

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua- León

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Farmacia.



Evaluación de Actividad Antimicrobiana de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León a través del Método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) realizado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Unan-León.

Tesis para optar al Título de Licenciado Químico farmacéutico:

Autores:

Br. Estela del Carmen Mantilla Díaz

Br. Daysis Elizabeth Mayorga Ortiz.

Br. Keyla José Medrano López.

Tutor:

Msc. Fernando Emilio Baca Escoto.

Diciembre 2013

“A la libertad por la Universidad!”

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis A:

- ⊕ Dios, por darnos la oportunidad de vivir y por estar con nosotras en cada paso que damos, por fortalecer nuestro corazón e iluminar nuestra mente y por haber puesto en el camino a aquellas personas que han sido soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.
- ⊕ Nuestros padres, quiénes nos dieron la vida, por creer en nosotras, por habernos acompañado a lo largo del camino, brindándonos la fuerza necesaria para continuar y sobre todo por darnos una carrera para nuestro futuro.
- ⊕ Nuestra familia y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de ésta tesis, por habernos apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante.
- ⊕ Msc. Fernando Emilio Baca Escoto, por su apoyo incondicional y tiempo invertido para la realización de éste importante estudio.

AGRADECIMIENTO

- ⊕ Primeramente agradecemos éste logro y toda nuestra carrera universitaria a Dios, amparo, fortaleza y fuente de inspiración en nuestros momentos de angustia, dedicación, alegrías y tristezas que caracterizaron el transitar por este camino que hoy culmina.
- ⊕ A nuestros Padres, que son los pilares más importantes de nuestras vidas, les agradecemos su amor, comprensión y sacrificio. Sus consejos, experiencias y ejemplos; que hicieron de nosotras unas mujeres profesionales, emprendedoras, decididas, con valores firmes y arraigados.
- ⊕ A nuestras familias en general, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre nos han brindado para salir adelante.
- ⊕ A nuestro tutor, Msc. Fernando Emilio Baca Escoto, quien nos orientó en todo momento en la realización de este proyecto que enmarca el último escalón hacia nuestro futuro, por todas las enseñanzas otorgadas, por su apoyo, cariño y confianza depositada en nosotras.
- ⊕ A Sra. Gladys Rojas, Sr. David Espinoza, Sr. Ernesto Piura y a todos nuestros profesores, a quienes estimamos profundamente y consideramos un ejemplo a seguir. A ellos agradecemos los conocimientos transmitidos, el estímulo, la confianza y disponibilidad.
- ⊕ A nuestra alma mater la Universidad, por permitirnos crecer en todos los aspectos como persona y por darnos la gran oportunidad de encontrar nuestro lugar en el mundo en esta profesión como Químicosfarmacéuticos, la cual ejerceremos honrosamente.

Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Planteamiento del Problema.....	3
3.	Objetivos.....	4
4.	Marco Teórico.....	5
	4.1 Cola de Alacrán.....	5
	4.1.1 Taxonomía.....	5
	4.1.2 Descripción.....	6
	4.1.3 Origen y Distribución.....	6
	4.1.4 Química.....	6
	4.1.5 Actividad Farmacológica.....	7
	4.1.6 Usos.....	7
	4.1.7 Toxicidad.	7
	4.2 Flor de Avispa.....	7
	4.2.1 Taxonomía.....	7
	4.2.2 Descripción.....	8
	4.2.3 Origen y Distribución.....	8
	4.2.4 Química.....	8
	4.2.5 Actividad Farmacológica.....	8
	4.2.6 Usos.....	9
	4.2.7 Toxicidad.	9
	4.3 Guayaba.....	9
	4.3.1 Taxonomía.....	9
	4.3.2 Descripción.....	9
	4.3.3 Origen y Distribución.....	10
	4.3.4 Química.....	10
	4.3.5 Actividad Farmacológica.....	10

4.3.6	Usos.....	10
4.3.7	Toxicidad.....	11
4.4	Palma.....	11
4.4.1	Taxonomía.....	11
4.4.2	Descripción.....	11
4.4.3	Origen y Distribución.....	12
4.4.4	Química.....	12
4.4.5	Actividad Farmacológica.....	12
4.4.6	Usos.....	13
4.4.7	Toxicidad.	13
4.5	Plátano Verde.....	13
4.5.1	Taxonomía.....	13
4.5.2	Descripción.....	14
4.5.3	Origen y Distribución.....	14
4.5.4	Química.....	14
4.5.5	Actividad Farmacológica.....	14
4.5.6	Usos.....	15
4.5.7	Toxicidad.....	15
5.	Microorganismos Patógenos más comunes.....	15
5.1	Gram (+).....	15
5.1.1	<i>Estafilococo Aureus</i>	16
5.1.1.1	Clínica.....	16
5.1.1.2	Antibiótico contra <i>Estafilococo Aureus</i>	17
6.	Espectrofotómetro UV-VIS.....	19
6.1	Fundamento.....	19
6.2	Partes del Espectrofotómetro UV-VIS.....	20
7.	Ensayo MTT.....	20
7.1	Fundamento.....	21
8.	Hipótesis.....	22

9.	Diseño Metodológico.....	23
10.	Resultados y Análisis.....	31
11.	Conclusión.....	47
12.	Recomendaciones.....	48
13.	Bibliografía.....	49
14.	Anexos.....	54

Abreviaturas:

- ◆ **A:** Absorbancia
- ◆ **Ai:** Absorbancia Inicial
- ◆ **Af:** Absorbancia Final.
- ◆ **°C:** Grados centígrados.
- ◆ **Cm:** Centímetros.
- ◆ **CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria.
- ◆ **C/U:** Cada uno
- ◆ **DL₅₀:** Dosis Letal al 50 %.
- ◆ **DMSO:** Dimetilsulfoxido.
- ◆ **M:** Metros.
- ◆ **Mg/kg:** miligramos/kilogramos.
- ◆ **ml:** mililitro.
- ◆ **mm:** milímetro.
- ◆ **mcg:** microgramos.
- ◆ **MO:** microorganismo.
- ◆ **MSSA:** *Staphylococcus aureus* susceptible a la Meticilina.
- ◆ **MRSA:** *Staphylococcus Aureus* resistente a la Meticilina.
- ◆ **MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio.
- ◆ **NaCl:** Cloruro de Sodio.
- ◆ **NK:** Natural Killer.
- ◆ **Nm:** Nanómetros.
- ◆ **Ppm:** Parte por millón.
- ◆ **Pl:** Picolitros.
- ◆ **Sln:** Solución
- ◆ **T/E:** Tubo de ensayo

- ◆ **Um:** micrómetros.
- ◆ **UFC:** Unidad Formadoras de Colonia.
- ◆ **μl:** Microlitro.

Glosario:

- ◆ **Anaerobiosis:** Capacidad que poseen algunos microorganismos de vivir en forma anaerobio.
- ◆ **Antiescorbútica:** Eficaz contra el escorbuto.
- ◆ **Antifúngico:** Relativo a una sustancia que destruye a los hongos o que inhibe su crecimiento o reproducción.
- ◆ **Ápice:** Tejido meristemático que ocupa la parte terminal del tronco, raíces y ramas.
- ◆ **Astenia:** Falta de fuerza, agotamiento tanto físico como psíquico.
- ◆ **Astringente:** Sustancia que provoca una contracción fibrilar de los tejidos orgánicos
- ◆ **Cataplasma:** Masa plástica y plana que contiene productos medicinales y que se aplica como calmante o emoliente.
- ◆ **Colitis:** Inflamación del colón.
- ◆ **Copras:** Médula del coco de la palma usada para la obtención de aceite.
- ◆ **Decocción:** Producto que se obtiene por el cocimiento en agua de sustancia vegetales o minerales.
- ◆ **Dismenorrea:** Menstruación dolorosa o difícil.
- ◆ **Eczemas:** Afección cutánea inflamatoria con aparición de vesícula, infiltración, exudación de un líquido sedoso y desarrollo de escamas y costras.
- ◆ **Empacho:** Indigestión de la comida.
- ◆ **Forúnculos:** Infección, necrosis del conjunto formado por el folículo piloso, glándulas sebáceas y tejidos conjuntivo circundante, muy doloroso.
- ◆ **Fluxión:** (Del lat. *fluxio*, *-ōnis*).1. f. Acumulación patológica de líquidos en el organismo.2. f. Constipado de nariz.
- ◆ **Instilación:** Procedimiento terapéutico que consiste en introducir un líquido gota a gota, en una cavidad del organismo.

- ◆ **Mesodermo:** Tercera hoja, blastodérmicas que origina los sistema muscular y óseo, entre otros.
- ◆ **Nematicida:** Pesticidas químicos que se utilizan para matar nematodos.
- ◆ **Paludismo:** Enfermedad infecciosa producida por el *Plasmodium* y transmitido por la hembra del mosquito *Anopheles*, endémicas en los países tropicales.
- ◆ **Principio Activo:** Sustancia química producida en el metabolismo de la planta que tiene actividad farmacológica.
- ◆ **Psoriasis:** Erupción cutánea en forma de placas rojas cubiertas de escamas.
- ◆ **Sahumerios:** Humo que produce una materia aromática, que se hecha en el fuego.
- ◆ **Sarcoma:** Tumor maligno derivado de estructuras mesenquimales.
- ◆ **Taquicardia:** Aumento de la frecuencia cardiaca superior a 100 latidos por minutos.
- ◆ **Tiña:** Grupo de afecciones parasitarias, cutáneas producidas por hongos, caracterizadas por la aparición de pequeñas erupciones rojas acompañada de picazón.

Introducción

Las bacterias juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el hombre: la presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, aunque algunos gérmenes son patógenos. Análogamente tienen un papel importante en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en la investigación. (León, A., 2006).

De acuerdo con el diagnóstico principal de ingreso según grupos de edades del Hospital Oscar Danilo Rosales Arguello (HEODRA), en su reporte anual del año 2012 encontró que los más afectados por enfermedades bacterianas y enfermedades del Sistema Respiratorio, son los pacientes pediátricos y geriátricos. (Departamento de Admisión del HEODRA., 2013).

Nicaragua es un país megadiverso, que conserva una gran cantidad de ecosistemas y especies de plantas vasculares de gran valor etnobotánico, por lo que el uso de plantas medicinales se ha consolidado como una alternativa viable en salud, pues contribuye de forma importante a la solución de problemas relacionados a ella (Mayorga, V., Gutiérrez, M., Rueda, R., 2007); pudiéndose **utilizar de una misma planta las hojas, las flores, la raíz, el tallo, los frutos, además cada planta puede tener diferentes aplicaciones o propiedades curativas.** (Botánica., 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce y estimula el gran valor de las plantas medicinales en la atención primaria de millones de personas. Aunque muchos fármacos sintéticos han desplazado a las plantas, aún así, 30% de los medicamentos son obtenidos en forma directa o indirecta de los vegetales. Por ser plantas medicinales deben tener utilidad terapéutica, cabe destacar que siendo sustancias biológicamente activas, con eficacia terapéutica, también poseen por extensión efectos tóxicos.

Según un estudio realizado en la Facultad de Ciencias Químicas de La UNAN-León sobre la "Evaluación de la actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* de 59 especies de plantas que fueron colectadas en la biodiversidad vegetal de la estación biológica Bartola-Río San Juan", concluyó que una especie mostró actividad antimicrobiana parcial (*Eugenia* sp. Familia Myrtaceae) y otra especie mostró actividad

antimicrobiana total (*Talisia Nervosa*, familia Sapindaceae) a través del bioensayo antimicrobiano de Mitcher (Herrera. G, Sotelo. A., 1999).

En el 2000, se realizó un estudio sobre la "Evaluación de la actividad antimicrobiana de 99 especies de plantas colectadas de la biodiversidad vegetal de las estaciones biológicas Bartola-San Juan y La Lupe-río San Juan con cepas de microorganismos *Shigella*, *Dysenteriae* y *Estaphylococcus aureus*", el cual concluyó que dos especies presentaron actividad antimicrobiana total frente a microorganismos *Estaphylococcus aureus* a 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a una concentración de 1000 µg/ml posteriormente se realizaron diluciones a concentraciones menores para determinar la CIM resultando así las especies *Dycterix oleifera benth* con una concentración de 900 ug/ml y *Otova novogranantensis mold* con una concentración de 60 µm/ml a través del método de Mitscher (Guido. E, Hernández. M, Nuñez. K., 2000).

Siendo de mucha frecuencia el uso de plantas medicinales por parte de nuestra población para tratar ciertas enfermedades infecciosas, usualmente en aquellos lugares donde no hay acceso a atención asistencial; siendo la Herbolología Médica un aspecto de gran relevancia para mantener la salud de los mismos. En nuestra facultad se cuenta con estudios de antioxidantes y antimicrobianos en especies vegetales utilizando diferentes métodos, sin embargo no existen estudios aplicando el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio); el presente trabajo pretende evaluar la actividad antimicrobiana de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León frente a *Estafilococo aureus* de importancia médica, como una alternativa natural al tratamiento tradicional de las enfermedades microbianas a través de éste método y así de esta manera contribuir a las futuras generaciones como base para estudios posteriores.

Planteamiento del problema:

La medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, que se utilizan para prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales que ha sido adoptada por un sinnúmero de poblaciones; sin embargo son escasos los datos resultantes de ensayos científicos destinados a evaluar la seguridad y eficacia de los productos y las prácticas de la medicina tradicional, es por ello que nos planteamos lo siguiente: ¿Tendrán las 5 especies vegetales actividad antimicrobiana?

Objetivo General:

- ✚ Evaluar actividad antimicrobiana de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León a través del método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) realizado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Unan-León.

Objetivos Específicos:

- ✚ Preparar extractos alcohólicos de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León.
- ✚ Determinar la CMI de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León a través del Método MTT contra a *Staphylococcus aureus*.

Marco teórico

La biodiversidad es un buen indicador ecológico, ya que expresa la proporción existente entre el número de seres vivos de un ecosistema y el número de especies diferentes a las que pertenece, es decir las riquezas de especies diferentes que pueblan la tierra (Gran Enciclopedia Sapiens Temática., 2000).

La flora y fauna de Nicaragua son muy abundantes, tal como corresponde a todo país tropical, conteniendo una cantidad innumerables de plantas en todo su territorio. La flora y fauna de Nicaragua pertenece a la *Región Neotropical*, amplia área que se extiende desde México hasta la Argentina (Incer, J., 2000).

El ser humano ha estado sobre la tierra aproximadamente dos millones de años. Durante 99% de este lapso ha vivido como recolector-cazador, hace 10 mil años comenzó a domesticar plantas y animales y lleva al menos de 200 años en una sociedad industrial. Esta aseveración en relación con las plantas medicinales, es concordante con las actividades que se han realizado alrededor de la domesticación de plantas. Una preocupación primordial del ser humano es el mantener su salud en buen estado, es evidente entonces, que el uso y manipuleo de plantas medicinales se remonta al momento mismo del surgimiento del ser humano sobre la tierra. (Ocampo S, Rafael., 1994).

Una de las importancias de la biodiversidad es lo que respecta a la producción de medicamentos, que se obtienen de muchas plantas, algunas por lo demás venenosas (digitalina, quinina, curare, etc.). (Gran Enciclopedia Sapiens Temática., 2000).

Información Botánica, Etnomédica y Química de Especies Vegetales:

4.1 "Cola de Alacrán":

4.1.1 Taxonomía:

- ✓ **Nombre Científico:** *Heliotropium angiospermum* (Vibrans, H., 2011).
- ✓ **Familia:** Boraginaceae (Vibrans, H., 2011).
- ✓ **Género:** *Heliotropium* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., 2009).
- ✓ **División:** Magnoliophyta (Vibrans, H., 2011).

- ✓ **Clase:** Magnoliopsida (dicotiledóneas) (Vibrans, H., 2011).
- ✓ **Subclase:** Asteridae (Vibrans, H., 2011).
- ✓ **Orden:** Lamiales. (Vibrans, H., 2011).
- ✓ **Sinonimia popular:** Cola de alacrán, rabo de mico, Alancrancillo, yerba del espasmo, Cola de mono, Rabo de alacrán. (Vibrans, H., 2011).
- ✓ **Sinonimia botánica:** *Cerithe lanceolata*, *Helitropium humile* Lam., *H. lancifolium*, *H. oblongifolium*, *H. parviflorum* L., *H. rugosum* . (Vibrans, H., 2011).

4.1.2 Descripción:

Hierba o subarbusto, anual o perenne, erecto de 15 a 80 cm de alto, ocasionalmente hasta 2 m. Hojas Alternas o algunas opuestas, pecioladas, ovadas (con forma de huevo), elípticas a lanceoladas (con forma de lanza), Flores: Lóbulos del cáliz lanceolados fruto fuertemente comprimido, bilobado, de 2 a 3 mm de grueso y 1 a 2 mm de alto, escasamente a muy rugoso, densamente cubierto por vesículas pequeñas e infladas, clusas (unidad que integra al fruto, nuececilla) 2, cada una con 2 semillas, la única cara ventral con una cavidad central grande, pedicelos en el fruto de 1 mm de largo, insertos cada 1.2 a 3 mm (Vibrans, H., 2011).

4.1.3 Origen y Distribución:

Esta planta es originaria del sur de Estados Unidos de América, Chile y Bolivia. Habita en climas cálido y semicálido desde el nivel del mar hasta los 738 m. Está presente en áreas de vegetación perturbada y crece a orillas de caminos, asociada a bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, además de matorral xerófilo (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., 2009).

4.1.4 Química:

Esta planta se caracteriza por la presencia de alcaloides. De la planta completa se han aislado los alcaloides de pirrolizidina lindelofidina, hidroximetil-1-2-epoxi-pirrolizidina, retronecina, supinidina y tachelantamidina. De la hoja, los alcaloides espermidina, espermina, y putrecina, y de la inflorescencia, sólo los dos primeros. En el tallo y las hojas se han detectado la presencia de alcaloides de pirrolizidina. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., 2009)

4.1.5 Actividad farmacológica:

El extracto acuoso obtenido de hojas con tallos presentó un ligero efecto estimulante en tejido de útero aislado de rata. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., 2009)

4.1.6 Usos:

Es común su uso en el tratamiento de padecimientos del aparato digestivo, como colitis, diarrea, empacho o gastroenteritis. Con mayor frecuencia se le emplea para curar la disentería. Se recomienda tomar un té preparado con las hojas de la planta. Este mismo remedio se ocupa cuando hay flujo de mujeres a causa de que duran mucho con la ropa mojada puesta, en este caso, el té se bebe en ayunas. Además, la infusión elaborada con la raíz sirve para curar el "empacho". Para sanar los granos del cuerpo se toman baños o lavados locales, con el cocimiento de las hojas. Por otro lado, se menciona útil contra afecciones de tipo respiratorio como gripe y tos, y en casos de picadura de alacrán e inflamaciones (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., 2009)

4.1.7 Toxicidad:

Es una planta tóxica (Vibrans, H., 2011). Se reporta en la literatura, que en Barbados algunos niños que tomaron dosis altas de la decocción de la planta, se envenenaron causándoles la muerte. En un ensayo realizado en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América, se observó la aparición de sarcomas en 10 de 4 ratas, en el sitio donde se inyectó un extracto de la planta (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana., 2009).

4.2 “Flor de Avispa”:

4.2.1 Taxonomía:

- ✓ **Nombre Científico:** *Hibiscus rosa-sinensis*. (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Familia:** Malvaceae (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Género:** Hibiscus (Cruz, A., 2007).
- ✓ **División:** Magnoliophyta. (Kumar, A. & Singh, A., 2012).

- ✓ **Clase:** Magnoliopsida (Cruz, A., 2007).
- ✓ **Subclase:** Dilleniidae (Kumar, A. & Singh, A., 2012).
- ✓ **Orden:** Malvales (Cruz, A., 2007).
- ✓ **Sinonimia popular:** Nicaragua: Flor de avispas, Guadalupe: Rose Kayenn Haiti: choublak, Martinica: kokliko wouj (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Sinonimia botánica:** No se encuentran sinónimos para esta planta.

4.2.2 Descripción:

Arbustos de hasta 5m, hojas aovadas de 6-10cm, acuminadas, acerradas, bractéolas 6-7, lineares; cáliz acampanados, corola blanca, roja purpurea, amarilla o anaranjada. De tamaño variable tubo estaminal tan largo como los pétalos. Cápsula oblonga de casi 3 cm de diámetro (Germosén, L. R., 1998).

4.2.3 Origen y Distribución:

Originaria de África y cultivada en todos los trópicos del mundo (Germosén, L. R., 1998).

4.2.4 Química:

La flor contiene ácido cítrico, oxálico y tartálico, sacarosa, fructosa y glucosa. Los pétalos contienen antocianina y flavonoides derivados del kaempferol, de la cianidina así como quercetina. La presencia de alcaloide en la hoja y en tallo es controvertida, para la hoja se han reportado además lípidos alcanos, beta-sitosterol y el triterpenoide taraxeril (Germosén, L. R., 1998).

4.2.5 Actividad farmacológica:

El extracto etanólico (80%) de la planta entera no mostró actividad antiviral in vitro. El extracto etanólico (70%) de la hoja tiene actividad antipirética y antiinflamatoria en ratas administradas por vía intraperitoneal en dosis de 100mg/kg mientras que se constató actividad analgésica en el ratón al administrar por vía oral en dosis de 125mg/kg (Germosén, L. R., 1998).

4.2.6 Usos:

- ✓ Gripe: flor u hoja, infusión o decocción de 3 a 4 minutos por vía oral (Germosén, L. R., 1998).

4.2.7 Toxicidad:

LD₅₀ del extracto hidroetanólico de las partes aéreas es de un 1g/kg. LD₅₀ del extracto alcohólico (70%) de hojas administradas por vía intraperitoneal es de 9.533g/kg en ratón. Nuevos datos contemplados en NAPRALERT hasta 1994 confirman la actividad anticonceptiva femenina, antiespermatogénica masculina y embriotóxica para la flor (Germosén, L. R., 1998).

4.3 "Guayaba":

4.3.1 Taxonomía:

- ✓ **Nombre Científico:** *Psidium guajava* L (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Familia:** Myrtaceae (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Género:** *Psidium* (Rivadeneira, N., 2010).
- ✓ **División:** Magnoliophyta (Rivadeneira, N., 2010).
- ✓ **Clase:** Magnoliopsida (Rivadeneira, N., 2010).
- ✓ **Subclase:** Rosidae (Ruiz, N., 2010).
- ✓ **Orden:** Myrtales (Grijalva, A., 2006).
- ✓ **Sinonimia popular:** Nicaragua: Guayaba, Guayaba de Gusano. En Mayangna o Sumu: Burimak, en Miskitos: Sikra, Honduras: Guayabos, México: Guayaba Colorada, Guayaba China, Guayaba De Venado, Guayaba Peruana, Guayaba Perulera (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Sinonimia botánica:** *Psidium aromaticum* L, *Psidium pomiferum* blanco, *Psidium pyriferum* jacq, *Psidium sapidissimum* L (Germosén, L. R., 1998).

4.3.2 Descripción:

Arbustos o árbol pequeño, hasta 10 m de altura, hojas opuestas de 10cm de largo, ovaladas, flores blancas (Germosén, L. R., 1998).

4.3.3 Origen y Distribución:

Ampliamente distribuida, desde Florida hasta las zonas tropicales de Sudamérica, también en las Antillas; naturalizadas y cultivadas en los trópicos del viejo mundo (Germosén, L. R., 1998).

4.3.4 Química:

El fruto es rico en vitamina C además posee vitaminas b1 y b2, también se encuentran en las hojas y cáscaras, aceite esencial, flavonoides y alcoholes sesquiterpénicos y ácidos triterpenoides (Germosén, L. R., 1998).

4.3.5 Actividad farmacológica:

A las hojas de estas plantas le han sido estudiadas sus efectos sobre el sistema nervioso central, particularmente la actividad sedante. La actividad antidiarreica se atribuyen a las quercetinas presentes en las hojas y cortezas, que tiene una definitiva actividad antisecretoras en la liberación de acetilcolina, que no es reversible por naloxano; este efecto se debe al bloqueo de los canales de calcio o a la inhibición del sistema enzimático responsable de la síntesis de prostaglandinas, que se relaciona con la liberación de acetilcolina. Al fruto se le atribuye actividad abortiva (Germosén, L. R., 1998).

4.3.6 Usos:

Diarrea, en Cuba las hojas las usan como astringentes, para curar llagas, los leños para diarrea y los cogollos en los refriados. La raíz y las hojas fortalecen el estomago. En México la corteza se usa para la disentería y el fruto como digestivo. En Guatemala la decocción de hojas es para tratar afecciones digestivas, enfermedades dermatomucosas, diabetes, hemorragias, uretritis y refriados; por vía tópica se recomienda para tratar infecciones de la piel, asma y lenguas inflamadas. En Colombia las hojas se consideran estimulantes y antiespasmódicas (Germosén, L. R., 1998).

4.3.7 Toxicidad:

La quercetina libre presente en materiales vegetales puede pasar en 44% a la decocción y cuando alcanza una concentración de 800mg/kg de hoja seca provoca actividad mutagénica detectable sobre el Test de Ames, está considerada como uno de los mûgatenos y carcinogénicos naturales por excelencia su DL₅₀ se ha precisado en 161mg/kg administrada por vía oral en ratas (Germosén, L. R., 1998).

4.4 “Palma”:

4.4.1 Taxonomía:

- ✓ **Nombre Científico:** *Roystonea regia* (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Familia:** Arecaceae (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Género:** *Roystonea* (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **División:** Angiospermae (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Clase:** Liliopsida (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Subclase:** Arecidae (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Orden:** Arecales (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Especie:** *R. regia* (Vidal, M. 27/09/13).
- ✓ **Sinonimia popular:** Cuba: Palma real, Palma real cubana, Palma y palma criolla. Florida: Florida Royal palm (Vidal, M. 27/09/13).

4.4.2 Descripción:

Palmera monoica de tronco único, grueso en su base, liso, de color grisáceo, alcanzando 12-16 m. de altura y 50-60 cm. de diámetro. Hojas pinnadas, de 4-6 m. de longitud, con folíolos dispuestos en diferentes planos respecto al raquis, que es aquillado. Inflorescencias que nacen de debajo del capitel, muy ramificadas, con flores blancas, aromáticas. Frutos de hasta 1.2 cm. de diámetro, rojizo-purpúreos. Palmera monoica de tronco único, grueso en su base, liso, de color grisáceo, alcanzando 12-16 m. de altura y 50-60 cm. de diámetro. Hojas pinnadas, de 4-6 m. de longitud, con folíolos dispuestos en diferentes planos respecto al raquis, que es

aquillado. Inflorescencias que nacen de debajo del capitel, muy ramificadas, con flores blancas, aromáticas. Frutos de hasta 1.2 cm. de diámetro, rojizo-purpúreos. O.F.Cook (2006).

4.4.3 Origen y Distribución:

Es nativa del sur de la Florida, Belice, Bahamas, Puerto Rico, Cuba, Honduras y de algunas regiones de México y de las Islas Caimán. Hoy está plantada en todos los países de la zona intertropical y en varias regiones se ha asilvestrado. Vidal, M.(27/09/13).

Se encuentra en los llanos cultivados cubanos como principal remanente de los bosques semicaducos que eran la vegetación predominante en Cuba y también crece en terrenos montañosos fértiles y húmedos, siendo a veces más abundante en la vegetación secundaria. Al igual que en otros países americanos, la mayoría de estos árboles suele sembrarse en los cañaverales de azúcar a lo largo de los caminos de interiores para delimitar parcelas y servir de orientación por ser fáciles de distinguir a la distancia. Vidal, M.(27/09/13).

4.4.4 Química:

El aceite del fruto entero más rico en Ácidos Grasos insaturados. Esto pudiera deberse a que la proporción de ácidos insaturados sea mayor en la parte externa del fruto que en la semilla. (Perez, Y, Molina, V y Oyarzábal, A.2010)

4.4.5 Actividad farmacológica:

El extracto lipídico de los frutos de la *Roystonea regia*, que ejerce efectos beneficiosos sobre los principales factores causales de la hiperplasia prostática benigna, ya que es un inhibidor de la 5 α -reductasa prostática, un antagonista de los ADR- α_1 , un inhibidor de la 5-lipooxigenasa y tiene acción antioxidante, lo que evidencia un mecanismo multifactorial. (Perez, Y, Molina, V y Oyarzábal, A.2010)

4.4.6 Usos:

En Cuba se usa la raíz en cocimiento como diurético, para expulsar piedras en la orina, para el tratamiento de la diabetes, y se dice que tiene propiedades emolientes. (Vidal, M. 27/09/13).

4.4.7 Toxicidad:

Los estudios de toxicidad general y especial mostraron que el D-004 no es una sustancia tóxica. Un estudio clínico demostró que el tratamiento por vía oral con dosis únicas y repetidas de D-004 (320-960 mg/d) resultó bien tolerado, sin afectar los indicadores de seguridad. Un segundo estudio mostró que el tratamiento con D-004 durante 6 semanas tiene acción antioxidante sobre los lípidos y las proteínas en hombres sanos. El D-004 fue seguro y bien tolerado. (Perez, Y, Molina, V y Oyarzábal, A.2010)

4.5 "Plátano verde":

4.5.1 Taxonomía:

- ✓ **Nombre Científico:** *Musa x paradisiaca* (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Familia:** Musaceae (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Género:** Musa L (Hanan, A y Pichardo., 2012).
- ✓ **División:** Magnoliophyta (Hanan, A y Pichardo., 2012).
- ✓ **Clase:** Liliopsida (Hanan, A y Pichardo., 2012).
- ✓ **Subclase:** Zingiberidae. (Lecciones Hipertextuales de Botánica., 2006).
- ✓ **Orden:** Zingiberales (Hanan, A y Pichardo., 2012).
- ✓ **Sinonimia popular:** Haití: Bannan Matente, Martinica: Bannan pis, República Dominicana: rulo, plátano verde, macho (Germosén, L. R., 1998).
- ✓ **Sinonimia botánica:** *Musa sapientum* L, *Musa x paradisiaca sapientum* L., *Musa x sapientum* L (Hanan, A y Pichardo., 2012).

4.5.2 Descripción:

Plantas de 6 a 10 m estaloniífera. Hojas pecioladas de hasta 2 m, las bases de las hojas forman el fuerte de la planta, inflorescencia, recurvos-colgante de hasta 1.5 m. Flores blanco-amarillento de 3 a 3.8 cm, cáliz con 5 dientes, frutos cilíndricos de hasta 30 cm amarillo o verdoso al madurar (Germosén L. R., 1998).

4.5.3 Origen y Distribución:

Originaria de Asia, es cultivada en las regiones tropicales (Germosén, L. R., 1998).

4.5.4 Química:

La hoja es rica en ácidos orgánicos, cítricos, málicos, glutámicos, oxálico, pirúvico y succínico, triterpenoides tetracíclico fueron puestos en evidencias en la inflorescencia. La cascara y la pulpa del fruto contienen también serotonina y dopamina. El fruto contiene norepinefrina y en estado maduro es rico en calcio, hierro, magnesio y sodio, la planta entera contiene gran cantidad de taninos especialmente la savia en tallos (Germosén, L. R., 1998).

4.5.5 Actividad farmacológica:

La planta presenta actividad antimicrobiana. In vitro el extracto acuoso del fruto fresco a concentración 0.2 ml presentó actividad sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillos Stereothermophillus* y *Clostridium sporogenes*. El ácido cítrico es anticoagulante, el ácido málico es destoxicante, el ácido glutámico es tánico, el ácido oxálico es un agente reductor, el ácido succínico es diurético y expectorante.

Los taninos son un grupo de compuestos que colorean la queratina de la epidermis, efecto que puede ser favorable en el tratamiento de lesiones leucodérmicas, muestran actividad astringente y antiséptica apropiada para el tratamiento de la diarrea ya que impide la multiplicación intestinal del microorganismo, aceleran la depuración de las toxinas derivadas del metabolismo de los gérmenes y ellos mismos son resistente a la degradación por efecto de las bacterias causante de la afección. El ácido ascórbico es un tónico con propiedad antiescorbútica,

antioxidante, potencia la resistencia a las infecciones y los efectos de los flavonoides (Germosén, L. R., 1998).

4.5.6 Usos:

- ✓ Diarrea: Savia con sal, vía oral; pulpa del fruto, vía oral.
- ✓ Astenia, debilidad: pulpa del fruto, caldo con sal, pulpa del fruto cocida, vía oral.
- ✓ Llagas, herida: mesoderma del fruto, en aplicación savia de la cascara del fruto (mancha) en aplicación.
- ✓ Reumatismo: hoja calentada, en aplicación.
- ✓ Inflamación: hoja, decocción en baño (Germosén, L. R., 1998).

4.5.7 Toxicidad:

La hoja de la planta se emplea en la confección de alimentos de consumo humano por vía oral, la administración de látex o savia del tallo liofilizado no es toxica al ser humano, administración a dosis de hasta 120 mg/d (Germosén, L. R., 1998).

5. Microorganismo Patógeno Común

La microbiología sanitaria se ocupa fundamentalmente del estudio de los microorganismos que producen enfermedad, entre ellos bacterias, hongos, virus, protozoos, helmintos y artrópodos.

El pequeño tamaño, la transparencia que dificulta su observación y el desconocimiento de sus características metabólicas explican que el mundo microbiano estuviera asentado hasta hace poco en la ignorancia humana. Sencillos pero ingeniosos métodos han permitido conocer lo que hoy sabemos de las bacterias. Revisaremos la más habitual:

5.1 Microorganismo Gram (+):

Se conoce como **bacterias Gram Positivas** al grupo de bacterias que no posee una membrana externa capaz de proteger el **citoplasma bacteriano**, que tienen una capa gruesa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie. Entre otras cosas, se distinguen especialmente por teñirse de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram aplicada

en bacteriología para analizar muestras de laboratorio y es justamente esto último lo que explica su nombre de “**Gram positivas**”.

Durante una infección, el peptidoglicano puede interferir en el proceso de fagocitosis y estimular diversas respuestas en el sistema inmune, tales como procesos epirogénicos que, entre otras cosas, son los que inducen la aparición de la fiebre. (P, Fernando., 2013).

5.1.1 *Estafilococo aureus*

Pertenece a la familia Micrococcaceae en la que hay 20 especies diferentes, aunque el *Estafilococo aureus* es el que con mayor frecuencia causa infecciones en el ser humano; suele estar en la piel y en las membranas mucosas sin llegar a causar infección, pero cuando penetra en los tejidos como puede ser en el caso de una herida puede ocasionar una amplia gama de infecciones debido a su producción de toxinas.

5.1.1.1 Clínica:

El *Estafilococo aureus* causa enfermedad mediante sus toxinas, por la invasión y destrucción de los tejidos, lo que provoca otras enfermedades debido a la proliferación del *Estafilococo*. En ocasiones puede entrar en el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes, como el cerebro o los pulmones. (Montane L., 2011).

Las enfermedades cuya responsabilidad recae en el *Estafilococo aureus* son muy diversas, entre las más destacadas se pueden citar:

- ✓ Conjuntivitis.
- ✓ Artritis.
- ✓ Sinusitis.
- ✓ Meningitis.
- ✓ Otitis media.
- ✓ Mastoiditis.
- ✓ Orzuelos.
- ✓ Bronquitis.
- ✓ Neumonía estafilocócica primaria.

✓ Cistitis. (Montane L., 2011).

Hay muchos portadores del *Estafilococo aureus* que no cursan infección; de hecho se considera que entre el 20% y el 40% de los adultos sanos son portadores asintomáticos de la bacteria, lo que constituye un serio problema en cuanto a la transmisión de la enfermedad. El *Estafilococo aureus* es una bacteria muy resistente y longeva, permaneciendo en el aire o sobre objetos inanimados, aunque el contagio se produce mayormente de persona a persona. (Montane L., 2011).

5.1.1.2 Antibiótico de tratamiento

A pesar de que pueden establecerse diferencias específicas (origen, estructura química) sus características generales, como mecanismo de acción, espectro, y otras, permite describirlas como un solo grupo. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias grampositivas y gramnegativas. (Rodríguez, M y Gundian J., 2010)

Las cepas bacterianas que tienen concentraciones inhibitoras mínimas de tetraciclina (MIC) de 4µg/ml o menos, se consideran susceptibles, excepto *Haemophilus Influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, cuyos valores críticos de susceptibilidad (definido como el límite superior de la concentración) en el que las bacterias se consideran aun susceptibles a un fármaco particular son de 2 µg/ml o menos y *Neisseria gonorrhoea* con el valor crítico de 0.25 µg/ml o menos. Intrínsecamente las tetraciclinas son más activas contra microorganismo gram + que contra gram -, pero es frecuente la resistencia adquirida a ellas.

Concentración del antibiótico necesario para inhibir la proliferación del 90% de las cepas en µg/ml (Porcentaje de cepas susceptibles con la concentración clínicamente alcanzable del fármaco)

<i>Estafilococo aureus</i>		
	MSSA	MRSA
Tetraciclina	Menor o igual a 2 (95.7)	Menor o igual a 2 (93.4)

- ✓ Las cifras superiores indican las concentraciones del fármaco en µg/ml.
- ✓ Y los paréntesis por debajo de cada concentración del fármaco incluyen el % de cepas inhibidas en concentración de fármacos útiles en seres humanos. (Goodman y Gilman)

En las dosis habituales las tetraciclinas producen *in vitro* un efecto bacteriostático. Sin embargo, en altas concentraciones el efecto bactericida es francamente logrado. En general se observa bastante similitud *in vitro* que *in vivo*. (Rodríguez, M y Gundian J., 2010)

De manera práctica podemos resumir sus indicaciones de la siguiente forma; de elección: tularemia, brucelosis, cólera, rickettsiosis, actinomicosis, acné, enfermedades producidas por *Chlamydia spp.* y enfermedades producidas por *Mycoplasma spp.* (Rodríguez, M y Gundian J., 2010)

Infectivas: estafilococcias, meningitis, endocarditis, pericarditis, osteomielitis, artritis séptica, tuberculosis, leptospirosis y empiema. (Rodríguez, M y Gundian J., 2010)

Dentro de los gérmenes que más han sobresalido en este aspecto de la resistencia se encuentran *Staphylococcus*, *Streptococcus* (*pneumoniae*, *pyogenes*, *viridans*), gonococo, meningococo, *Haemophilus*, *Shigellas* y anaerobios; no obstante, la gran mayoría de estas cepas se mantienen sensibles a las tetraciclinas de segunda y tercera generación, incluso estas últimas se encuentran dentro del stock de antibióticos en la lucha contra las bacterias multirresistentes (*Staphylococcus aureus* meticillin-resistente, *Staphylococcus epidermidis*

meticillin-resistente y enterococo-vancomycin-resistente). (Morejón, M., Salup, R y Cué Manuel., 2011)

6. Espectrofotómetro.

Desde hace muchos años se ha usado el color como ayuda para reconocer las sustancias químicas; al reemplazar el ojo humano por otros detectores de radiación se puede estudiar la absorción de sustancias, no solamente en la zona del espectro visible, sino también en ultravioleta e infrarrojo. (Brunatti, C y Martín, A. 2009).

Se denomina espectrofotometría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda. (Brunatti, C y Martín, A. 2009).

La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía. (Brunatti, C y Martín, A. 2009).

La transmitancia y la absorbancia se miden en un instrumento llamado espectrofotómetro, la solución del analito se debe contener en algún recipiente transparente, tubo o celda. (Brunatti, C y Martín, A. 2009).

6.1 Fundamento:

Utiliza las propiedades de la luz y su interacción con otras sustancias, para determinar la naturaleza de las mismas. En general, la luz de una lámpara de características especiales es guiada a través de un dispositivo que selecciona y separa luz de una determinada longitud de onda y la hace pasar por una muestra. La intensidad de la luz que sale de la muestra es captada y comparada con la intensidad de la luz que incidió en la muestra y a partir de esto se calcula la transmitancia de la muestra, que depende de factores como la concentración de la sustancia. (Equipos de laboratorio, 2012)

6.2 Partes del Espectrofotómetro UV-VIS:

- ✓ Chasis.
- ✓ Porta cubeta.
- ✓ Selector de filtro.
- ✓ Selector de modo.
- ✓ Ajuste grueso.
- ✓ Selector de longitud de onda.
- ✓ Indicador de longitud de onda.
- ✓ Pantalla.
- ✓ Fuente de luz: ilumina la muestra, generalmente son lámparas de tungsteno o de xenón.
- ✓ Monocromador: aísla las radiaciones de longitud de onda deseada. Se usa para obtener luz monocromática.
- ✓ Fotodetectores: percibe la señal de múltiples longitudes de onda (hasta 16) simultáneamente. (Equipos de laboratorio, 2012)

7. Ensayo MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio.

Según Guerra Ordóñez, M., (2001) para realizar estudios *in vitro* de sensibilidad a drogas se han empleado diferentes ensayos y criterios de viabilidad como morfología, motilidad, exclusión por colorante vital, adherencia e incorporación de un sustrato radiomarcado. Los primeros, eran métodos de microscopia laboriosos o conllevaban a subcultivos posteriores, que planteaban como inconveniente el sobrecrecimiento o consumían tiempo y materiales radiomarcados. Lo más reciente que hemos podido encontrar en la literatura, refiere el empleo de ensayos colorimétricos, tales como el Ensayo MTT.

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) es un indicador que detecta crecimiento y viabilidad celular, tiene función de óxido-reductor que en condiciones de disminución de la concentración de oxígeno, como las generadas durante la actividad metabólica bacteriana, cambia de color: del amarillo (estado oxidado) al púrpura (estado

reducido). Al reducirse, su solubilidad en medio acuosa disminuye y se produce la precipitación de cristales del reactivo. Las micobacterias sensibles a las drogas y las no viables no producirán el viraje del indicador. Esta técnica, por lo tanto, permite la lectura visual de la reacción, lo que facilita la determinación de la concentración de antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano (M. V. Pontino, B. Di Giulio, C. Fernández, B. Imperiale, A. Bodon, N. Morcillo., 2006).

De acuerdo con Solís, L., (2005) es una técnica para la determinación de la resistencia a drogas. Este sistema permite la determinación de la concentración inhibitoria mínima para cada droga. Este tipo de ensayo permite recoger y guardar el medio de cultivo para posteriores análisis pero su principal desventaja consiste en que si se da una proliferación celular significativa y desigual entre los grupos de estudio, puede confundir los resultados (Villalonga, J., 2007).

7.1 Fundamento:

Este método fue desarrollado por *Mosmann* en 1983 siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot y Rita Lang*.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Pardo, C., Diciembre, 2006).

El MTT, ha sido usado para visualizar la actividad de la enzima deshidrogenada, esta enzima remueve el hidrógeno del sustrato y lo transfiere al aceptor de hidrógenos, usualmente una coenzima. De la coenzima es transferido al MTT, el cual es reducido a un compuesto intensamente coloreado e insoluble en agua llamado formazán que absorbe a una longitud de onda de 550 a 570 nm (Ramírez, L., y Marín, D., Agosto, 2009).

Hipótesis:

Alternativa:

Los extractos alcohólicos de las 5 especies vegetales no poseen actividad antimicrobiana contra *Estafilococo aureus*.

Nula:

Los extractos alcohólicos de las 5 especies vegetales poseen actividad antimicrobiana contra *Estafilococo aureus*.

Diseño Metodológico

❖ **Tipo de Estudio:** Analítico, experimental.

❖ **Área de Estudio:** Laboratorio de Microbiología y en el Área de Productos Naturales del Departamento de Farmacia Industrial ubicados en la Facultad de Ciencias Químicas, del complejo Docente de la Salud (Campus Médicos).

❖ **Unidad de análisis:** Extractos alcohólicos de especies vegetales.

❖ **Universo:** Especies vegetales pertenecientes a las familias:

- ✓ Arecaceae.
- ✓ Boraginaceae.
- ✓ Malvaceae.
- ✓ Myrtaceae.
- ✓ Musaceae.

❖ **Muestra:** En la siguiente tabla se muestran las diferentes plantas utilizadas:

Nombre Común	Nombre Científico	Familia	Parte utilizada
Cola de Alacrán	<i>Heliotropium angiospermum</i>	Boraginaceae.	Hoja y rabo.
Flor de Avispa	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Malvaceae	Flor
Guayaba	<i>Psidium guajava L</i>	Myrtaceae	Hojas
Palma	<i>Roystonea regia</i>	Arecaceae	Fruto
Plátano Verde	<i>Musa x paradisiaca</i>	Musaceae	Hojas

❖ **Criterios:**

Inclusión:

- ✓ Plantas utilizada por la población en problemas infecciosos.
- ✓ Plantas pertenecientes a las familias anteriormente mencionadas.

Exclusión:

- ✓ Plantas que no son utilizada por la población en problemas infecciosos.
- ✓ Plantas no pertenecientes a las familias anteriormente mencionadas.

❖ **Variables:**

- ✓ Extractos Alcohólicos.
- ✓ Actividad antimicrobiana.
- ✓ Microorganismos.

❖ Variables dependientes:

- ✓ Actividad Antimicrobiana.

❖ Variable independiente:

- ✓ Microorganismos.
- ✓ Extractos.

❖ Operacionalización de variables:

Variable	Definición	Indicadores	Escala de Medida
Microorganismos	Ser vivo sólo visible a través del microscopio.	-Crecimiento	-Ausencia -Presencia
Extractos	El producto obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes.	-Peso -Volumen	-mg/g -ml/l
Actividad Antimicrobiana	Capacidad de matar, destruir, inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o Impedir su acción patógena.	-Actividad	-Positivo -Negativo
CMI (Concentración Mínima Inhibitoria)	Concentración menor de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo tras 18-24 horas de incubación.	-Peso -Volumen	mg/ml

❖ Procedimientos para la recolección de información:

La información de las especies vegetales fue obtenida a través del Herbario Miguel Ramírez Goyena en donde las especies de interés fueron identificadas procediendo a realizar investigaciones bibliográficas en diferentes fuentes tales como libros, tesis, internet y visita al Centro de Iniciativa Medioambiental de la Ciudad de León (CIMAC).

✓ **Método de recolección de información:**

-Cálculos, se midieron las absorbancias de cada una de las muestras en un espectrofotómetro UV-VIS con una longitud de onda de 630 nm.

❖ **Forma de analizar la información:** La información se analizó mediante tablas en el programa de Microsoft Word y Microsoft Excel lo que nos permitió interpretar y presentar de mejor manera los resultados obtenidos.

✓ **Materiales y equipos:**

- Guantes.
- Nasobuco.
- Gorro.
- Gabacha.
- Algodón.
- Papel de Aluminio.
- Papel filtro.
- Probeta 100 ml.
- Pana para baño maría.
- Beaker 250 ml, 600 ml y 1000 ml.
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Balón 50 ml, 100 ml y 1000 ml.
- Erlenmeyer 50 ml y 250 ml.
- Tubos de ensayos y Gradillas.
- Vidrio reloj.
- Espátula.
- Embudo.
- Soporte de madera.
- Asas.

- Cuchillo.
 - Cápsulas de porcelana.
 - Viales.
 - Frascos con tapa.
 - Balanza analítica.
 - Agitador de vórtices.
 - Licuadora.
 - Cocina.
 - Mechero.
 - Incubadora.
 - Celdas.
 - Freezer.
 - Micropipetas 10-100 µl, 40-200 µl y 100-1000 µl.
 - Espectrofotometro UV-VIS.
 - Espectronic 20.
 - Autoclave.
- ✓ **Microorganismo:**
- *Estafilococo Aureus* ATTC

Procedimiento:

Reactivos necesarios:

1. NaCl.
2. Agua destilada.
3. Polvo MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio).
4. Medio de cultivo: Caldo Mueller Hinton, Agar Trípica Soya.
5. Control positivo: Polvo estándar de Tetraciclina.
6. Blanco-negativo: DMSO (Dimetilsulfoxido).
7. Capsula de Tetraciclina de 500 mg.
8. MeOH (metanol).
9. Etanol.
10. HCl 0.1 N.
11. Cloro.

Preparación de Agar Tríptica Soya:

-Para preparar el agar de Tríptica soya: 4g en 100 ml de agua.

1. Pesar cantidad necesaria de Tríptica soya.
2. Transferirlo a un Erlenmeyer.
3. Disolver con cantidad necesaria de agua hirviendo y agitar a temperatura para facilitar la disolución de los grumos.
4. Transferir 10 ml de agar a cada tubo de ensayo.
5. Colocar los tubos de ensayo en un beaker y retapar.
6. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Preparación de Solución Salina:

-Para preparar la solución salina: 8.5 en 1000 ml de Agua.

1. Pesar NaCl.
2. Disolver con 1000 ml de agua y agitar.
3. Transferir 9.2 ml de esta solución a cada tubo de ensayo y se cierra herméticamente con algodón.
4. Retapar para colocar en la autoclave (121 ° C durante 15 minutos).

Preparación de Suspensión Bacteriana:

1. Sembrar el microorganismo en 2 tubos de ensayos con Agar Tríptica Soya e incubar.
2. Después de incubado, adicionar un poco de solución salina.
3. Agitar en el Agitador de vórtices, para desprender las bacterias del agar.
4. Traspasar esta solución a un tubo de ensayo con solución salina y agitarlo en el agitador de vórtices.
5. Leer la solución en el Spectronic 20.

Obtención de absorbancias de las suspensiones:

-Tres suspensiones de *Estafilococo Aureus* al 25% de transmitancia.

1. De cada suspensión tomar 1 ml y adicionar a 3 tubos de ensayos con solución salina respectivamente.
2. Por analista, realizar triplicado.
3. Leer las diluciones en el espectrofotómetro UV-VIS, a una longitud de onda de 630 nm.

4. Las absorbancias obtenidas deben de ser de 0.08 ± 0.01 , de no ser así, repetir los pasos anteriores.

Preparación de extractos alcohólicos:

1. Pesar la muestra previamente lavada.
2. Licuar las muestras con determinada cantidad de alcohol.
3. Macerar por una semana en un frasco con tapa.
4. Filtrar.
5. Secar los extractos alcohólicos a temperatura ambiente.

Método:

Tratamiento de las muestras:

1. Pesar 40 mg de los extractos alcohólicos secos.
2. Disolver en una capsula de porcelana con 800 μ l de DMSO (100%).
3. Adicionar 3200 μ l caldo Mueller Hinton para preparar 4 ml de muestra. Esto es importante porque se necesita tener una concentración de DMSO de 20% como solución madre. Si se puede preparar a menos concentración de DMSO es mejor todavía. Hasta obtener la concentración de la muestra de 10 mg/mL para solución madre.

Tratamiento del control positivo:

1. Preparar solución a una concentración aproximadamente de 0.24 μ g/ml en agua, a partir de la solución madre a 1 mg/ml en HCl 0.1 N.

Ensayo:

Blanco-negativo:

- a. Utilizar 3 celdas.
- b. Agregar 3200 μ l de DMSO a la celda # 1.
- c. Agregar a las celdas 2 y 3: 1600 μ l de caldo.
- d. Transferir de la celda # 1, 1600 μ l a la celda # 2.
- e. Transferir de la celda # 2, 1600 μ l a la celda # 3.

- f. Remover 1600 µl de la celda # 3 y desechar en un beaker con cloro.

Control Positivo:

1. Utilizar 9 celdas.
 2. Agregar 3200 µl de control positivo a la celda # 1.
 3. Agregar de la celda # 2 a la # 9: 1600 µl de caldo.
 4. Transferir de la celda # 1, 1600 µl a la celda # 2 para hacer diluciones hasta llegar a la celda # 9.
 5. Remover volumen final y desechar en un beaker con cloro.
 6. Adicionar 150 µl de suspensión bacteriana a cada celda.
 7. Realizar este mismo procedimiento para: **Cápsula de Tetraciclina 500 mg, muestras y control de crecimiento (sin antibiótico)**, sustituyendo en las celdas # 1 dichas sustancias para hacer sus respectivas diluciones.
-
- ✓ Leer en el espectrofotómetro cada celda a 630 nm para revisar la absorbancia inicial.
 - ✓ Incubar por 18 horas en una “shaker incubator”.
 - ✓ Leer en el espectrofotómetro para calcular la absorbancia final.
 - ✓ Agregar a las celdas 20 µl del MTT (15mg/3mL en MeOH).
 - ✓ Incubar nuevamente por 60 min a 37 °C.
 - ✓ Con este método (MTT), la concentración mínima inhibitoria se calcula visualmente; Amarillo: significa que el extracto a inhibido el crecimiento bacteriano (significa que tiene actividad); Azul: significa que el extracto no ha inhibido nada y que las bacterias siguieron creciendo (no hay actividad).
 - ✓ Utilizar la siguiente fórmula para calcular el % de inhibición = $[1 - (\text{Amuestra} - \text{Ablanco}) / \text{media A control de crecimiento}] \times 100$.

RESULTADOS Y ANALISIS

Análisis de Varianza

Operador	Día 1	Día 3
O1	6.33E-02	9.42E-02
	6.96E-02	9.79E-02
	0.57145	9.45E-02
	0.14581	7.10E-02
	8.23E-02	7.66E-02
	7.85E-02	7.50E-02
	7.44E-02	8.68E-02
	7.57E-02	8.74E-02
	7.43E-02	8.75E-02
	8.13E-02	8.57E-02
O2	6.15E-02	7.64E-02
	4.38E-02	0.10201
	4.77E-02	8.33E-02
	4.28E-02	7.93E-02
	4.76E-02	7.01E-02
	4.69E-02	9.19E-02
	3.46E-02	9.24E-02
	4.96E-02	8.69E-02
	4.62E-02	7.66E-02
	4.26E-02	7.56E-02

Origen de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Días	0.13283074	19	0.00699109	1.06050096	0.44973051	2.1682516
Operador	0.00019626	1	0.00019626	0.02977098	0.86483559	4.38074967
Repetibilidad	0.12525282	19	0.00659225			
Total	0.25827981	39				

Al ser F calculado menor que el F 0.95% no hay diferencias significativas entre los días ni entre los operadores, lo que indica que no habrá interferencia en los resultados obtenidos durante la aplicación del ensayo.

Varianza entre días	1.99419 E-05
Varianza (Operador)	0.0006396
Precisión Intermedia	0.024892925
Var. Reproducibilidad	0.005972596
Desviación estándar de Reproducibilidad	0.077282572
RSD _R % o CV _R %	86.84645084
RSD _r % o CV _r %	27.21774924

En la anterior tabla podemos observar que no hay reproducibilidad ni Repetibilidad entre los operadores, sin embargo hay datos que se repiten, cabe destacar que nuestros

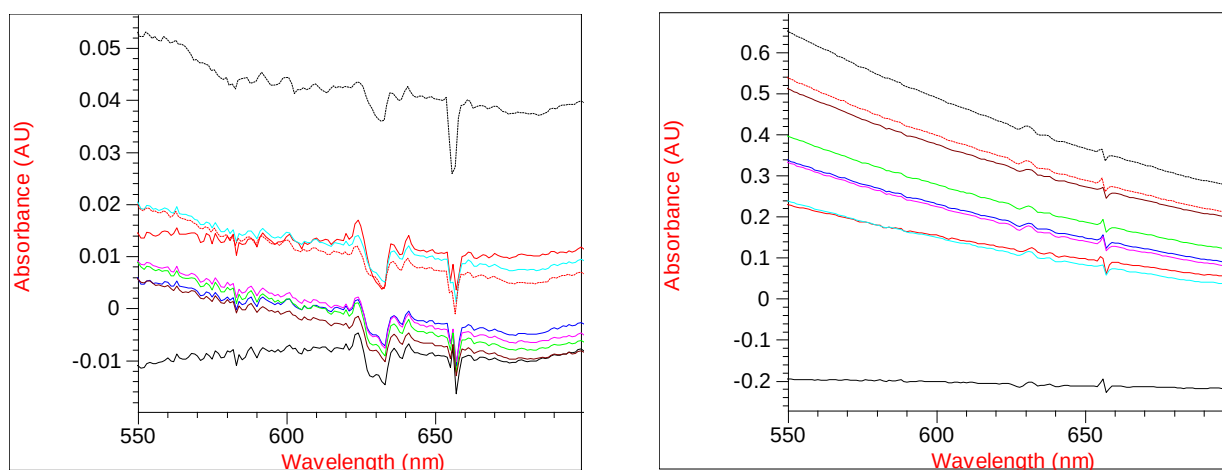
microorganismos son seres vivos que obedecen a características propias y por lo tanto proliferan constantemente, lo cual interfirió con los datos obtenidos.

Lecturas obtenidas del ensayo:

Tabla #1

Patrón estándar de Tetraciclina			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (µg/ml)
Celda 1	1.2616 E-2	0.20529	0.24
Celda 2	5.0859 E-3	0.11976	0.12
Celda 3	5.0120 E-3	0.18396	0.06
Celda 4	6.9480 E-3	0.11471	0.03
Celda 5	5.2848 E-3	0.17644	0.015
Celda 6	6.8755 E-3	0.22571	0.0075
Celda 7	7.9098 E-3	0.31587	0.00375
Celda 8	3.7041 E-2	0.41830	0.001875
Celda 9	5.9357 E-3	0.33389	0.0009375

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas, según los datos obtenidos se puede observar que en las 9 celdas, las absorbancias finales aumentaron respecto a la inicial debido a la proliferación de bacterias en cada una de ellas.

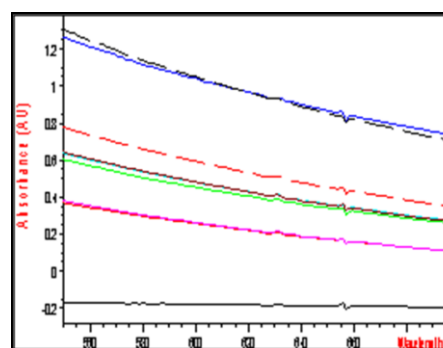
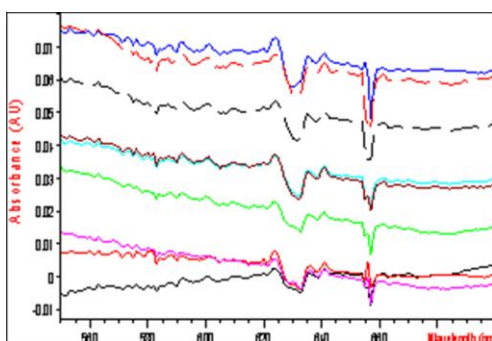
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo en la celda 1, ya que se visualizó cambio de color de anaranjado a amarillo, indicando la concentración (0.24 $\mu\text{g/ml}$) del antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 2 a la celda 9, se visualizó el color purpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo en la celda 1, se aplicó la formula de porcentaje de inhibición, siendo este de 76.14%

Tabla #2

Cápsula de Tetraciclina 500 mg			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (µg/ml)
Celda 1	3.4747 E-3	0.18332	0.24
Celda 2	2.2249 E-3	0.21053	0.12
Celda 3	5.7754 E-2	0.93420	0.06
Celda 4	2.5857 E-2	0.41247	0.03
Celda 5	1.4195 E-3	0.21350	0.015
Celda 6	1.5445 E-2	0.38671	0.0075
Celda 7	2.5033 E-2	0.41196	0.00375
Celda 8	4.2385 E-2	0.93410	0.001875
Celda 9	5.5740 E-2	0.51390	0.0009375

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubarse 24 horas las celdas conteniendo capsulas de tetraciclina, en estos datos se observa que en las 9 celdas, las absorbancias finales aumentaron respecto a la inicial por lo que hubo mayor proliferación de bacterias en todas ellas.

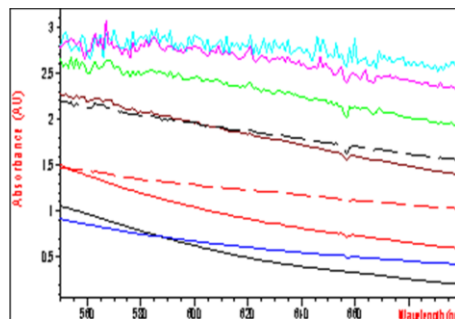
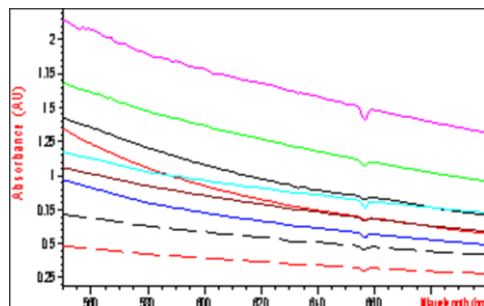
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo únicamente en la celda 1, ya que se visualizó cambio de color de anaranjado a amarillo, indicando la concentración (0.24 µg/ml) del antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 2 a la celda 9, se visualizó el color púrpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo en la celda 1, se aplicó la fórmula de porcentaje de inhibición, obteniéndose un 78.69% de inhibición en dicha celda.

Tabla # 3

<i>Roystonea regia</i>			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (mg/ml)
Celda 1	0.93395	0.44651	10
Celda 2	0.78124	0.87399	5
Celda 3	0.63743	0.58260	2.5
Celda 4	0.87782	2.87020	1.25
Celda 5	1.62500	2.646470	0.625
Celda 6	1.22270	2.27900	0.3125
Celda 7	0.75823	1.78560	0.15625
Celda 8	0.51956	1.83430	0.078125
Celda 9	0.35051	1.21000	0.0390625

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas las celdas conteniendo *Coco nucifera*, en estos datos se observa que en las celdas 1 y 3 hubo disminución en las absorbancias, lo que indica que hubo una baja en la proliferación bacteriana. En las celdas 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se presentó un aumento en las absorbancias, por ende un aumento en el crecimiento de la bacteria.

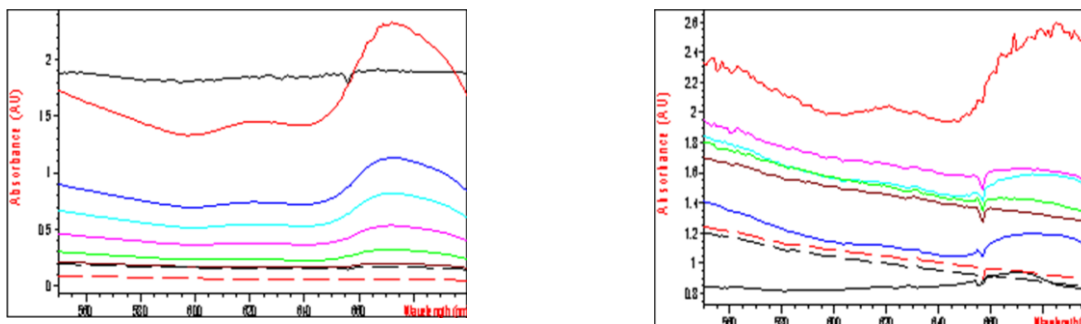
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo en las celdas 1, 2 y 3 en donde se visualizó cambio de color de café rojizo a amarillo, indicando la concentración (10mg/ml, 5mg/ml y 2.5mg/ml respectivamente) de la muestra a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 4 a la celda 9, se visualizó el color purpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo en las celdas 1, 2 y 3, se aplicó la formula de porcentaje de inhibición a la celda 3 pues a partir de ella se observo el ultimo viraje positivo, obteniéndose 32.28 % de inhibición en dicha celda.

Tabla #4

<i>Heliotropium angiospermum</i>			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (mg/ml)
Celda 1	1.83230	0.84587	10
Celda 2	1.44170	2.00160	5
Celda 3	0.73459	1.09240	2.5
Celda 4	0.54060	1.50810	1.25
Celda 5	0.37119	1.63790	0.625
Celda 6	0.23387	1.48320	0.3125
Celda 7	0.16734	1.43960	0.15625
Celda 8	0.15287	0.98185	0.078125
Celda 9	6.0511 E-2	1.03390	0.0390625

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas las celdas conteniendo *Heliotropium angiospermum*, en estos datos se observa que en la celda 1 se produjo disminución en la absorbancia, lo que indica que hubo una baja en la proliferación bacteriana. En las celdas 2- 9 se presentó un aumento en las absorbancias, por consiguiente un aumento en el crecimiento de la bacteria.

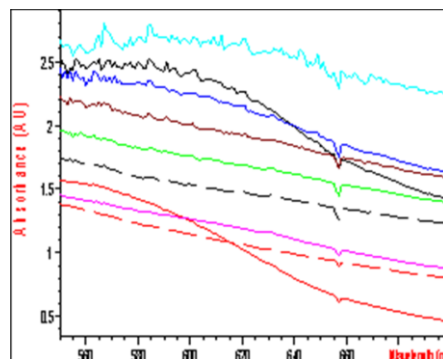
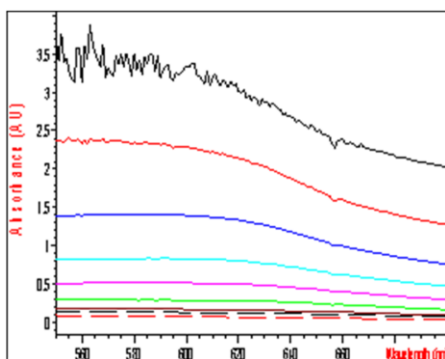
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo desde las celdas 1-6, en donde se visualizó cambio de color de verde a amarillo, indicando la concentración (10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg/ml y 0.312mg/ml) de la muestra a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 7 a la celda 9, se visualizó el color purpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo del método colorimétrico, se aplicó la formula de porcentaje de inhibición a la absorbancia de la celda 6 pues a partir de ella se observó el ultimo viraje positivo, obteniéndose 72.40%.

Tabla #5

<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (mg/ml)
Celda 1	2.86830	2.12300	10
Celda 2	2.02620	0.91762	5
Celda 3	1.27000	2.07040	2.5
Celda 4	0.76987	2.56310	1.25
Celda 5	0.48232	1.16440	0.625
Celda 6	0.27822	1.66080	0.3125
Celda 7	0.16053	1.88120	0.15625
Celda 8	0.11580	1.44580	0.078125
Celda 9	6.7752 E-2	1.03310	0.0390625

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas las celdas conteniendo *Hibiscus rosa-sinensis*, en estos datos se observa que en las celdas 1 y 2 hubo poca proliferación bacteriana representada por la disminución en las absorbancias. En las celdas 3-9 hubo mucha proliferación de bacterias lo que aumento las absorbancias finales.

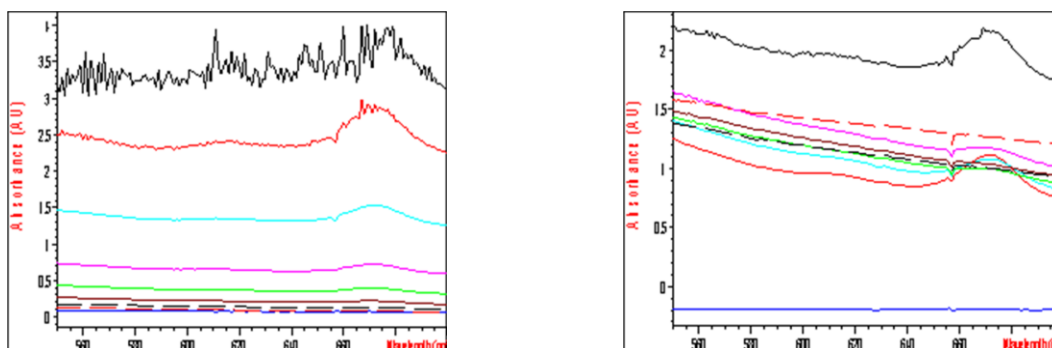
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo en las celdas 1 y 2 en donde se visualizó cambio de color a amarillo, indicando la concentración (10mg/ml y 5mg/ml respectivamente) de la muestra a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 4 a la celda 9, se visualizó el color purpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo en las celdas 1 y 2, se aplicó la formula de porcentaje de inhibición a la celda 2 pues a partir de ella se observo el ultimo viraje positivo, obteniéndose 6.66 % de inhibición en dicha celda.

Tabla #6

<i>Psidium guajava L</i>			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (mg/ml)
Celda 1	3.27159	1.90000	10
Celda 2	2.34720	0.88847	5
Celda 3	6.6200 E-2	0.198005	2.5
Celda 4	1.32220	1.01590	1.25
Celda 5	0.63710	1.25600	0.625
Celda 6	0.35640	1.09140	0.3125
Celda 7	0.20885	1.15510	0.15625
Celda 8	0.13021	1.11450	0.078125
Celda 9	8.8631 E-2	1.36500	0.0390625

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas las celdas conteniendo *Psidium guajava L*, en estos datos se observa que en las celdas 1, 2 y 4 los valores de la absorbancia disminuyeron, debido a la baja proliferación de bacterias en dichas celdas. En cambio en las celdas 3, 5, 6, 7, 8 y 9, los valores de las absorbancias aumentaron pues la proliferación bacteriana acá fue mayor.

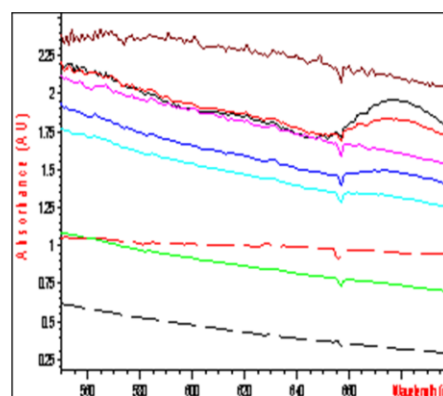
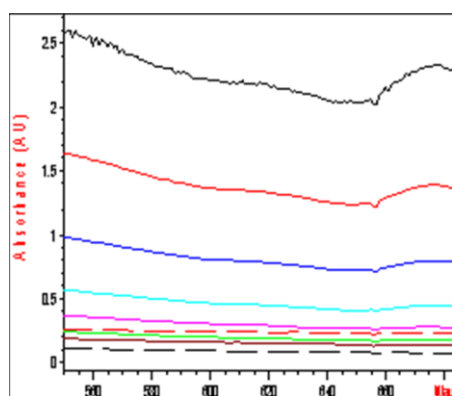
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo en las celdas 1, 2, 3 y 4 en donde se visualizó cambio de color de verde musgo a amarillo, indicando la concentración (10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml y 1.25mg/ml respectivamente) de la muestra a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 5 a la celda 9, se visualizó el color purpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo del método colorimétrico, se aplicó la formula de porcentaje de inhibición a la absorbancia de la celda 4, pues a partir de ella se observó el ultimo viraje positivo, obteniéndose 18.09%.

Tabla #7

<i>Musa x paradisiaca</i>			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (mg/ml)
Celda 1	2.11180	1.80660	10
Celda 2	1.29890	1.83450	5
Celda 3	0.75992	1.56520	2.5
Celda 4	0.43485	1.43820	1.25
Celda 5	0.27903	1.78540	0.625
Celda 6	0.18250	0.84795	0.3125
Celda 7	0.14504	2.26410	0.15625
Celda 8	8.2892 E-2	0.41832	0.078125
Celda 9	0.23751	1.00260	0.0390625

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas las celdas conteniendo *Musa x-paradisiaca*, en estos datos se observa que en la celda 1 se presento una disminución entre sus absorbancias, causada por una baja proliferación de bacterias. Por otro lado, desde las celdas 2-9, se observa un aumento en las absorbancias finales, pues hubo una mayor proliferación bacteriana.

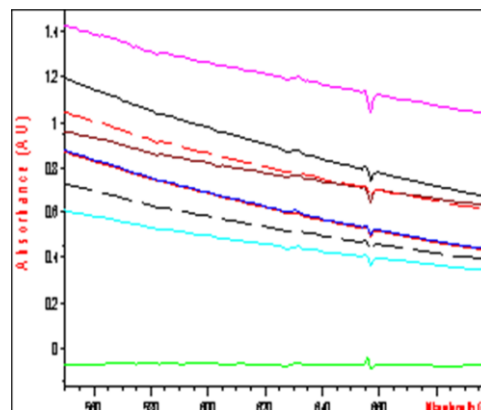
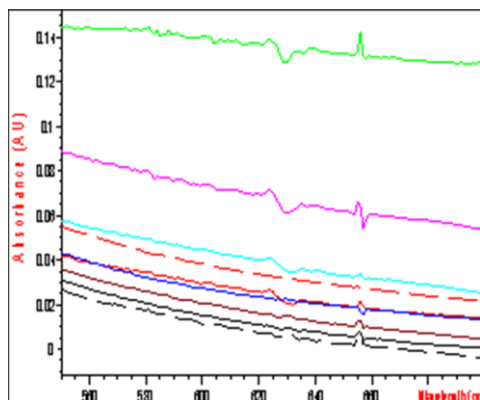
Luego de la aplicación del método colorimétrico, se obtuvo resultado positivo en las celdas 1, 2, 3 y 4 en donde se visualizó cambio de color verde a amarillo, indicando la concentración (10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml y 1.25mg/ml respectivamente) de la muestra a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Sin embargo desde la celda 5 a la celda 9, se visualizó el color púrpura indicado resultados negativos.

Para confirmar el resultado positivo del método colorimétrico, se aplicó la formula de porcentaje de inhibición a la celda 4; pues a partir de ella se observo el ultimo viraje positivo, obteniéndose 67.17%.

Tabla #8

Control de Crecimiento			
Diluciones	(Ai)	(Af)	Concentración (mg/ml)
Celda 1	9.5162 E-3	0.87718	10
Celda 2	2.0742 E-2	0.59793	5
Celda 3	2.2591 E-2	0.60790	2.5
Celda 4	3.4865 E-2	0.44522	1.25
Celda 5	6.0932 E-2	1.19640	0.625
Celda 6	1.5241 E-2	0.76645	0.3125
Celda 7	6.8989 E-3	0.52275	0.15625
Celda 8	3.2238 E-2	0.78655	0.078125

Espectros de Absorbancia Inicial y Final respectivamente



En la tabla anterior se muestran las Absorbancias iniciales y Absorbancias después de incubar 24 horas las celdas conteniendo Control de crecimiento, en estos datos se observa que en la celda 1 y 6 se presentó una disminución entre sus absorbancias, causada por una baja proliferación de bacterias, causado posiblemente por errores de analistas. Por otro lado, en las celdas 2, 3, 4, 5, 7 y 8 se observa un aumento en las absorbancias finales, pues hubo una mayor proliferación bacteriana.

Aplicando el método colorimétrico, todas las celdas dieron resultado negativo, color purpura.

Determinación de Porcentaje de Inhibición

$$\% \text{Inhibición} = [1 - (\text{Amuestra} - \text{Ablanco}) / \text{Media Acontrol de crecimiento}] * 100$$

	Dilución/celda Donde hubo viraje	Amuestra	Ablanco	Media cotrol de crecimiento	%Inhibicion
Patrón antibiótico	1	0.20529	0	0.6361	76.14
Antibiótico capsulas	1	0.18232	0	0.6361	78.69
<i>Coco nucifera</i>	3	0.58260	0	0.6361	32.28
<i>Heliotropium angiospermum</i>	6	1.48320	0	0.6361	72.40
<i>Hibiscus rosa- sinensis</i>	2	2.07040	0	0.6361	6.66
<i>Psidium guajava l</i>	4	1.01590	0	0.6361	18.09
<i>Musa x paradisiaca</i>	4	1.43820	0	0.6361	67.17

Conclusión

En el estudio realizado sobre la Evaluación de la actividad antimicrobiana de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León a través del Método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio); podemos concluir que todas las especies vegetales mostraron actividad contra *Estafilococo aureus* en el caso del *Heliotropium angiospermum* a concentraciones de 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg/ml, y 0.312mg/ml, *Hibiscus rosa-sinensis* a concentraciones de 10mg/ml y 5mg/ml, *Psidium guajava* L a concentraciones de 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml y 1.25mg/ml, *Roystonea regia* en concentraciones de 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml y *Musa X paradisiaca* a concentraciones de 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml y 1.25mg/ml.

Comparando con el patrón estándar de tetraciclina y cápsulas de 500 mg de tetraciclina a concentración de 0.24µg/ml revela que las todas las especies vegetales antes mencionadas tiene menor actividad antimicrobiana ya que necesitan una concentración mayor para poder impedir la proliferación bacteriana.

Recomendaciones:

I. Aplicación del método:

- ✓ Usar micropipetas para obtener la cantidad correcta y así evitar margen de errores en la medición.
- ✓ La cantidad de DMSO no debe ser mayor de 20 % para evitar falsos positivos.
- ✓ Realizar las incubaciones en el tiempo establecido del sembrado para hacer suspensiones entre 18 y 24 horas.
- ✓ Después de aplicado el MTT, incubar por una hora para que se pueda dar la reacción química.
- ✓ Ampliar rango de muestras con diferentes especies vegetales que presenten actividad fititerapéutica.
- ✓ Utilizar más de un microorganismo para la determinación de actividad terapéutica de las especies vegetales.

II. Analista:

- ✓ Hacer cálculos correspondientes de peso, muestra, volumen, diluciones, antibiótico, patrón, etc.
- ✓ Al prepara las suspensiones al 25 % de Transmitancia, agitar bien antes de leer en el Spectronic 20.
- ✓ Calibrar el Spectronic 20 con el blanco cada vez que se vaya a leer.
- ✓ Antes de proceder a leer en el Spectronic 20 y Espectrofotómetro UV-VIS: limpiar cada celda.
- ✓ Si el porcentaje de Transmitancia da menor de 25 %, adicionar solución salina; si es mayor del 25 %, adicionar bacterias, en ambos casos hasta obtener el 25 % de Transmitancia.

Bibliografía:

- ◆ Base de datos: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana: Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Cola de alacrán México: Autor. Recuperado de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7164>
- ◆ Base de datos: Consumoteca. Definición de *microorganismo*. (10 de Noviembre, 2009). Recuperado de: <http://www.consumoteca.com/diccionario/microorganismo>
- ◆ Base de datos: Lecciones Hipertextuales de Botánica. (2006). Familia musaceae. Recuperado de: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/musaceae.htm>
- ◆ Base de datos: Sano por dentro. Extractos vegetales. Recuperado de: <http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>
- ◆ Base de Datos: Chanchamayo. (2012). Recuperado: <http://www.colegiosantaursula.com/.../Separata%20Chanchamayo%202012...>
- ◆ Baus, Caroline, (junio 2010), Las plantas Salvadoreñas y sus usos tradicionales, Editorial: FUNPROCOOP.
- ◆ Botánica. (2009) *El poder medicinal de las plantas. Procedimientos*.20.
- ◆ Brunatti, Carlos y Martín Ana María. (2009). Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano. <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>. 2 diciembre 2013.
- ◆ Castro de Pardo, C. (01 de Diciembre, 2006). Práctica IV: Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT. Colombia: Facultad de Medicina y Fundación Universitaria San Martín.
- ◆ Copyright C.I. M y M Instrumentos Técnicos S.A.S. (2007). Instrumentos técnicos. Medellín, Colombia. Recuperado de: www.arted dinamico.nethttp://www.myinstrumentostecnicos.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1808
- ◆ Cruz, A. (Febrero, 2007). *Hibiscus Rosa-Sinensis*. Colombia. Recuperado de: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=297194>
- ◆ Cultek. (Febrero, 2006). Soluciones ELISA. *Protocolo y Técnicas*, (pp.1-7). Autor. Recuperado de: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>

- ◆ Departamento de Admisión del HEODRA. (2013). Diagnóstico principal de egreso según grupos de edades para neumonía y enfermedades gastrointestinales. León: Departamento de Estadísticas del HEODRA.
- ◆ Equipos de laboratorio, 2012. Espectrofotómetro uso y características, <http://equiposdelaboratorio.wordpress.com/2012/02/23/espectrofotometro-uso-y-caracteristicas/>. 2 de diciembre 2013.
- ◆ Germosén, L. R., (1998) *Farmacopea Vegetal Caribeña*. Venezuela: Enda Caribe. Edición universitaria Martinique. F, W.I., Ediciones Emile Désormeaux.
- ◆ Gran Enciclopedia Sapiens Temática. (2000). La biodiversidad. *Ciencia de la vida II*. (pp. 78-79). España: Trama Equipo Editorial.
- ◆ Grijalva, A. (Junio, 2006). Flora útil etnobotánica de Nicaragua (1ª ed.). Managua, Nicaragua: MARENA.
- ◆ Goodman y Gilman. Las bases de la farmacología de la terapéutica. 12ava edición. Cap 55. Pag 1521-1522. 27 de noviembre, 2013.
- ◆ Guido, E., Hernández, M., Núñez K., (Mayo 2000). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de 99 especies de plantas colectadas en la biodiversidad vegetal de las estaciones biológicas Bartola-San Juan y la Lupe- Río San Juan con cepas de microorganismo Shigella Dysenteriae y Staphylococcus Aureus*. León- Nicaragua 2000.
- ◆ Herrera, G. y Sotelo, A. (1999). *Evaluación de la actividad antimicrobiana en cepas de Pseudomona Aeruginosa y Klebsiella Pneumoniae de 59 especies de plantas que fueron colectadas en la biodiversidad vegetal de la estación biológica Bartola- Río San Juan*. León- Nicaragua 1999.
- ◆ Incer, J. (2000). Título. Biodiversidad, la abundancia de la flora y la fauna. *Geografía dinámica de Nicaragua*. (pp. 25-26), (2da ed.). Managua, Nicaragua: Hispamer.
- ◆ In forma rica al límite. (24 de mayo, 2012). Taxonomía de las plantas. Archivo de blog. Recuperado de: <http://informaricaallimite.blogspot.com/2012/05/taxonomia-de-las-plantas.html>
- ◆ Ingraham, J. y Ingraham, C. (2010). Microbiología. *Introducción a la microbiología*, Volumen 2 (pp. 457-458-460). EDITORIAL REVERTÉ. Recuperado de:

http://books.google.com.ni/books?id=dUEZSXaz2UC&hl=es&source=gbs_similarbooks_r&edir_esc=y

◆ Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA) y Centro para el desarrollo de la medicina tradicional (CEDEMETRA). (Octubre, 2005). Plantas medicinales y otras especies útiles. Diagnostico situacional sobre la producción, industrialización y comercialización. Managua: Recuperado:

http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Plant_Medic.pdf. Autor. Managua, Octubre del 2005.

◆ Klein, J. (Septiembre, 2010). Shigella infections. Pagina oficial de Kids health. Estados Unidos: The Nemours Foundation/ Kids health. Recuperado de: http://kidshealth.org/parent/en_espanol/infecciones/shigella_esp.html#

◆ Kumar, A. & Singh, A. (Abril – Junio, 2012). Review on *hibiscus rosa sinensis*. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(2), 534-539. Recuperado de: <http://www.ijrpbsonline.com/files/13-3213.pdf>

◆ León, A (2006). Las Bacterias. Base de datos: Monografias.com. Recuperado de: <http://www.monografias.com/trabajos/bacterias/bacterias.shtml#ixzz2HUcYNIKv>

◆ Mayorga, V., Gutiérrez, M. y Rueda, R. (2007). Plantas medicinales utilizadas por la población de la ciudad de León. Nicaragua: Departamento de Biología. Facultad de Ciencias: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León. (UNAN-León). Recuperado de: <http://www.unanleon.edu.ni/universitas/pdf/1ro/Arto4VOI1.pdf>

◆ Morejón, M., Salup, R y Cué Manuel., 2011. Actualización en tetraciclinas. Facultad de Ciencias Médicas "Manuel Fajardo", 2 de diciembre, 2013.

◆ M. V. Pontino, B. Di Giulio, C. Fernández, B. Imperiale, A. Bodon, N. Morcillo (Julio-Septiembre 2006) *Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a Mycobacterium tuberculosis*. Revista Argentina de Microbiología 38 (3). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Recuperado: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v38n3/v38n3a10.pdf>

◆ O.F.Cook (2006). ROYSTONEA REGIA (HBK). Recuperado de: <http://www.arbolesornamentales.es/Roystonearegia.htm>

◆ Ordoñez, E. (Noviembre, 2007). Determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de nueve plantas guatemaltecas sobre *campylobacter jejuni*, utilizando el método de difusión en

disco. Tesis. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

◆ Peñas B, M y Bolt, A. (2010). Plantas medicinales - Centro de entendimiento con la naturaleza. Nicaragua: Centro de entendimiento con la naturaleza Macizo de Peñas Blancas, Reserva de Biosfera de BOSAWAS. Recuperado de: http://www.cenaturaleza.org/doc/1328225810_Plantas%20Medicinales%20%C3%A1rea%20protegida%20Macizo%20de%20Pe%C3%B1as%20Blancas.pdf

◆ Perez, Y, Molina, V y Oyarzábal, A.(2010). Tratamiento farmacológico en la hiperplasia prostática benigna/Pharmacological treatment of the benign prostatic hiperplasia. La Habana, Cuba. Centro de Productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).

◆ P, Fernando. (13 de Febrero, 2013). Las bacterias gram positivas. Base de datos: Ojo Científico. Recuperado de: <http://www.ojocientifico.com/2010/10/23/las-bacterias-gram-positivas>.

◆ Puerta-García, A y Mateos-Rodríguez F. (2010). Enterobacterias. México: Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Recuperado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf

◆ Ramirez, L. y Marin, D. (12 de julio de 2009). Methodologies for evaluating the in vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira*. No 42, ISSN 0122-1701 263. Recuperado de: https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:Y_WSQVs9eWUJ:revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/download/2687/1409+metodologia+del+MTT+para+determinacion+antimicrobiana&hl=es&gl=ni&pid=bl&srcid=ADGEEsIuT1tDGJoyinYMQIMz4iS26VtYnhHbkM896C5CKqIBbVIxV7K454WkXZEU3linH2gk9xiHCSCZV_EV24i1idMbV0ol_hfSsYUnT-L8uFhrOMNpP85r27S13XWUVwqH_t_4YPq&sig=AHIEtbSU_8VPYrXTganYva_V2VMsU98qIg

◆ Rivadeneira, N. (28 de septiembre, 2010). *Clasificación Científica*. Base de datos: *Herbario Monteria*. Recuperado de: www.herbariomonteria.blogspot.com/

◆ (Rodríguez, M y Gundian J., 2010), Tetraciclinas. Recuperado de: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.htm. 2 de diciembre, 2013.

- ◆ Ruiz, M. (2010) Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira ICA I (Psidium guajava) / Antioxidant capacity and softening of guava fruit Palmira ICA I (Psidium guajava). Biblioteca digital repositorio institucional. Colombia. Recuperado: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2783/>.
- ◆ Solís, L. (16 de Julio, 2005). Sección de epidemiología. *Nuevos métodos para la detección de TB-MDR*. Perú. Recuperado de: http://spe.epiredperu.net/Act-SemTBC/TBC_Diag.pdf
- ◆ Valdés, M. (2008). Capítulo 26: Enterobacterias. Microbiología y parasitología médicas tomo I. Colombia: editorial. Recuperado de: http://mvz.unipaz.edu.co/textos/biblioteca/microbiologia/microbiologia_y_parasitologia_medicinas_-_tomo_i/microcap26.pdf
- ◆ Vibrans, H.. (1 de octubre, 2011). *Heliotropium angiospermum*. Base de datos Conabio. México: Conabio. Recuperado de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/boraginaceae/heliotropium-angiospermum/fichas/ficha.htm>
- ◆ Vidal, M.(27/09/13). Roystonea regia . Recuperado de: http://es.wikipedia.org/wiki/Roystonea_regia
- ◆ Villalonga, J. (diciembre 2007) *Fisiopatología de la Isquemia Cerebral*. (pp.50-51) Barcelona (España), ICG MARGE, SL © 2013 1999, Editorial Ciencias Médicas. Recuperado: http://books.google.es/books?id=EDpk9iOQtD4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

ANEXOS



Estimación de la muestra de la Potencia:

Microorganismo de prueba	Método	Medio utilizado		Periodo de incubación	Factor de dilución	Periodo de almacenamiento sugerido en refrigeración
		Mantenimiento	Suspensión de prueba			
A) <i>Staphylococcus Aureus</i>	1	1	1	24	1:20	1 semana
C) <i>Micrococcus luteus</i>	1	1	1	24	1:40	2 semanas
D) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1	1	24	1:14	1 semana
E) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	19	19	48	1:30	4 semanas
F) <i>Bordetella Bronchiseptica</i>	1	1	1	24	1:20	2 semanas
H) <i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	24	*	6 meses
	2	1	32	5d		6 meses
I) <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	1	1	1	24	1:25	1 semana
J) <i>Escherichia coli</i>	1	1	1	24	1:20	2 semanas
K) <i>Streptococcus faesium</i>	5	-	-	-	-	24 horas
L) <i>Micrococcus luteus</i>	1	1	1	24	1:35	4 semanas
M) <i>Microsporum gypseum</i>	4	-	-	-	-	2 meses
T) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	19	19	48	1:30	4 semanas

W) <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	1	1	1	24	1:25	2 semanas
X) <i>Mycobacterium smegmatis</i>	8	36	34	*	-	2 semanas

MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Antibiótico	Organismo de prueba	Medio liquido	Volumen sugerido de inculo estandarizado por 100ml de medio	Temperatura de incubación (°C)
Amikacina	A	3	0.1	36-37.5
Cloranfenicol	J	3	0.7	36-37.5
Estreptomina	I	3	0.1	36-37.5
Gramicidina	K	3	1.0	36-37.5
Kanamicina	A	3	0.2	36-37.5
Rolitetraciclina	A	3	0.1	36-37.5
Tetraciclina	A	3	0.1	36-37.5

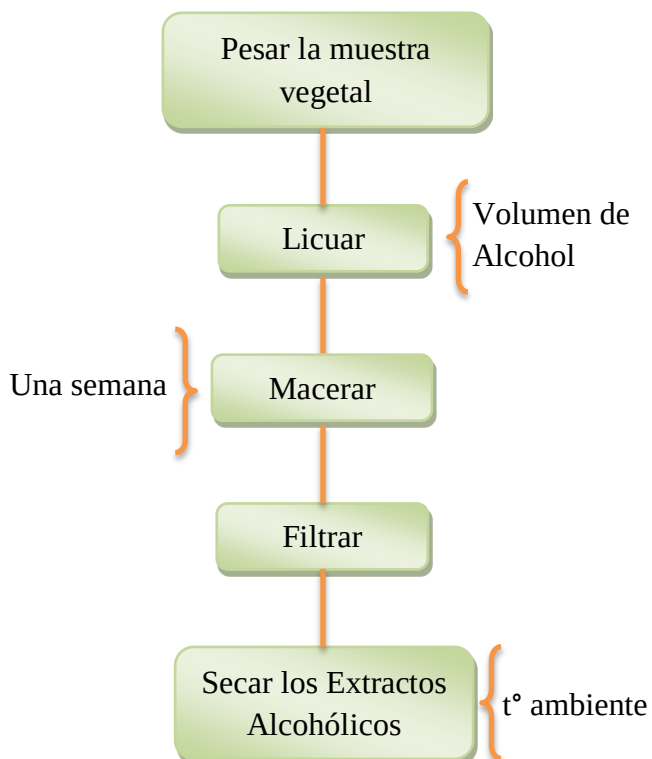
Antibiótico	Soluciones de Trabajo					Concentración de la curva patrón		
	Secado Previo	Disolvente inicial	Diluyente	Concentración mg/ml	Almacenamiento en refrigeración	Diluyente Final	Dosis media activa en µg/ml	Factor de dilución
Amikacina	No	-	Agua destilada	1mg	2 semanas	Agua destilada	10.0	1.12
Cloranfenicol	No	Alcohol etílico (1000µg/ml)	Agua destilada	1mg	1 mes	Agua destilada	2.50	1.25
Estreptomicina	1	-	Agua destilada	1mg	1 mes	Agua destilada	30.0	1.12
Gramicidina	1	-	Agua destilada	1mg	1 mes	Alcohol etílico	0.40	1.12
Kanamicina	No	-	Agua destilada	1mg	1 mes	Agua destilada	10.0	1.12
Rolitetraciclina	1	-	Agua destilada	1mg	1 día	Agua destilada	0.240	1.12
Tetraciclina	No	-	HCL 0.1 N	1mg	1 día	Agua destilada	0.240	1.12

Codificación de Plantas Vegetales

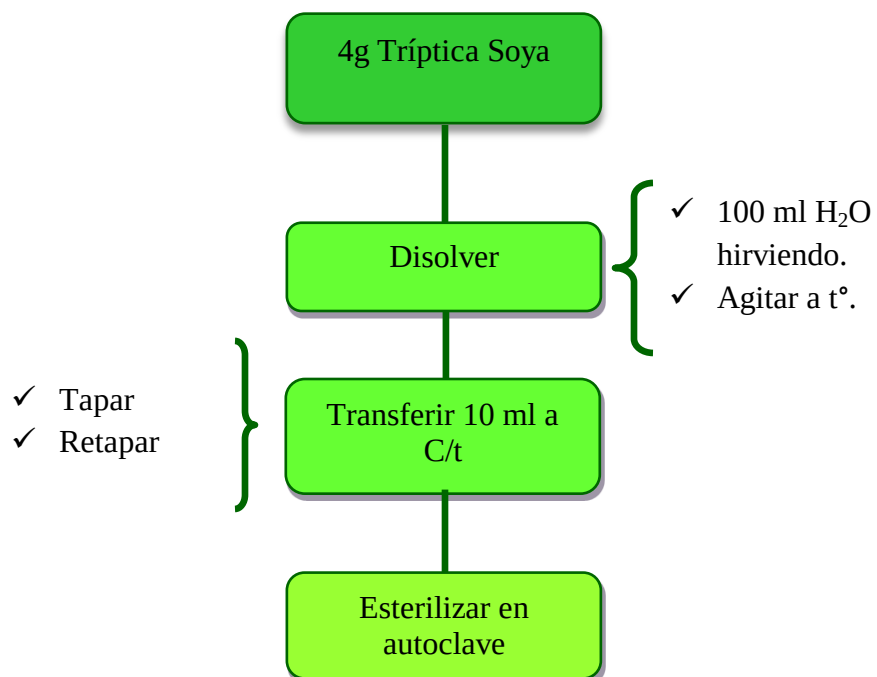
Código	Nombre Común	Nombre Científico	Parte Utilizada	Peso
DEK01	Palma	<i>Roystonea regia</i>	Fruto	50 g
DEK02	Flor de Avispa	<i>Hibiscus rosa sinnensis</i>	Flor	30 g
DEK03	Plátano	<i>Musa X Paradisiaca</i>	Hoja	40 g
DEK04	Cola de Alacrán	<i>Heliotropium Angiospermum</i>	Hoja y rabo	50 g
DEK05	Guayaba	<i>Psidium Guayaba L</i>	Hoja	35 g

Procedimientos:

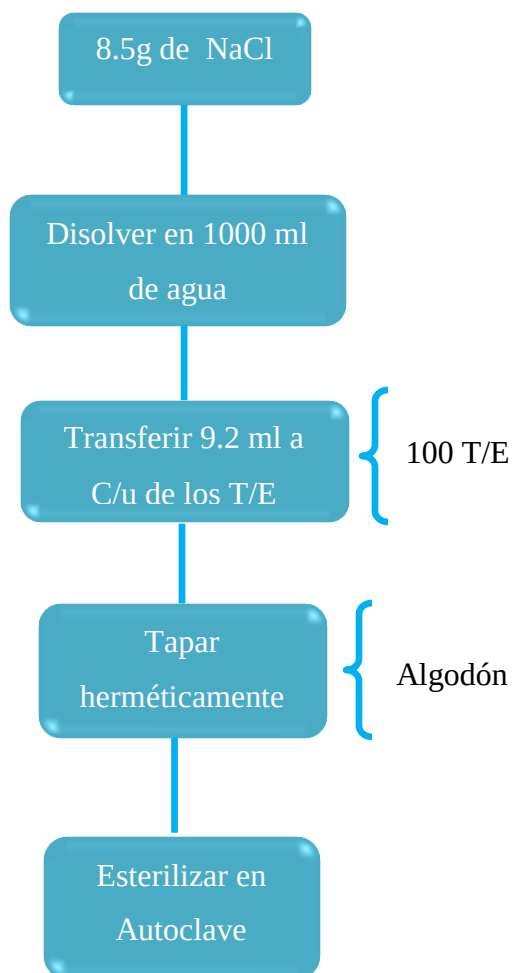
Preparación de Extractos Alcohólicos



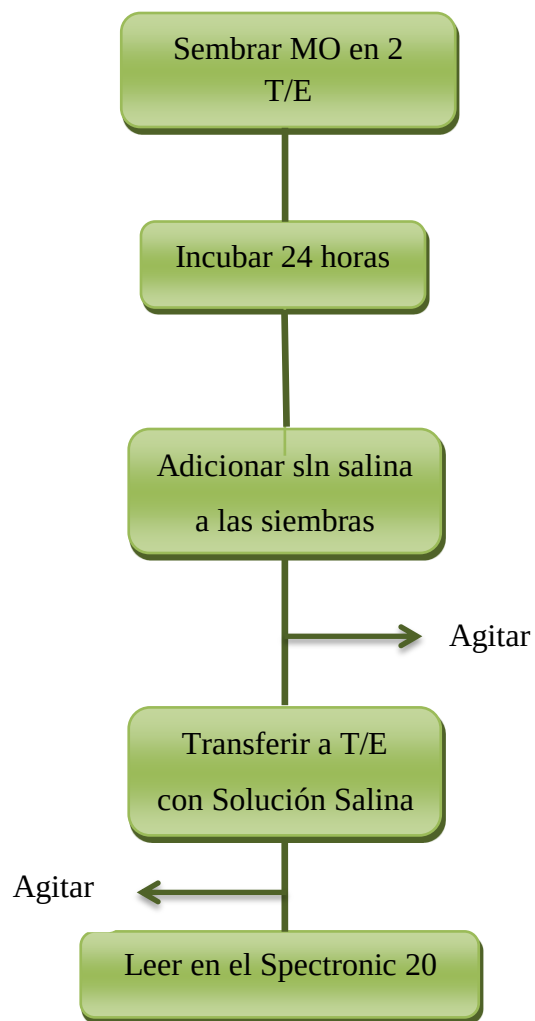
Preparación de Triptica Soya:



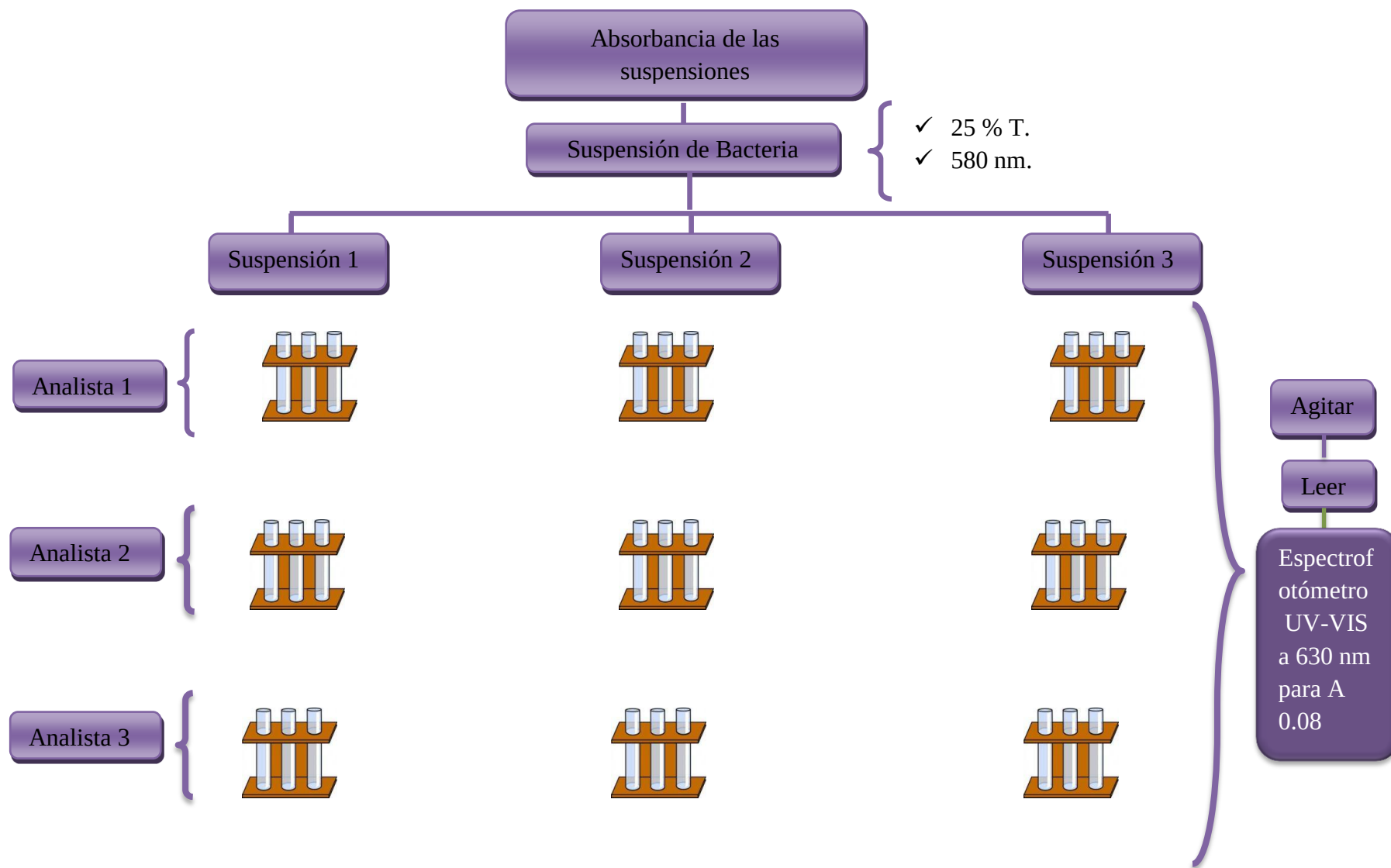
Preparación de Solución Salina:



Preparación de Suspensión Bacteriana con una Transmitancia al 25 %:



Obtención de la absorbancia de las suspensiones bacterianas:

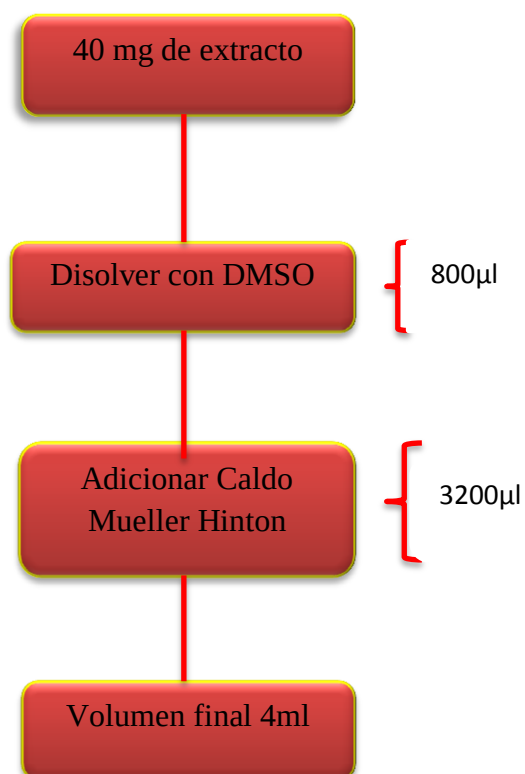


Método:

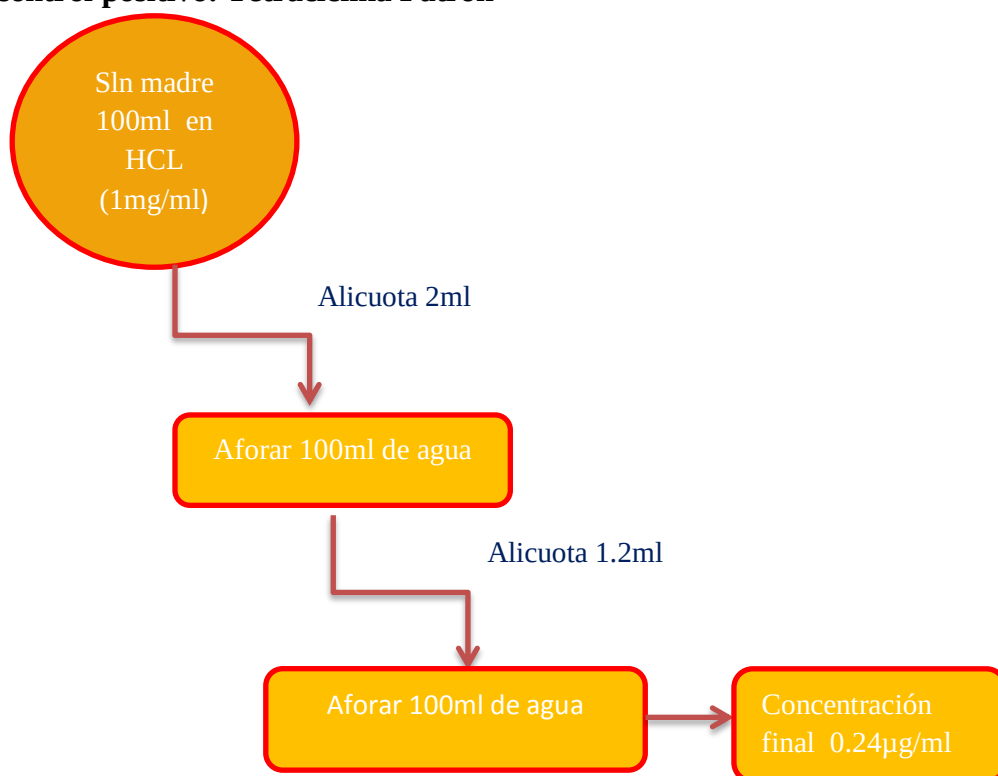
Pesado de la Muestra para el ensayo:

Especie Vegetal	Peso en g
	0.0404
<i>Heliotropium angiospermum</i>	0.0405
<i>Hibiscus rosa-sinnensis</i>	0.0412
<i>Psidium Guajava l</i>	0.0429
<i>Musa x paradisiaca</i>	0.0426

Tratamiento de la muestra

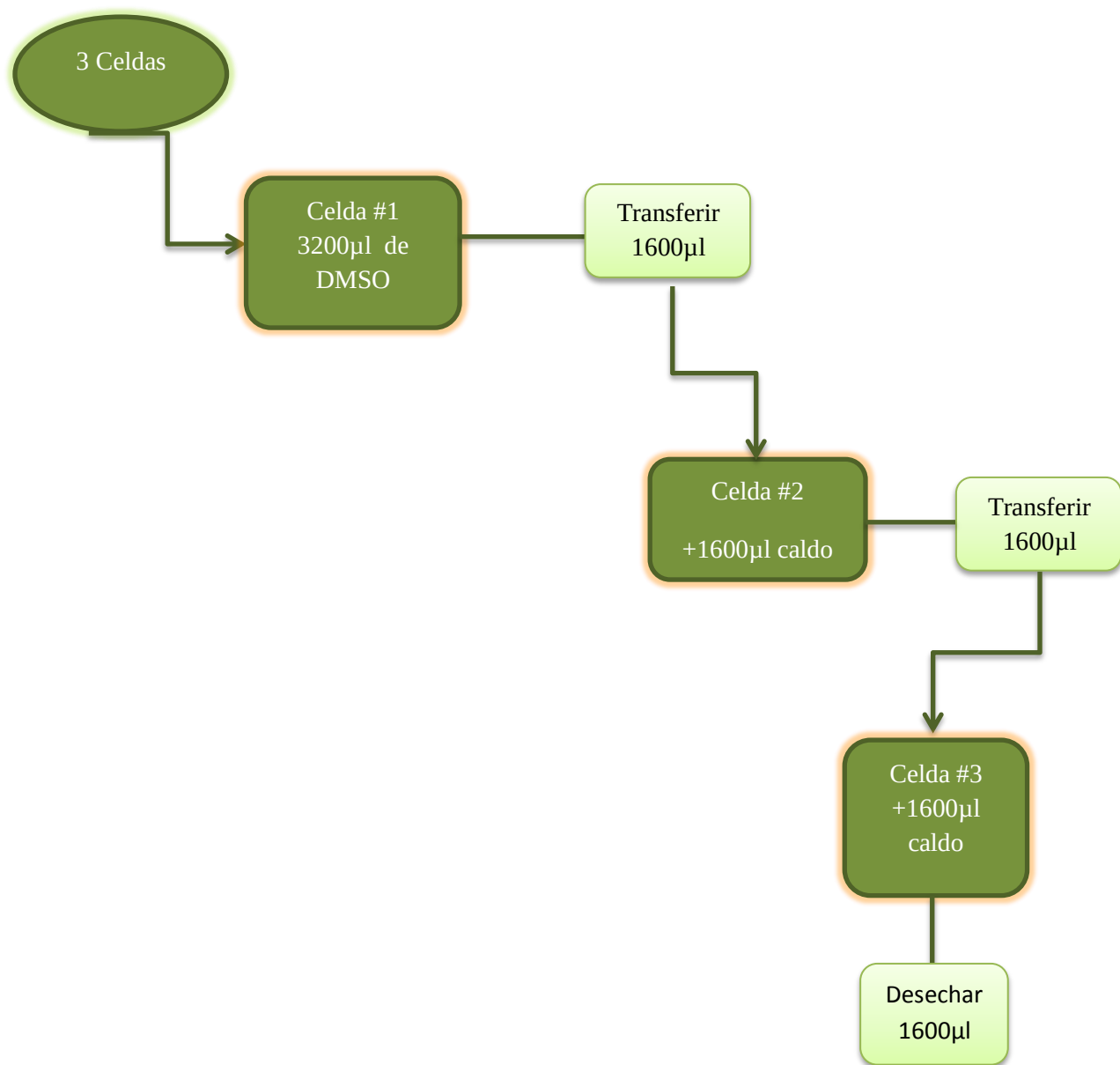


Tratamiento de control positivo: Tetraciclina Patrón



Ensayo

Blanco-Negativo



Preparación de Tetraciclina 500mg.

Nº	Cápsulas llenas	Cápsulas vacías
1	0.6364 g	0.1028 g
2	0.6421 g	0.1005 g
3	0.6045 g	0.1026 g
4	0.6453 g	0.1058 g
5	0.6368 g	0.1075 g
6	0.6439 g	0.1096 g
7	0.6319 g	0.1033 g
8	0.6406 g	0.1051 g
9	0.6347 g	0.1051 g
10	0.6530 g	0.1045
Media	0.6369 g	0.1046 g

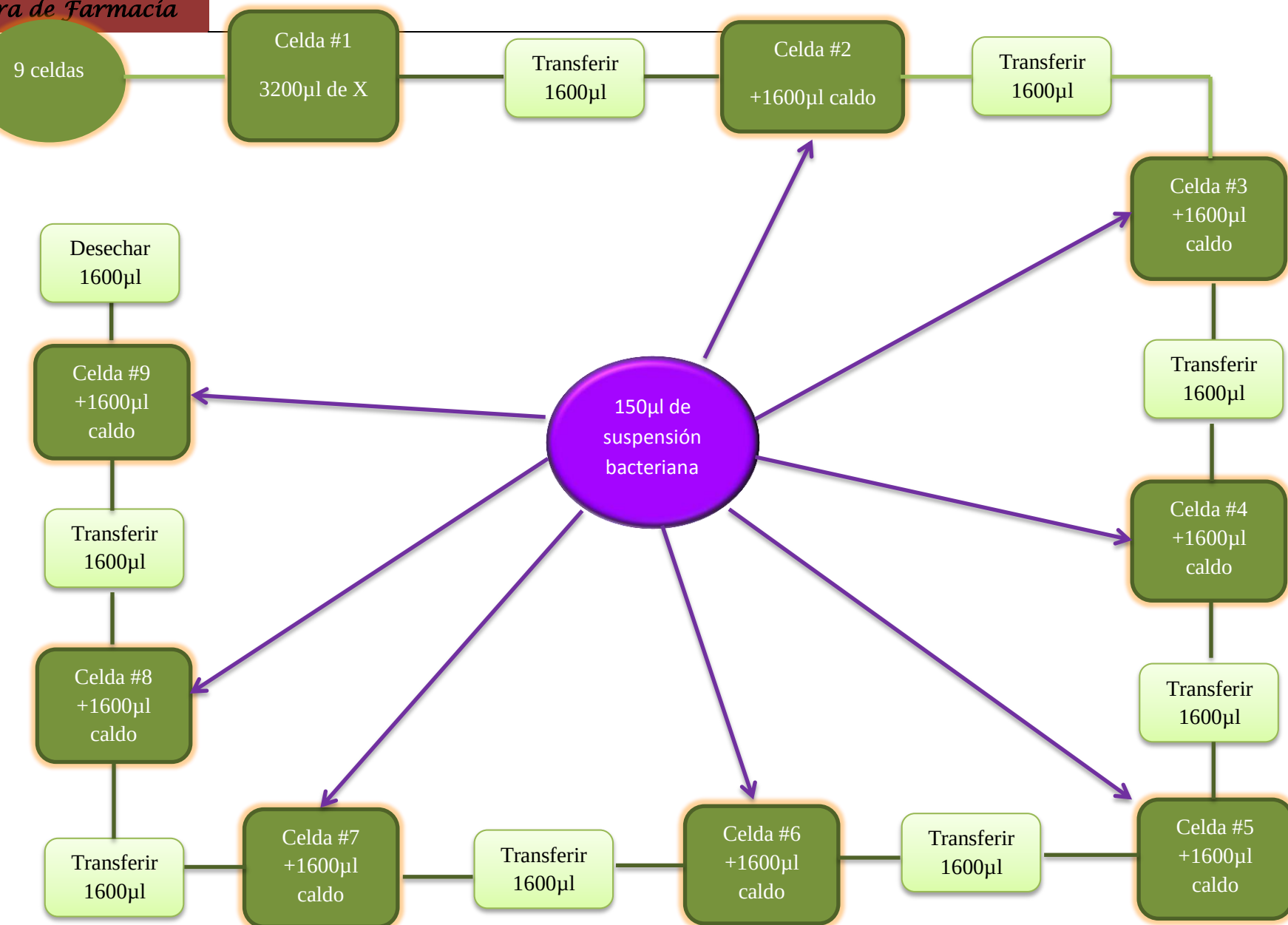
Peso promedio: Media de cápsulas llenas – Media de capsulas vacías

Peso promedio: 0.5323 g.

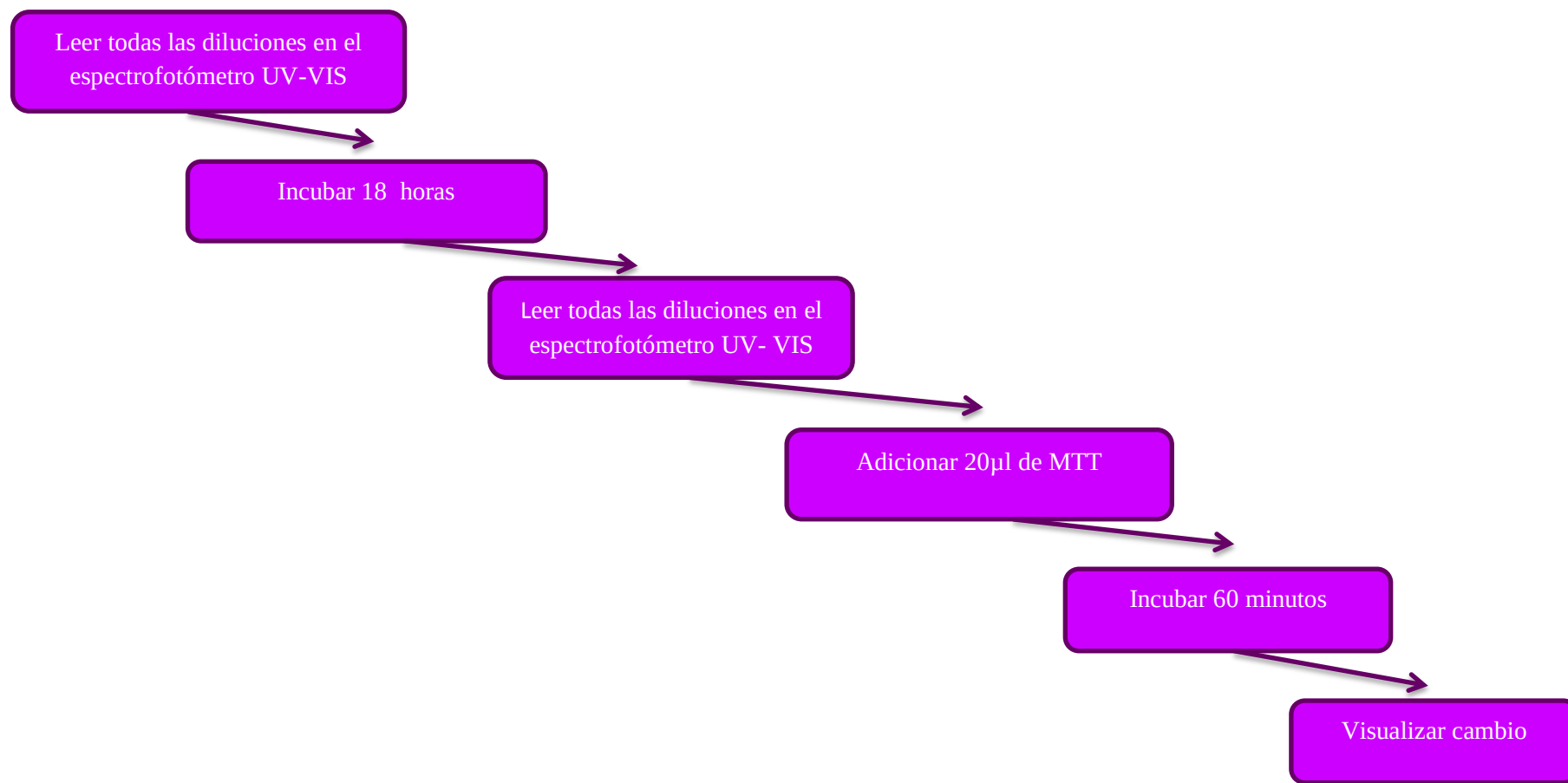
Peso utilizado: 0.102 g.

Diluciones realizadas:

X: Puede ser Patrón positivo (Patrón estándar del antibiótico), Capsulas del antibiótico, muestras o control de crecimiento (caldo sin antibiótico)



Lecturas de Absorbancias:



Plantas Estudiadas:

"Cola de Alacran" (*Heliotropium angiospermum*)



"Flor de Avispa" (*Hibiscus rosa-sinensis*.)



"Guayaba" (*Psidium guajava* L.)



“Palma” (*Roystonea regia*)



“Plátano Verde” (*Musa x paradisiaca*)



Cronograma de Actividades:

N.	Nombre de tarea	Comienzo	Fin	Duración	Cronograma																																															
					Sep 2012	Oct 2012	Nov 2012	Dic 2012	Ene 2013	Feb 2013	Mar 2013	Abr 2013	May 2013	Jun 2013	Jul 2013	Ago 2013	Sep 2013	Oct 2013	Nov 2013	Dic 2013	Ene 2014	Feb 2014	Mar 2014	Abr 2014	May 2014	Jun 2014	Jul 2014	Ago 2014	Sep 2014	Oct 2014	Nov 2014	Dic 2014	Ene 2015	Feb 2015	Mar 2015	Abr 2015	May 2015	Jun 2015	Jul 2015	Ago 2015	Sep 2015	Oct 2015	Nov 2015	Dic 2015								
1	Planteamiento del Tema.	12/09/2012	18/09/2012	1s																																																
2	Planteamiento de los Objetivos.	29/10/2012	26/12/2012	8.6s																																																
3	Recolección, búsqueda y análisis de la información.	14/09/2012	22/03/2013	27.2s																																																
4	Elaboración del Marco Teórico.	27/12/2012	22/03/2013	12.4s																																																
5	Elaboración de Diseño Metodológico.	27/12/2012	25/03/2013	12.6s																																																
6	Redacción de Protocolo.	27/12/2012	20/05/2013	20.6s																																																
7	Recolección de las Muestras.	24/06/2013	20/08/2013	8.4s																																																
8	Preparación de las Muestras.	23/08/2013	13/09/2013	3.2s																																																
9	Almacenamientos de las Muestras.	16/09/2013	22/11/2013	10s																																																
10	Aplicación del Método.	25/11/2013	02/12/2013	1.2s																																																
11	Discusión de Resultados.	02/12/2013	06/12/2013	1s																																																
12	Redacción de Informe Final.	02/12/2013	10/12/2013	1.4s																																																
13	Presentación del Trabajo Final.	10/12/2013	10/12/2013	.2s																																																