

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

León, Nicaragua



**TESIS MONOGRAFICA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN
QUIMICA Y FARMACIA**

**Comparación de actividad antimicrobiana en Látex de plantas
por el método de Mistcher vs Difusión en placa marzo –
septiembre 2015**

Trabajo investigativo presentado por:

Br. Elvis José González Peñalba

Br. Iliá Noemí Juárez Rojas

Tutor:

Lic. Kelvin Núñez

2015

“A la Libertad por la Universidad”



Agradecimientos.

Le agradezco primeramente a Dios por haberme dado la fuerza, la sabiduría y haberme acompañado a lo largo de mi carrera, además de darme la vida y la felicidad todos y cada uno de estos días.

Le doy gracias a mis padres y A mis hermanos por apoyarme en todo momento, por enseñarme los valores tanto morales como espirituales y estar al lado mío en mis momentos de flaquezas y debilidades, por haberme dado el don de la vida y comprenderme todo momento, por darme fuerzas para seguir adelante y sacar una sonrisa cada día.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi tutor: Kelvin Núñez. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y su amistad.

A Ilia por haber sido una buena compañera de tesis y amiga.

Le agradezco a don David y a doña Gladis por haber dispuesto de su tiempo y sus conocimientos para la realización de esta tesis.

Elvis



Agradecimientos.

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres Alberto y Juanita por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi tutor: Kelvin Núñez. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y su amistad.

A Elvis por haber sido un buen compañero de tesis y amigo.

Le agradezco a mi tía Gladis por apoyarme a lo largo de mi carrera y a don David por su ayuda, dedicación y por compartir sus conocimientos en la realización de esta tesis.

Ilia.



ÍNDICE:

Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Marco Teórico	4
Diseño Metodológico	19
Resultado y Análisis de Resultados.....	29
Conclusiones.....	36
Recomendaciones	37
Bibliografía.....	38



INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad, las infecciones por organismos como: las bacterias, hongos, parásitos y virus han sido de las principales causas de muerte; y que en la actualidad siguen afectando mayormente a personas de escasos recursos.

Muchas especies botánicas muestran una acción reguladora sobre un gran número de enfermedades. Este efecto se ha atribuido a la presencia de un grupo de metabolitos secundarios en las diferentes partes de las plantas que les confieren una protección natural; por ello se estudia la posibilidad que sean utilizados en el manejo integrado para uso humano.

Existen métodos para la determinación de actividad antimicrobiana cualitativos y cuantitativos eficaces y específicos. Entre los métodos más utilizados para la determinación de dicha actividad es conocido el método de Mistcher y Potencia Antimicrobiana (susceptibilidad por el medio de difusión agar), que utilizan procedimientos que difieren entre sí, pero de misma finalidad; de lo anterior se procedió a comparar dichos métodos para evidenciar diferencias existentes entre resultados, utilizando látex de las especies *Euphorbia tirucallia*, *Castilla elastica* Sessé, *Rauwolfia tetraphylla* L, cepas de *Estafilococos aureus*, *Candida albicans* y *Samonella spp*, y estándares secundarios Cextriazona , clotrimazol y Neomicina como referencias.

Referencias bibliográficas evidencian, que los aceites esenciales obtenidos de plantas del género *Piper* inhiben el crecimiento de microorganismos que afectan al hombre.¹

De igual manera referencias comparativa de Sangre de Drago, aloe Vera y *Gynocanesten*, como control comprobó la inhibición de microorganismos ²

Un estudio reportado en látex del fruto de la papaya (*Carica Papaya*) demostró efecto sobre una endopepsidasa catalizadora en la síntesis de péptidos y otros derivados ³. Es más barata y fácil de obtener que las peptidasas de origen microbiano.³



Los resultados obtenidos en los procedimientos experimentales en el presente estudio demuestran que en comparación con el estándar de referencia ceftriazona, clotrimazol y neomicina ambos métodos (Mistcher y difusión en placa) son adecuados para realizar evaluación de actividad biológica, con la salvedad de ventajas y beneficios del método de Potencia Antimicrobiana (susceptibilidad por el medio de difusión en placa) sobre el método de Mistcher.

Este estudio se realizó con el fin de contribuir a investigaciones científicas posteriores y desarrollar estudios de plantas potencialmente activas, siendo uno de los principales objetivos hacer crecer el interés de los investigadores en el estudio de muestras naturales de los cuales se pueden obtener un sin número de sustancias las cuales podrían servir para actuar en enfermedades humanas.



Objetivos:

Objetivo General:

- Comparar la actividad antimicrobiana en Látex de plantas por el método de Mistcher vs Difusión en placa.

Objetivos Específicos:

- Determinar la actividad antimicrobiana de Látex de *Euphorbia tirucallia*, *Castilla elastica* Sessé, *Rauvolfia tetraphylla* L, con cepas Gram (+) *Estafilococos aureu*, cepas Gram (-) *Salmonella spp*, y levaduras de *Candida albicans* por el método de Mistcher.
- Determinar la actividad antimicrobiana de Látex de *Euphorbia tirucallia*, *Castilla elastica* Sessé, *Rauvolfia tetraphylla* L con cepas Gram (+) de *Estafilococos aureus*, por el método de Difusión en placa.
- Comparar método de Mistcher vs Difusión en placa según la actividad biológica de Látex de *Euphorbia tirucallia*, *Castilla elastica* Sessé, *Rauvolfia tetraphylla* L.



MARCO TEORICO

1. Generalidades de las Plantas:⁴

La utilización de plantas naturales en el tratamiento de enfermedades, incluidas las infecciosas, constituyen en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa. Mención especial merece el uso de sustancias producidas por microorganismos con carácter biácida, haciendo especial hincapié en el papel de los probióticos. Pero es sin duda el reino vegetal el que ofrece variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas. Dado el aumento de la resistencia microbiana y la preocupación creada por la falta de fármacos clínicamente útiles con nuevas formas de acción, la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana que posean estructuras y/o mecanismos de acción diferentes es de fundamental importancia.

El desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos con estructuras y mecanismos de acción novedosos es por lo tanto una tarea de importancia crítica (Leggiadro, 1995) o se podría estar arribando a una era post-antibiótica como ha sido postulado por Berkowitz (1995). La búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos es un área de investigación activa.

1.2.Plantas con acción antimicrobiana⁴

La gran mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina moderna son o han sido producidos por microorganismos, tipo levaduras u hongos, que pertenecen al reino vegetal. Las plantas superiores producen antimicrobianos principalmente como mecanismo de defensa contra infecciones o son sustancias constituyentes del metabolismo celular.

Como es de esperar, además de una larga lista de plantas con actividad antimicrobiana, existe un buen número de compuestos químicos responsables de esta actividad. Alcaloides, cumarinas, fenoles simples, flavonas, quinonas y taninos son los más comunes.



2. Taxonomía y descripción de las plantas de estudio⁵

2.1. Hombre desnudo:

Nombre científico: *Euphorbia tirucalli*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Tribu: Magnoliophyta

Género: Euphorbia

Especie: *E.tirucalli*L



Imagen 1
Euphorbia Tirucalli

2.1.1. Descripción:⁵

Es un arbolillo o arbusto densamente ramificado, con ramas carnosas, frágiles, lisas, cilíndricas generalmente en verticilo que realizan la fotosíntesis, hay ejemplares monoicos y dioicos, carece de espinas puede alcanzar excepcionalmente los 10 m de altura, su color verde, salvo en plantas muy desarrolladas en las que suele aparecer una corteza algo fisurada de color gris claro.

Hojas con una vida muy corta, alternas, espaciadas, muy finas y situadas al final de los tallos jóvenes, su forma linear-lanceolada. Flores, masculinas y femeninas, las primeras reducidas a 1 estambre sobre un pedicelo, las femeninas con 2 estilos unidos en la base, se agrupan al final de las ramas. Fruto en capsula casi esférica sobre un pedúnculo tomentoso de 1 cm de largo

2.1.2. Palo de hule:⁶

Nombre Científico: *Castilla elastica sessé* in Cerv

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Urticales

Familia: Moraceae

Tribu: Castilleae

Género: Castilla

Especie: *C. elástica* CERV.



Imagen N° 2
Castilla elastica sessé



2.1.3. Descripción:⁶

Árbol hasta de 25 m y diámetro hasta 60 cm con el tronco derecho, con las ramas muy separadas entre sí, horizontales y ligeramente en forma de S, copa abierta y piramidal. Corteza del tronco externa lisa ligeramente marcada con hendiduras a la largo, con un látex blanco o cremoso sumamente abundante, amargo. Ramas jóvenes muy gruesas. Las hojas son grandes y largas de 20 a 45 cm de largo y de 10 a 20 cm de ancho, con el margen ondulado, ápice agudo u obtuso. Abundantes pelos sedosos en el envés de las hojas que se aprecian al tacto. Los árboles de esta especie pierden sus hojas entre enero y mayo, excepto en las zonas muy húmedas. Las flores masculinas y femeninas en receptáculos en las ramas de 15 mm de color verde amarillento. Los frutos son carnosos, agregados de 4 a 5 cm de diámetro, cada fruto cónico, de color anaranjado o bermellón, son cartilagosos, conteniendo una o dos semillas de 8 a 10 mm de largo, rodeados de una cubierta dura morena

2.2. Raíz de Serpiente⁷

2.2.1. Taxonomía⁴

Nombre Científico: *Rauwolfia tetraphylla* L.

Nombre común: Raíz de serpiente salvaje

Familia: Apocynaceae

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Subfamilia: Rauvolfioideae

Tribu: Vinceae

Género: *Rauwolfia*

Sinónimos: *R. canescens*, *R. heterophylla*, *R. hirsuta*



Imagen N° 3

Rauwolfia tetraphylla L



2.2.2. Descripción⁷

Descripción Botánica: Arbusto leñoso, pequeño y ramificado, 0.6-1.2 m de altura; hojas elípticas verde a verde oscuras radialmente dispuestas en el tallo, en grupos de 4 de igual tamaño en cada nodo; flores blanco-verduscas o cremosas en cimas en umbela; drupas ovales, púrpura oscuro al madurar, semilla oblonga y rugosa.

3. Generalidades del Látex: ⁸

3.1. Látex de las plantas

Desde el siglo 17, el látex se ha usado como un término para la sustancia fluida en las plantas, el látex que es el elemento principal de la planta para tratamiento de enfermedades, se puede utilizar aún de plantas muy tiernas si el requerimiento es indispensable y muy urgente; este componente principal se encuentra en mayor cantidad en el tallo, pero también se encuentra en menor cantidad en las hojas y raíces. Siendo esta sustancia muy irritante.

Cuando la planta es tierna su látex es de color blanco claro, poco densa y muy fluida, se puede utilizar para tratamiento médico, obteniéndose efecto curativo pero utilizando mayor proporción de látex por cantidad de agua que cuando el látex es de planta adulta. El látex de una planta adulta es de color muy blanco y muy denso, en este estado es más recomendable su utilización, pues el efecto curativo es mayor.

3.2.Recolección del Látex⁸

Para recoger el látex de las plantaciones, se practica un corte diagonal en ángulo hacia abajo en la corteza del árbol. El corte tiene una extensión de un tercio o de la mitad de la circunferencia del tronco. El látex exuda desde el corte y se recoge en un recipiente.

3.3.Características del látex.

- **Composición Química⁸**

El látex tiene características muy determinantes. Si hablamos del pH del material, es de un rango de 10 a 11 de acidez lo que quiere decir que es un caucho ácido y susceptible a reaccionar con otros materiales. Tiene una viscosidad a 20° C de 200 a 600 centipois.



- **Temperaturas**⁸

El látex se debe almacenar entre 15°C y 25°C. La exposición a temperaturas menores que 5°C y mayores a 30°C, podría producir daños al látex ocasionando coagulación irreversible, y provocando la descomposición del material.

4. Actividad Antimicrobiana⁴

Se define como “La capacidad que posee un Fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos”.

Generalmente los compuestos que poseen dicha actividad tienen gran interés a nivel mundial, ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos.

5. Antibióticos naturales⁴

Los antibióticos naturales son simplemente algunas plantas o minerales, que podemos encontrar en la naturaleza, que actúan inhibiendo el crecimiento y el desarrollo normal de microorganismos. De esta manera, prevenimos y hasta podemos curar muchas enfermedades y condiciones médicas problemáticas.

6. Ventajas de los antibióticos naturales:⁴

- Por lo general carecen de efectos secundarios.
- Rara vez causan alergias.
- Eliminan únicamente microorganismos que son nocivos para el cuerpo.
- Precio barato y fácil de encontrar

7. Características de las cepas:⁹

7.1. *Candida albicans*⁹

7.1.1. Taxonomía

Reino: Fungi
Filo: Deuteromiceta
Subfilo: Saccharomycotina
Clase: Saccharomycetes
Orden: Saccharomycetales
Familia: Saccharomycetaceae
Género: Candida



Imagen N°3
Candida albicans



7.1.2. Descripción y características generales⁹

C. albicans es una levadura, cuyas células en yema son redondas, ovaladas u oblongas de 2.5 por 3-14 μm y de paredes delgadas, se presentan solas o en racimos, presentan coloración azul al Gram.

Forma clamidosporas de pared gruesa sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas y blastoconidias producidas en densos racimos regularmente espaciados a lo largo de las pseudohifas. Es un hongo dimorfo capaz de producir hifas y micelios verdaderos, a menudo forma pseudomicelios compuestos de pseudohifas. Las paredes celulares de *C. albicans* contiene los constituyentes micóticos típicos y además compuestos no identificados que son tóxicos.

7.1.3. Características generales de cultivo⁹

Candidaalbicans a temperatura ambiente existe como levadura, pero cuando se inocula dentro de un huésped susceptible o cuando son cultivadas con bajos potenciales de óxido-reducción forman filamentos denominados pseudomicelios.

En cultivo se trata de una colonia de crecimiento rápido (2-5 días) y de crecimiento lento (2-3 semanas). *C. albicans* crece rápidamente en agar Sabouraud, agar sangre, soya tripticasa y en otros medios enriquecidos.

En agar glucosado de Sabouraud germina bien y produce colonias que recuerdan las bacterianas; son irregulares, cremosas, húmedas, opacas y al envejecer desarrollan hifas al interior del agar. Son capaces de desarrollarse a 37°C o a temperatura ambiente.

El crecimiento es aerobio, diminutas colonias suelen ser visibles a las 24-36 horas y alcanza un tamaño de 1.5 a 2 mm en aproximadamente una semana en agar Sabouraud. Las colonias por lo general son de color blanco pero pueden tornarse cremas o bronce al envejecer.

7.2. *Staphylococcus aureus*⁹

7.2.1. Taxonomía

Reino: Bacteria

Phillum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Micrococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *aureus*

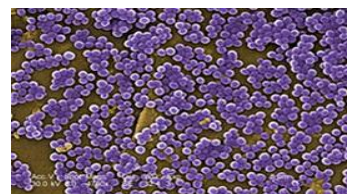


Imagen N°3
Staphylococcus aureus



7.2.2. Descripción y características generales⁹

Es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis.

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo.

7.2.3. Características Generales del Cultivo: ⁹

Staphylococcus aureus crece bien en medios de cultivo no selectivos, como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro-corazón. También los medios líquidos utilizados para hemocultivos permiten recuperar fácilmente este microorganismo.

El medio selectivo más empleado en los laboratorios clínicos para aislar *Staphylococcus aureus* es el medio agar sal manitol (medio de Chapman); que por su elevado contenido en sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias gramnegativas.

Además este medio permite realizar una identificación presuntiva basándose en la coloración amarilla característica que adquieren las colonias.

Este microorganismo fermenta manitol con producción de ácido. La acidificación produce un cambio en el color del medio que vira de rosa pálido a amarillo. La mayoría de los *staphylococcus coagulasa* negativos no fermentan manitol y crecen en el medio formando colonias de color blanco-rosado.



7.3. *Salmonella*⁹

7.3.1. Taxonomía:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*



Imagen N°4

Salmonella spp.

7.3.2. Descripción y características generales:⁹

Es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi* ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo.

Es un agente productor de zoonosis de distribución universal. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar; también por vía sexual.

Algunas salmonellas son comunes en la piel de tortugas y de muchos reptiles, lo cual puede ser de cuidado cuando se manipulan este tipo de mascotas a la vez con alimentos. El hábitat natural de esta especie normalmente es en los intestinos de cualquier tipo de animal homeotermo (incluidos seres humanos).

Métodos para la detección antimicrobiana

7.1. Antibiograma difusión de microdiscos (kirby-bauer)¹⁰

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 interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica obtenida por 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 que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.

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.

7.2. Potencia o actividad antimicrobiana.¹⁰

La potencia o actividad antimicrobiana se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado y se basa en la medición de un atributo del producto, por ejemplo su efecto inhibitorio sobre un determinado microorganismo (halo de inhibición), se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos. La actividad o potencia de un antibiótico puede ser demostrada durante el proceso inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo en el análisis de potencia.

Se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia.

7.3. Método de difusión en cilindro-placas (difusión en placa)¹⁰

Depende de la difusión de un antibiótico desde un espacio cilíndrico denominado pozuelo, que se hace en un medio de agar solidificado en una caja de Petri (placa) en el cual ha sido inoculado con un microorganismo modelo o de prueba bien establecido (cepa ATCC);

Este último es inhibido dentro de la zona de difusión del antibiótico en un área circular (zona de inhibición), alrededor de la zona en que se ha ubicado el cilindro que contiene las diferentes diluciones del antibiótico evaluado (6 cilindros por placa); los halos así formados



tanto por el patrón como para la muestra son medidos y cuantificados de forma estadística para determinar la potencia relativa de la muestra.

7.3.1. Lectura de las placas e interpretación de los resultados¹⁰

Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en mm. Pasando por el centro del disco. La placa petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada. Para *Staphylococcus aureus*, se requieren 24 horas de incubación y luz transmitida se usa para examinar la zona de neomicina. El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible.

7.4. Dilución en caldos de cultivo¹⁰

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (macro dilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de micro titulación (micro dilución).

7.5. Ensayo de actividad antimicrobiana por el método de mitscher¹⁰

Se basa en el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados, inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar. En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua.

El Método consiste en colocar diferentes concentraciones del extracto en cajas de Petri conteniendo agar tripticasa soya, en los cuales se procede a marcar con una línea el sitio donde será rallado cada uno de los microorganismos de prueba y luego con una asa de Henle estéril se toma una asada de la suspensión de cada microorganismo en turno.

El asa con el microorganismo entonces es rayada en un patrón radial de cada caja de petri siguiendo una plantilla.



Una vez inoculada se incuban y luego se examina cada una de las placas y se determina si hubo o no actividad antimicrobiana por la presencia no de colonias.⁵

8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ¹⁰

La concentración mínima inhibitoria es la actividad que muestra el extracto puesto a prueba en el laboratorio y es expresada como la concentración más baja a la cual el extracto inhibe la multiplicación de microorganismos, la cual se expresa como CIM.

9. Turbidimetria.¹⁰

Cuando se hace incidir una fuente de radiación electromagnética, como por ejemplo la luz de una bombilla, la energía radiada a la suspensión es disipada en parte de absorción, y en parte por reflexión y refracción, mientras que la restante es transmitida.

Mediante la aplicación de la ley Lambert - Beer es posible determinar el valor de la concentración de una solución en base a relación entre la energía emitida por una fuente y la absorbida por un cuerpo. Es posible medir así con la ayuda de un espectrofotómetro la relación entre la energía emitida y la energía absorbida por un cuerpo.

Es posible medir con la ayuda de un espectrofotómetro la relación entre la energía emitida y la energía absorbida por la muestra mediante la medición de los valores de transmitancia y absorbancia.

La ley de Lambert - Beer establece que:

$$A = -\log(T) = K \cdot b \cdot c \text{ (formula 2)}$$

Dónde:

A= Valor de la absorbancia.

T= Valor de la transmitancia.

K= Constante de absorptividad.

b= Ancho de la cubeta donde se encuentra.

c = concentración de la muestra.

De esta forma, como k y b son constantes para diferentes muestras de una misma sustancia a concentraciones diferentes, es posible establecer que la absorbancia en función de la concentración debe ser una línea recta que pasa por el origen.



Utilizando este principio es posible con ayuda de un espectrofotómetro determinar el valor de la concentración de una muestra desconocida a partir de una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración.

En el caso de una suspensión, realizar un análisis de la concentración con ayuda de un espectrofotómetro implica el control de ciertas variables que pueden alterar los valores de lectura.

10. Suspensiones normalizadas o estandarizadas.¹⁰

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de resultados esperados.

Normalmente, la farmacopea para ensayos de recuperación microbiana en presencia de productos (validación de la esterilidad o grado de contaminación) indica que se siembre un número determinado de microorganismo de cultivos recientes.

11. Preparación del inocuo.¹⁰

Un inóculo corresponde a una cantidad suficiente y representativa de m. o problema. Si la muestra no es pura se aplicarán distintos métodos para el aislamiento, si el problema está en la cantidad de microorganismo será necesario prepara un inóculo con el fin de obtener resultados fiables.

12. Métodos de inoculación o siembra¹⁰

El paso de una muestra microbiana a un medio de un cultivo se denomina Siembra o Inoculación.

El paso de una muestra de un medio a otro se denomina resiembra.

13. Siembra de un inoculo en medio líquido:¹⁰

- Con asa de siembra se adiciona al medio agitándola.
- Con pipeta se vierte agitándose hasta su homogenización.
- Con hisopo o escobillón igual que con el asa de siembra.

14. Técnica de Barry¹⁰:

Para ello se cultiva de previamente fundido en tubo se le añade el inóculo, se homogeniza, se vierte en la placa Petri y se deja solidificar. Se utiliza para determinación de CMI.



15. Siembra de muestra líquida en Placa con Asa de Digralesky¹⁰:

Consiste en distribuir la muestra de manera de uniforme por la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Para ello adicionamos al medio sólido un inóculo líquido con la pipeta graduada, y posteriormente se extiende con el asa de digralesky. Se utiliza para el recuento de viables y antibiogramas.

16. Siembra por agotamiento o aislamiento en Estría¹⁰

Se tomara con el asa de siembre una cantidad adecuada depositando el inóculo en uno de los extremos superiores de la placa, se realizaran movimientos en Zig-zag sin levantar el asa hasta concluir la siembra en toda la placa.

17. Siembra por agotamiento

17.1. Aislamiento en estría múltiple¹⁰

Se toma el inóculo y se deposita en el extremo superior, extendiéndose en la parte superior solamente. Flameamos y giramos ligeramente la placa continuando con los procesos anteriores. Repetimos la operación 4 o 5 veces. El resultado son colonias cada vez más separadas como consecuencia de cada vez se van arrastrando y separando la muestra.

17.2. Técnica de los cuatro cuadrantes: ¹⁰

Con un rotulador dividiremos la placa en 4 cuadrantes iguales. Con el asa extendemos por cada cuadrante el inóculo haciendo zig-zag sin flamear. Finalmente observamos como en el último cuadrante las colonias se encuentran aisladas o separadas.

17.3. Técnicas de los 3 giros: ¹⁰

Se rotula de forma análoga con el asa de platino y se siembra por estrías la mitad superior de la placa. Sin flamear giramos 90° y volvemos a sembrar (así hasta 3 veces).

17.4. Técnica de siembra por dilución: ¹⁰

Se dispondrá de una batería de tubos y se adicionara una cantidad de muestra conocida en el primer tubo, homogeneizamos diluimos en los siguientes tubos hasta obtener la dilución deseada. Una vez realizada la dilución inoculamos en las placas de cultivo y extenderemos con el asa de Digralesky. Incubamos a la temperatura precisa durante 24 horas y recontamos.



18. Siembra por inóculo en tubo

18.1. Siembra por estría en túbulo con medio inclinado:¹⁰

Con el asa de siembra se añade al tubo una cantidad de muestra realizando movimientos ascendentes en zig-zag. Este método es utilizado para conservar cepas durante largos periodos, así como para la realización de ciertas pruebas bioquímicas.

18.2. Siembra por picadura:¹⁰

Con hilo de siembra introducir el asa en el medio cultivo hasta el fondo en la zona central de este. Se utiliza en la siembra de cultivos semisólidos.

19. Medios de Cultivos¹⁰

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias variadas.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*.

También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones.

19.1. Medios Sólidos¹⁰ Medio sólido es todo aquel que contiene un agente gelificante. La dureza del medio depende de la dureza del medio depende principalmente de dos factores:

- a) **Agar:** es una mezcla de polisacáridos extraídos de un alga marina. Tiene una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red. El agar interactúa con los componentes nutritivos del medio. El agar se funde a altas temperaturas (100° C), se solidifica alrededor de los 40° C y no se degrada con la luz. Generalmente se utiliza a una concentración de 0,6 – 1 %. **Gelrita:** Es un heteropolisacárido amónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar. Se puede usar una concentración de 0,15 – 0,30 %.

19.2. Medios Enriquecidos:¹⁰

Algunos microorganismos no son capaces de desarrollarse en medios de cultivo normales. Para cultivarlos necesitamos añadir sustancias altamente nutritivas como sangre, suero,



extractos de tejidos animales. En medios son los medios enriquecidos, y los microorganismos que crecen en ellos son microorganismo a exigentes o fastidiosos, ejemplos: agar-sangre.

19.3. Medios Selectivos:¹⁰

Contienes uno o varios compuestos que inhiben el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo y no afectan a otros tipos. Ej. El cristal violeta inhibe la gram (+).

Otra manera es modificar la fuente de carbono: si sustituimos la glucosa por maltosa, seleccionamos aquellos microorganismos capaces de digerirla.

19.4. Medios diferenciales:¹⁰

Contienes distintos compuestos químicos o indicadores sobre los que determinamos microorganismos adquiere coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada.

20. Composición y pH del medio de cultivo.¹⁰

La composición y el pH del medio pueden influir en los resultados. Muchos antimicrobianos químicos son ácidos o bases débiles y su solubilidad en los lípidos aumenta cuando se encuentra de forma ionizada.

El pH influye sobre el grado de ionización y, por tanto, en su solubilidad en los lípidos y, en último término, en su efecto antimicrobiano.

Por el contrario, las bases débiles como los antibióticos aminoglicosidos, Neomicina, son activos a los pH ligeramente alcalinos.

Almacenamiento de medios de cultivos:¹⁰

Los medios de cultivo deshidratados se deben almacenar en envases sellados bajo las condiciones que señale el fabricante. Generalmente se almacenan en un lugar fresco (15 a 25°C), con poca humedad y protegidos de luz solar directamente. Nunca se deben almacenar de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor.

Los medios de cultivo deshidratados se deben descartar cuando se hidraten o decoloren.

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado se debe almacenar entre 2 y 8°C, a menos que el medio requiera alguna condición diferente. Se deben mantener en recipientes bien cerrados para evitar su deshidratación. Cuando se usa tapón de algodón se debe colocar por encima una envoltura de papel (craft).



DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de Estudio: Experimental.

Área de Estudio: Laboratorio de Farmacognosia y Laboratorio de microbiología del departamento de Farmacia Industrial Facultad de Ciencias Químicas, UNAN- León

Universo: Plantas Medicinales que producen látex: *Aloe Vera*, *Ficus insípida*, *Carica papaya*, *Musa sapientum*, *Croton erythrochilus*, *Calophyllum brasiliense*, *Bursera simaruba*, *Euphorbia tirucalli*, *Castilla elastica sessé*, *Rauvolfia tetraphylla L.*

Muestra: *Euphorbia tirucalli*, *Castilla elastica Sessé in Cerv*, *Rauvolfia tetraphylla L.*

Unidad de Análisis:

- Látex de *Euphorbia tirucalli* , *Castilla elastica sessé in Cerv*, *Rauvolfia tetraphylla L*

Criterio de Exclusión:

- Látex de aspecto enmohecido u oscuro que muestre carácter de sufrir oxidación
- Látex de especies con estudios antimicrobianos por el método de difusión en placa

Criterio de Inclusión:

- Látex de aspecto semisólido, viscoso que no muestre carácter enmohecido u oscuro tras sufrir oxidación.
- Látex de especies no reportados estudios antimicrobianos por el método de difusión en placa

Variable de Estudio:

- Látex.
- Actividad antimicrobiana.



Tabla N 1 Operacionalización de Variable:

Variable	Definición	Unidad de Medida
Látex	El látex se usa como un término para la sustancia fluida en las plantas, que es el elemento principal de la planta para tratamiento de enfermedades	µg/ml
Actividad antimicrobiana	Capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos.	Presencia +++ Ausencia ---

Tabla N° 2 Materiales, medios, equipo y cristalería.

Cristalería		Equipo	Material	Medio y reactivos
Volumen ml	Marca	Agitador bortex (scientific industries)	Aplicadores de madera	Sabouraud dextrosa (ph 5.6 ±0.2)
Erlenmeyer (250)	Pirex	Cocina (cornig hot plate PC-100)	Algodon	Tripticasa de Soya (7.3 ±0.2)
Balones (25,50,100)	pirex	Asas de Henle	Papel aluminio	Dimetil sulfoxido grado biológico molecular
Probetas (100)	pirex	Gradillas plásticas y metalicas	Alcohol al 70%	Clotrimazol 10mg/ml
Pipetas (1,5,10)	pirex	Esèctrofotometros (bausch and Lomb)	Marcador permanente	Ceftrianona 1g/ml
Beaker	pirex	Balanza triple brazo (Ohaus 2610gr)	Gorro	Neomicina 1g/ml
Placas Petri (100x100)	pirex	Balanza analítica (Gibertoni peso max: 510g, peso min: 1g)	boquillas	



mm)				
Tubos de ensayo	pirex	Horno (Precision)	Gabacha	
		Lector de Zona (Fisher Lilly)	Guantes	
		Incubadora doble (Precision Scientific, 37°C)		
		Baño maria (Precision Scientific)		
		ph-metro (Corning Modelo 10)		
		Cilindros de acerp inoxidable		
		Pinza metalica		
		Autoclave para descontaminación (Mod. 25x1 UL)		
		Autoclave para esterilizar (Petton y Crane)		
		Refrigeradora (Energy GUID)		

Procedimiento

1. Revisión bibliográfica

Para documentarnos buscamos artículos científicos y bibliografía relacionada al tema, con el objetivo de tener conocimientos previos para la realización del trabajo. Además buscamos información de las plantas que contienen látex y así seleccionar aquellas plantas que se encuentren a nuestro alcance y así incluirse en nuestro estudio.

2. Recolección de la muestra

Para la recolección nos dirigimos al Jardín Botánico de la UNAN León, el cual encontramos una de las muestras a evaluar que era *Castilla elástica sesse*, al tallo de esta le realizamos rayados diagonales, posteriormente el látex se depositó en alcohol al 70%.



Las otras dos plantas se cortaron tallos y hojas que producían látex, realizando de igual manera cortes diagonales para su extracción.

3. Preparación de la cristalería

- **Lavado y empacado:**

A tres galones de agua, agregar 500ml de cloro y 500ml de jabón líquido, dejarla en remojo por 24 horas, pasado este tiempo con ayuda de un paste verde lavar con abundante agua hasta eliminar todo residuo de jabón, se coloca en un mesa de manera invertida para su secado, luego se cierran las placas y a empacar, cortamos pedazos de aluminio y empacamos las placas Petri en paquetes de 5, las pipetas en paquetes de tres a estas antes de empacar se les coloca una pequeña cantidad de algodón en el área donde se succiona para evitar contaminar la muestra y contaminarnos nosotros, una vez empacadas marcamos la cantidad, el volumen y una flecha que indica donde vamos a abrir, para los Erlenmeyer se realiza un tapón y se coloca en la boca de este y luego se coloca una retapa de aluminio y se lleva al horno, en el regulador lo ponemos en 7 para alcanzar una temperatura de 180°C por dos horas.

- **Descontaminación:**

En un autoclave modelo 25X-1 (UL) llenar con agua hasta cubrir la rejilla, en el contener introducimos la cristalería, colocamos la tapa procurando que los indicadores coincidan y procedemos a cerrar el autoclave, enchufamos y encendemos, a una temperatura de 121°C por 1 hora, asegurándonos que la válvula de seguridad este hacia abajo, pesada la hora sacamos el contenedor y procedemos a lavar la cristalería siguiendo el procedimiento antes mencionado.

Tomamos placas de vidrio de (100x100ml), pipetas (1,5 y 10ml), balones (25,50, y 100ml), cilindros, pinzas; hisopos, tubos de ensayo, erlenmeyer (100ml), fiolas (50 y 100ml) las cubrimos con papel de aluminio y las esterilizamos en el horno por 4 horas a 180°C.

4. Preparación de la solución salina:

- Pesamos 0.85g de cloruro de sodio y los disolvimos en 100ml de agua destilada hervida.
- Se autoclavo a 121°C por 15 minutos.



- La solución se puede mantener a temperatura ambiente por varias semanas. Es importante que la misma se tape adecuadamente.

5. Cultivo de microorganismo:

Después de la preparación del agar tripticasa caseína de soya, se llenaron 14 tubos de ensayo con 9ml de agar aproximadamente, se autoclavo a 121°C por 15 minutos y se inclinaron sobre una superficie hasta que el agar se solidifico.

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

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

Los tubos se marcaron con cuidado y se incubaron a 37°C por 24 horas.

6. De actividad antimicrobiana por el método de Mistcher

Metodología del método:

Cualquier muestra puede ser procesada en este medio y puede sembrarse por diferentes métodos así:

1. Con asa bacteriológica estéril trabajando siempre a la llama del mechero, tomar una mínima muestra de las cepas *Estafilococos aureus* y *Samonella spp* y levaduras de *Candida albicans*.
2. Sembrar suavemente sobre la superficie tensa del medio por el procedimiento de agotamiento de asa.
3. Incubar las placas en posición invertida a 37°C para evitar que la humedad de las paredes de la tapa de placa se derrame sobre el agar, y evitar posible errores al momento de la lectura fina.
4. Al término de 18-24 horas de incubación examinar el cultivo y determinar los estudios a seguir si se requiere.

6.1. Preparación estándar de ceftriazona y clotrimazol.

Se pesó cuidadosamente 100mg de ceftriazona utilizando una balanza analítica, luego se disueltivo en 10ml de agua destilada estéril. Esta solución no es autoclavable (contiene



10mg/ml) luego se trasvaso aun balón de 100ml y se aforo. Si se mantiene refrigerada a la solución es estable por muchas semanas y puede ser utilizada repetidamente.

En caso de la clotrimazol: Tomamos 0.1ml de clotrimazol en solución directamente ya que el producto declara 10mg/ml, para obtener una concentración de 100µg/ml

6.2. Preparación de los medios cultivo para método de Mistcher:

a) **Agar tripticasa de soya:** Es un medio de cultivo recomendado para la recuperación y aislamiento de toda clase de bacterias, grampositivas y gramnegativas aerobias. El agar tripticasa de soya garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto grampositivos como gramnegativos, este medio tiene multiples usos puede ser utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies, para el mantenimiento de cepas ATCC y para el análisis de agua y alimentos. El agar tripticasa de soya contiene caseína digerida con enzimas pancreáticas 5.0g caseína digerida con papaína 5.0g, cloruro de Na 5.0g , agar 15.0g pH final (7.3+/-0.2).

De este se tomó 4 gramos que se disolvieron en 100 ml de agua en ebullición, se agito en caliente para una mejor disolución del medio.

b) **Agar Sabouraud Dextrosa:** medio de cultivo recomendado para el crecimiento de hongos.

De este se tomó 6.5 gramos que se disolvieron en 100 ml de agua en ebullición, se agito en caliente para una mejor disolución del medio.

6.3. Preparación de los platos para rayado:

Después que se autoclavo el agar se dejó enfriar aproximadamente a 55°C. Asépticamente, se añadieron 9.9ml de agar a cada plato Petri y 0.1 ml de la muestra correspondiente, se agito suavemente la mezcla para homogenizar lo más que sea posible. El agar se dejó solidificar y se mantiene a temperatura ambiente. Debe hacerse por triplicado para evitar errores en la lectura, dado por una mala maniobra.

Una proporción de esta solución (0.1ml) se añadió con 9.9ml de agar estéril a un plato Petri marcado, resultando en una solución final de 100 µg/ml.



6.4. Preparación de las muestras para el ensayo:

100mg de extractos alcohólicos secos por separado de cada muestra a evaluar, se disolvieron en 1ml de dimetil sulfoxido estéril, luego se trasvaso a un balón y se aforo a 100ml.

Inoculación: Se tomó una porción de esta solución y se deposita en un plato Petri que contenga 9.9ml de agar tripticasa de soya y caseína estéril recientemente colocado. Se Agito suavemente hasta obtener una concentración final de 1000µg/ml.

6.5. Preparación de la suspensión de los microorganismos:

Todos los tubos de ensayo que contienen a los microorganismos deben ser visiblemente turbios y con olor característicos con el fin de conseguir aproximadamente la misma velocidad de crecimiento de cada uno de los microorganismos, se tomaron 2 o 3 asadas de microorganismos y se solubilizaron en tubos que contenían solución salina estéril de cloruro de sodio 0.9%, luego se midió en un espectrofotometro a 580nm hasta alcanzar 25% de tramitancia.

6.6. Rayado de los microorganismos:

Los platos se sacaron de la incubadora y se examinaron. No debían tener contaminación visible, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado en otra ocasión.

Se humedeció el aplicador con la suspensión de microorganismo y luego se inocularon los platos, mediante rayado horizontal con los microorganismos en estudio. Se incubaron 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.

6.7. Interpretación de resultados analíticos:

Cualquier tipo de crecimiento en el agar tripticasa de soya y sabouraud desxtrosa se evidenciara por la aparición de colonias en el medio, reportadas como ausencia, caso contrario como presencia.



7. De actividad antimicrobiana por Difusión en Placa

7.1. Preparación o activación del microorganismo a ensayar:

Se realizaron pases sucesivos de microorganismos en tubos de ensayo conteniendo agar tripticaseína soya estéril, realizando estos pases siete días, se tomaron con una asa de Henle estéril una o dos asadas de microorganismos y se inocularon a un tubo inclinado en forma de cuña contenido 10 ml de agar. Este envase se marcó y se encubo 37°C por 24 horas.

7.2. Preparación de la muestra para método por Difusión en Placa:

Se pesaron 50mg de extractos alcoholicos secos con precisión en una balanza analítica, luego se disolvieron en 1ml dimetil sulfoxido luego se trasvaso a un balón de 50ml para obtener una concentración de 1mg/ml

7.3. Preparación del estándar.

Se pesó cuidadosamente 50mg de Neomicina utilizando una balanza analítica y se disolvieron en 50ml de buffer N°. 3 para obtener una concentración de 1mg/ml

7.4. Preparación de la solución buffer N° 3

Fosfato dibasico de potasio	16.73g
Fosfato monobásico de potasio	0.523g
Agua c.s.p.	1000ml
pH	8.0 ±0.1

7.5. Preparación de los medios para método por Difusión en Placa

Se disolvieron 30.5g de agar de antibiótico #11 (capa siembra, capa base) luego se disolvieron cada uno en 1000ml de agua destilada caliente hasta lograr una clarificación total del agar posteriormente; se introdujeron por 5min en el autoclave a 121°C, antes y después se miden el pH del medio el cual debe oscilar en 6.5 para ambos medios, en caso contrario deberán hacerse los ajustes necesarios (antibiótico #11).

7.6. Preparación de la solución salina para la preparación de la suspensión del microorganismo

Se preparó la solución salina de cloruro de sodio al 0.9% pesando con exactitud en una balanza analítica 0.9g de cloruro de sodio y se disolvieron en 100ml de agua destilada luego se autoclavo a 121°C por 15min la solución salina se pueden mantener a temperatura ambiente por varias semanas, es importante que la solución se tape adecuadamente.



7.7. Preparación de la suspensión de microorganismos

Se tomaron 2 o 3 asadas de microorganismos preparadas anteriormente en tubos con agar tripticaseína soya inclinada y se solubilizaron en tubo que contenía solución salina de cloruro de sodio al 0.9% estéril luego se agito hasta homogenizar la mezcla con ayuda de un Vortex,

Luego se utilizó un espectrofotómetro en los que se seleccionó una longitud de onda de 580nm hasta alcanzar el 25% de transmitancia teniendo en cuenta que la medición de la solución solo sirve de referencia para el ajuste en la concentración de microorganismos.

7.8. Preparación de las placas inoculadas

Se seleccionó el medio de cultivo y la cantidad del mismo para la capa base y siembra; el microorganismo de ensayo y la cantidad de inóculo sugerido para el antibiótico que se va a utilizar.

Metodología

7.9. Capa base

Con ayuda de una pipeta serológica de 26 ml, agregamos la cantidad apropiada (generalmente 21ml) de medio fundido a cada placa Petri. Distribuimos el medio suavemente para cubrir todo el fondo de la placa. Colocamos la tapa dejándola ligeramente abierta (inclinada), para prevenir acumulación de la humedad condensada. Cuando el medio se endurece tapar bien cada placa.

7.10. Capa siembra

Preparado el medio se procedió a la adición del inóculo al agregar el antibiótico N°11 para la suspensión del microorganismos de ensayo al medio del cultivo. Se recomienda que el medio este a una temperatura tolerable al contacto con la mejía.

Deberá agitarse el frasco conteniendo el medio haciéndolo girar, para obtener una suspensión homogénea del microorganismo, durante el montaje del ensayo.

Agregar a cada placa 4ml del medio inoculado y distribuir suavemente sobre la capa base. Dejar las placas sin tapar ligeramente sobre la mesa para que se endurezca la capa siembra (se puede preparar 6-8 placas de una vez y luego continuar de 3 en 3 o 4 en 4 según la consistencia del medio.



7.11. Adición de los cilindros

Después de solidificar el agar conteniendo la capa base y la capa siembra sobre él se colocan sobre la superficie de agar inoculada los 6 cilindros equidistantes entre sí en forma de estrella utilizando el aparato colocador de cilindros.

Los cilindros se llenan con un volumen fijo de muestras y estándar previamente rotulados indicando en forma inequívoca que solución se colocara en cada punto (S1, M1, S1, M1, S1, M1) finalizando este paso se procede a colocar las placas preparadas sobre bandejas y taparlas para su predifusión.

7.12. Predifusión

Se dejó difundir el antibiótico a temperatura ambiente un tiempo establecido experimentalmente (generalmente de media a una hora).

7.13. Incubación

Las placas se incubaron a temperatura adecuada para el microorganismo durante toda la noche (37°C).

7.14. Lectura de los halos

Se midieron los diámetros de los halos en milímetros de inhibición obtenidos con la mayor precisión posible, utilizando un instrumento de medida o lector de zona (proyección sobre una pantalla).

7.15. Análisis e interpretación de los resultados

Se realizó la lectura a las 24 horas posteriores en un lector de zona.



ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Tabla N° 3 Comparación Método Mistcher vs Difusión en placa.

Nombre de la muestra	Método de Mistcher						Potencia Antimicrobiana					
	<i>Candida albicans</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> 24 horas					
Tiempo	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	Neomicina	Muestra	Neomicina	Muestra	Neomicina	Muestra
<i>Castilla elastica Sessé in Cerv</i>							18.4mm	0mm	18.6mm	0mm	18.6mm	0mm
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	17.2mm	0mm	18.8mm	0mm	18.6mm	0mm
							17.8mm	0mm	18.5mm	0mm	18.8mm	0mm
<i>Euphorbia tirucalli</i>							18.2mm	0mm	18.3mm	0mm	18.4mm	0mm
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	18.0mm	0mm	18.0mm	0mm	17.4mm	0mm
							18.0mm	0mm	17.8mm	0mm	18.8mm	0mm
<i>Rauwolfia tetraphylla L</i>							18.8mm	0mm	18.2mm	0mm	17.4mm	0mm
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	18.0mm	0mm	18.6mm	0mm	18.4mm	0mm
							18.0mm	0mm	18.4mm	0mm	18.8mm	0mm
Ceftriaxona	+++	+++	---	---	---	---						
Clotrimazol	---	---	---	---	---	---						
Control de medio	---	---	---	---	---	---				---		
Control de ambiente	---	---	---	---	---	---				---		

+++ : Crecimiento

--- : Ausencia

La tabla N° 3 evidencia el ensayo de actividad biológica por el método de Mistcher y potencia antibiótica (difusión en placa) en látex de plantas a concentración de 1g/ml obtenidos de *Euphorbia tirucalli*, *Castilla elastica Sessé in Cerv*, *Rauwolfia tetraphylla L*, en comparación a los estándares de referencia de Ceftriaxona, Clotrimazol y Neomicina, los cuales utilizamos por su accesibilidad ya que los estándares que podíamos utilizar como primera y segunda opción, no estaban disponibles en la facultad, por ende trabajamos con los que se nos hizo más fácil conseguir en los establecimientos de medicamentos, mostrándose actividad biológica nula para el método de Mistcher que valoro la formación de colonias viables, este método mostro el crecimiento de las cepas y levaduras en los rayados, no se realizó la valoración de la Concentración mínima inhibitoria (C.M.I) en este ensayo y el método de difusión en placa, el cual valoró la medición de los halos en milímetros (mm) en un lector de zona Fisher-lilly en donde el crecimiento de los halos

Comparación de actividad antimicrobiana en látex de plantas por el método de Mistcher vs Difusión en placa



evidencio por una parte la inhibición antimicrobiana del estándar, mientras que la muestra no formo halo de inhibición por lo tanto su actividad antimicrobiana fue nula; la efectividad de ambos métodos fue valorada estadísticamente ,observándose para dichas pruebas Método de Mistcher y método de difusión en placa la actividad cualitativa y cuantitativa respectivamente.



Comparación de actividad antimicrobiana en látex de plantas por el método de Mistcher vs Difusión en placa

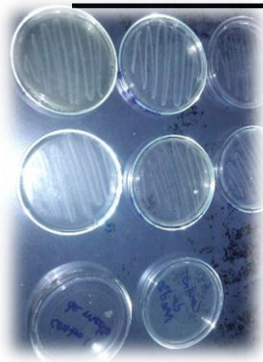


Ilustración 1

Muestra de *Euphorbia tirucallia* *Estafilococos aureus* y *Salmonella Spp* y control de medio y ambiente según Mistcher.



Ilustración 2

Muestra de con *Castilla elastica Sessé* con *Candida albicans* y *Salmonella spp.* y control de medio y ambiente según Mistcher.



Ilustración 3

Muestra de *Rauvolfia tetraphylla L* con, *Candida Albicans*

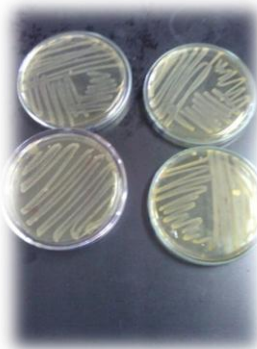


Ilustración 4

Muestra de *Rauvolfia tetraphylla L* con *Salmonella Spp.* *Estafilococo aureus.*

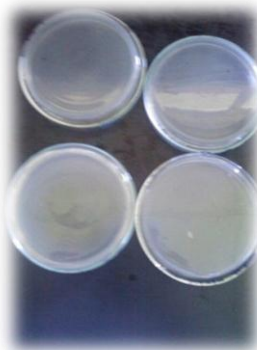


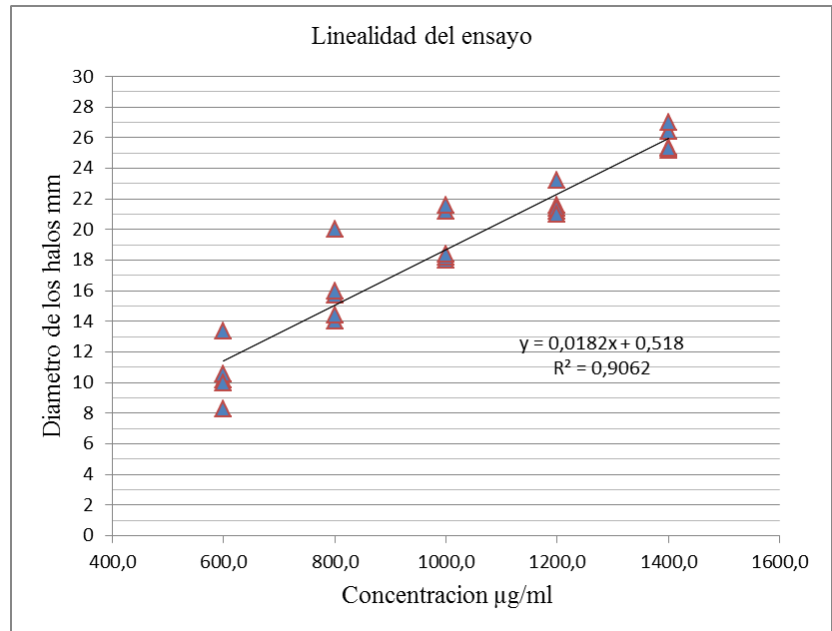
Ilustración 5

Estándares de Clotrimazol y Ceftriaxona



Tabla N°4, Grafico N° 1, Linealidad de los resultados entre el logaritmo de la concentración del antibiótico y el diámetro de los halos

Concentraciones (µg/mL)	Diámetros halos de inhibición en mm para el estándar	Diámetros halos de inhibición en mm para la muestra
1400,00	25,2	0
1400,00	26,4	0
1400,00	25,4	0
1400,00	27,0	0
1400,00	25,3	0
1200,00	21,6	0
1200,00	23,2	0
1200,00	21,2	0
1200,00	21,4	0
1200,00	21,0	0
1000,00	18,0	0
1000,00	21,2	0
1000,00	21,6	0
1000,00	18,2	0
1000,00	18,4	0
800,00	14,0	0
800,00	15,7	0
800,00	14,4	0
800,00	20,0	0
800,00	16,0	0
600,00	10,2	0
600,00	10,6	0
600,00	8,3	0
600,00	10,0	0
600,00	13,4	0



La tabla No 4 y grafico No 1 evidencian la linealidad de los resultados obtenidos para el ensayo de potencia antibiótica en el cual para las concentraciones ensayadas el grafico No 1 muestra un valor de coeficiente de determinación de $R^2=0.9062$ que indica que la variabilidad entre la concentración y el diámetro de los halos es aceptable mas no ideal con un valor superior al 0.75 para un rango comprendido entre 0-1, lo cual permite considerar que la concentración ensayada en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana es adecuada, esto lo realizamos para observar si hubo algún error en el procedimiento utilizado, no obstante dicho valor se ve interferido por la presencia de valores aberrantes, a los cuales posteriormente se les aplico el criterio de Huber para su corrección.



Tabla N° 5 Prueba de Huber

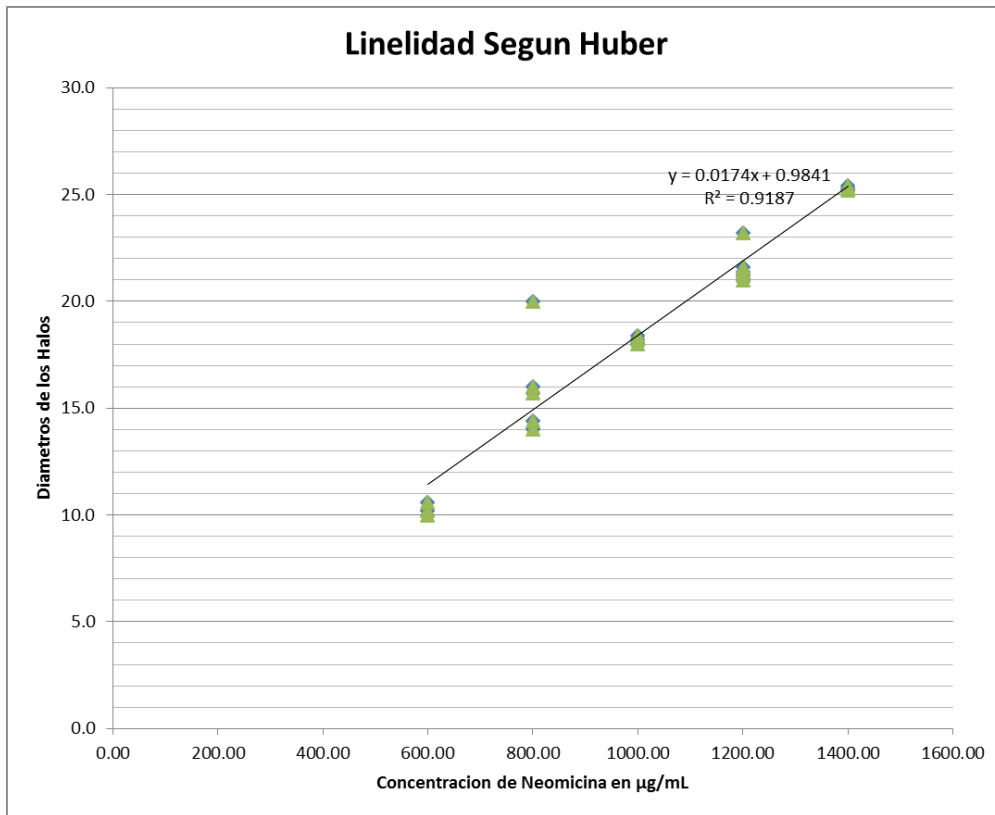
Fórmula para calcular límite superior y límite inferior

$$\tilde{x} \pm 3,5MAD$$

Concentraciones (µg/mL)	Diámetros halos de inhibición en mm para el estándar	Calculo de mediana y límite de ensayo $\tilde{x} \pm 3,5MAD$	Ord 1	Xi-Mediana	Ord 2	Diámetros halos de inhibición en mm para el estándar
1400,00	25,2		25,2	-0,2	0,0	25,20
	26,4		25,3	-0,1	0,1	
1400,00	25,4		25,4	0,0	0,2	25,40
	27,0		26,4	1,0	1,0	
1400,00	25,3		27,0	1,6	1,6	25,30
		Mediana	25,4		0,2	
		Limite Inf	24,7			
		Limite Sup	25,4			
1200,00	21,6		21,6	0,2	0,0	21,60
1200,00	23,2		21,0	-0,4	1,6	23,20
1200,00	21,2		21,2	-0,2	1,8	21,20
1200,00	21,4		21,4	0,0	2,0	21,40
1200,00	21,0		23,2	1,8	2,2	21,00
		Mediana	21,4		1,8	
		Limite Inf	15,1			
		Limite Sup	27,7			
1000,00	18,0		18,0	-0,4	0,0	18,00
	21,2		18,2	-0,2	0,2	
	21,6		18,4	0,0	0,4	
1000,00	18,2		21,2	2,8	2,8	18,20
1000,00	18,4		21,6	3,2	3,2	18,40
		Mediana	18,4		0,4	
		Limite Inf	17,0			
		Limite Sup	19,8			
800,00	14,0		14,0	-1,7	0,0	14,00
800,00	15,7		14,4	-1,3	0,3	15,70
800,00	14,4		15,7	0,0	1,3	14,40
800,00	20,0		16,0	0,3	1,7	20,00
800,00	16,0		20,0	4,3	4,3	16,00
		Mediana	15,7		1,3	
		Limite Inf	11,2			
		Limite Sup	20,3			
600,00	10,2		8,3	-1,9	0,0	10,20
600,00	10,6		10,0	-0,2	0,2	10,60
	8,3		10,2	0,0	0,4	
600,00	10,0		10,6	0,4	1,9	10,00
	13,4		13,4	3,2	3,2	
		Mediana	10,2		0,4	
		Limite Inf	8,8			
		Limite Sup	11,6			



Grafica N° 2



La tabla No 5 y grafico No 2 evidencian la linealidad de los resultados obtenidos tras la corrección de los datos aberrantes según el criterio de Huber para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana en el cual se muestra un valor de coeficiente de determinación de $R^2=0.9187$ con una tendencia positiva para los valores aberrante, por lo cual esta variabilidad es aceptable entre las concentraciones y el diámetro de los halos con un valor superior al 0.75 para un rango comprendido entre 0-1 y ,mostrando una mejor alineación de sus puntos demostrando que la concentración ensayada en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana fueron adecuadas .



Ilustraciones de resultados del método de Difusión en placa



Ilustración 6

Método de difusión en placa, Neomicina vs *Castlla elastica sesse*.

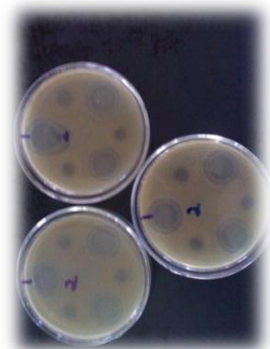


Ilustración 7

Método de difusión en placa, Neomicina vs *Euphorbia tirucallia*

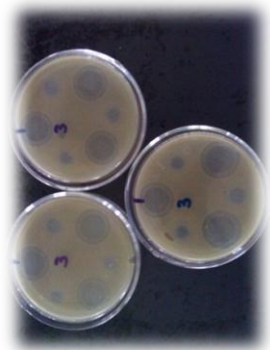


Ilustración 8

Método de difusión en placa, Neomicina vs *Rauwolfia tetraphylla L*



CONCLUSIÓN

El presente estudio que determino la actividad antimicrobiana de exudados de *Euphorbia tirucallia*, *Castilla elastica Sesse* y *Rauwolfia tetraphylla L*, por el metodos Mistcher y potencia antibiotica (difusion en agar), concluye que las especies no muestran actividad en las concentraciones ensayadas de 1mg/ml .De igual manera los métodos ensayados muestran ser eficaces para valorar cualitativamente (metodo Mistcher) y cuantitativamente (difusion en placa) con la salvedad de ventajas y beneficios del método de Potencia Antimicrobiana (susceptibilidad por el medio de difusión en placa), puesto que este nos da resultados que se pueden plasmar o representar estadísticamente, además que la muestra y las cepas tienen un mayor contacto en el ensayo, lo que nos beneficia en la obtención e interpretación de los resultados, mientras que el método de Mistcher solo evidencia la presencia o ausencia de dicha actividad.



RECOMENDACIONES:

1. Procurar realizar el pesado y preparación del agar con precisión, así como demás reactivos a utilizar a fin de evitar alteraciones de pH en los medios y soluciones y garantizar la viabilidad de las cepas de ensayo.
2. Precisión y cuidado al momento de colocar los cilindros sobre la capa de agar a fin de evitar alteraciones en la difusión de su contenido.
3. Precisión y cuidado en el volumen de llenado de los cilindros para evitar posteriores inconvenientes en la medición de los halos.
4. A la facultad, para otros estudios de monografías a realizar darle un mantenimiento preventivo y debida calibración a los equipos realizando un programa de mantenimiento preventivo de al menos una vez al año.
5. Establecer un laboratorio de control de calidad enfocado directamente en el área de productos naturales como centro de referencia a nivel nacional



BIBLIOGRAFÍA:

1. Sánchez, Y. ; Pino, O. ; Correa, T.; Naranjo, E.; Iglesia, A. (2009), Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum kunth* (caisimón de anís), Revista de protección vegetal. V. 24. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100006&script=sci_arttext
2. Cayo, C., Ecurra, C., y Robles, G. (2012). Eficacia antimicótica del aloe vera y la sangre de grado en comparación al Gynocanesten. Ciencia y Desarrollo, [en línea] 15, (2), 17-29. [Consulta 10 Enero 2015]. ISSN 1994-7224. Recuperado de <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/viewFile/315/232>
3. Faita, M., Garroteb, G., Clapésc, P., y Morcelled, S. (2012). Producción de un agente antimicrobiano con potencial actividad tensioactiva mediante el empleo de tecnologías amigables con el medio ambiente. AUGMDOMUS, Revista Electrónica del Comité de Medio Ambiente, [en línea] 4, 49-61. [Consulta 9 de Enero 2015]. ISSN 1852-2181. Recuperado de <http://revistas.unlp.edu.ar/domus/article/view/533/540>
4. Farmacorresistencia, microorganismos y antimicrobianos,(2014) organización mundial de la salud, http://www.who.int/drugresistance/microbes_and_antimicrobials/es/
5. Arbusto de goma, Árbol dedo, Árbol de los dedos, Arbusto de leche, Palitroque, Abá, InfoJardin, <http://fichas.infojardin.com/crasas/euphorbia-tirucalli-arbustos-goma-arbol-dedo-dedos-leche.htm>
6. Especies forestales de uso tradicional del Estado de Veracruz, Zona Centro-Xalapa, <http://www.verarboles.com/Hule/hule.html>



7. Amjad Ali M. Iqbal, F. A. (2013). Ethno-Phyto-Pharmacological Overview on *Rauwolfia tetraphylla* L. International Journal of Pharmaceutical and Phtofarmacological.
8. Joven club de computación, (2014), EcuRed conocimiento con todos y para todos y para todos. Recuperado de: <http://www.ecured.cu/index.php/L%C3%A1tex>
9. Tapia Contero, J.A (2012), Determinacion de la Actividad Antimicrobiana de los extractos etanolicos y subextractos cloroformico y etéreo de *Senna multijuga* , *Tagetes zipaquirensis* y *Coursetia dubia*, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
10. Avilés González, D.L.; Delgado Espinales, K.R. ; Gómez Valenzuela, A.G ; (2010), Correlación de suspensiones estandarizadas de microorganismos por métodos turbidimetricos vs escala de Macfarland. UNAN- León, Nicaragua.