta la posibilidad de que algunas colonias se hayan generado a partir de dos o más microorganismos adyacentes o muy cercanos entre sí durante la siembra⁽⁴²⁾.

12. Inoculo Material microbiano utilizado para sembrar o inocular un recipiente de cultivo⁽⁴³⁾.

13. Cultivo Es el crecimiento de poblaciones de microbianas en ambientes artificiales bajo condiciones de laboratorio⁽⁴³⁾.

14. Método de Kirby-Bauer El método que se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia⁽⁴⁴⁾.

15. Gentamicina Es un antibiótico aminoglucósido importante para tratar muchas infecciones graves por bacilos gramnegativos. Es el más usado y de primera elección por su bajo costo y efectiva actividad contra casi todos los aerobios gramnegativos⁽⁴⁵⁾.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y nivel de investigación

La investigación fue de tipo experimental se basó en la manipulación de las variables. Además, fue de enfoque cuantitativo, ya que se demostraron los resultados a través de mediciones numéricas para probar las hipótesis planteadas en este estudio.

El nivel del estudio fue transversal, la investigación se desarrollará en un determinado periodo de tiempo, por ende la muestra vegetal fue recolectada en una fecha determinada y el análisis microbiológico para medir el efecto antibacteriano fue realizado en 24 horas siendo el único ensayo realizado.

3.2. Diseño de investigación

El diseño de la investigación fue cuasiexperimental.

3.3 Población y Muestra

3.3.1 Población:

- 10 pellas de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) x m²
- Cepas de *Shigella flexneri*

3.3.2 Muestra:

- 1,5 Kg de *Brassica oleracea* var. capitata L. (Col morada)
- placas petri con *Shigella flexneri* divididas en dos grupos según concentración: 50% y 100%, cada grupo con su respectivo control positivo y negativo.

Controles/Estándar

- Gentamicina Estándar
- Alcohol 96°
- Quercetina Estándar

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Técnica

- Prueba de sensibilidad método Kirby-Bauer (método de difusión en agar)

3.4.2 Instrumentos

- Ficha de recolección de datos. Anexo N°10
- Instrumento de medición de precisión vernier

3.5. Equipos, materiales y reactivos

3.5.1 Medios de cultivo

- Agar Mueller Hinton
- Suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%)

3.5.2 Materiales de Bioseguridad

- Guantes Quirúrgicos
- Gafa protectora
- Mascarilla
- Gorros desechables
- Mandil
- Botas descartables(protector de zapatos)

3.5.3 Materiales de laboratorio

- Canastillas de plástico
- Papel Aluminio
- Mortero
- Probeta de 500ml
- Embudos
- Frasco ámbar de vidrio de 1000ml de boca ancha
- Viales de vidrio de 10ml
- Espátula
- Placas Petri
- Bagueta de vidrio
- Placa de porcelana con cavidades

- Frascos goteros
- Pipetas volumétricas 1ml, 2ml, 5ml
- Tubos de ensayo de vidrio
- Gradilla de plástico
- Beakers 50ml , 100ml y 500ml
- Pinzas de madera
- Placas de Silica gel
- Capilares
- Matraz de Erlenmeyer 500 ml y 1000 ml
- Tiras de papel de pH
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Asa de siembra
- Hisopos largos
- Espátula de Drigalsky
- Sacabocados
- Micropipeta (2-20 μ L),(10-100 μ L)

3.5.4 Instrumentos de Laboratorio

- Balanza analítica Sartorius
- Bomba al vacío
- Estufa
- Cocinilla eléctrica
- Mechero
- Lámpara de luz ultravioleta
- Cuba de vidrio
- Autoclave
- Incubadora
- Vernier
- Regla milimetrada de metal

3.5.5 Reactivos

- Balanza analítica Sartorius
- Alcohol 96°
- Cloroformo
- Etanol
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Metanol
- Cintas pequeñas de Magnesio
- Ácido Clorhídrico concentrado 37% (HCl)
- Cloruro de Hierro III al 5%
- Reactivo Dragendorff
- Reactivo Mayer
- Reactivo Wagner
- Reactivo de Kedde
- Anhidro acético
- Ácido Sulfúrico
- Fehling A
- Fehling B
- Ninhidrina
- N-butanol
- Ácido acético
- Agua destilada

3.6. Procedimiento experimental

3.6.1 Obtención de la especie vegetal

Las muestras de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) se obtuvieron en la región de Lima, el distrito de Santa Anita (Gran Mercado Mayorista de Santa Anita). Se incluyeron todas las partes del vegetal y fueron principalmente las hojas internas (cabeza) de la col morada las que se emplearon en la investigación. Se realizó la determinación taxonómica de la especie en el Museo de Historia Natural perteneciente a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima. Anexo N°4.

3.6.2 Limpieza

Las hojas internas (cabeza) de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) fueron seleccionadas y sometidas a un proceso de limpieza con agua destilada para eliminar cualquier suciedad o materiales extraños.

3.6.3 Obtención del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L.(col morada)

A la muestra de *Brassica oleracea* var. capitata L.(col morada) se le retiró su núcleo central y se separaron las hojas.

Luego la muestra fresca fue triturada con el mortero y se pesó en la balanza analítica. Fueron almacenadas en un frasco ámbar de boca ancha de 1000 mL, se agregó alcohol 96°, en relación muestra de col morada : disolvente de extracción 1kg :1L(p/V).

Se realizó la maceración por siete días con agitación tres veces por día, temperatura ambiente y en oscuridad. Después del tiempo estimado, se procedió a filtrar por bomba al vacío, el extracto obtenido se puso en unas placas petri, en seguida se colocó en una estufa por 3 días a 40°C para su concentración. Finalmente, se retiró con una espátula y se almacenó en un vial de vidrio. Anexo N° 5

3.6.4 Análisis fisicoquímico

3.6.4.1 Prueba de solubilidad

- **Muestra:** Extracto etanólico concentrado de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada).
- **Procedimiento:**
Se colocó 2mg de la muestra del extracto en cada pocillo de la placa de porcelana. Luego, se añadió a cada pocillo 3mL de cada solvente correspondiente a analizar y se agitó con una bagueta hasta observar resultado.
- **Solventes según su polaridad:** cloroformo, etanol, dimetilsulfóxido, metanol y agua destilada. Anexo N°6

3.6.4.2 Marcha fitoquímica

- **Muestra:** Extracto etanólico concentrado de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada).
- **Procedimiento:** Se realizó en doce tubos de ensayos. Previamente en el tubo blanco se colocó 12 mg, luego se adicionó 13 mL de etanol, estando en agitación por 2 a 3 minutos. Posteriormente, fueron distribuidos en los tubos enumerados. Anexo N°7

Determinación de flavonoides

Reacción de Shinoda: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se le colocó una cintas pequeñas de Magnesio y 3 gotas HCl concentrado. La precipitación formada es indicativo de flavonoides: flavonas y flavonoles(amarillo a rojo), flavanoles(rojo a magenta), flavanonas(rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas(amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración⁽⁴⁶⁾.

Determinación de compuestos fenólicos y taninos

Reactivo FeCl₃ al 5%: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se le agregó FeCl₃ al 5% y se agitó. La aparición de una coloración verde sugiere la presencia de compuestos fenólicos y también taninos⁽⁴⁶⁾.

Determinación de alcaloides

Reacción de Dragendorff: En 1 mL de HCl 10% a 1mL de extracto concentrado, se calentó a 60°C por 10 minutos y se agregó solución del reactivo Dragendorff. Se observa una precipitación roja a naranja ante la presencia de alcaloides⁽⁴⁶⁾.

Reacción de Mayer: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se agregó 2 gotas del reactivo de Mayer y se agitó. Se observa la aparición de un precipitado blanco a crema ante la presencia de alcaloides⁽⁴⁶⁾.

Reacción de Wagner: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se agregó 2 gotas del reactivo de Wagner y se agitó. Se observa la aparición de una coloración marrón ante la presencia de alcaloides⁽⁴⁶⁾.

Determinación de lactonas insaturadas

Reacción de Baljet: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se agregó 3 gotas del reactivo de Baljet. Se considera positivo ante presencia de coloración rojo claro a oscuro ante la presencia de lactona- α,β -insaturada⁽⁴⁶⁾.

Determinación de núcleo esteroideal o triterpenoide

Reacción de Kedde: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se agregó 0.5ml del reactivo de Kedde. Se observa la aparición de una coloración purpura o violáceo ante la presencia de glicósidos cardíacos ⁽⁴⁶⁾.

Reacción de Liebermann-Burchard: Se mezcló 0.5mL de anhídrido acético y 0.5ml de cloroformo, se enfrió, luego se le añadió 1 gota de ácido sulfúrico. Esto se agregó a 1mL de extracto etanólico concentrado. Se observa la aparición de una coloración verde–azul para esteroideas, coloración rosada purpura para triterpenicas⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾.

Determinación de saponinas

En 1mL de extracto etanólico concentrado, se le agregó agua caliente (40 °C), se dejó reposar durante 15 a 30 minutos y luego se agitó manualmente durante 1 a 2 minutos. La formación de espuma se considera positiva⁽⁴⁷⁾.

Determinación de azúcares reductores

Prueba de Fehling: En 1mL de extracto etanólico concentrado, se adicionó 1mL de Fehling A y 1mL de Fehling B (reactivos de sulfato de cobre y tartrato de sodio y potasio), calentar a fuego directo constante. Se considera positivo el precipitado rojo ladrillo de óxido cuproso⁽⁴⁷⁾.

Determinación de antocianinas

En 1ml de extracto etanólico concentrado, se añadió 0.5 mL de NaOH diluido. Se observa la coloración formada. Por lo general Azul.

En otro tubo de ensayo se adicionó 1 mL del filtrado y añadir 3 gotas de algún ácido mineral diluido (HCl ó H₂SO₄ al 10%). Se observó la coloración formada. Por lo general de Rojo a Anaranjado. Las antocianinas se reconocen por producir diferentes color es a diferentes pH⁽⁴⁸⁾.

Determinación de aminoácidos

Ensayo de Ninhidrina: En 1ml de extracto etanólico concentrado, se adicionó 1mL de ninhidrina. Se calentó hasta ebullición por 1min. Se dejó enfriar y se observa una coloración violeta o azul violeta, que determina positiva la prueba⁽⁴⁹⁾.

3.6.4.3 Cromatografía en capa fina analítica

- **Muestra:** extracto concentrado de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada).
- **Fase móvil:** n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5)⁽⁴⁶⁾.
- **Fase estacionaria:** placa cromatográfica de Silica gel 60F 10 cm x 10 cm
- **Estándar:** Se utilizó a la Quercetina la cual fue diluida en etanol (0.5g : 2mL).
- **Visualización:** luz UV (luz ultravioleta) 254 nm⁽⁴⁶⁾.
- **Procedimiento:** en un tubo de diluyó 30mg del extracto concentrado de la muestra en 30mL de metanol. Seguidamente, se procedió a sembrar la muestra problema en la placa cromatográfica en dos puntos equidistantes de 5µL(microlitros) cada una, mediante el uso de capilares. Se colocó la placa cromatográfica en la cuba donde está la fase móvil(disolventes) y se dejó que recorra la distancia del sistema estacionario. Una vez que la fase móvil recorrió cierta distancia en la silica, se retiró de la cuba y se dejó secar, después se procedió a revelarlo en la cámara Uv para observar el recorrido del estándar con las muestra problema y se calculó el Rf (factor de retención) de las muestras⁽⁵⁰⁾. Anexo N°8

3.6.5 Análisis Microbiológico

3.6.5.1 Obtención de concentraciones al 50% y 100%

Se procedió a realizar las diluciones antes de desarrollar el método Kirby Bauer. Para realizar las diluciones a partir del extracto hidroalcohólico, se usó alcohol 96° y dichas diluciones se realizaron de la siguiente forma:

Concentración al 100%:

- *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada): Se consideró el extracto etanólico al 100% al extracto concentrado, se colocó 5mL del extracto en un vial de vidrio.

Concentración al 50% :

- *Brassica oleracea* var.capitata L. (col morada): Se consideró el extracto etanólico al 50% al extracto obtenido de la maceración 100mL (50 mL de col morada + 50mL de agua destilada).

3.6.5.2 Método Kirby Bauer

Las muestras de la bacteria *Shigella flexneri* fueron obtenidas del laboratorio microbiológico de la Universidad Mayor de San Marcos de la ciudad de Lima, las cuales se encontraban en placas petri; posteriormente, se dividieron en dos grupos para evaluar el efecto antibacteriano de la especie vegetal estudiada.

Tabla N° 6: Distribución de muestras para el estudio microbiológico

| placas petri con <i>Shigella flexneri</i> | GRUPOS | EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. (col morada) | | CONTROLES | |
|---|--------|--|------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| | | Concentración al 50%* | Concentración al 100%* | Positivo (Gentamicina)* | Negativo (Alcohol Etílico 96°C)* |
| | 1 | ✓ | | ✓ | ✓ |
| 2 | | | ✓ | ✓ | ✓ |

(*) tres repeticiones

Fuente: Elaboración propia, 2018

Preparación del agar Muller Hinton

Se consideró las instrucciones del fabricante para suspender el agar Mueller - Hinton en agua destilada. Se autoclavó el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo programado, se dejó enfriar en baño maría de 45 a 50°C, y se obtuvo la temperatura adecuada. Se vertió el preparado fresco a placas petri estériles, dándole un fondo uniforme de 4 mm aproximadamente (correspondiendo de 25-30mL para placas de 100 mm de diámetro). Seguidamente, se procedió a dejar enfriar a temperatura ambiente el medio de agar. El pH adecuado fue entre 7,2 - 7,4 para este medio (para medir el pH se puede sumergir el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar).

Preparación del inóculo

De un primer tubo de ensayo, que contenía colonias puras de la bacteria *Shigella flexneri*, se utilizó una cierta cantidad de estas y fueron diluidas en un segundo tubo de ensayo, el cual contenía 10mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de forma que la solución obtenida tenga una turbidez muy semejante al primer tubo de la escala de MacFarland (escala turbidimétrica que se fundamenta en una serie de tubos con turbidez creciente según una escala de 0.5 a 10, que posibilita encontrar la concentración aproximada de la población bacteriana en una muestra) el cual pertenece a una concentración de 3×10^8 UFC/mL⁽⁵¹⁾. De esta última solución, se realizó una dilución de 1 en 3, por lo cual, de esta solución preparada, se tomó 3mL y fue diluido en un volumen total de 9mL con suero fisiológico en un tubo de ensayo con tapa rosca. La solución obtenida tuvo 1×10^8 ufc/mL de concentración, por ello, fue la concentración de trabajo para el inóculo.

Inoculación de las placas

Se agregó 100µL del inóculo bacteriano obtenido (1×10^8 ufc/mL) a cada una de las placas, al esparcir el inóculo con la espátula de Drigalsky. Se consiguió un crecimiento homogéneo, se deslizó el asa en la placa petri de manera paralela cubriendo toda la superficie de esta. En seguida, se rehizo la técnica rotando la placa sesenta grados en dos ocasiones más. El procedimiento se realizó con extremo cuidado al sembrar las placas de borde a borde para evitar complicaciones en la realización de las lecturas. Finalmente, se dejó secar en un intervalo de tiempo de 3 a 5 minutos antes de la formación de los pocillos.

Preparación del control positivo (Gentamicina estándar)

Se elaboró una solución de Gentamicina 0.25mg/mL diluyendo 12.5mg de Gentamicina Estándar en 50mL de alcohol etílico.

Formación de pocillos y aplicación de la muestra en las placas inoculadas

Para realizar la formación de los pocillos, se utilizó un sacabocados, el que se esterilizó con alcohol y se pasó en un mechero. Posteriormente, se formaron los pocillos, se hicieron tres por cada placa petri. Los pocillos estuvieron distribuidos cada uno a 15mm del borde de la placa, de esta manera se evitó la superposición de los halos de inhibición.

Posteriormente a la formación de los pocillos, se colocó la muestra, se distribuyó una concentración por cada placa. A cada pocillo se le agregó 40 µL de la dilución (concentración al 50% y 100%) de la muestra. Finalmente, las placas se colocaron en la incubadora a 35-37°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados

Transcurridas las 24 horas de incubación, las placas fueron observadas. Las áreas de inhibición (halos) obtenidas tuvieron formas similarmente circulares en una capa homogénea del incremento bacteriano. Las zonas de inhibición (halos) fueron medidas en milímetros (mm). Se calculó el diámetro del halo. Se usó vernier para realizar la medición. Luego que se obtuvieron los valores por triplicado de las mediciones, se promediaron y compararon con los valores de los halos de inhibición producidos por el control positivo (Gentamicina) y control negativo(alcohol 96°). Anexo N°9

3.7. Técnicas para el procesamiento de datos

Se interpretaron los resultados obtenidos del estudio según los objetivos e hipótesis planteadas, se midió y comparó los diámetros de los halos de inhibición, entre los grupos de diferentes concentraciones (50% y 100%) del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada). El análisis estadístico se realizó con Software SPSS v22 para Windows, con el que se ejecutó los siguientes procedimientos estadísticos de análisis: ANOVA oneway la prueba de Tukey, en los cuales se considerará un margen de error estadístico de 5%.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Presentación de Resultados

4.1.1 Prueba de solubilidad

Tabla N°7: Prueba de Solubilidad del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.

| PRUEBA DE SOLUBILIDAD | |
|-------------------------|------------|
| SOLVENTE | RESULTADOS |
| Cloroformo | - |
| Metanol | + |
| Etanol | +++ |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | +++ |
| Agua destilada | +++ |

Leyenda: (+++) Muy soluble, (++)poco soluble, (+) parcialmente soluble, (-) negativo

En la Tabla N°7 muestra la solubilidad del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L. (col morada), ante solventes de diferentes polaridades, obteniéndose como resultado que la muestra problema es muy soluble en etanol, agua destilada y DMSO(Dimetilsulfóxido), parcialmente soluble en metanol y negativo en cloroformo. Se realizó tres repeticiones consecutivas por cada solvente utilizado en la prueba.

4.1.2 Marcha fitoquímica

Tabla N°8: Resultados de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada)

| MARCHA FITOQUIMICA | | |
|---|---|------------|
| METABOLITOS PRIMARIOS | REACCIÓN | RESULTADOS |
| Determinación de azúcares reductores | Prueba de Fehling | + |
| Determinación de aminoácidos | Ensayo de Ninhidrina | +++ |
| METABOLITOS SECUNDARIOS | REACCIÓN | RESULTADOS |
| Flavonoides | Reacción de Shinoda | +++ |
| Compuestos fenólicos y taninos | Reactivo FeCl ₃ al 5% | +++ |
| Determinación de alcaloides | Reacción de Dragendorff | + |
| | Reacción de Mayer | + |
| | Reacción de Wagner | + |
| Determinación de lactonas insaturadas | Reacción de Baljet | - |
| Determinación de núcleo esteroide o triterpenoide | Reacción de Kedde | - |
| | Reacción de Liebermann-Burchard | ++ |
| Determinación de saponinas | Generación de espuma (agua destilada + agitación) | - |
| Determinación de antocianinas | HCl | +++ |

Leyenda: (+++)Abundante, (++)Moderado, (+)poco, (-) negativo

4.1.3 Cromatografía en capa fina analítica

Tabla N°9: Resultados de la cromatografía en capa fina analítica del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada)

| Muestra: Principio Activo | Fase Móvil | Revelador | Resultado | Rf |
|---|--|--------------------------------------|----------------------------|--------|
| Flavonoide Estándar: Quercetina | n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5) | luz UV (luz ultravioleta) 254 nm | Mancha verde oscura | 0.31mm |
| Extracto etanólico <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. (col morada). | | | Mancha azul verdosa oscura | 0.28mm |

Calculo del Rf(factor de retención), el factor de retención es una medida en donde se calcula la distancia vertical que recorre el metabolito, desde el punto en que se aplicó originalmente en la placa, dividido entre la distancia recorrida por el disolvente, medida desde el mismo punto de partida⁽⁵⁰⁾ :

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto desde la línea base}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Muestra: Flavonoide Estándar(Quercetina)

$$Rf = \frac{1.9}{6.1} = 0.31 \text{ cm}$$

Muestra: Extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada)

$$Rf = \frac{1.7}{6.1} = 0.28 \text{ cm}$$

El rf de la muestra de extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada), es cercano al rf de la muestra estándar (Flavonoide), por lo tanto, se deduce que el flavonoide Quercetina, es un metabolito presente en este vegetal.

4.1.4 Análisis Microbiológico

Para evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada), se tomó en referencia el halo de inhibición del control positivo: Gentamicina, según el Manual de sensibilidad de Instituto Nacional de Salud (2002) incluyó a este antibiótico dentro del grupo I de discos de sensibilidad antibiótica a utilizar en el antibiograma para *Enterobacteriaceae*, en la cual está incluida *Shigella flexneri*⁽⁵²⁾.

Tabla N°10: Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias

| Antimicrobiano | Contenido del Disco | Diámetros críticos para <i>Enterobacteriaceae</i> (Diámetro en mm) | | |
|----------------|---------------------|---|------------|----------|
| | | Resistente | Intermedio | Sensible |
| Gentamicina | 10 µg/mL | 12 | 13-14 | 15 |

Fuente: Sacsquispe R, et al. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión, Serie de Normas Técnicas N° 30 –Instituto Nacional de Salud; 2002⁽⁵²⁾.

Tabla N°11: Distancias inhibitorias en mm de diámetro de halos en las concentraciones de los controles y extractos etanólicos al 50% y 100%.

| EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. (col morada) | | | | |
|--|--|---|-----------------|------|
| Grupos/ N° de placa | Control positivo Gentamicina 10µg/mL | Control Negativo Alcohol Etílico 96° (blanco) | Concentraciones | |
| | | | 50% | 100% |
| Halos de Inhibición (mm) | | | | |
| 1 | 18 | 6 | 6 | 10 |
| 2 | 18 | 6 | 6 | 9 |
| 3 | 19 | 6 | 6 | 9 |

EL TAMAÑO DE LOS POCILLOS FUE DE 6mm, POR LO TANTO CUANDO SE REPORTA ESTA MEDIDA INDICA QUE NO HUBO FORMACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN. CONCENTRACIÓN DE INOCULO 1x10⁸ UFC/mL”

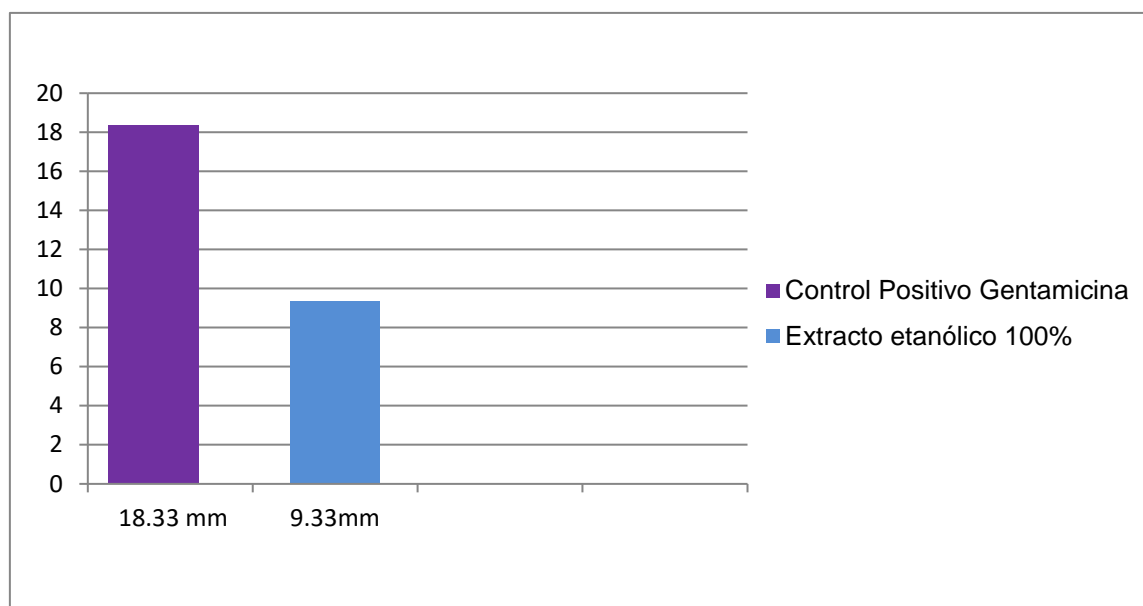


Figura N°7: Determinación del efecto antibacteriano del extracto Etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada)

Fuente: Elaboración propia, 2018

Se realizó la medición de los halos inhibitorios formados en las placas petri con el instrumento vernier digital, además se utilizaron fichas de recolección de datos durante la investigación. Anexo N° 10

4.2 Contrastación de Hipótesis

Hipótesis General

El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

Tabla N°12: Estadísticas descriptivas para los halos de inhibición obtenidos de cada concentración de del extracto etanólico aplicado.

| Descriptivos | | | | | | | | |
|--|----|---------|---------------------|----------------|--|-----------------|--------|--------|
| Diametro de los Halos de inhibicion (mm) | | | | | | | | |
| | N | Media | Desviación estándar | Error estándar | 95% del intervalo de confianza para la media | | Mínimo | Máximo |
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Control positivo Gentamicina 10ug | 3 | 18.3333 | 0.57735 | 0.33333 | 16.8991 | 19.7676 | 18.00 | 19.00 |
| Control Negativo Alcohol Etilico 96° | 3 | 6.0000 | 0.00000 | 0.00000 | 6.0000 | 6.0000 | 6.00 | 6.00 |
| Concentraciones 50% | 3 | 6.0000 | 0.00000 | 0.00000 | 6.0000 | 6.0000 | 6.00 | 6.00 |
| Concentraciones 100% | 3 | 9.3333 | 0.57735 | 0.33333 | 7.8991 | 10.7676 | 9.00 | 10.00 |
| Total | 12 | 9.9167 | 5.28219 | 1.52484 | 6.5605 | 13.2728 | 6.00 | 19.00 |

Leyenda:

- Control Positivo: Gentamicina 10µg.
- Control Negativo: Alcohol 96°.
- Extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 50%.
- Extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100%.
- N: Número de muestras (placas petri).

Se observa 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.

“EL TAMAÑO DE LOS POCILLOS FUE DE 6mm, POR LO TANTO CUANDO SE REPORTA ESTA MEDIDA INDICA QUE NO HUBO FORMACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN. CONCENTRACIÓN DE INOCULO 1x10⁸ UFC/mL”

Tabla N°13: Prueba de LEVENE de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) .

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error

| Halos de inhibición (mm) | | | |
|--------------------------|-----|-----|-------|
| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
| 10.667 | 3 | 8 | 0.004 |

Dónde:

H₀: Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos ($P < 0.05$)

H₁: Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos ($P > 0.05$)

Observamos que $p < 0.05$, se concluye que, las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, aceptando la hipótesis nula, permitiéndonos deducir los tipos de pruebas estadísticas, en esta investigación fueron: ANOVA oneway o de un factor y la prueba de Tukey.

Tabla N°14: Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada)

| ANOVA | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|----------|--------------|
| Halos de inhibición (mm) | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 305.583 | 3 | 101.861 | 611.167 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 1.333 | 8 | 0.167 | | |
| Total | 306.917 | 11 | | | |

H₀: No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P > 0.05$)

H₁: Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P < 0.05$)

Con el resultado ($P < 0.05$), se confirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los extractos etanólicos.

Tabla N°15: Comparaciones múltiples de la Variable dependiente: Diámetro de Halos (mm) - HSD Tukey

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------|-------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: | | | | | | |
| (I) Control/Concentración (j) | (I) Control/Concentración (j) | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1 | 2 | 12,33333* | 0.33333 | 0.000 | 11.2659 | 13.4008 |
| | 3 | 12,33333* | 0.33333 | 0.000 | 11.2659 | 13.4008 |
| | 4 | 9,00000* | 0.33333 | 0.000 | 7.9325 | 10.0675 |
| 2 | 1 | -12,33333* | 0.33333 | 0.000 | -13.4008 | -11.2659 |
| | 3 | 0.00000 | 0.33333 | 1.000 | -1.0675 | 1.0675 |
| | 4 | -3,33333* | 0.33333 | 0.000 | -4.4008 | -2.2659 |
| 3 | 1 | -12,33333* | 0.33333 | 0.000 | -13.4008 | -11.2659 |
| | 2 | 0.00000 | 0.33333 | 1.000 | -1.0675 | 1.0675 |
| | 4 | -3,33333* | 0.33333 | 0.000 | -4.4008 | -2.2659 |
| 4 | 1 | -9,00000* | 0.33333 | 0.000 | -10.0675 | -7.9325 |
| | 2 | 3,33333* | 0.33333 | 0.000 | 2.2659 | 4.4008 |
| | 3 | 3,33333* | 0.33333 | 0.000 | 2.2659 | 4.4008 |

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Leyenda :

- 1 = Control Positivo (Gentamicina 10µg)
- 2 =Control Negativo(Alcohol 96°)
- 3= Extracto Etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 50%
- 4= Extracto Etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100%

En el cuadro adjunto, observamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 – 2 – 3. Por ello, se aplicó la prueba de subconjuntos de Tukey para reconocer las diferencias antes mencionadas.

“EL TAMAÑO DE LOS POCILLOS FUE DE 6mm, POR LO TANTO CUANDO SE REPORTA ESTA MEDIDA INDICA QUE NO HUBO FORMACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN. CONCENTRACIÓN DE INOCULO 1x10⁸ UFC/mL”

Tabla N°16: Prueba de subconjuntos de Tukey, Diámetro de Halos de inhibición

| Diámetro de Halos de inhibición (mm) | | | | |
|--|---|------------------------------|--------|---------|
| Controles / Concentración | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
| | | 1 | 2 | 3 |
| Control Negativo Alcohol Etilico 96° | 3 | 6.0000 | | |
| Concentraciones 50% | 3 | 6.0000 | | |
| Concentraciones 100% | 3 | | 9.3333 | |
| Control positivo Gentamicina 10ug | 3 | | | 18.3333 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000

Se observa que todas las medias de los tratamientos aplicados son distintos (se observa en forma de escalonada), siendo el extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100% de concentración, el que presentó ligero efecto antibacteriano.

“EL TAMAÑO DE LOS POCILLOS FUE DE 6mm, POR LO TANTO CUANDO SE REPORTA ESTA MEDIDA INDICA QUE NO HUBO FORMACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN. CONCENTRACIÓN DE INOCULO 1×10^8 UFC/mL”

Hipótesis específica (N°1)

H₀: El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) no tiene presencia de diversos tipos de metabolitos.

H₁: El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) tiene presencia de diversos tipos de metabolitos.

Como se observa en la Tabla N°8, el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L. (col morada) presentó un moderado contenido de metabolitos, distribuidos según precipitación formada. Se halló abundante presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, antocianinas y aminoácidos; de moderada presencia en compuestos de núcleo esteroidal o triterpenoide, de poca presencia en alcaloides y azúcares reductores y de nula presencia de lactonas insaturadas y saponinas. Por lo tanto, se afirma que el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) tiene presencia de diversos tipos de metabolitos.

Hipótesis específica (N°2)

H₀: Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) no influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

H₁: Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

Según concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada):

H₀: La concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) al 50% no influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

H₁: La concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) al 50% influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

Tabla N°17: Estadísticas de muestra única N°1

| Control/ Concentración | N | Media | Desviación estándar | Media de error estándar |
|---|---|--------|---------------------|-------------------------|
| Concentraciones 50% Halos de inhibición (mm) | 3 | 6,0000 | ,00000 ^a | ,00000 |
| Concentraciones 100% Halos de inhibición (mm) | 3 | 9,3333 | ,57735 | ,33333 |

a. t no se puede calcular porque la desviación estándar es 0.

Al aplicar la concentración a 50% no se observaron cambios en los halos de inhibición. En el resultado de los estadísticos descriptivos no se observan datos para el contraste de la hipótesis. Por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula.

H₀: La concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100% no influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

H₁: La concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100% influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

Tabla N°18: Estadísticas de muestra única N°2

| | | Prueba de muestra única ^a | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----|------------------|----------------------|--|----------|
| | | Valor de prueba = 0 | | | | 95% de intervalo de confianza de la diferencia | |
| Control / Concentración | | t | gl | Sig. (bilateral) | Diferencia de medias | Inferior | Superior |
| Concentraciones 100% | Halos de inhibición (mm) | 28,000 | 2 | ,001 | 9,33333 | 7,8991 | 10,7676 |

a. No se han calculado estadísticas para uno o más archivos segmentados.

El p_valor obtenido es 0.001 que es menor que el nivel de significancia 0.05 por lo tanto se rechaza la hipótesis nula. Por ello, se pudo afirmar que La concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100% influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.

Se afirma la hipótesis alternativa, las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*; específicamente la concentración del extracto etanólico al 100%.

Hipótesis específica (N°3)

H₀: El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) tiene menor efecto antibacteriano comparado con Gentamicina 10µg/mL sobre cepas *Shigella flexneri*, *in vitro*.

H₁: El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) tiene mayor efecto antibacteriano comparado con Gentamicina 10µg/mL sobre cepas *Shigella flexneri*, *in vitro*.

Según se mostró en la tabla N°11 (Distancias inhibitorias en mm de diámetro de halos en las concentraciones de los controles y extractos etanólicos al 50% y 100%) el halo de inhibición del extracto de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) al 100% presentó un halo de inhibición de 9.33 mm de promedio y la concentración al 50% no presentó halos de inhibición (6 mm tamaño del pocillo), a comparación de la Gentamicina 10µg/mL que presentó halos de inhibición superiores con promedio de 18.33mm. Asimismo, en la tabla N° 14 (Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico *Brassica oleracea* var.capitata L.) permitió interpretar que si existen contrastes significativos entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno, al observar el resultado ($P < 0.05$) se confirmó la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los extractos etanólicos. Posteriormente, en la tabla N°18 (Estadísticas de muestra única del extracto a concentración al 100%) se mostró estadísticamente que el p_valor obtenido es 0.001 que es menor que el nivel de significancia 0.05, por lo tanto, se pudo afirmar que la concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*; específicamente la concentración del extracto etanólico al 100%.Concluyéndose, que se pudo confirmar la hipótesis nula: el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) tiene menor efecto antibacteriano comparado con Gentamicina 10µg/mL sobre cepas *Shigella flexneri*, *in vitro*.

4.3 Discusión de Resultados

En el presente estudio se evaluó, el efecto antibacteriano del extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) frente a cepas bacterianas de *Shigella flexneri*, *in vitro*; mediante el método de Kirby Bauer (difusión en disco).

Según Satya M⁽¹¹⁾, et al. en su “Estudio comparativo del análisis fitoquímico y la actividad antimicrobiana *in vitro* de tres hortalizas importantes de la familia *Brassicaceae*”, en donde se incluyó a *Brassica oleracea* var. capitata (col), señala que compuestos fitoquímicos obtenidos de los vegetales de la familia *Brassicaceae* pueden actuar como agentes antimicrobianos; asimismo, en su estudio comprobó la presencia de metabolitos secundarios como carbohidratos, aminoácidos, taninos, alcaloides, fenoles, terpenoides, quininas, proteínas y cumarinas, y fueron los flavonoides los de mayor presencia (cualitativamente) en los extractos etanólicos. Esto coincide con los resultados obtenidos, como se observa en la Tabla N°8 durante la marcha fitoquímica de esta investigación, demostró la mayor existencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, antocianinas y aminoácidos en esta especie. De la misma forma, Suganya D, et al⁽⁵³⁾ en su investigación “Análisis antibacteriano y fitoquímico en *Brassica oleracea* var. botrytis Linn”, manifiesta que la compleja mezcla de fitoquímicos en los vegetales de esta especie proporcionan un mayor efecto protector sobre la salud que los fitoquímicos individualmente.

En la prueba de cromatografía (tabla N°9) en capa fina para flavonoides a 254 nm, se utilizó como muestra estándar a la Quercetina, demostró la presencia de estos compuestos mediante la comparación de r_f (factor de retención). La muestra estándar tuvo un r_f de 0.31 cm y la muestra problema (extracto etanólico) fue de 0.28 cm, esta diferencia mínima hizo deducir que la Quercetina es un metabolito secundario presente en esta especie.

En el Análisis Microbiológico para evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) en cepas de *Shigella flexneri* a concentraciones de 50% y 100% mediante el método Kirby Bauer, demostró mayor efectividad en la concentración del extracto a 100%. Esto se dedujo mediante la comparación de los halos de inhibición formados

(figura N°7), donde el promedio de la concentración al 100% de 9.33 mm y la concentración al 50% un promedio de 6mm; es decir, esta última no presentó efectividad, ambos resultados señalan que el efecto antibacteriano del extracto etanólico depende de su concentración, a mayor concentración el efecto se incrementa ligeramente. En relación con el control positivo se utilizó Gentamicina, la cual es un antibiótico incluido en el antibiograma para *Enterobacteriaceae* según el Manual de sensibilidad de Instituto Nacional de Salud⁽⁵²⁾, y se obtuvo un promedio de 18.33mm de diámetro en los halos de inhibición, mientras el control negativo (alcohol 96°) mostró un promedio de 6mm; en consecuencia, no poseía ningún efecto sobre la bacteria.

En la tabla N° 13 se muestra la prueba de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento (concentración) aplicado son iguales o distintos estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Se mostró que $p(0,004) < 0.05$, se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, aceptando la hipótesis nula. Este resultado nos permitió deducir diferentes tipos de pruebas estadísticas, en esta investigación fueron: ANOVA oneway o de un factor y la prueba de Tukey.

El análisis de variancia (ANOVA) fue el diseño estadístico que se utilizó y permitió determinar las diferencias estadísticas significativas entre los promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) en los todos los grupos de análisis, con un nivel de confianza ($p < 0.05$). Asimismo, se incluyó la prueba HSD de Tukey, que permitió contrastar las diferencias entre los grupos de estudio en base a los promedios del diámetro de los halos de inhibición resultantes en la investigación.

La prueba ANOVA One Way (Tabla N°14) permitió interpretar que si existen contrastes significativos entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno. Al observar el resultado $P(0.000) < 0.05$, se confirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los extractos etanólicos. Para determinar que estas medias son estadísticamente diferentes

se aplica pruebas POST HOC, esta investigación empleó la prueba de Tukey. La prueba de Tukey realizada permitió realizar comparaciones múltiples y además determinó cuáles fueron las medias son estadísticamente heterogéneas. En la tabla N°15, observamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 – 2 – 3. Por ello, se aplicó la prueba de subconjuntos de Tukey para reconocer las diferencias antes mencionadas. En la tabla N°16(Prueba de subconjuntos de Tukey), se observa que todas las medias de los tratamientos aplicados son distintos (en forma de escalonada), siendo el extracto etanólico *Brassica oleracea* var.capitata L. (col morada) al 100% de concentración, el que presentó ligero efecto antibacteriano. Asimismo, según se mostró en la tabla N°11 (Distancias inhibitorias en mm de diámetro de halos en las concentraciones de los controles y extractos etanólicos al 50% y 100%) el halo de inhibición del extracto de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) al 100% presentó un halo de inhibición ligero de 9.33 mm de promedio y la concentración al 50% no presentó halos de inhibición (6 mm tamaño del pocillo), a comparación de la Gentamicina 10µg/mL que presentó halos de inhibición superiores con promedio de 18.33mm y en la tabla N°18 (Estadísticas de muestra única del extracto a concentración al 100%) se mostró estadísticamente que el p(0.001) que es menor que el nivel de significancia 0.05, por lo tanto, se pudo afirmar que la concentración del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L. (col morada) al 100% influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, in vitro.

Pacheco-Cano R, et al⁽¹⁰⁾, en su investigación “Extractos crudos de brócoli (*Brassica oleracea* var.italica) con efecto de actividad inhibitoria contra bacterias y levaduras patógenas de importancia en salud humana y hongos fitopatogenos”, demostró que *Brassica oleracea* var.itálica (género al cual pertenece la col morada también) posee efecto inhibitorio contra bacterias Gram-negativas en las que incluyó a *Shigella flexneri*; Por otro lado, Ayshwarya M, et al ⁽¹³⁾ en su estudio “Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Brassica oleracea* var.capitata rubra”, investigó el potencial efecto antibacteriano de este vegetal mediante el método de difusión de disco contra bacterias Gram positivas (*Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*,

Staphylococcus aureus) y Gram negativas (*Proteus vulgaris*, *Serratia marsecens*, *Pseudomonas aeruginosa*), en el cual realizo extracciones con diferentes solventes como etanol, metanol, acetona, cloroformo y agua. El extracto metanólico y etanólico fueron los que mostraron un mayor efecto antibacteriano sobre el crecimiento de todos los microorganismos en comparación con los demás extractos.

Según la escala de Duraffourd⁽⁸⁾, indica valores de sensibilidad según el tamaño del diámetro formado por los halos inhibición formados: sensibilidad nula ≤ 8 mm, sensibilidad limite 9 -14 mm, sensibilidad media 15 – 19 mm , sumamente sensible ≥ 20 mm; según los resultados obtenidos(tabla N°11), el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) al 100% presentó una sensibilidad limite al tener un promedio de halos de 9.33mm y Gentamicina 10 μ g/mL se presentó sumamente sensible al tener un promedio de halos de 18.33mm, deduciéndose que el extracto etanólico de *Brassica oleracea* var.capitata L.(col morada) al 100% tiene menor efecto antibacteriano que Gentamicina 10 μ g/mL.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) presenta la presencia de diversos tipos de metabolitos secundarios: principalmente flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y antocianinas.
2. El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) al 100 %, presentó ligera formación de halos de inhibición; por lo tanto, influye positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*.
3. El extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) tiene menor efecto antibacteriano en cepas de *Shigella flexneri*, *in vitro*, en comparación con Gentamicina 10 µg/mL.

5.2 Recomendaciones

1. Realizar estudios a mayores concentraciones del extracto etanólico de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada) con la finalidad de garantizar un mayor efecto antibacteriano.
2. Evaluar el efecto antibacteriano ante bacterias Gram-positivas, y como antimicótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; c2017. Enfermedades diarreicas; [citado 16 Mar 2018]. [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
2. Dirección General de Epidemiología: Boletín epidemiológico, Las Enfermedades Diarreicas Agudas en el Perú. [Internet]. Lima: MINSA; 2016. [citado 16 Mar 2018]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2016/02.pdf>
3. Baca C, Yupanqui L, Canales J, Zamudio M, Quispe M, Tamariz J. Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* aisladas en un instituto de salud pediátrico de Lima, Perú entre enero y julio 2013. *Rev Med Hered.* 2014; 25:73-9.
4. Vargas-Rincón C, Sánchez-León G, Jiménez P. La producción de metabolitos secundarios en la familia *Brassicaceae*. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas (Universidad Militar Nueva Granada)*[Internet]. 2013 [citado 16 Mar 2018]; 9(2): 282-305. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5323711>
5. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; c2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos; [citado 16 Mar 2018]. [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
6. Instituto de Salud Tropical [Internet]. Navarra: Universidad de Navarra; c2015. *Shigella*; [citado 16 Mar 2018]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.unav.edu/web/instituto-de-salud-tropical/investigacion/patologias-bacterianas/shigella>
7. Choquenaira R, Rivas S. Extracción del aceite de las semillas de *Curcubita* máxima Dutch var. Macre y var. Zambo, determinación de los ácidos grasos insaturados libres (ácido oleico, ácido linoleico y ácido α -linolénico) y de su efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella Flexneri*. [Tesis Pregrado en internet]. Arequipa: Universidad Católica Santa María; 2013 [citado 20 Mar 2018]. Disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/3792>

- 8.** Castilla C. Determinación del efecto antibacteriano in vitro del extracto de hojas de *Carica pubescens* L (*Caricaceae*) “Papaya Arequipeña” frente a bacterias patógenas. [Tesis Pregrado en internet]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2016 [citado 20 Mar 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/1855>
- 9.** Rondón A. Patrones de sensibilidad de cepas de *Shigella sp* Hospital I Carlos Alcántara Butterfield 2014. [Tesis Pregrado en internet]. Lima: Universidad San Martín de Porres; 2015 [citado 20 Mar 2018]. Disponible en: <http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/handle/usmp/1313>
- 10.** Pacheco-Cano R, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona J. Extractos crudos de brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) con efecto de actividad inhibitoria contra bacterias y levaduras patógenas de importancia en salud humana y hongos fitopatógenos. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos [Internet]. 2018 Ene [citado 20 Mar 2018]; 3 (2018):59-64. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/2/11.pdf>
- 11.** Satya Prasad M, Suman Joshi DSD, Narendra K, Nadiya SK, Masthani SK, Padmaja Phani N, Krishna Satya A. A comparative study of phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of three important vegetables from *Brassicaceae* family. Int. J. Res. Ayurveda Pharm.[Internet]. 2015 Dic [citado 20 Mar 2018]; 6(6) :767-72. Disponible en: https://www.ijrap.net/admin/php/uploads/1430_pdf.pdf
- 12.** Szabó Sz, Németh Zs, Polyák É, Bátaic I, Kerényi M, Figler M. Antibacterial effect of sprouts against human pathogens in vitro. Acta Alimentaria. [Internet]. 2014 Ago [citado 20 Mar 2018]; 43 (3): 501–8. Disponible en: <https://akademai.com/doi/pdf/10.1556/AAlim.43.2014.3.18>
- 13.** Ayshwarya M, Sudha Rameshwari K. Antimicrobial activity of the plant extracts of *Brassica oleracea var. capitata rubra*. Journal Of International Academic Research For Multidisciplinary [Internet]. 2015 Nov [citado 20 Mar 2018]; 10(3):149-56 p. Disponible en: <http://www.jiarm.com/NOV2015/paper25442.pdf>

14. Fornaris GJ, Características de la planta. En: Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico (EEA/UPR). Conjunto Tecnológico para la Producción de Repollo. Revisión 2014. San Juan: EEA/UPR; 1999. p. 6-7.
15. Sarita V. Cultivo de Repollo, Serie cultivos Boletín Técnico N°18 [Internet]. Santo Domingo: Fundación de Desarrollo Agropecuario Inc [citado 20 Mar 2018]. 24 p. Disponible en: <http://www.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/repollo.pdf>
16. Zamora E. Departamento de Agricultura y Ganadería, México; Serie guías – Producción de Hortalizas DAG/HORT-011 , "EI CULTIVO DE REPOLLO" [Internet] . Sonora: Universidad de Sonora; 2016. [citado 20 Mar 2018]. Disponible en: <http://www.dagus.uson.mx/Zamora/COL%20O%20REPOLLO-DAG-HORT-011.pdf>
17. Sargent, Frederick. "Plants And Their Uses - An Introduction To Botany". 1ª ed. New York: H. Holt and company ,Estados Unidos; 1913. 642 p.
18. Khan M, Yadav S, Chauhan N, Ahmad A. Use of red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) as nutritional food. Asian J. Bio. Sci. 2010 oct; 5 (2): 249-50.
19. Sudharameshwari K, Ayshwarya M; Evaluation of antiulcerogenic activity of methanol extracts of *Brassica Oleracea* Var. *Capitata Rubra* on albino rat gastric ulceration. Asian J Pharm Clin Res [Internet]. 2017 Mar [citado 13 Mayo 2018]; 10(3):314-17. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/8639/6eee026a1b52b890a759b711f8d50c52813f.pdf>
20. Agricultural Research Service National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release United States[Internet]. Maryland: Department of Agriculture; c2018. Basic Report: 11112, Cabbage, red, raw; [citado 13 Mayo 2018] [1 pantalla]. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/301783?manu=&fgcd=&ds=&q=Cabbage,%20red,%20raw>
21. Neelufar Shama S, Alekhya T, Sudhakar K. Pharmacognostical & phytochemical evaluation of *Brassica oleracea* linn var. *capitata* f. *rubra* (the red cabbage). Journal of pharmaceutical biology. 2012; 2(2): 43-6.

- 22.** Volden J, Bengtsson G, Wicklund T. Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*); effects of long-term freezer storage. *Food Chemistry* [Internet]. 2009 Feb [citado 15 Mayo 2018]; 112(4):967-76. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608008376>
- 23.** Rincón A. Biosíntesis de los glucosinatos e importancia nutricional humana y funciones de protección a las plantas. *Revista Alimentos Hoy* [Internet]. 2014 [citado 15 Mayo 2018]; 22(31): 64-80. Disponible en: <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/256>
- 24.** Campas-Baypoli O, Bueno-Solano C, Martínez-Ibarra D, Camacho-Gil F, Villalberma A, Rodríguez-Núñez J, López-Cervantes J, Sánchez-Machado D. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos latinoamericanos de nutrición* [Internet]. 2009 [citado 15 Mayo 2018]; 59(1). Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2009/1/art-15/>
- 25.** Falk K, Vogel C, Textor S, Bartram S, Hick J, Pickett, Gershenzon J. Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry*[Internet]. 2004 Apr [citado 25 Mayo 2018]; 65(8):1073-84 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942204000949>
- 26.** Guerrero-Beltrán C, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Irasema Chirino Y. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Exp Toxicol Pathol* . 2012 Jul; 64 (5): 503-8.
- 27.** Romeo L, Iori R, Rollin P, Bramanti P, Mazzon E. Isothiocyanates: An Overview of Their Antimicrobial Activity against Human Infections. *Molecules* [Internet]. 2018 Mar [citado 11 Junio 2018]; 23(3), 624: 1-18. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/3/624>
- 28.** Cartea M, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules* [Internet]. 2010 Dic [citado 11 Junio 2018]; 16(1): 251-80. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/1/251>

- 29.** Calderón J, Burgos E, Pérez C, López M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. Mini Reviews in Medicinal Chemistry [Internet]. 2011 Abr. [citado 18 Junio 2018]; 11(4):298-344. Disponible en: <https://personal.us.es/mlopezlazaro/2011.%20MRMC.%20Kaempferol.pdf>
- 30.** Vicente-Vicente L, Prieto M, Morales A. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. Rev. Toxicol [Internet]. 2013 Jul-Dic. [citado 18 Junio 2018]; 30(2): 171-81. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/919/91931189008.pdf>
- 31.** Renuka J. Studies On Anticancer Activity Of *Brassica oleraceae* Extract And Its Mechanism Of Action On Human Epithelial Carcinoma Cells Hep-2. [tesis doctoral en Internet]. Kattankulathur: SRM University; 2013 [citado 25 Junio 2018]; 36 p. Disponible en: <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/33055>
- 32.** Sharapin N, Machado L, Souza E, Rocha De Albuquerque E, Valverde E, López De Almeida J. Fundamentos De Tecnología De Productos Fitoterapeúticos. 1ª ed. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello, Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo Colombia ;2000. 248p.
- 33.** Díaz J, Echezuria L, Petit N, Cardozo M, Arias A, Rísquez A. Diarrea Aguda: Epidemiología, Concepto, Clasificación, Clínica, Diagnóstico, Vacuna Contra rotavirus. Archivos Venezolanos De Puericultura Y Pediatría. 2014 Mar. [citado 25 Junio 2018]; 77(1):29-40. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3679/367937050007.pdf>
- 34.** León S. Shigelosis (disentería bacilar). Salud En Tabasco. 2002 Abr. [citado 25 Junio 2018]; 8(1):20-23. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/487/48770306.pdf>
- 35.** Rettner R. [Internet]. New York: Live Science; c2015. Drug-Resistant Stomach Bug Increasing in US; [citado 25 Junio 2018]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.livescience.com/50357-drug-resistant-shigella-united-states.html>
- 36.** Kasper D, Hauser S, Jameson J, Fauci A, Longo D, Loscalzo J. Harrison Principios de Medicina Interna. 19ª ed. Ciudad de Mexico: McGRAW-HILL Interamericana México;2015. 2770 p.

- 37.** Cano Wilmer. Efecto Del Extracto Etanólico de *Azadirachta indica* (NEEM) sobre la viabilidad in vitro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis Pregrado en internet]. Piura: Universidad Cesar Vallejo;2017 [citado 26 Junio 2018]. Disponible en: <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/730>
- 38.** Bergeron C, Carrier D, Ramaswamy S. Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing. 1ª ed. West Sussex:John Wiley & sons Ltd. United Kingdom;2012.344 p.
- 39.** Montoya H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Medellín: Universidad de Antioquia. Colombia;2008. 229 p.
- 40.** Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Panamericana. Argentina;2007. 988 p.
- 41.** Eldridge L. [Internet].New York: Verywell Health; c2017. What Does In Vivo and In Vitro Mean?; [citado 03 Julio 2018]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.verywellhealth.com/what-does-in-vivo-and-in-vitro-mean-2249118>
- 42.** Bennington J. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. 1ª ed. Buenos Aires: Panamericana. Argentina; 2000. 1556 p.
- 43.** Stainer R, Ingraham J, Wheelis M, Painter P. Microbiología. 2ª ed. Barcelona: Reverté. España;1992. 768 p.
- 44.** Ramírez L, Marín D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica[Internet]. 2009 Agos [citado 03 Jul 2018]; 42(2):263-268. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- 45.** Morales A, Díaz Y. Ototoxicidad causada por Gentamicina 80mg utilizada en pacientes de 15-65 años con infección del tracto urinario que asisten al Hospital Gaspar García Laviana del departamento de Rivas, Agosto 2010-Marzo 2011[Seminario De Graduación en línea]. Managua: Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua 2011[citado 03 Jul 2018]; Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/42/1/86531.pdf>

- 46.** Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. 2ª ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú; 1994. 300 p.
- 47.** Kuklinski C. Farmacognosia. 1ª ed. Barcelona: Ediciones Omega. España; 2003. 504 p.
- 48.** Stahl E, Howard A, Morris L. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. 2ª ed. Berlin: Springer-Verlag Alemania; 1965. 553 p.
- 49.** Macarulla J, Goñi F. Biomoléculas, Lecciones De Bioquímica Estructural. 3ª ed. Barcelona: Reverté España; 2002. 294 p.
- 50.** Judge M.[Internet]California: Sciencing;2018 Jun. Factors That Affect RF Values in Thin Layer Chromatography; [citado 03 Jul 2018]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://sciencing.com/factors-values-thin-layer-chromatography-8561359.html>
- 51.** Gamazo C, Sánchez S, Camacho A. Microbiología Basada En La Experimentación. 1ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2013. 232 p.
- 52.** Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión, Serie de Normas Técnicas N° 30[Internet]. Lima: Instituto Nacional de Salud [citado 03 Jul 2018]. 67 p. .Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
- 53.** Suganya D, Hussain Ali Fathima M, Kanimozh K. Antibacterial and Phtyochemical Analysis On *Brassica oleracea* var. *botrytis* Linn. Rev JAPSA[Internet]. 2016 Mar [citado 03 Jul 2018]; 2(3):21-31. Disponible en: <https://ijapsa.com/published-papers/volume-2/issue-3/antibacterial-and-phtyochemical-analysis-on-brassica-oleracea-var-botrytis-linn.pdf>

ANEXOS

Anexo N°1 Matriz de Consistencia

| EFECTO ANTIBACTERIANO, <i>IN VITRO</i> , DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(COL MORADA) EN CEPAS DE <i>Shigella flexneri</i> | | | | | | |
|---|--|--|--|---|-------------------|---|
| PROBLEMAS GENERAL | OBJETIVOS GENERAL | HIPÓTESIS GENERAL | OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES | | METODOLOGÍA | INSTRUMENTOS |
| | | | VARIABLE INDEPENDIENTE | INDICADORES | TIPO | |
| ¿El extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) poseerá efecto antibacteriano en cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> ? | Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) sobre cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> . | El extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. (col morada) posee efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> . | Extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(Col morada) | -Metabolitos secundarios -Concentración del extracto al 50 % -Concentración del extracto al 100%. | Experimental | Población: -10 pellas de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. x m2 -Cepas de <i>Shigella flexneri</i> Muestra: -1,5 Kg de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L -Placas petri con <i>Shigella flexneri</i> divididas en dos grupos según concentración: 50% y 100% Técnica: -método Kirby-Bauer Instrumentos -Ficha de recolección de datos -Instrumento de medición de precisión vernier |
| ESPECÍFICOS | ESPECÍFICOS | ESPECÍFICOS | VARIABLE DEPENDIENTE | INDICADORES | NIVEL | |
| 1.-¿Qué tipos de metabolitos estarán presentes en el extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada)? | 1.-Determinar los tipos de metabolitos presentes en el extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada). | 1.-El extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) tiene presencia de diversos tipos de metabolitos. | Efecto antibacteriano en <i>Shigella flexneri</i> | -Medida de los halos de inhibición(inhibición de crecimiento) unidad de medida mm de diámetro. | Transversal | |
| 2.-¿Cómo influirán las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) en el efecto antibacteriano en cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> ? | 2.-Determinar si las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> . | 2.-Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) influyen positivamente en el efecto antibacteriano en cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> . | | | DISEÑO | |
| 3.-¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) comparado con Gentamicina 10µg/mL en cepas de <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> ? | 3.-Comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) con el efecto antibacteriano de Gentamicina 10µg/mL sobre cepas <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> . | 3.-El extracto etanólico de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.(col morada) tiene mayor efecto antibacteriano comparado con Gentamicina 10µg/mL sobre cepas <i>Shigella flexneri</i> , <i>in vitro</i> . | | | Quasiexperimental | |

Anexo N° 2 Certificación Taxonómica de *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (COL MORADA)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 177-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (repollo) recibida de **Alexandra Estefany CRUZAT CAMPOS**, estudiante de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica Nutrición, ha sido estudiada y clasificada como: ***Brassica oleracea* var. *capitata* L.**, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: CAPPARALES

FAMILIA: BRASSICACEAE

GENERO: *Brassica*

ESPECIE: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.,

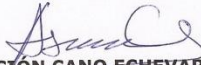
Nombre vulgar: "col morada"

Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios

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

Lima, 22 de mayo de 2018




Mag. ASUNCIÓN CANO-ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: museo@unmsm.edu.pe
<http://museo@unmsm.edu.pe>

Anexo N° 3 Protocolo de Análisis de *Brassica oleracea* var. capitata L. (COL MORADA) - UNMSM



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOKOLO DE ANÁLISIS N.º00376-CPF-2018


ORDEN DE ANÁLISIS : 04993/2018
SOLICITADO POR : ALEXANDRA CRUZAT CAMPOS
MUESTRA : COL
NÚMERO DE LOTE : ---
CANTIDAD : 01 frasco x 10mL
FECHA DE RECEPCIÓN : 24 de Julio del 2018
FECHA DE FABRICACIÓN : ---
FECHA DE VENCIMIENTO : ---

| Microorganismo | DIAMETROS DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS | | | |
|--------------------------|---------------------------------------|--------|-------------|---------|
| | Gentamicina | Blanco | Col 100% | Col 50% |
| <i>Shigella flexneri</i> | 18 | 6 | 10 | 6 |
| | 18 | 6 | 9 | 6 |
| | 19 | 6 | 9 | 6 |
| | | | | |

*El tamaño de los pocillos es de 6mm, por lo tanto cuando se reporta esta medida indica que no hubo formación de halo de inhibición.

*Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL

Lima, 17 de Agosto del 2018


QF. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification

N° BR232265



Anexo N° 4 Obtención del Material Vegetal

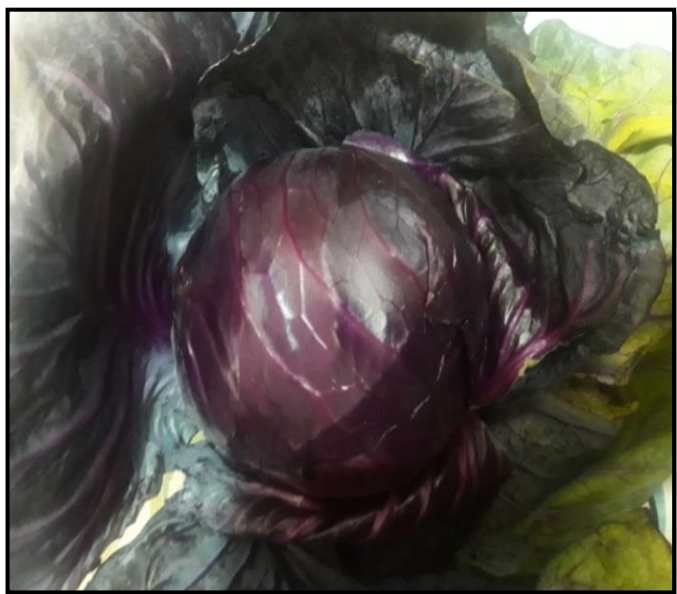
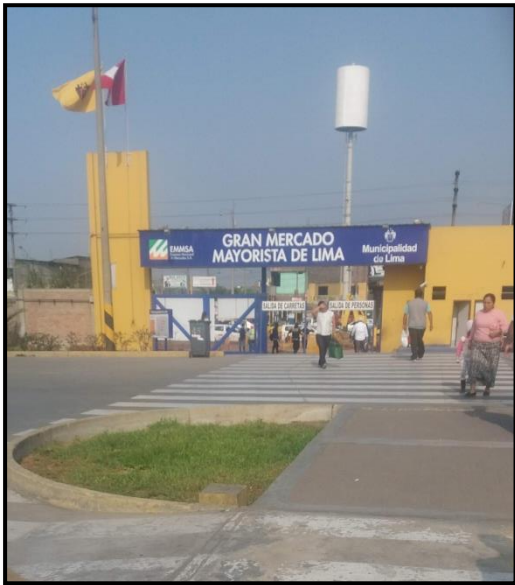


Figura N° 8: Obtención de la muestra de *Brassica oleracea* var. capitata L. (col morada), Gran Mercado Mayorista de Santa Anita, distrito de Santa Anita en la región de Lima.

Anexo N° 5 Obtención del Extracto Etanólico



Figura N° 9: Selección, molienda y pesado de la muestra vegetal

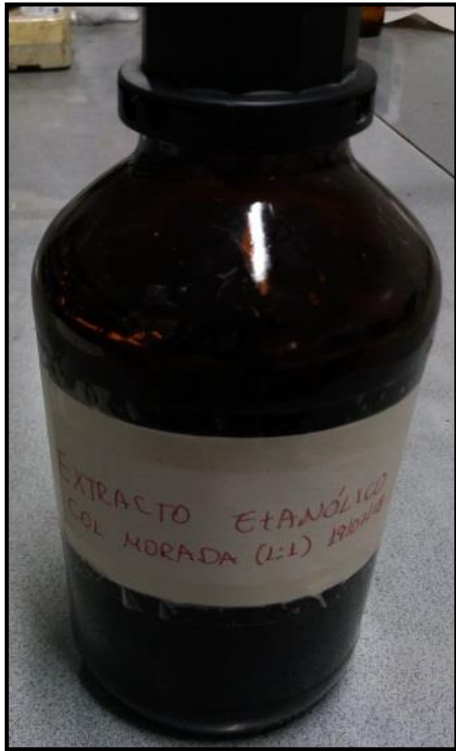


Figura N°10: Maceración, filtrado por bomba al vacío, secado en estufa y almacenamiento(en un vial de vidrio).

Anexo N° 6 Prueba de solubilidad

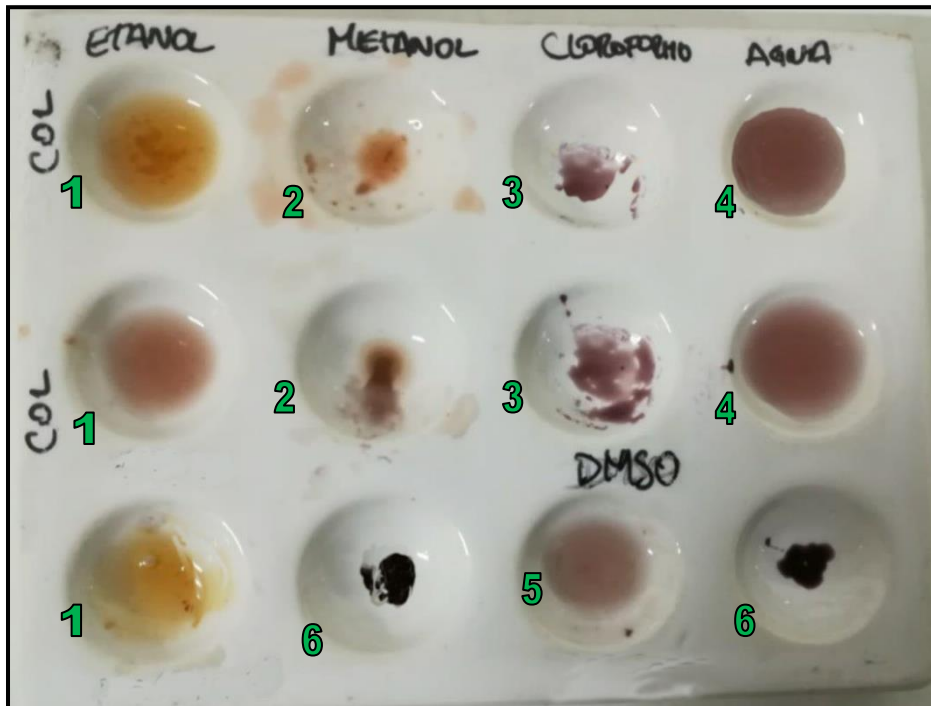


Figura N°11: Prueba de solubilidad

- (1) Etanol
- (2) Metanol
- (3) Cloroformo
- (4) Agua Destilada
- (5) Dimetilsulfóxido /DMSO
- (6) Muestra /Extracto

Anexo N°7 Marcha fitoquímica



Determinación de flavonoides

Determinación de compuestos fenólicos y taninos

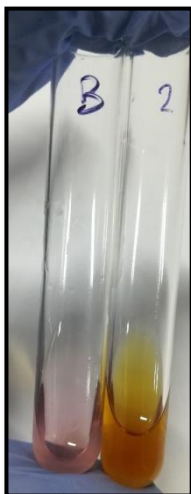


Reacción de Shinoda

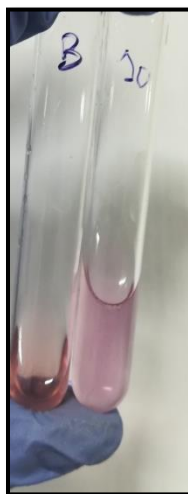


Reacción de FeCl₃

Determinación de alcaloides



Reacción de Dragendorff



Reacción de Mayer



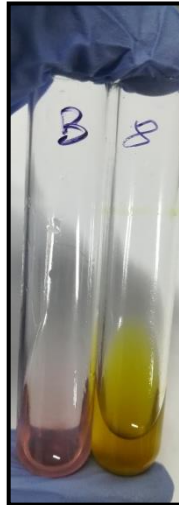
Reacción de Wagner

Determinación de lactonas insaturadas

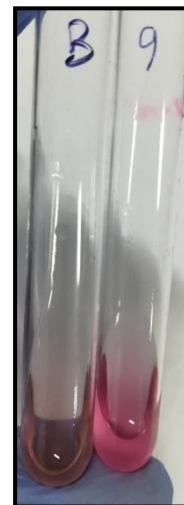


Reacción de Baljet

Determinación de núcleo esteroide o triterpenoide



Reacción de Kedde



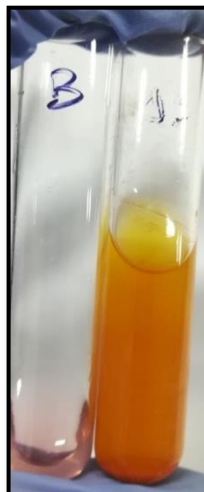
Reacción de Liebermann-Burchard

Determinación de saponinas



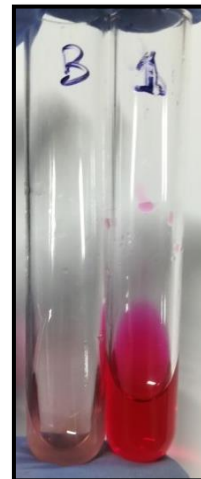
+ H₂O

Determinación de azúcares reductores



Prueba de Fehling

Determinación de antocianinas



+ HCl

Determinación de aminoácidos



Ensayo de Ninhidrina

Anexo N°8 Cromatografía en capa fina analítica

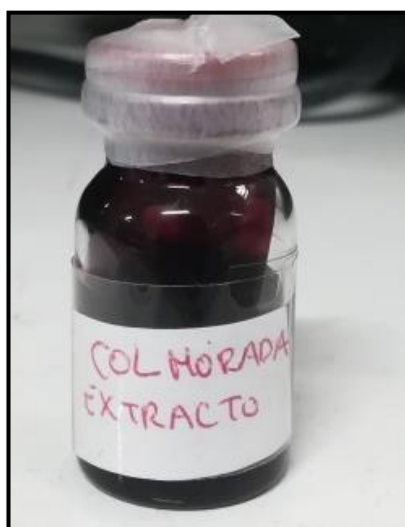
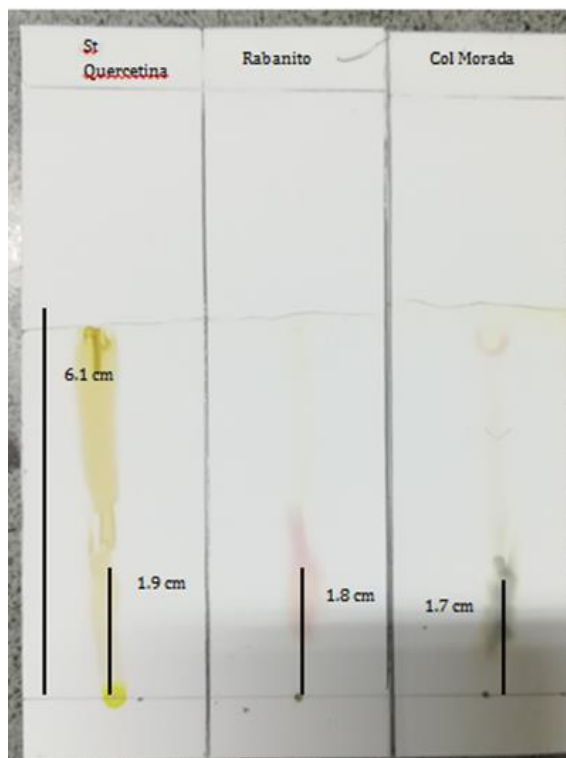
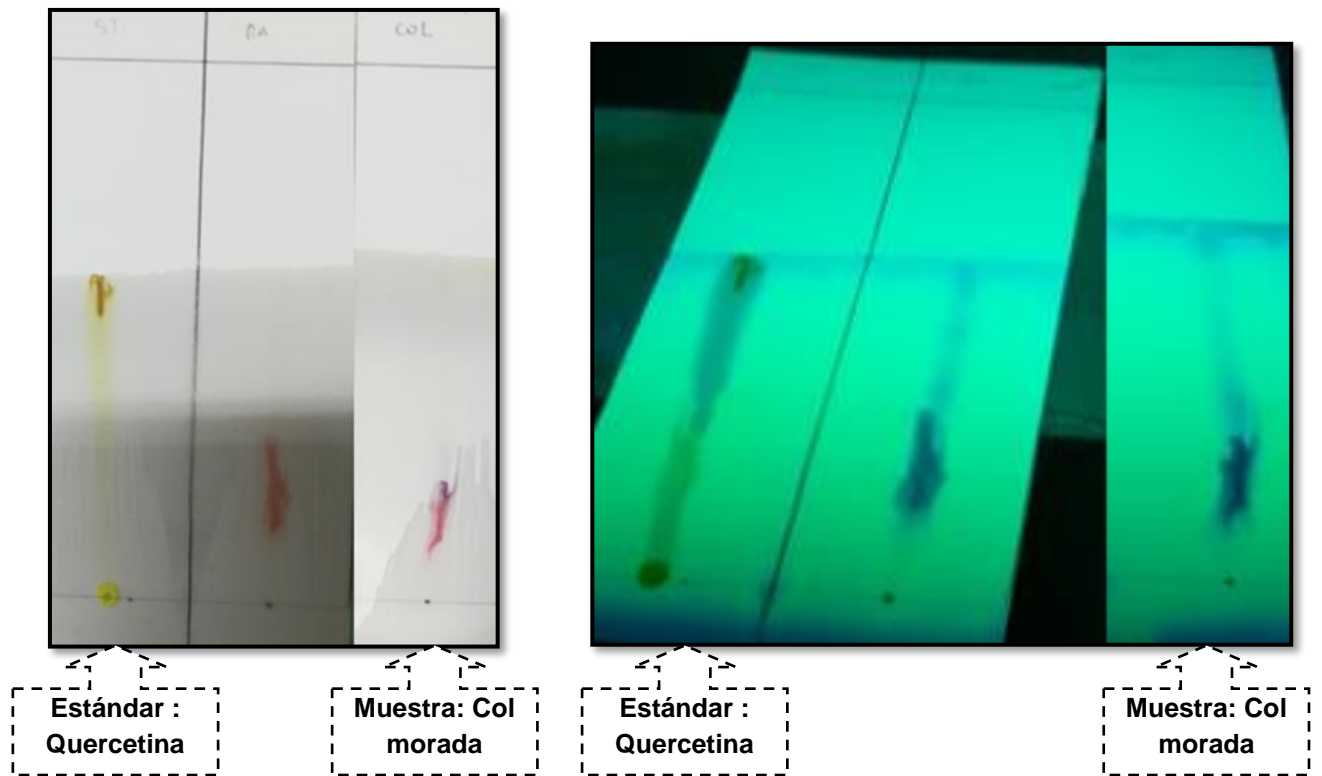


Figura N°12: Fase móvil n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5) y fase estacionaria (placa cromatográfica de Silica gel 60F 10 cm x 10 cm) de la cromatografía en capa fina analítica



Rf estándar: $1.9/6.1 = 0.31$
 Rf Col Morada: $1.7/6.1 = 0.28$
 Conclusión: Positivo para flavonoides

Figura N°13: Visualización en la cámara Uv 254 nm, para observar el recorrido del estándar con las muestra problema y se calculó el Rf (factor de retención) de las muestras.

Anexo N°9 Análisis Microbiológico

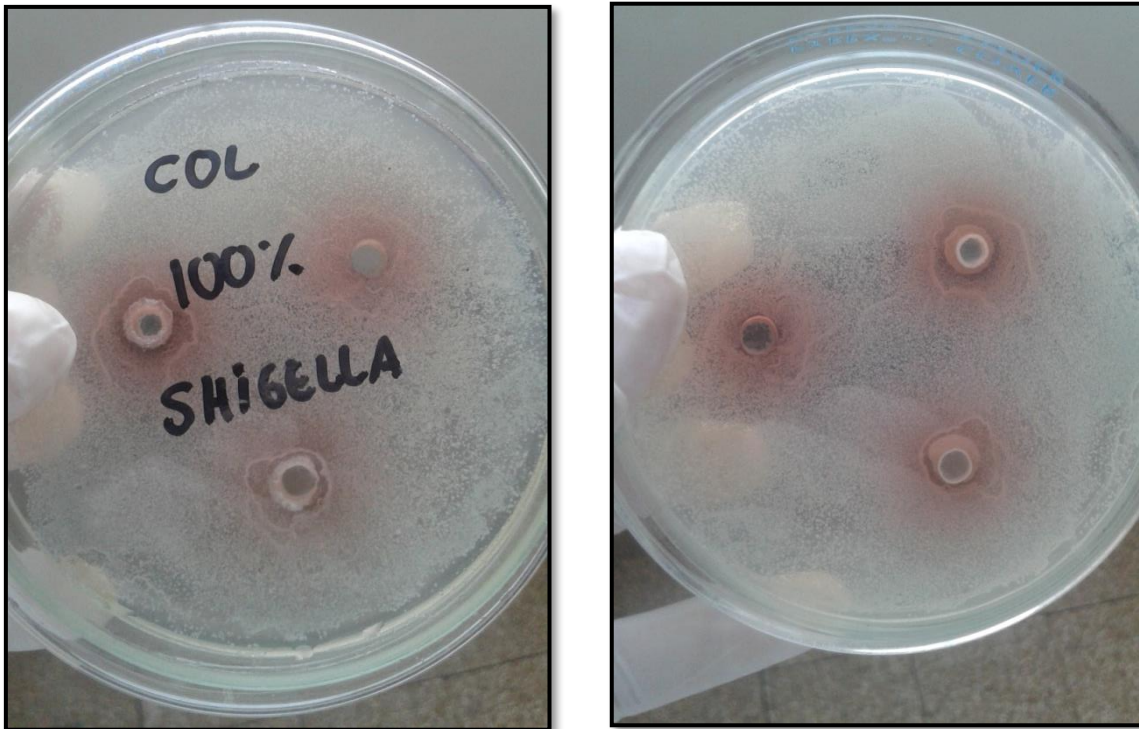


Figura N°14: Los halos de inhibición en concentración del extracto al 100%: Disco N° 1 (10 mm), Disco N° 2 (9mm) y Disco N° 3 (9mm).



Figura N°15: Los halos de inhibición en concentración del extracto al 50%: Disco N° 1 (6mm), Disco N° 2 (6mm) y Disco N° 3 (6mm).

Anexo N°10 Ficha de Recolección de Datos

Instrumento de recolección de datos :

“EFECTO ANTIBACTERIANO, *IN VITRO*, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Brassica oleracea* var. capitata L. (COL MORADA) EN CEPAS DE *Shigella flexneri*”

| EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. (COL MORADA) | | | | |
|---|---|--|-----------------|------|
| Grupos / N° de placa | Control positivo Gentamicina 10ug | Control Negativo Alcohol Etílico 96° (blanco) | Concentraciones | |
| | | | 50% | 100% |
| Halos de Inhibición (mm) | | | | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |

El tamaño de los pocillos es de 6mm, por lo tanto cuando se reporta esta medida indica que no hubo formación de halo de inhibición.

Concentración de inóculo 1×10^8 UFC (unidades formadoras de Colonias)/mL.

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE BRASSICA OLERACEA VAR. CAPITATA L. (COL MORADA) EN CEPAS DE SHIGELLA FLEXNERI

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Skarbø, Kristine. "Multiple trends in interspecific crop diversity: a longitudinal case study from the Ecuadorian Andes", Genetic Resources and Crop Evolution, 2015. Publicación | 2% |
| 2 | www.fcb.uanl.mx Fuente de Internet | 1% |
| 3 | repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 4 | alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet | 1% |
| 5 | www.repositorioacademico.usmp.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 6 | www.redalyc.org Fuente de Internet | 1% |
| 7 | documents.mx Fuente de Internet | 1% |

| | | |
|----|--|-----|
| 8 | tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 9 | www.alimentos hoy.acta.org.co Fuente de Internet | 1% |
| 10 | dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet | 1% |
| 11 | Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante | 1% |
| 12 | repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 13 | biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet | <1% |
| 14 | Submitted to Universidad Andina del Cusco Trabajo del estudiante | <1% |
| 15 | jiarm.com Fuente de Internet | <1% |
| 16 | www.unav.edu Fuente de Internet | <1% |
| 17 | cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 18 | repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 19 | repositorio.unan.edu.ni | |

| | | |
|----|--|-----|
| | Fuente de Internet | <1% |
| 20 | www.chapingo.mx Fuente de Internet | <1% |
| 21 | uvadoc.uva.es Fuente de Internet | <1% |
| 22 | ijrap.net Fuente de Internet | <1% |
| 23 | Submitted to Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador Trabajo del estudiante | <1% |
| 24 | Submitted to Universidad Nacional San Agustín Trabajo del estudiante | <1% |
| 25 | dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 26 | 2fwww.redalyc.org Fuente de Internet | <1% |
| 27 | repositorio.upagu.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 28 | www.saludtab.gob.mx Fuente de Internet | <1% |
| 29 | www.ars.usda.gov Fuente de Internet | <1% |

www.researchgate.net

30 Fuente de Internet <1%

31 repositorio.ufsm.br Fuente de Internet <1%

32 Submitted to Monash University Trabajo del estudiante <1%

33 www.monografias.com Fuente de Internet <1%

34 repositorio.unh.edu.pe Fuente de Internet <1%

35 www.phytojournal.com Fuente de Internet <1%

36 docplayer.es Fuente de Internet <1%

37 repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet <1%

38 bases.bireme.br Fuente de Internet <1%

39 Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante <1%

40 repositorio.unica.edu.pe Fuente de Internet <1%

bibliotecadigital.usb.edu.co

| | | |
|----|--|-----|
| 41 | Fuente de Internet | <1% |
| 42 | economia.unmsm.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 43 | dehesa.unex.es Fuente de Internet | <1% |
| 44 | repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 45 | www.imedpub.com Fuente de Internet | <1% |
| 46 | real.mtak.hu Fuente de Internet | <1% |
| 47 | www.mdpi.com Fuente de Internet | <1% |
| 48 | Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador Trabajo del estudiante | <1% |
| 49 | ijapsa.com Fuente de Internet | <1% |
| 50 | Submitted to University of Portsmouth Trabajo del estudiante | <1% |
| 51 | Submitted to University of Birmingham Trabajo del estudiante | <1% |

www.curn.edu.co

52

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

< 20 words

Excluir bibliografía

Apagado