



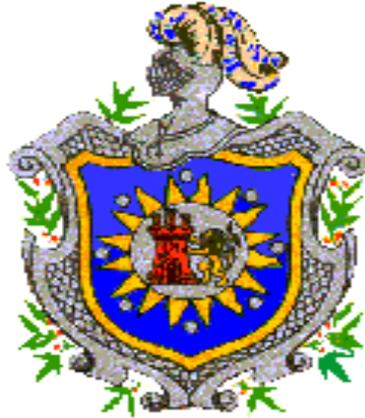
*Bixa orellana. L*

*Adriana Paredes*

*Zorayda Pérez*

*Facultad de ciencias químicas*  
*Virginia Palacios.*

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.  
UNAN- LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.**



**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN FARMACIA Y QUÍMICA**

Determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos del ***Bixa orellana L.*** en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*.

**AUTORES:**

Br. Adriana de los Ángeles Paredes Medina.

Br. Zorayda Maria Pérez Ortiz.

Br. Virginia Cristina Palacios Rosales.

**TUTOR:** Lic. Gloria Maria Herrera.

**LEON, NICARAGUA  
ABRIL 2004**



**TEMA:**

**Determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos del Bixa orellana L. en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*.**



## **AGRADECIMIENTO**

- *Damos gracias a **DIOS** por permitirnos llegar a la culminación de nuestros estudios y por ser el guía de todas las etapas de nuestro existir, fortaleciéndonos en nuestras caídas brindándonos su sabiduría.*
  
- *Agradecemos a **Lic. Gloria Maria Herrera** por habernos instruido durante el transcurso de la realización de este trabajo monográfico.*
  
- *A todo el personal de laboratorio:  
Sr. Clemente Velásquez.  
Sr. David Espinoza.  
Sra. Gladys Rojas.  
Por haber aportado su granito de arena.*



## **Dedicatoria.**

Dedico este esfuerzo grande primeramente a:

### **Mi Dios.**

Por guiarme siempre en su camino, porque sé que siempre estuvo, está y estará conmigo iluminando mi vida, escuchando mis oraciones, y por que confío que el me permitió llegar a esta etapa de mi vida.

### **A mi madre adorada:**

Maria Eloisa Ortiz, quien es el regalo mas grande que Dios me ha dado para ser mi apoyo, mi amiga, hermana y mi madre como el pilar de mi triunfo.

### **A mi padre:**

Alberto Pérez Morales por ser mi apoyo en tiempos difíciles.

### **A mis hermanos (a):**

Por que confiaron en mi que llegaría a lograr lo que en mi corazón estaba propuesto.

### **A mis profesores:**

Quienes nos transmitieron todo su saber y ese don hermoso que Dios les da para enseñarnos siempre que necesitemos.

### **A mis amigos (as).**

Por ser especiales, por demostrarme que si puedo lograrlo no mirando mi condición siempre estuvieron prestos para ayudarme.

**A mi novio:** por su comprensión, paciencia y seguridad que me brindo para confiar en mi misma.

Gracias, Dios por todo esto y más.

*Zorayda Maria Pérez Ortiz.*



## **DEDICATORIA.**

Dedico este trabajo monográfico,

### **A Dios padre:**

Porque me regala la vida, y hace una historia perfecta conmigo, porque siempre me ayuda en todos los obstáculos que se me presentan en este caminar.

### **A mis padres:**

Ángela del carmen Medina

José Enrique Paredes Meneses.

Con su amor, dedicación, trabajo y esfuerzos permitieron que llegara a realizarme profesionalmente.

### **A mis profesores:**

Me transmitieron su saber durante el periodo estudiantil con dedicación, dándome una ayuda en mi aprendizaje.

### **A mis amigos (as):**

Por estar conmigo en mis momentos de angustia, tristeza, decaimiento y de darme animos para continuar hacia delante.

### **A mi novio:**

Por ser tan especial conmigo, por su ayuda en la realización de este trabajo, su comprensión y su apoyo incondicional.

Gracias a todos.

*Adriana de los Ángeles Paredes Medina.*



## RESUMEN.

El uso tradicional de las plantas muchas veces no se encuentra científicamente justificados y continuamente se les ofrece a pacientes plantas míticas capaces de sanar prácticamente todo, sin embargo algunas plantas son una fuente importante de medicamentos y deben tratarse como tales. Desafortunadamente, solo una parte de las plantas medicinales utilizadas comúnmente en la práctica están avaladas por estudios metodológicos rigurosos.<sup>(4)</sup>

Dentro de la gran diversidad de plantas medicinales el **Bixa orellana L.** fue recolectada y empacada en la ciudad de León para su posterior identificación en el herbario de la UNAN - LEON Miguel Ramírez Gollena; contando con la misma planta e interesándonos en sus semillas se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes en su extracción de bixina obteniéndose lo siguiente:

**Bixa orellana L.** con bixina (colorante.)

**Bixa orellana L** sin bixina,

Luego utilizando el lavado o enjuague posteriormente fue secado igual que el que contaba con el colorante, para luego ser estudiada por el método de MITCHER, con el objetivo de determinar su actividad antimicrobiana contra las cepas de, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Micrococcus luteus y Klebsiella pneumoniae.

De las dos muestras evaluadas una presentó actividad antimicrobiana contra las cuatro cepas a la cual posteriormente se le calculó la CMI, siendo la muestra que presentó actividad **Bixa orellana L** sin bixina a una concentración de 2g/1.5mL-1.46g/1.1mL en un mayor período de tiempo, de 48 horas.



## INTRODUCCION

El empleo de hierbas terapéuticas puede registrarse desde tiempos muy remotos; aún cuando no existían documentos escritos ya se utilizaban plantas con fines terapéuticos. La fitoterapia tal como se conoce en la actualidad, es la ciencia del tratamiento de las enfermedades con plantas medicinales, basados tanto en la investigación como en la experiencia popular. (2)

Las hierbas medicinales ofrecen una amplia variedad de principios activos con diversa actividades biológicas. En los últimos años se han revalorizados los productos naturales como fuente de sustancias de interés médico, veterinario, cosmético y agroquímico. Aproximadamente el 25% de las drogas que se comercializan en el mercado provienen de una fuente vegetal. Se conocen alrededor de 250,000 especies, sin embargo solo el 1% de estas han sido estudiadas exhaustivamente en cuanto a la composición química y uso terapéutico, existiendo aun una gran cantidad de moléculas bioactivas por ser estudiadas. (2)

De la información escrita del **Bixa orellana L.** podemos encontrar partes importantes de la planta que se han empleado por su uso medicinal tales como: sus hojas, corteza y fruto. Por tal razón son muchos los efectos que se le atribuyen a esta planta. Del fruto de **Bixa orellana L.** que se extrae en Sudamérica una sustancia denominada "achiote" era utilizada en tiempos atrás a manera de pigmento en tintorería, para teñir ceras y como colorante natural en algunas bebidas. (2)

Los resultados de estudios farmacológicos han comprobado sus acciones terapéuticas, diuréticas, antigonorréicas y antibacterianas, que refuerzan la acción benéfica del ACHIOTE sobre la próstata y las vías genitourinarias, teniendo en consideración que la prostatitis es una inflamación generalmente de origen infeccioso y cuyo tratamiento requiere de productos antibacterianos y diuréticos.

Con el auge que actualmente está teniendo la medicina tradicional en Nicaragua, tomamos a esta planta; por su fuerte potencial, debido a que sus sustancias biológicamente activas son de gran importancia para el tratamiento de enfermedades, por tanto no podemos pasarlo por alto.



La actividad antimicrobiana de la planta no es algo nueva en el mundo de la investigación científica; razón por lo que en el presente trabajo se estudia la actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos con la utilización del screening antimicrobiano por el método de MITCHER ejercida por el fruto de la planta **Bixa orellana** L. Comparando su acción con la de tres antibióticos: Vancomicina, Gentamicina y Cefalexina. Sobre cuatro cepas de microorganismos susceptibles a ellos como son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae* para su posible utilización como antimicrobiano en la ciudad de León. (1)



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

☀ Evaluar la actividad antimicrobiana de los frutos del **Bixa orellana** L. en cepas de *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Micrococcus luteus* recolectadas en la ciudad de León .

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Preparar extractos hidroalcohólicos de la semilla del **Bixa orellana** L. con bixina y sin bixina.
2. Efectuar la siembra de *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* y *Micrococcus luteus* en muestras y patrones respectivamente.
3. Determinar concentración mínima inhibitoria(CMI) del extracto de semilla del **Bixa orellana** L.



## **Índice.**

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>6</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>8</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>30</b>
<b>Material y método.....</b>	<b>32</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>Análisis de resultados.....</b>	<b>41</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>43</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>47</b>
<b>Glosario.....</b>	<b>.....</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>.....</b>



## **LA RECOLECCION DE PLANTAS**

La recolección requiere de una especial atención y dedicación en determinadas épocas del año según la especie a recolectar. Una parte de una planta determinada recolectada antes de la floración o después de ella no tendrá los mismos principios activos, al igual que si se recolecta en día soleado o nublado variara su composición en aceites esenciales.<sup>(1)</sup>

### **LA RECOLECCION**

La recolección de drogas provenientes de plantas cultivadas asegura una fuente natural valiosa para la obtención de productos de calidad, lo que no siempre se logra en el caso de las drogas extraídas de plantas silvestres. La falta de cuidado o la ignorancia por parte del recolector, puede traer como consecuencia la sustitución parcial o completa de las mismas, especialmente cuando las drogas son difíciles de recolectar o cuando la fuente natural es muy escasa. Muchas drogas son recolectadas en gran escala de plantas salvajes por cosechadores de oficio, y otras veces en pequeña escala, por parte de aficionados. Dado que las drogas provienen de todas partes del mundo, las áreas de recolección son casi universales y los recolectores varían desde nativos analfabetos hasta botánicos altamente especializados.<sup>(1,5)</sup>

- El mejor momento es cuando la parte vegetal de la droga tiene el más alto contenido de principios activos, y cuando el material desecado ofrece la mejor calidad y tiene el mejor aspecto.<sup>(1,5)</sup>

### **LA SEMILLA**

Las semillas deben recolectarse cuando están completamente maduras, si estas provienen de frutos carnosos deben estar limpias de los restos de la pulpa que las envuelve y deben estar secas, pero, si es posible, antes de la dehiscencia de los frutos, preferiblemente entre el décimo y el octavo mes del año.<sup>(\*)</sup> <sup>(1,6)</sup>

### **RAICES Y RIZOMAS**

Las raíces y rizomas deben recolectarse durante el invierno, en el período de reposo vegetativo. Las raíces, especialmente si son carnosas, encogen y se vuelven esponjosas con el secado si se las recoge durante la época de crecimiento.<sup>(\*)</sup> <sup>(5,6)</sup>



## **CORTEZAS**

Las cortezas deben ser recogidas en el inicio del verano. La atmósfera húmeda facilita la separación de la corteza. Las cortezas deben ser retiradas cuidadosamente y deben ser cortadas en segmentos verticales. Se deben tener en cuenta diversos cuidados para no hacer en la corteza cortes horizontales alrededor del tronco, ya que este procedimiento impide la circulación de la savia y produce la muerte de la planta. (5;7)

## **FLORES**

Las flores serán recolectadas antes o casi en la época de polinización.(4)

## **FRUTOS**

Los frutos pueden ser recolectados antes o después del período de maduración, es decir cuando están totalmente desarrollados pero no maduros, o cuando están completamente maduros. (4)

## **SECADO**

El secado del material vegetal elimina suficiente cantidad de humedad como para conservar la calidad de la droga y prevenir el enmohecimiento, la acción de las enzimas y de las bacterias, y posibles alteraciones químicas. El secado fija los constituyentes y facilita la trituration y la molienda. (7)

Este procedimiento comprende dos principios básicos:

- Control de la temperatura y regulación de la ventilación.
- Control del secado depende de la naturaleza del material que ha de secarse y del aspecto que se desee dar al producto terminado.



El secado al aire puede hacerse al sol o a la sombra, según el material.  
El secado al sol es apto para drogas que no son alteradas por los rayos solares.  
El secado a la sombra se hace cuando se desea conservar el color natural de la droga.

El secado con calor artificial es el método más aceptable si se usa con habilidad. Requiere el empleo de diversos secadores, que pueden adquirirse o armarse especialmente.

En principio, el secado consiste en un espacio cerrado donde se ubican varias bandejas movibles y separadas, para permitir la circulación de aire caliente; la ventilación puede ser regulada y del mismo modo la fuente de calor. Dicho espacio debe tener capacidad para un poco más de la cantidad prevista.

El secado artificial es más ventajoso que el secado al aire porque detiene la acción enzimática más rápidamente. Las raíces y rizomas son cortados en lonja o rebanadas para facilitar el secado. Si las condiciones climáticas lo permite puede secarse al sol, asegurando una ventilación correcta para evitar enmohecimiento. Las cortezas se secan al sol, a la sombra o por medio de calor artificial, según la naturaleza de los constituyentes.

El secado de las flores requiere mayor cuidado que las otras partes del vegetal porque sus principios activos tienden a ser menos termo estables que los de otras drogas. (7)

### **TECNICA DE EXTRACCION:**

Para aprovechar las sustancias activas de una planta medicinal, se recurre frecuentemente a los extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un líquido, que generalmente suele ser agua o alcohol; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución más o menos concentrada en aplicación que se le vaya a dar.

Existen varias técnicas de extracción. Veamos las más clásicas:

#### **Percolación**

Es una extracción que se realiza también a temperatura ambiente de entre 15° a 20°. Este procedimiento utiliza un líquido circulante. Es el método empleado ordinariamente para extraer las sustancias tóxicas.<sup>(11)</sup>

#### **Digestión**

Se trata de una extracción a altas temperaturas, de entre 35° y 40° C., aunque no superiores a 50° C. Este procedimiento se realiza con aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles. Para ello se introducen las partes a extraer en un recipiente, con el líquido previamente calentado a las temperaturas indicadas; se mantiene durante un período que puede oscilar entre media hora y 24 horas, agitando el envase regularmente.<sup>(11)</sup>



## **Infusión**

Ya que los aceites esenciales que contienen se evaporan a temperaturas mayores que las precisas para preparar la infusión.

La infusión se realiza sumergiendo las partes troceadas de la planta en una cantidad de agua hirviendo (dependiendo de la planta pueden ser partes enteras, como las semillas del lino); se deja reposar unos 15 minutos removiendo de vez en cuando y se filtra a continuación mediante un tamiz o papel de filtro. Las dosis generales (excepto para drogas tóxicas que deberán determinarlas un médico) son aproximadamente de un gramo de planta por cada 10 de agua. <sup>(11)</sup>

## **Decocción**

La decocción es una extracción en agua de determinadas partes vegetales, a la cual se le da un cierto tiempo de ebullición. Dependiendo de la consistencia de las partes a extraer, se darán tiempos de decocción más o menos largos; generalmente, las raíces, hojas, flores y pedúnculos foliados se hierven en agua durante unos 15 minutos, mientras que las ramas y otras partes más duras pueden precisar hasta una hora, tiempo durante el cual deberá ir reponiéndose el agua evaporada. Una vez hecha la decocción hay que filtrar el líquido mediante un paño, exprimiendo bien el líquido de las partes cocidas. Las dosis son similares a las de la infusión, es decir una parte de planta por cada diez de agua salvo con las plantas que tienen alto contenido en mucílagos (malvavisco o lino) que será de 1/20. Hay que tener la precaución de no almacenar las decocciones, no se deben conservar más allá de 48 horas; preferentemente se prepararán para aplicar en el momento. <sup>(9,11)</sup>

## **Los extractos**

Los extractos son sustancias, más bien concentradas, obtenidas mediante maceración en determinados líquidos, como agua, alcohol, éter, o mezcla de éstos.

Se suelen aplicar en gotas o mediante mezclas diversas, y pueden tener consistencias líquidas, densas, fluidas o secas. Los extractos líquidos, como los de tomillo, son ligeramente espesos, parecidos a los de un almíbar. Los extractos fluidos, como los del helecho macho, tienen consistencia similar al de la miel fresca. El extracto denso, como el de la belladona, contiene un máximo del 20% de agua, mientras que el 80% es materia seca. El extracto seco, como el del ruibarbo, tiene solamente un 5% de agua, por lo que puede ser convertido fácilmente en polvo. <sup>(9,11)</sup>



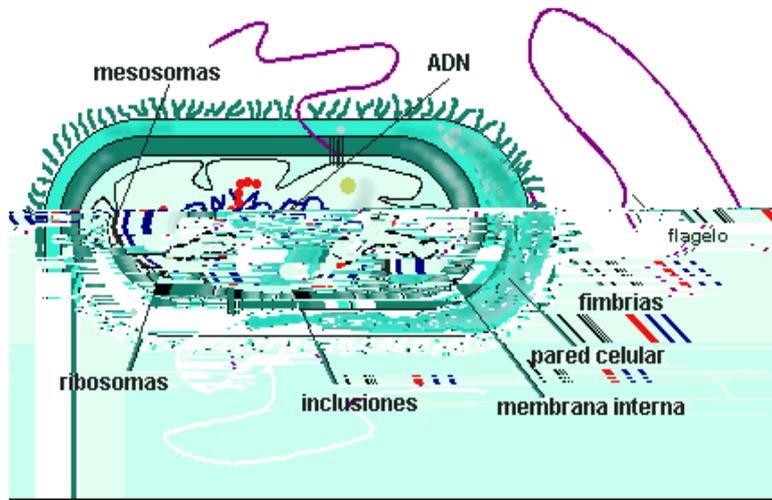
## MACERACION

La maceración consiste sencillamente en remojar la droga o sustancia, debidamente fragmentada, en un menstro, hasta que este penetre muy bien en la estructura celular y se ablanden y disuelvan las porciones solubles. Se pone la droga en un frasco con el disolvente, se tapa bien aquel y se agita de cuando en cuando por un período de dos a catorce días; luego se decanta el líquido, se exprime el residuo para evitar perdidas y se filtran los líquidos mezclados. Algunas veces la droga triturada se mete en un saquito y se suspende en la porción superior del menstro. Se maceran las drogas en determinadas cantidades de menstro, que puede ser alcohol de concentraciones diversas, éter y alcohol o algún otro disolvente que se especifique. Se requiere cierto tiempo para la maceración; y preparar algunas tinturas se recomienda la agitación. Luego se separa el líquido por coladura o exprimiendo el líquido insoluble, y después que se deja asentar, se filtra. Se ha de evitar cuanto sea posible la evaporación durante la filtración. La maceración no tiene ninguna ventaja sobre la lixiviación para confeccionar gran numero de preparados líquidos de drogas, a menos que la segunda se haga descuidadamente o por persona inexperta. Si el operador no tiene ningún conocimiento del proceso de lixiviación, es más segura la maceración, que no requiere ninguna particular destreza ni criterio alguno; el remojo. Se concluye a su debido tiempo, y la separación del líquido absorbido, aunque es una operación laboriosa y sucia, tiene, cuando menos, la ventaja de producir una tintura de concentración uniforme; si no se hace bien la expresión; acarrea perdidas pecuniarias a causa del menor rendimiento; más el preparado final representa debidamente la droga. En cambio, en la lixiviación, si no se aprieta uniformemente el polvo de la droga en el lixivador, no se extrae todo su principio soluble con la cantidad de menstro empleada, queda en el residuo que se desecha parte de la sustancia activa y el preparado no tiene la debida concentración. Es preciso valerse de la maceración para extraer ciertas drogas, principalmente las que contienen poca o ninguna estructura celular, como benjuí, aloe, el estoraque, el Tolú, etc.

La maceración se debe efectuar a temperaturas de 15 a 20°C. (9,11)



# BACTERIAS



Son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistas inferiores. Son células de tamaño variable cuyo límite inferior está en las  $0,2\mu$  y el superior en las  $50\mu$ ; sus dimensiones medias oscilan entre  $0,5$  y  $1\mu$ .<sup>(12,13)</sup>

Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores; son células procariontas (Su núcleo está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear). Igualmente son muy diferentes a los virus, que no pueden desarrollarse más dentro de las células y que solo contienen un ácido nucleico.<sup>(12,13)</sup>

Las bacterias juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el hombre: la presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, aunque gérmenes son patógenos. El examen microscópico de las bacterias no permite identificarla, ya que existen pocos tipos morfológicos, cocos(esférico), bacilos(bastón), espirilos (espiras) y es necesario por lo tanto recurrir a técnicas específicas <sup>(12,13)</sup>



## GENERO STAPHYLOCOCCUS

Él género contiene al menos 15 especies.

### PRUBAS PARA STAPHYLOCOCCUS:

- Pruebas de coagulasa +
- Proteína A en la superficie celular +
- Producción de exotoxina reconocidas +
- Producción de hemolisina +

Resistencia a novobiocina (5µg): Útil para distinguir entre *S. epidermis* y *S. saprophyticus*.

### Staphylococcus aureus

**Características:** Cocos gram positivos; células en grupo(lo que refleja la capacidad de dividirse en más de un plano); células individuales de alrededor de 1µm de diámetro. Algunas cepas producen cápsulas. No son sensibles, capaces de respiración aeróbica y anaerobia.

**Enfermedades:** Furúnculos; Sepsis cutánea, infección de heridas postoperatoria; síndrome de la piel escaldada; infección asociada al catéter; infección transmitida por alimentos, septicemia, endocarditis, síndrome de shock tóxico, osteomielitis; neumonía.

**Transmisión:** Hábitat normal; seres humanos (y animales asociados con ellos), piel, especialmente la nariz y el perineo ( muchos portadores entre los pacientes y el personal del hospital). La transmisión es por contacto y vía aérea. El microorganismo sobrevive a la desecación, tolera sales y nitritos.

**Marcadores epidemiológicos:** Tipificación mediante bacteriófago.

**Patogenia:** Virulencia multifactorial y la mayor parte de los factores que se muestran a continuación está presente en algunas cepas: Asociadas con las células; cápsula proteína A\* proteína ligada de fibronectina, proteína ligadora de colágeno.

Presentes en todas las cepas: **Mucopéptido, coagulasa.**

Muchas cepas tienen la proteína A unida al Mucopéptido de la pared celular. Esta proteína interacciona de forma inespecífica con los anticuerpos Ig G del huésped reduciendo la opsonización y provocando la activación local del complemento.

**Tratamiento y prevención:** Los antibióticos de elección son las proteínas estables frente a betalactamasa( alrededor del 80% de los aislados hospitalarios produce betalactamasa). La resistencia a metilcilina es un problema local y en este caso esta indicada la vancomicina. La mupirocina puede utilizarse para el tratamiento tópico del estado del portador.

Prevención de la transmisión mediante aislamiento y tratamiento de los portadores en áreas de alto riesgo en el hospital. No se dispone de ninguna vacuna.



La mayoría de las personas albergan *Staphylococcus* sobre la piel, nariz o faringe. El microorganismo desarrolla con rapidez resistencia a muchos fármacos antimicrobianos y dichos fármacos no pueden actuar en la porción necrosada de una lesión supurante.

Las infecciones como bacteriemia, endocarditis, neumonía requieren terapéutica intravenosa con penicilina resistente a betalactamasa. La vancomicina se reserva para su empleo contra *S. Aureus* resistente a la nafcilina. El fármaco preferido es la penicilina G.

La selección efectuada por los antimicrobianos resistentes a betalactamasa no es el único determinante de la resistencia bacteriana a dichos fármacos. <sup>(14)</sup>

## **GENERO ESCHERICHIA**

Este género contiene sólo una especie con importancia medica *E. Coli*.

**Características:** Bacilo Gram. Negativo; móvil; con o sin cápsula; no es delicado, anaerobio facultativo, tolera la bilis capaz de crecer a 44°C.

**Enfermedades:** Infección de las vías urinarias; enfermedades diarreicas; meningitis de recién nacidos; septicemia.

**Transmisión:** El hábitat normal es el intestino del hombre y los animales; pueden colonizar la porción inferior de la uretra y la vagina. Se transmite por contacto y por ingestión( vía fecal - oral); puede asociarse a alimentos, puede ser endógeno. Posee los antígenos O ( somáticos), H (flagelar), K ( capsular) y F ( fimbria), que puede utilizarse para caracterizar las cepas mediante serotipificación. También esta disponible la tipificación con colicina ( Bacteriosina).

**Patogenia:** Se han identificado varios factores de virulencia, sobre todo de cepas asociadas con enfermedades diarreicas.

**Tratamiento y prevención:** Disponemos de una amplia variedad de agentes antibacterianos, pero la incidencia de resistencia es variable y a menudo esta mediada por plasmidos. El tratamiento con antibiótico reduce de manera eficaz la duración de la enfermedad pudiendo ser él más selectivo la Gentamicina. Debe determinarse mediante pruebas de sensibilidad. No suele ser necesario el tratamiento específico de la enfermedad diarreica. No se dispone de ninguna vacuna. <sup>(14)</sup>



## **GENERO: KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

**Características:** Bacilos Gram. negativos a veces encapsulados (habitual en klebsi), pocas exigencias para el crecimiento. Capaces de respiración aeróbica y anaerobia.

**Identificación en laboratorio:** Microorganismos que fermentan la lactosa, toleran la bilis. Crece fácilmente en medio ácido laboratorio habitual oxidasa negativas. La identificación completa se basa en reacciones bioquímicas( se dispone de juegos de reactivos comerciales).

**Enfermedades:** Infecciones oportunistas en el huésped inmuno deprimido (habitualmente hospitalizado). Los lugares más frecuentes de infección son las vías urinarias y respiratorias puede ser difícil distinguir entre colonización e infección.

**Transmisión:** El hábitat normal es el intestino del hombre y los animales y los ambientes inanimados húmedos, especialmente el suelo y el agua. La infección puede ser endógena o adquirirse por contacto. Klebsiella tiene una capacidad notable de sobrevivir en las manos. Se dispone de varios métodos de identificación epidemiológica para estudiar los brotes de infección hospitalaria.

**Patogenia:** Todos poseen endotoxinas y fimbrias u otras adhesiones, las cápsulas cuando están presentes son importantes para inhibir la fagocitosis.

**Tratamiento y Prevención:** Es frecuente la resistencia a múltiples antibióticos, habitualmente mediada por Plásmido y si está indicado el tratamiento hay que realizar pruebas de sensibilidad. El tratamiento con antibiótico reduce de manera eficaz la duración de la enfermedad pudiendo ser él más selectivo la Gentamicina aunque la prevención depende de prestar una atención escrupulosa a las técnicas asépticas y el lavado de manos en los hospitales.



## **GENERO *MICROCOCCUS* COCOS**

### **Suborden *Micrococccineae*.**

### **Fam. *Micrococcaceae*.**

**Características:** Gram. (+), aerobios, inmóviles. *M. luteus*, colonias amarillas.

Los micrococcos son células bacterianas esféricas dispuestas en agrupaciones irregulares en racimos, en tétradas o paquetes (masas irregulares, no suelen formar cadenas). La mayoría de las especies que abundan en los alimentos son aerobias, no son patógenas (desprovistas de coagulasa y hemolisina) y catalasa positiva. Es flora inocua, es frecuente después del otoño por su temperatura óptima elevada (25° a 30°C).

**Hábitat:** suelos y aguas.

La importancia de los diferentes micrococcos en alimentos se debe a las siguientes propiedades:

- (1) Algunas especies son capaces de utilizar las sales de amonio otros compuestos nitrogenados sencillos como única fuente de nitrógeno,
- (2) La mayoría de las especies son capaces de fermentar azúcares produciendo una mediana cantidad de ácido,
- (3) Algunas desdoblan las proteínas con producción de ácidos (*M freudenreichii*),
- (4) Otras toleran concentraciones elevadas de sal, son capaces de crecer en medios con valores de humedad relativamente bajos; estas especies crecen en las salmueras,
- (5) Algunas son termodúricas, resisten al tratamiento de comercial que se aplica a la leche (*M. varians*),
- (6) Otras producen pigmentaciones y coloraciones anormales en la superficie de los alimentos, por ejemplo *M. luteus* produce un pigmento amarillo, mientras que *M. roseus* produce un pigmento rosado,
- (7) algunos micrococcos son capaces de crecer a temperaturas próximas o inferiores a los 10°C.

Los micrococcos abundan en polvo y agua, se encuentran frecuentemente en los utensilios y equipos insuficientemente lavados y desinfectados.

### **Tratamiento :**

El tratamiento con antibiótico reduce de manera eficaz la duración de la enfermedad pudiendo ser él más selectivo la Cefalexina.



## **ENSAYOS ANTIMICROBIANOS**

### **Introducción**

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o difusión, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El método de difusión define la actividad *in Vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Para determinar la actividad de los antimicrobianos se emplean métodos generales de evaluación siendo su clasificación la siguiente:

1. Métodos de difusión:
  - a) Método del disco.
  - b) Método del ensayo de agujero en plato.
  - c) Método del cilindro.
  
2. Método de dilución:
  - a) Método de ensayo o turbidimétrico.
  - b) Método de dilución en agua.
  
3. Método bioautográficos:
  - a) Bioautografía de contacto.
  - b) Bioautografía directa.
  - c) Bioautografía de inmersión.

## **MÉTODOS DE DIFUSION**

### **Método de difusión disco – placa:**

La difusión disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos más recomendados para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. La difusión disco- placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración.



Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.

Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (Ej. : métodos de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o “recta de concordancia” que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (L) o resistente (R).

### **MÉTODO DEL EPSILON TEST**

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

### **MÉTODOS DE DILUCIÓN.**

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.



Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.

### **Dilución en agar:**

En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar, teniendo en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos.

### **Dilución en caldo**

Se recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con  $\text{Ca}^{2+}$  (20-25 mg/l) y  $\text{Mg}^{2+}$  (10-12.5 mg/l). Esta cantidad de iones divalentes asegura la reproducibilidad de los valores de CMI de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos, al compararlos con los que se obtienen con agar Mueller-Hinton.

Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo).

### **Método de macrodilución.**

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos

### **Método de microdilución.**

En el método de microdilución cada una de las pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en "U" representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o bien se pueden comprar a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados.



## INFORMACION BOTANICA, ETNOMEDICA, BIOLOGICA Y QUIMICA DE LA ESPECIE.

**Nombre científico:** Bixa orellana L.

**Género y Especie:** Bixa orellana L.

**Familia:** BIXACEAE.

**Nombres comunes:** Achiote, anato, analto, bija, Bixa, urucú, chancaguarica, achote, achote de monte, annatto, orellana, eroya, pumacoa, rocou, uñañe.(17)



Castedo, J.P. [www.ccbol.com/achiote.html](http://www.ccbol.com/achiote.html)



[www.peruecologico.com.pe/econeg\\_achiote.html](http://www.peruecologico.com.pe/econeg_achiote.html)



## DESCRIPCION BOTANICA

Arbusto o árbol pequeño cuyas ramas se inician a 1m. del suelo y puede crecer hasta 5 o 6m. Su aspecto es robusto, muy frondoso y ornamental, con hojas, simples, alternas, grandes cordiformes y lustrosas, ovadas, de punta larga en el ápice, en pecíolos delgados y largos, acorazonadas en la base, puntos notables de color marrón en el envés, de 9 a 19 cm de largo por 6 a 11 cm de ancho. Flores hermafroditas, muy vistosas, blancas o rosadas, agrupadas en panículas o inflorescencia terminales con estambres numerosos. El fruto es una cápsula ovoide a ovoide globosa, pardo-rojiza, de 3 a 5 cm de largo por 3 a 4.5 cm de diámetro.

Semillas rojas casi triangulares algo comprimidas y pequeñas de 5 a 5.5 cm de largo por 4 a 5 mm de ancho, con una testa pulposa de color rojo y un albumen carnoso. Los cotiledones son planos. La corteza externa café claro, algo fisurada, se desprende fácilmente en largas tiras. <sup>(16)</sup>

## HABITAT.

Desde orillas del mar hasta 1700 metros de altitud. Prospera en climas diversos, preferentemente en los de tipo cálido, húmedo, semicálidos y templados, con temperaturas que varían entre 20 y 30°C y precipitaciones anuales mayores a 1000mm. Las optimas condiciones para cultivar Achiote las reúnen aquellas regiones entre 100 - 300m de altitud, con temperatura media entre 20 y 26°C y un máximo de 3 meses de época seca.

Se puede adaptar a una gran variedad de suelos, ya que se encuentran creciendo desde los suelos franco - arenoso hasta arcillosos, pueden crecer en suelos de escasa fertilidad natural, los mejores rendimientos se han obtenidos en suelos aluviales, bien drenados y con altos contenidos de materia orgánica.

## USOS ETNOMEDICOS

Usos reportados por la tradición oral: Para curar la bronquitis y regular las funciones digestivas, lo mismo que en los casos de envenenamientos producidos por la "yuca brava", como antídoto y en el tratamiento de las quemaduras para que no queden cicatrices. Se reporta también como repelente o ahuyentados de insecto y como adorno o arreglo personal directo en muchas tribus indígenas. Se usa como antiinflamatorio, antictérico, antiespasmódico. Las semillas se emplean para tratar bronquitis, hemorroides. El aceite en gargarismos se usa para curar la tosferina. El aceite de Achiote o las semillas machacadas y aplicadas localmente se consideran un remedio en caso de quemaduras. Las cataplasmas y los emplastos con infusión de semillas en aceite o leche caliente, se utilizan fríos contra inflamaciones producidas por golpes, esquinces y torceduras.



La decocción de las raíces es considerada como diurético, antidisenterica, antivenérea y antidiabética. La decocción de las hojas, en forma de gargarismo, se emplea como desinflamatorio en las inflamaciones de boca y garganta y como emenagogo, hepatotropo, diurético, purgativo, antivenéreo, antiemético y reanimante después de las fiebres intermitentes.

La decocción en leche de las semillas es utilizada para curar personas con astenia y debilidad. La infusión o la decocción de las semillas se utiliza como antidiarreico, calmante de las hemorroides, hepatotrópico, tónico, vulnerario, digestivo, laxante suave, diurético, purgativo, antiemético, estomacico, antiasmático, febrífugo, antidiabético, expectorante, afrodisíaco y repelente de insectos especialmente de mosquitos y zancudos.<sup>(16)</sup>

### **ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

Los extractos en alcohol etílico de hojas han mostrado tener *in vitro* actividad en contra de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La harina colada de la semilla tiene un valor biológico de la proteína y una digestibilidad suficiente para utilizarla como fuente de alimentación. (16)

### **COMPOSICION QUIMICA**

**Carotenoides:** Bixina, norbixina, metil-bixina, betacaroteno, criptoxantina, luteínas y zeaxantina.

**Flavonoides:** Bisulfato de apigenina, glucósidos de apigenina, bisulfato de hipolactina, bisulfato de luteína, etc...

**Proteínas:** Azúcares, celulosas, grasas, vitaminas A, B y C; Calcio, hierro, fósforo.

**Betacarotenos, triterpenos (tocotrienol).**

### **VARIEDADES:**

No se han realizado estudios sistemáticos amplios. Empíricamente se conocen algunas variedades, distinguidas por características de color y forma de las cápsulas:

- \* Variedad de flor rosada y cápsula morada. (Coloración morada)
- \* Variedad de flor blanca y cápsula verde. (Coloración amarilla)
- \* Variedad con cápsula sin espinas.

El Centro Agronómico Tropical de Investigaciones Experimentales - CATIE - de Costa Rica realiza, desde hace varios años, estudios varietales.

1) **ACHIOTE o ACHOTE:** (*Voz caribe*). Árbol mediano de tronco delgado, ramas irregulares cubiertas de hojas anchas, acorazonadas, que crecen alternadamente y mantienen permanente follaje, flores blancas, olorosas, que dan como fruto racimos de pequeñas cápsulas de forma similar a las hojas, erizada la superficie de múltiples y pequeños pelos ásperos al tacto y llena de granos rojos. Estos granos tiñen de color rojo anaranjado los aceites y especias que se utilizan en la cocina.



Se cultiva en los patios caseros donde su follaje y olorosas flores sirven de ornamento, amén de la utilidad de las semillas. Se reproduce por semillas.

2) **ACHOTE o ACHOTE DE BIJA O VIJA:** Árbol de características similares al anterior, pero de flores rojas y semillas de color rojo más encendido y tinte más fuerte que el anterior, que antiguamente era usado por los indios chimilas y caribes en general, para teñirse el cuerpo y la cara. Se reproduce por semillas.

**Bixa orellana L.** Es originaria de América tropical, posiblemente del sureste de las amazonas. Se extiende desde México hasta Brasil, Argentina y en el caribe. Actualmente se distribuye en los países tropicales del nuevo y viejo mundo.

Debido a la escasez de la existencia de la variedad amarilla de **Bixa orellana L.** En nuestro país trabajamos con la variedad colorada de esta planta la cual fue recolectada en León en la comarca Clarisa Cárdenas carretera a Poneloya.

## FARMACOLOGIA

Los estudios farmacológicos son relativamente escasos ya que los colorantes utilizados en la industria alimenticia, son claramente inertes biológicamente, no tienen olor ni sabor y se utilizan en una proporción tan pequeña que su acción farmacológica es deleznable. Sin embargo su uso en la medicina tradicional de diversos grupos humanos ha atraído alguna atención hacia estudios de laboratorio.

Patnaik y su grupo probaron también la posible acción hipoglicémica de las hojas y tallos encontrando que no tenía ningún efecto, pero Morrison y West encontraron que las semillas sí lo tienen por vía oral.

Nuevamente Patnaik y colaboradores, no encontraron actividad antiespasmódica en las partes aéreas de la planta, Dunham y Allard demostraron que en la raíz hay sustancias que relajan el músculo liso del intestino del ratón y disminuye la secreción gástrica de la rata. Así mismo se demostró que extractos acuosos de la raíz poseen actividad hipotensora en ratas y ratones y músculo-relajante en cerdos.



## **CEFALEXINA**

**Farmacocinética:** Se absorbe después de la ingestión y es posible administrarlo por vía oral; la cefalexina oral ocasiona concentraciones mayores en plasma de 16µg/mL después de una dosis de 0.5g, y es adecuada para inhibir muchos patógenos Gram. positivos y Gram. negativos que son sensibles a la cefalotina. El antibiótico en cuestión no es metabolizado y por la orina se excreta entre 70 y 100% de él.

**Espectro antibacteriano y uso:** Primera generación; todos estos agentes tienen un espectro antibacteriano similar lo que incluye bacterias Gram. positivas y Gram. negativas, pero su mayor actividad es contra los Gram. positivos incluyendo todos los tipos de *Staphylococcus*, pero no los resistentes a metilcilina.

Todos los bacilos Gram. positivos son sensibles a excepción de la listeria monocitogena.

Son alternativas a las infecciones producidas por *Streptococos* y *Staphylococcus*(no enterococos), en pacientes alérgicos a la penicilina pero no en la hipersensibilidad inmediata

El mecanismo de resistencia más frecuente a la cefalosporina es su destrucción por la hidrólisis del anillo b-lactámico.



## **CLORHIDRATO DE VANCOMICINA**

Es el clorhidrato de una sustancia antibiótica obtenida de cepas de streptomyces orientalis.

**Descripción:** Sólido blanco. Anfótero. Tiene un punto isoeléctrico de 5.0 y un peso molecular de 3200 - 3500. Tiene un pH aproximado de 5.8.

**Solubilidad:** Muy soluble en agua; moderadamente soluble en metanol acuoso; insoluble en alcoholes superiores; acetona y éter.

**Usos:** La vancomicina es muy activa contra los cocos gram positivos. Ha probado ser valiosa en el tratamiento de infecciones estafilocócicas graves. No se sabe la fecha no se ha demostrado ninguna. Esto puede repercutir extraordinariamente importante, pues los estafilococos son capaces de resistir todos los antibióticos sistémicos principales anteriormente conocidos. Las infecciones estreptocócicas y neumocócicas se han tratado también con éxito con vancomicina. La droga puede causar sordera, tromflebitis, erupciones de la piel y fiebre. Debe reservarse para emplearla en infecciones serias.

**Dosis:** Intravenosa, 500 mg cada 6 horas. Se diluye generalmente con 100 a 200 mL de solución de cloruro de sodio o dextrosa isotónico y se administra en goteo intravenoso lento. (18,19)



## **GENTAMICINA**

La Gentamicina es un antibiótico de amplio espectro obtenido de especies del actinomiceto micromonospora. La Gentamicina es un compuesto importante para tratar muchas infecciones graves por bacilos gram negativos. Es el aminoglicósido de primera elección por su bajo costo y actividad fiable contra casi todos los aerobios gramnegativos, excepto los más resistentes. Sin embargo, la aparición de microorganismos resistentes en algunos hospitales ha constituido un problema grave y puede delimitar su uso futuro.

### **Aplicaciones terapéuticas de la Gentamicina**

Es posible utilizar indistintamente Gentamicina u otros aminoglicósidos en el tratamiento de casi todas las infecciones. En lo que toca a todas las indicaciones, la Gentamicina es el compuesto preferido por la larga experiencia en su empleo y costo relativamente bajo.

### **Infecciones por microorganismos gram negativos**

En sujetos con endocarditis por enterococos, incluso la mitad de las cepas de otros microorganismos no es destruida por la combinación de penicilina y estreptomina; sin embargo, dichas cepas casi siempre son sensibles a la penicilina administrada con Gentamicina.

**Aplicaciones locales:** La absorción de la Gentamicina es muy lenta si se aplica en pomada, pero puede acelerarse si se emplea una crema local. Cuando se administra un antibiótico en grandes zonas de superficie corporal cruenta, como en los quemados, las concentraciones plasmáticas pueden llegar a 4µg/mL, quizás aparezca en la orina 2 a 5 % del fármaco usado.

**Efectos adversos:** Estos son semejantes a los de otros aminoglicósidos. Las acciones colaterales más graves e importantes generadas por la Gentamicina incluyen nefrotoxicidad y ototoxicidad irreversible. La administración intrarraquídea o intraventricular ( cerebral) puede causar inflamación local y culminar en radiculitis y otras complicaciones, razón por la cual rara vez se la utiliza.<sup>(18,19)</sup>



### **REACTIVOS:**

Extractos hidroalcoholicos y maceración simple de especies de plantas medicinales, dimetilsulfoxido, agua destilada, solución salina 0.9% agua peptonada, agar nutritivo.

#### → **Dimetilsulfóxido estéril (solvente de los extractos) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO.**

**Propiedades:** Líquido higroscópico incoloro, punto de ebullición 189<sup>0</sup>C, punto de fusión 18.5<sup>0</sup>C, constante dieléctrica 48.9(20<sup>0</sup>C), densidad específica 1.01(20/20<sup>0</sup>C), calor específico 0.7. Sabor amargo, miscible en agua. Extremadamente poderosos disolvente aprótico. Penetra completamente los tejidos de la piel, combustible peligroso; si se ingiere es peligroso debe ser aplicado solamente a la superficie de la piel.

**Usos:** Disolvente de polimerización y reactivos de cianuro, reactivos analíticos, limpieza industrial, pesticida, difusión de drogas.

#### → **Agua destilada:**

**Propiedades:** Líquido incoloro, inodoro e insípido, altamente polar, alta constante dieléctrica, electrolitos débiles.

**Viscosidad:** 0.01002. Punto de ebullición: 100<sup>0</sup>C. Punto de fusión 0<sup>0</sup>C.

**Usos:** Disolvente para filtrar, lavar e hidrólisis.

#### → **Etanol:**

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, líquido incoloro; claro, volátil, inmóvil aun a bajas temperaturas. Se volatiliza rápidamente, es inflamable, contiene no menos del 92.3% y no más del 93.8% en peso que corresponde a no menos del 94.9% y no mas del 96% en volumen a 15.56%.

Densidad 0.812 y 0.816.

**Punto de inflamación:** 95° ( vaso abierto).

**Solubilidad:** soluble en agua, etanol, acetona, benceno, éter y cloroformo.

**Conservación:** frascos color ámbar, bien cerrados.

#### → **Cloruro de sodio:**

**Propiedades:** cristales anhidros, incoloros o polvos cristalino blanco, inalterables al aire. Los cristales contienen muchas veces agua de interposición, al calentarlos decrepitan. La sal funde a 808 °C aproximadamente y se volatiliza a temperatura más alta. Fácilmente soluble en agua y glicerol y ligeramente soluble en etanol.

**Conservación:** se conserva en frascos tapados.



## **HIPOTESIS**

Las plantas medicinales son un medio de curación para muchas enfermedades que utilizaron nuestros antepasados.

Nuestro estudio es basado en el conocimiento de que la especie colectada bajo el concepto de biodiversidad presentan actividad antimicrobiana. Basados en esta teoría durante el presente estudio Investigativo, se realiza la determinación de la actividad antimicrobiana del **Bixa orellana L.**, y a la vez se muestra la necesidad de conservar los componentes de la naturaleza para el bienestar de los seres vivos.



## **DISEÑO METODOLOGICO**

**Tipo de estudio:** El presente estudio es de tipo experimental.

**Universo:** Plantas de **Bixa orellana** L. Existentes en la ciudad de León.

**Muestra:** Doce plantas Medicinales de **Bixa orellana** L.

**Unidad de análisis:** Semillas de **Bixa orellana** L. Con bixina y sin bixina.

### **Área de estudio:**

Estudio realizado en el departamento de análisis de droga, medicamentos y tóxico, en el área de control microbiológico de la U.N.A.N.

### **Fuente de información:**

- ✓ Internet.
- ✓ Libros.(Fuentes terciarias).
- ✓ Monografías.(Estudios de plantas).
- ✓ Herbario de Escuela de Biología UNAN- León.

### **Procedimiento:**

Para el desarrollo del estudio se procedió a la revisión bibliográfica sobre la planta **Bixa orellana** L. y de esta manera determinar las partes utilizadas que posiblemente posean poder antimicrobiano en las enfermedades de diarrea, enfermedad de las vías respiratorias altas y aparato genitourinario del sexo femenino.

Luego se definió el tema recopilando información en la Biblioteca del Complejo Docente de la Salud.

De la flora vegetal de la ciudad de León se recolecto esta planta, pudiendo determinar su nombre científico y se nombre común, así como las partes empleadas.

La preparación de la muestra del vegetal así como el procedimiento de recolección, secado y maceración, etc. está realizados de acuerdo a los parámetros establecidos por la fitoquímica.

### **Recolección y secado de las plantas:**

- ✓ Cortar la parte de la planta a utilizar antes del mediodía entre las 10 AM. y las 11 AM..
- ✓ Secar a la sombra entre 25-30°C sobre el papel.
- ✓ Pesar 100g de muestra.
- ✓ Almacenar y etiquetar en bolsa plástica. (ANEXO 1)



### MATERIAL Y EQUIPO

- ◆ **Cristalería:** Placas petri( grandes y pequeños), tubos de ensayos de rosca, beacker ( 1000mL), probeta, kitazato y termómetro.

- ◆ **Equipo de laboratorio:**

Equipo	Marca	Modelo
Cocina eléctrica(plato).	Corning	P.C. 100
Mechero	Fisher	1201-21
Incubadora(T° 37° C)	Doble marca	Precisión.
Refrigeradora.	General electric.	T.B.F. 12 DM
Embudo busner.		
Asa de henle.		
Horno.	Precisión.	368 A.
Gradilla metálica.		
Pana de baño María.		
Espectrofotómetro.	Busch & Lomb.	Serie N° 0617622E.
Espátula.		
Contador de colonias.	Quibec.	3325.
Autoclave.	Vernitron Medical Products. Inc.	N° 8020.
Agitador eléctrico.	Vortex.	K-5506.
Baño María (incubadora 45° C).	GCA Precisión.	G/C.

- ◆ **Material descartable:**

Algodón, aplicadores, papel de aluminio, papel filtro, bolsas plásticas.

- ◆ **Equipo de protección:**

Gabacha, guantes, gorro, gafas, nasobuco.

- ◆ **Cepas:**

Staphylococcus aureus (ATCC), Escherichia coli (ATCC), Klebsiella pneumoniae y Micrococcus luteus.

- ◆ **Maceración simple:**

Se pesó 50-100g de una de las especies en estudio, adicionando un volumen de 100-400ml de solución alcohólica (100% alcohol), se dejo reposar por 72horas se filtro al vacío y se tomo la muestra a utilizar.



## **TECNICA DE EXTRACCIÓN DE Bixa orellana L. CON BIXINA.**

1. Pesar 100 g de semillas.
2. Triturar las semillas de Bixa orellana L.
3. Macerar por 72 horas con agitación en 180 ml de solución hidroalcohólica.
4. Filtrar el contenido de la maceración en tela fina de 0.2 micras.
5. Concentrar a temperatura de 45 °C.
6. Obtención del extracto hidroalcohólico.

## **EXTRACCION DEL PIGMENTO DE LA SEMILLA DEL Bixa orellana L.**

1. Recolectamos la semilla de Bixa orellana L.
2. Secamos la semilla prensada en papel filtro.
3. Extraemos las impurezas.
4. Lavamos las semillas con agua fría hasta la obtención del color café característico de ella, dándose la separación de la Bixina de la semilla.
5. Secamos las semillas ya sin el pigmento en papel periódico.
6. Pesar 100 g de la semilla sin pigmento.
7. Triturar las semillas de Bixa orellana L.
8. Macerar por 72 horas con agitación en 180 ml de solución hidroalcohólica.
9. Filtrar el contenido de la maceración en tela fina de 0.2 micras.
10. Concentrar a temperatura de 45 °C.
11. Obtención del extracto hidroalcohólico sin Bixina.



## **ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE MITCHER**

### **A. CULTIVO DE MICROORGANISMO:**

Después de la preparación del agar, se llenan 14 tubos de ensayo con 9ml de agar aproximadamente, se autoclavan a 121<sup>0</sup>C por 15 minutos y se inclinan sobre una superficie hasta que el agar se solidifique.

Para la inoculación de los tubos inclinados se necesitan cultivos frescos de los microorganismos. Con una asa de inoculación estéril antes de cada aplicación, se transfiere una asa de microorganismos a cada tubo inclinado.

Con el fin de incrementar el área en el cual los microorganismos puedan crecer, el asa de inoculación se mueve en zig-zag a través de la superficie del agar, comenzando desde el fondo hacia arriba.

Los tubos se marcan con cuidado y se incuban a 37<sup>0</sup>C por 24 horas. Se hacen los pases sucesivos por 7 días para disminuir su patogenicidad.<sup>(4,9,20)</sup>

### **B. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO:**

Se pesa con precisión 2g de extracto hidroalcohólico seco de cada muestra a evaluar y se disuelve en 1.5ml de Dimetilsulfóxido estéril.

Se toma una porción de esta solución y se deposita en un plato petri que contenga 9.9mL de agar tropic soya y caseína estéril recientemente colocados. Agitar suavemente y obtener una concentración final de 1330 mg/mL.

### **C. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS:**

#### **Agar nutritivo:**

- ❖ Pesar 2.35g de agar y disolver en 100ml de agua destilada hervida.
- ❖ Se hierve el agua y se añade y se añade el agar, se calienta la suspensión hasta que se logre una solución clara.
- ❖ Luego, esta solución se transfiere a tubos con tapa (9.9ml/tubo) y posteriormente a beakers.
- ❖ Se autoclavan por 15 minutos a 121<sup>0</sup>C.
- ❖ Antes y después de autoclavar se mide el pH el cual debe ser de 7.3 +\_0.2.<sup>(4,9,20)</sup>



#### D. PREPARACIÓN DE LOS PLATOS:

Después que autoclava el agar se deja enfriar aproximadamente a 55<sup>0</sup>C. Asépticamente, se añaden 9.9ml de agar a cada plato petri y 0.1 ml de la muestra correspondiente, se agita suavemente la mezcla para homogenizar lo más que sea posible. El agar se deja solidificar y se mantiene a temperatura ambiente. Debe hacerse por triplicado para evitar errores en la lectura, dado por una mala maniobra.<sup>(4,9,20)</sup>

#### E. PREPARACIÓN STOCK DE CLORHIDRATO DE VANCOMICINA, GENTAMICINA Y CEFALEXINA:

Del patrón se pesa cuidadosamente 100mg de clorhidrato de vancomicina, Gentamicina y Cefalexina utilizando una balanza analítica, luego se disuelve en 10ml de agua destilada estéril.

Esta solución no sé autoclava (contiene 10mg/ml) si se mantiene refrigerada la solución stock es estable por muchas semanas y puede ser utilizada repetidamente.

Una proporción de esta solución (0.1ml) se añade con 9.9ml de agar estéril a un plato petri marcado, resultando en una solución final de 1000µg/ml.<sup>(4,9,)</sup>

#### F. PREPARACIÓN DE LA SOLUCION SALINA:

- ❖ Pesar 1.35g de cloruro de sodio y se disuelven en 150ml de agua destilada hervida.
- ❖ Sé autoclava a 121<sup>0</sup>C. por 15 minutos.
- ❖ La solución se puede mantener a temperatura ambiente por varias semanas. Es importante, que la misma se tape adecuadamente. <sup>(4,9)</sup>

#### G. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSION DE LOS MICROORGANISMOS:

Todos los tubos de ensayo que contienen a los microorganismos deben ser visiblemente turbios y con olor característicos (en el caso de la **Escherichia coli**) con el fin de conseguir aproximadamente la misma velocidad de crecimiento de cada uno de los microorganismos, se toman 2 o 3 asadas de microorganismos, y se solubilizan en tubos que contengan solución salina estéril de cloruro de sodio 0.9%, luego se mide e el espectronic 20 a 580nm hasta alcanzar 25% de transmitancia.<sup>(4,9)</sup>



## H. RAYADO DE LOS MICROORGANISMOS:

Los platos se sacan de la incubadora y se examinan. No deben tener contaminación visible; si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado en otra ocasión.

Se humedece el aplicador con la suspensión de microorganismo y luego se inoculan los platos, mediante rayado horizontal con los microorganismos en estudio. Se incuban a 37°C por 24 horas.

Deben incubarse de forma inversa para evitar que las gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y afectar su crecimiento.<sup>(4,9)</sup>

## I. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA:

Se pesa con exactitud 2g de extracto hidroalcoholico y se disuelve en 1.5 de DMSO estéril agitando hasta lograr solubilizar completamente la muestra.

Para preparar las muestras a las diferentes concentraciones se toman 5 platos petri por triplicado y se marca cuidadosamente las diferentes concentraciones en cada una, ( 1.99, 1.86, 1.79, 1.68, 1.59, 1.46g/mL), se coloca en cada plato el agar tropic soya y caseína estéril y luego se le agregan a cada plato los volúmenes de extracto más Dimetilsulfóxido combinados que se necesita para completar los 10mL y así alcanzar las concentraciones respectivas.

Nombre científico	Concentración del extracto	Cantidad de DMSO	Agar por mL
<b><u>Bixa orellana</u> L.</b> SIN BIXINA	<b>G</b>	<b>mL</b>	
	1.99	1.46	8.54
	1.86	1.4	8.6
	1.79	1.35	8.65
	1.68	1.27	8.73
	1.59	1.2	8.8
	1.46	1.1	8.9



### **RESULTADOS**

El estudio realizado, en el departamento de Análisis de drogas, medicamentos y tóxicos, en la subarea de microbiología de la UNAN-León, consistió en determinar la actividad antimicrobiana de **Bixa orellana** L. con cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Micrococcus luteus*, efectuando las siembras de microorganismos en las muestras del extracto vegetal y en los patrones, contando con dos extractos hidroalcohólicos de **Bixa orellana** L. con y sin colorante obteniendo los siguientes resultados.

#### **Extracciones hidroalcohólicas con Bixina (colorante)**

Nombre científico	Familia	Concentraciones g/mL.	Microorganismos							
			<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>M.luteus</i>		<i>K.pneumoniae</i>	
			24h.	48h.	24h.	48h.	24h.	48h.	24h.	48h.
<b><u>Bixa orellana</u></b> L.	Bixaceae	1.5/1mL	ATC	PTC	ATC	PTC	ATC	PTC	ATC	PTC
		1.0/1mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC
		0.08/0.8mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC
		0.05/0.5mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC
		0.03/0.3mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC
		0.01/0.1mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC

#### **Extracciones hidroalcohólicas sin Bixina (colorante)**

Nombre científico	Familia	Concentraciones g/mL.	Microorganismos							
			<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>M.luteus</i>		<i>K.pneumoniae</i>	
			24h.	48h.	24h.	48h.	24h.	48h.	24h.	48h.
<b><u>Bixa orellana</u></b> L.	Bixaceae	2/1.5mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1.5/1.1mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1/0.75mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC
		0.5/0.4mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC
		0.01/0.1mL	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC

- ATC = Ausencia total de colonias.
- PTC = Presencia total de colonias.



A las 24 horas se comparó resultados de la especie con los patrones presentando actividad (ATC) a una concentración mayor de 1g, considerando a esta especie de vital importancia. Se comparó nuevamente los resultados a las 48 horas mostrando el extracto sin Bixina su actividad antimicrobiana y se determinó que el extracto con Bixina no presentó actividad a este tiempo determinado de lectura.

<b><u>ANTIBIOTICOS</u></b>	<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>S.aureus</i></b>	<b><i>M.luteus</i></b>	<b><i>K.Pneumoniae</i></b>
<b>Sulfato de Gentamicina</b>	ATC			ATC
<b>Clorhidrato de Vancomicina</b>		ATC		
<b>Cefalexina</b>			ATC	

**Concentración Mínima Inhibitoria.(CMI)**

Nombre científico	Familia	Concentración g/mL	Microorganismos								
			<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>M.luteus</i>		<i>K.pneumoniae</i>		
			24H	48H	24H	48H	24H	48H	24H	48H	
<b><u>Bixa orellana L.</u></b> <b>Sin bixina</b>	<b>Bixaceae</b>	1.99g/mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1.86g/mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1.79g/mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1.68g/mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1.59g/mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
		1.46g/mL	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC

➔ **ATC = Ausencia total de colonias.**



Luego de realizadas las lecturas a las 24 de la incubación a 37°C del extracto(con bixina) y las cepas, en este período se observó que se ha logrado determinar el tiempo mínimo de actividad del fruto del **Bixa orellana L**. con Bixina en los microorganismos respectivamente.

Después de realizadas las lecturas a las 24, 48 horas de la incubación a 37°C del extracto(sin bixina) y las cepas, en este período se observó que se ha logrado determinar el tiempo máximo de actividad del fruto del **Bixa orellana L**. sin Bixina en los microorganismos respectivamente.



## **ANALISIS DE RESULTADOS**

Luego de haber obtenido los resultados del estudio realizado con los extractos hidroalcohólicos correspondiente a extracto con (colorante) del achiote y extracto sin colorante del mismo y expuesta a microorganismos de:

*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, comparando los resultados con los siguientes antibióticos:

- Gentamicina.
- Vancomicina.
- Cefalexina.

En un intervalo de 24 y 48 horas presentó actividad antimicrobiana contra estas cepas el extracto correspondiente a la muestra sin Bixina ( tabla), y en el extracto con Bixina se observó su actividad solamente a las 24 horas( tabla).

Posteriormente se procedió a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de esta especie **Bixa orellana** L. sin bixina biológicamente activa con cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, del cual se obtuvo una C.M.I. para todas las especies de extracto hidroalcohólico en las siguientes concentraciones:

- 1.99g/mL.
- 1.86g/mL.
- 1.79g/mL.
- 1.68g/mL.
- 1.59g/mL.
- 1.46g/mL.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen un gran significado científico para estudios posteriores pudiéndose constatar que la semilla del **Bixa orellana** L. posee actividad antimicrobiana sin Bixina a diferentes concentraciones.

Determinándose de esta manera que su utilización no solo es como de uso domestico, industria, cosmético, sino como una alternativa para ciertas enfermedades.



## **CONCLUSION**

En nuestro trabajo monográfico se determinó la actividad antimicrobiana de dos extractos hidroalcohólicos de la especie **Bixa orellana L.** recolectadas en la ciudad de León.

Para el estudio se utilizó el método de MITCHER con los extractos de la semilla del fruto con y sin bixina (colorante) de la especie mencionada en presencia de microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*. Encontrándose que la semilla con bixina posee actividad antimicrobiana únicamente a las 24 horas de incubación a una temperatura de 37°C.

Debido a esta situación se procedió a realizar el mismo procedimiento de la semilla sin bixina para lograr determinar el tiempo de actividad del achiote con exposición a estas cepas, la cual inhibe a las 24 horas y 48 horas de incubación a una temperatura de 37°C con una concentración de 2000 µg/mL, luego se procedió a la realización de concentraciones menores para determinar la concentración mínima inhibitoria, resultando la especie con una concentración de 1.5g/1.1 mL de extracto, con inhibición total a las 48 horas en los microorganismos en estudio. Facilitando información de gran interés.



## RECOMENDACIONES

1. Determinar los principios activos y grupos funcionales que influyen en la actividad biológicamente activa. (**Bixa orellana L.**)
2. Utilizar cepas de microorganismos ATCC que garanticen la calidad del estudio y evitar así la contaminación del medio de trabajo e investigadores.
3. Que la UNAN-León disponga de equipos de laboratorio para poner en practica los métodos de análisis actualizados y con cepas de microorganismos ATCC para investigaciones monográficas.
4. Garantizar la esterilidad de los materiales de trabajo evitando obtener resultados falsos-positivos.
5. Realizar el estudio en la época en que la semilla de **Bixa orellana L.** cuente con un alto porcentaje de principio activo.



## **Glosario de términos.**

### **A.**

Antibiótico:

Sustancia producida por un microorganismo, u otra sustancia similar producida total o parcialmente por síntesis, que a baja concentraciones es capaz de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

Actividad antimicrobiana:

Que tiende a destruir los microbios, a impedir su desarrollo o acción patógena.

Afrodisíaco:

Que incrementa el deseo sexual, cualquier cosa que incrementa u origine el deseo sexual.

Agar:

Polisacárido obtenido de geledium y otras algas marinas; utilizados como agente solidificante en medios de cultivos. Compuesto de alto peso molecular que forma soluciones acuosas, gelatinosas y se encuentra clasificados dentro del grupo de hidrocoloides vegetales naturales, se usa como base demulcente para la medicación cutánea, agente suspensor para polvos insolubles, agente emulsificante para aceites, administración por vía oral y como medio de cultivos de bacterias (*in Vitro*)

Aerobios:

Microorganismo que medra en presencia de oxígeno del aire.

Aluviales:

Perceptible con el tiempo.

Anaerobio:

Microorganismo que son capaces de vivir sin la presencia de oxígeno libre.

Antictérico:

Contra la ictericia.

Antimicrobiano:

Agente químico o biológico capaz de matar los microorganismos o inhibir su actividad.

Astenia:

Debilidad.

### **B**

Bacteria:

Un polisacárido unicelular, un miembro de los exquizomicetos; un hongo dividido.

Biológico:

Se refiere a productos naturales, no tratados químicamente, productos biológicos.



**Bixina:**

carotenoide (ácido caroteno dioico); la materia colorante rojo anaranjados de la semilla de bixa orellana; el ester etílico se usa como alimento y como colorante.

**C.**

**Cepas:**

Grupo de microorganismos dentro de una especie o variedad caracterizadas por algunas cualidades especiales.

**Colicina:**

bacteriosina producida por cepas de *E. Coli* y otras enterobacterias (*shigella* y *salmonella*) que son portadoras de los plásmidos necesarios.

**D.**

**Demulcente:**

Golpear suavemente, ablandar. Que suaviza, que alivia la irritación agente como mucílago o aceite que suaviza o alivia irritación especialmente de superficie mucosas

**Drenadas:**

Desaguar un terreno.

**E**

**Enfermedad infecciosa:**

Enfermedad causada por gérmenes patógenos como bacterias, virus, protozoarios y hongos, pueden ser contagiosa, pero no es obligado.

**Escaldada:**

Quemadura o lesión que resulta del contacto con líquido o vapor caliente.

**F**

**Foliaceas:**

Pertenciente o relativo a las hojas de las plantas, estructura laminar.

**Furúnculo:**

Infección piogena localizada u originada en un folículo piloso.

**G**

**Gram. negativo:**

Microorganismo bacteriano que rápidamente decolorado con alcohol en la coloración de Gram. y que se observa luego el color de la tinción de fondo.

**I**

**Infección:**

Multiplicación de un agente infeccioso dentro del cuerpo. La multiplicación de bacterias que son parte de la flora normal de vías gastrointestinales, piel, etc., por lo general no se



considera una infección, por otra parte, la multiplicación de bacterias patógenas, aunque la persona permanezca asintomático se considera infección.

**Inhibición:**

Restringir a refrenar.

**Inflorescencia:**

Todo sistema de ramificación que se resuelve en flores.

**L**

**Lanceolada:**

Aplicarse a los órganos laminares como hojas, bacterias, pétalos etc.

**M**

**Menstruo:**

Líquido en el que se deja la maceración.

**Microorganismo:**

Un organismo tan pequeño que no pueden verse directamente a simple vista, incluyen bacterias, virus, protozoarios, hongos y algas unicelulares.

**Mucílagos:**

sustancia viscosa de mayor o menor transparencia que se halla en ciertas partes de algunos vegetales.

**Mucopéptidos:**

péptido que se encuentra en combinación con polisacáridos que contienen ácidos murámico o sialico.

**P**

**Patógeno:**

Cualquier virus, microorganismo que produce enfermedades.

**Pedúnculos:**

Pediculo, tallo de unión.

**Plásmido:**

elemento extracromosómico, partícula genética que puede funcionar y replicarse en forma estable separada del cromosoma de la célula huésped (principalmente bacterias) y que no es esencial para la función básica celular.

**S.**

**Sepsis:**

Presencia de diversos microorganismos formadores de pus y otros patógenos o sus toxinas en la sangre o los tejidos.



**T**

Tomillo:

Planta perenne de la familia de las labiadas, muy olorosas con tallos leñosos, derechos, blanquecinos, ramosos de 2-3 decímetros de altura.

**V.**

Virulencia:

Calidad de virulento, maligno ocasionado por un virus o que participa en la naturaleza de este.



## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. **ECOALDEA.COM**  
LA RECOLECCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES SILVESTRES Y DE CULTIVO. Para ... RECOLECCION DE PLANTAS MEDICINALES SEGÚN EL MES DEL AÑO ENERO ...  
[www.ecoaldea.com/plmd/recoleccion.htm](http://www.ecoaldea.com/plmd/recoleccion.htm)
2. **EL ACHIOTE.**  
El achiote prospera en zonas tropicales y de adapta a distintos tipos de climas en suelos. Crecen el altitudes desde 100 hasta 1000....  
[http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/achiote.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/achiote.html)
3. **<http://www.tuotromedico.com/temas/antibioticos.htm#0>**
4. **Mendoza Altamirano, Maria Auxiliadora.**  
Determinación de la actividad antimicrobiana con cepas de E. Coli y S. Aureus de 8 plantas medicinales de uso folklórico utilizado en el tratamiento de infección renal.
5. **Varru E. Tyler.**  
Farmacognosia , segunda edición EL ATENEO 1979.  
Pág. No 7-10.
6. **Nikolai Sharapin**  
Fundamentos de tecnología de productos fitoterapeúticos. Santafe de Bogota, D.C. Colombia, primera edición marzo del 2000. Pág. No 23.
7. **Void- R, Bunshein, M.** Método de extracción en. Tratado de tecnología farmacéutica ( V.C.R) ver lag vold, and gesondheit, eds)  
Zaragoza, España 1982.  
Pág. No 438, 479,498,499.
8. **Farmacopea francesa – CODEES – medicamentarius Gallicus.**  
Edición lengua española. Rennes 1939 .  
Pág. No 903, 904,905.
9. **Claudia García, Araceli Jiménez.**



Determinación de actividad antibacteriana y antifúngica, en tres especies vegetales, hamelia Patens, Bursera Simaruba y Tabebuia Rosea, de uso folklórico comercializada en Nicaragua, contra cepas de staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis y cándida Albicans, realizado en el 2<sup>do</sup> semestre del año 2002. Pág. 49, 50.

**10.**<http://www.cfnavarra.e/bif/boletines/14/1401.htm>

**11. Eric W. Martín**

Farmacia practica de Remington. Segunda edición editorial hispano1965  
Pág. No 319.

**12. Microbiología**

Las **bacterias** son microorganismos procariotas de organización muy sencilla. ... pared celular es rígida y con moléculas exclusivas de **bacterias**. ...  
[www.arrakis.es/~lluengo/microbio.html](http://www.arrakis.es/~lluengo/microbio.html)

**13. Jawetz, Melnick y Adelberg.**

Microbiología medica. 17<sup>a</sup> edición, editorial " EL MANUAL MODERNO", México, DF  
Santafe de Bogotá.  
Pág. No 243-249; 269-274, 276; 319.

**14. Mims, Playfair, Roitt.**

Microbiología medica.  
2<sup>da</sup> edición, MARCOURT BRACE.  
España, Madrid 1999.  
Pág. No 513, 529.

**15. Las Bacterias - Monografias.com**

... Ciertas **bacterias** grampositivas pueden sintetizar un órgano de resistencia que les permite sobrevivir en condiciones más desfavorables, y se transforma de ...  
Descripción: Información acerca de estos seres que pertenecen al grupo de los protistos inferiores.

Categoría: [World](#) > [Español](#) > ... > [Biología](#) > [Microbiología](#)

[www.monografias.com/trabajos/bacterias/bacterias.shtml](http://www.monografias.com/trabajos/bacterias/bacterias.shtml) 1 Feb 2004

**16. Mario A. Saavedra.**

Compendio nicaragüense de plantas medicinales.  
Primera edición en español. Forwad Enterprise.  
Pág. No 10-11.

**17. introduction and evaluation of pejibabe(bactris gasipaes) for...**



*bixa orellana* L. "achiote" o annato es una planta arbustiva, con hojas de forma variable, flor hermafrodita, de frutos capsular y numerosos en las cuales se .....

[http://www1.gratisweb.com/jibanezo/Bixa\\_orellana.htm](http://www1.gratisweb.com/jibanezo/Bixa_orellana.htm)

**18. Goodman & Gilman.**

Las bases farmacológicas de la terapéutica.

Volumen II, décima edición 2001.

Pág. No 1237, 1249, 1251, 1852.

**19. Goodman & Gilman**

Las bases farmacológicas de la terapéutica.

Novena edición, volumen II.

Pág. No 1213, 1214.

**20. Herrera, Gloria María**

Evaluación de la actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas Aeruginosa* y *Klebsiella, Pneumoniae* de cincuenta y nueve especies de plantas que fueron colectadas en la biodiversidad vegetal de la estación ecológica Bartola – Río San Juan.

**21. <http://www.monografias.com/trabajos/bacterias.shtml>.**

**22. Journal of ethno pharmacology. 23, 1988.**



## **ANEXO 1.**

### **RECOLECCION Y SECADO DE LA PLANTA**

Cortar la planta a utilizar antes del medio día entre las 10 AM. Y 11 AM.



Secar a la sombra entre 25 y 30°C sobre el papel periódico.



Pesar 100g de muestra.



Almacenar y etiquetar en bolsa plástica.



## Anexo 2

### **TECNICA DE EXTRACCIÓN DE *Bixa orellana* L. CON BIXINA.**

Pesar 100g de semillas.



Triturar las semillas de *Bixa orellana* L.



Macerar por 72 horas con agitación en 180ml de alcohol.



Filtrar el contenido de la maceración en tela fina de 0.2micras.



Concentrar a temperatura de 45°C.



Obtención del extracto hidroalcohólico.



### **ANEXO 3.**

#### **Extracción del pigmento de semilla de Bixa orellana L.**

Recolectar la semilla de Bixa orellana L.



Secar la semilla prensada en papel.



Extraer las impurezas.



Lavar las semillas con agua fría, hasta la obtención de color café característico de ella, dándose la separación de la Bixina de la semilla.

Secar las semillas prensadas en papel periódico.

Pesar 100 g de la semilla sin pigmento y trituramos las semillas de Bixa orellana L.



Maceramos por 72 horas con agitación en 180 ml de solución hidroalcohólica y filtramos el contenido de la maceración en tela fina de 0.2 micras.

Concentramos a temperatura de 45 °C hasta la obtención del extracto hidroalcohólico sin Bixina.



## **ANEXO 4.**

### **CULTIVO DE MICROORGANISMOS.**

Cepas ATCC ( inactivas) 48 horas



7 Cepas ATCC activadas pases.



Pases a tubos de agar inclinados



Marcar e incubar a 37°C por 24 horas.



## **ANEXO 5.**

### **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.**

**Pesar**

**20mg de extracto hidroalcohólico**



**Disolver en 0.2 ml de DMSO estéril.**



**Tomar 0.1ml de esta solución.**



### ❖ Preparación de los medios

#### Agar Nutritivo

Pesamos 2.35g y la solubilizamos en 100ml de agua destilada hervida y calentamos hasta que se logra una solución clara.



Transferir a tubos de ensayo con tapas de rosca(9.9MI)



Colocar dichos tubos para autoclavar por 15 minutos a 121<sup>0</sup>C.



Enfriar por 15 minutos a 55<sup>0</sup>C.



Sacar del autoclave los tubos dejando solidificar el Agar en posición decline.



**Anexo No 7**

❖ **Agar nutritivo para los medios de cultivos de microorganismos.**

**Pesar 4.6g de agar nutritivo.**



**Disolver en 200mL de agua (hervida).**



**Calentar hasta obtener la solución clara.**



**Autoclavar por 15 minutos a 121°C.**



**Reposar en baño maría**



## **Anexo N° 8**

### **❖ Esterilización de materiales.**

Empacar con papel de aluminio los materiales como:

- ✓ Pipetas.
- ✓ Platos petri.( De 5 en 5).
- ✓ Isopos de madera o aplicador.
- ✓ Celdas.

Introducir al esterilizador los materiales empacados por tres horas y medias a 180 ° C.



## **Anexo N° 9**

### **❖ Preparación de los platos.**

**Trabajando cerca del mechero( asépticamente)**



**Verter 9.9 mL de Agar previo en baño maria.**



**Agregar 0.1mL de la muestra**



**Agitar en forma de ocho para homogenizar.**



**Se deja solidificar a temperatura ambiente.**



**Rayado de microorganismos.**



**Incubar a 37 °C por 24 a 48 horas.**

## **Anexo N° 10**



❖ **Preparación de la solución salina**

**Pesar 1.35g de cloruro de sodio.**



**Disolver en 150mL de agua destilada.**



**Homogenizar y transferir a tubos de ensayo(9mL).**



**Autoclavar por 15 minutos a 121°C.**



## **Anexo N°11**

### **❖ Preparación de la suspensión de microorganismos**

Tomar de dos a tres asadas de microorganismos, activado anteriormente.



Diluir en tubos con solución salina al 0.9%.

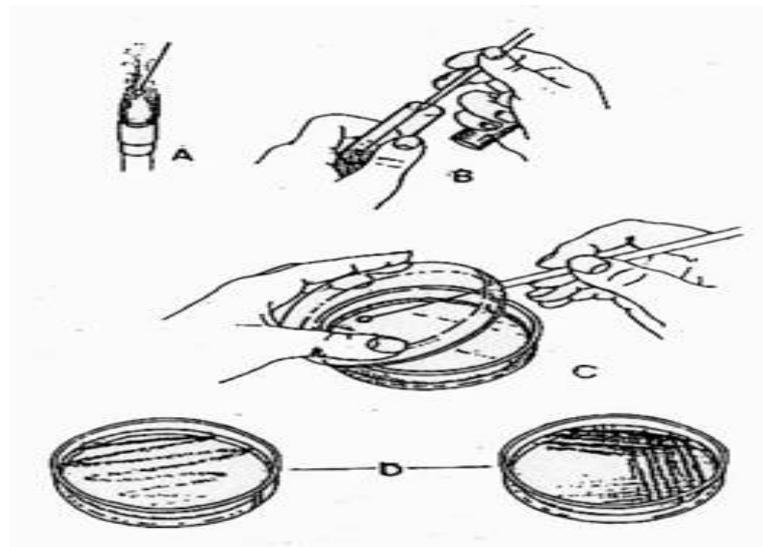
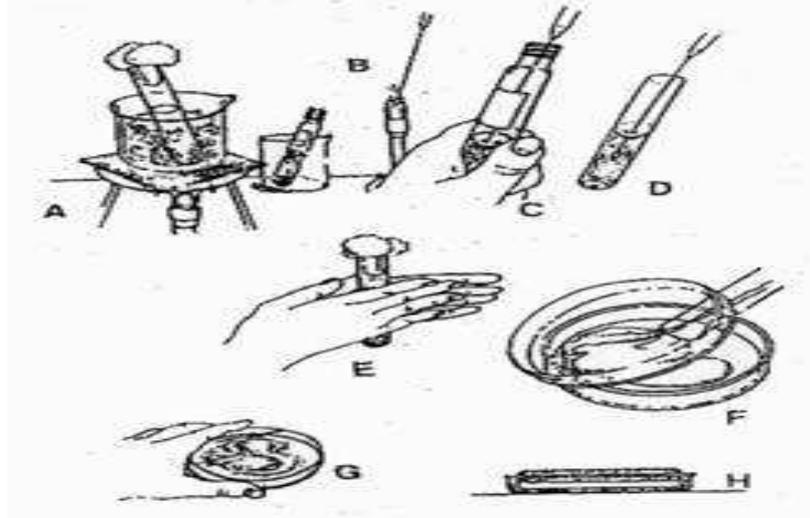


Agitar hasta homogenizar la suspensión.



Medir en espectronic. a 580nm y 25% de transmitancia (para ajustar la suspensión).

## **Anexo N° 12**



**Anexo N° 13**

