



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS

**“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO
LIOFILIZADO DE LAS HOJAS DE *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre)
SOBRE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia
coli* 25922”**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: RAMOS QUISPE, Ruth.

ASESOR: Q.F. BARRETO YAYA, Danilo Arturo.

LIMA – PERÚ

2016

Dedicatoria

A Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí.

A mi madre Sofía Quispe y hermanas Otilia y Nancy Quispe, por su apoyo.

Agradecimientos

A Dios por darme la fortaleza para salir adelante.

A mi mamá y mis hermanas por brindarme los recursos necesarios.

A mi asesor por su apoyo y compañeras de estudio.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre microorganismos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

El estudio comienza con la obtención de las hojas de nabo silvestre las que fueron recolectadas en el distrito de Chiguata Departamento de Arequipa, la cual fue desecada y pulverizada para obtener el extracto acuoso y posteriormente ser sometido a un proceso de liofilización. Para determinar su efecto antibacteriano se hizo mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido con el extracto acuoso liofilizado a concentraciones de 100 mg/ml, 50 mg/ml y 25 mg/ml. Los cuales se colocaron sobre colonias en crecimiento de bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC.

El extracto acuoso liofilizado de (Nabo silvestre) presento actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC; donde la más alta actividad antibacteriana se obtuvo sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 100mg/ml, el cual produjo un halo de inhibición de 30 mm. En el de 50 mg/ml el halo fue de 27 mm y en el de 25 mg/ml tuvo un halo de 24 mm. La actividad antibacteriana sobre la *Escherichia coli* a la concentración de 100 mg/ml fue de 14 mm, a la concentración de 50 mg/ml y para 25 mg/ml fue de 10 mm y 8 mm. Todos los valores se analizaron por DS, ANOVA y Tukey con un nivel de confianza de 95% ($P \leq 0.05$) mostrando diferencias en las medidas de cada concentración.

Palabras claves: Efecto antibacteriano, extracto acuoso, sensibilidad.

ABSTRACT

This research aims to determine the antibacterial effect of the extract from the leaves of *Brassica rapa* L. (Wild turnip) on microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The study begins with obtaining wild turnip leaves that were collected in the district of Chiguata Department of Arequipa, which was dried and pulverized to obtain the aqueous extract and then be subjected to a lyophilization process. To determine its antibacterial effect it was made by diffusion of active substances in a solid medium with lyophilized aqueous extract at concentrations of 100 mg / ml, 50 mg / ml and 25 mg / ml. Which they were placed on growing bacterial colonies of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* ATCC.

The dried aqueous extract (wild turnip) presented antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* ATCC; where the highest antibacterial activity was obtained on the growth of *Staphylococcus aureus* at a concentration of 100mg / ml, which produced an inhibition of 30 mm. In the 50 mg / ml halo was 27 mm and the 25 mg / ml had a 24 mm halo. The antibacterial activity on *Escherichia coli* at the concentration of 100 mg / ml was 14 mm, the concentration of 50 mg / ml and 25 mg / ml was 10 mm and 8 mm. All values are analyzed by DS, ANOVA and Tukey with a confidence level of 95% ($P \leq 0.05$) showing differences in the measurements of each concentration.

Keywords: antibacterial effect, aqueous extract, sensitivity

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE GRAFICOS	x
INTRODUCCIÓN	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1 Descripción de la realidad problemática	13
1.2 Formulación del Problema:	14
1.2.1 Problema General	14
1.2.2 Problemas Específicos	14
1.3 Objetivos de la Investigación:	14
1.3.1 Objetivo General.....	14
1.3.2 Objetivos Específicos	14
1.4 Hipótesis de la Investigación:	15
1.4.1 Hipótesis General	15
1.4.2 Hipótesis Secundarias.....	15
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación	15
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	16
2.1 Antecedentes de la Investigación:	16
2.1.1. Antecedentes Nacionales.....	16
2.1.2. Antecedentes Internacionales	16
2.2 Bases teóricas	18
2.2.1 GENERALIDADES DE <i>Brassica rapa</i> L. (Nabo silvestre).....	18
2.2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	19
2.2.1.2 Descripción Morfológica	21
2.2.1.3 Eco geografía	21
2.2.2 Método de Extracción.....	23
2.2.2.1 Extracción por Decocción o Cocimiento.....	24

2.2.2.2 Liofilización.....	24
2.2.3 Identificación cromatografía.....	24
2.2.3.1 Cromatografía de Capa Fina	24
2.2.4 Bacterias.....	27
2.2.4.1 Bacterias Gram positivas	27
2.2.4.2 Bacterias Gram Negativas	36
2.2.5 Método de difusión en agar	42
2.3 Definición de términos Básicos:.....	42
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	44
3.1 Tipo de Investigación.....	44
3.2 Nivel de Investigación.....	44
3.3 Método de Investigación	44
3.4 Diseño de Investigación.....	45
3.5 Población y Muestreo de la Investigación.....	45
3.5.1 Población.....	45
3.5.2 Muestra	45
3.6 Variables e Indicadores	46
3.6.1 Variables.....	46
3.6.1.1 Variable Independiente (Y).....	46
3.6.1.2 Variable Dependiente (X)	47
3.6.2 Indicadores	48
3.6.3.- Variables Implicada	48
3.7 Procedimiento, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos:	
.....	50
3.7.1 Procedimientos.....	50
3.7.2 Técnicas	50
3.7.3 Instrumentos.....	60
3.7.3.1 Materiales de vidrio	60
3.7.3.2 Equipos de Laboratorio	60
3.7.3.3 Reactivos	61
3.7.3.4 Medios de cultivos.....	61
3.7.3.5 Material biológico	61

3.7.3.6 Otros	61
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN, ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	62
4.1 Resultados.....	62
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS.....	81

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1 : Clasificación Taxonómica de Brassica rapa l. (Nabo silvestre).....	19
TABLA N° 2 : Variable independiente	48
TABLA N° 3 : Variable Dependiente	49
TABLA N° 4 : Tabla de Variable Implicada	50
TABLA N° 5 : Porcentaje de inhibición.....	60
TABLA N° 6 : Porcentaje de inhibición para Staphylococcus aureus.....	62
TABLA N° 7 : Porcentaje de inhibición para Escherichia coli.....	63
TABLA N° 8 : Resultados de determinación de la presencia de metabolitos secundarios según la metodología thin layer chromatography (TLC).....	64
TABLA N° 9 : Diámetros de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de Brassica rapa l. (Nabo silvestre) sobre Stahylococcus aureus.....	65
TABLA N° 10 : Diámetros de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de Brassica rapa l. (Nabo silvestre) sobre Escherichia coli.....	66

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico N° 1: Brassica rapa l. (Nabo silvestre).....	20
Gráfico N° 2: Brassica rapa l. (Nabo silvestre).....	20
Gráfico N° 3: Estructura general de un glucosinolato.	23
Gráfico N° 4: Colonias de Staphylococcus aureus en agar Muller Hinton	29
Gráfico N° 5: Colonias de E. coli en agar EMB.....	37
Gráfico N° 6: MATRIZ DE CONSISTENCIA	81
Gráfico N° 7 : Prueba de ANOVA del Staphylococcus aureus.....	82
Gráfico N° 8: Prueba de Turkey del efecto antibacteriano del extracto acuoso Liofilizado de Brassica rapa l. (Nabo silvestre) a diferentes concentraciones sobre Staphylococcus aureus.	83
Gráfico N° 9: Prueba de ANOVA de Escherichia coli	84
Gráfico N° 10 : Prueba de Turkey del efecto antibacteriano del extracto acuoso Liofilizado de Brassica rapa l. (Nabo silvestre) a diferentes concentraciones sobre Escherichia coli.	85
Gráfico N° 11: Imágenes de planta en estudio Brassica rapa l. (Nabo silvestre), recolectada en el Distrito de Chiguata - Arequipa.....	86
Gráfico N° 12: Proceso de desengrasado de la planta	86
Gráfico N° 13: Se observa las corridas de cromatografía de capa fina. .	87
Gráfico N° 14: Liofilización de la muestra.	87
Gráfico N° 15: Autoclave utilizada para esterilización del material.	88
Gráfico N° 16: Placas sembradas con bacterias y colocadas con sus respectivos discos.....	88
Gráfico N° 17: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado Brassica rapa l. sobre Staphylococcus aureus.	89
Gráfico N° 18: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado Brassica rapa l. sobre Staphylococcus aureus.	89
Gráfico N° 19: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado Brassica rapa l. sobre Staphylococcus aureus.	90
Gráfico N° 20: Lectura de inhibición de los halos a las diferentes concentraciones con el control positivo y negativo	90
Gráfico N° 21: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado Brassica rapa l. sobre Escherichia coli.	91
Gráfico N° 22: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado Brassica rapa l. sobre Escherichia coli.	91
Gráfico N° 23: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado Brassica rapa l. sobre Escherichia coli.	92

INTRODUCCIÓN

En la práctica diaria encontramos que las enfermedades causadas por bacterias, son patologías comunes entre los seres humanos siendo consideradas como un problema de salud pública en todas partes del mundo, debido a que afectan la calidad de vida de los que la padecen. Cabe resaltar que las bacterias son los microorganismos unicelulares más abundantes del planeta ya que son capaces de resistir a condiciones extremas y poseen formas variadas.

Tanto el *Staphyococcus aureus* como la *Escherichia coli* son microorganismos patógenos que pueden llegar a colonizar heridas, causando en ellas infecciones y evitando así el desarrollo del proceso de cicatrización de estas enfermedades, estos microorganismos patógenos se encuentran en el organismo humano como microbiota normal, pero en ocasiones en que las defensas caen puede causar enfermedad.

El uso de plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas se puede obtener innumerables sustancias químicas con propiedades específicas que pueden ayudarnos a prevenir o tratar enfermedades.

En el Perú, se posee una rica flora como parte de nuestra biodiversidad, con plantas medicinales o que potencialmente lo son; y una tradición popular en su empleo para dar solución sobre todo a problemas primarios de salud.

Y existen muchas de nuestras especies de plantas a la que la medicina tradicional atribuye eficaces propiedades terapéuticas, como es el caso de la *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre). El nabo silvestre es una planta oriunda de Europa y Asia, en el Perú esta planta tiene amplia utilización empírica, por sus propiedades curativas, en infecciones bronquiales, como antibacteriano.

Por tales consideraciones, el *Brassica rapa* (nabo silvestre) se lo reconoce en el medio popular como una planta que posee las cualidades como la de curar de heridas infectadas, que hayan sido causadas por lesiones de cortaduras, extracción de uñas (donde por causa de mala limpieza se infecta), etc. Donde los invasores más comunes y causantes de que se produzca la infección son el *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Por todo lo expuesto, el objetivo principal de la presente investigación es evaluar la existencia de propiedades antibacterianas del extracto acuoso liofilizado del nabo silvestre (*Brassica rapa L.*) y proponer nuevas alternativas preventivas en base a las propiedades fitoterapéuticas del extracto acuoso liofilizado de nabo silvestre (*Brassica rapa L.*) a diferentes concentraciones sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

En la actualidad podemos observar con frecuencia que los antibióticos o antibacterianos ya no son tan eficaces contra bacterias patógenas, debido a la resistencia que ellas crean para los medicamentos, por lo que podemos observar que el principal problema es la resistencia bacteriana que presentan ciertos microorganismos como es el caso del *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y entre otras bacterias patógenas, que son principales causantes de infecciones de heridas, etc., los cuales terminan por infectar y a la vez ofrecen resistencia.

Debido a los antecedentes que se van observando en los procesos de tratamiento, podemos observar que se, está tomando más en cuenta a la medicina a base de plantas medicinales, que es más conocida como medicina alternativa la cual basa sus tratamientos en métodos naturales, a partir de infusiones, decoctos, aceites esenciales, etc.

En estos tiempos muchos de los tratamientos son dados en complemento con medicina a base tratamiento natural. La cual hace más efectivo el proceso de curación del paciente.

En tratamientos referidos a infecciones, causadas por bacterias oportunistas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), que se van presentando nuevas alternativas de tratamientos a base de remedios caseros que van ayudando a la pronta recuperación del paciente.

Por tales motivos es necesario pensar en alternativas que pueden llegar a ser efectivas para combatir a ciertas bacterias patógenas resistentes.

1.2 Formulación del Problema:

1.2.1 Problema General

- ¿Tendrá efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre el crecimiento de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia. Coli* 25922?

1.2.2 Problemas Específicos

- ¿Tendrá efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre el crecimiento de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923?
- ¿Tendrá efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre el crecimiento de las cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922?

1.3 Objetivos de la Investigación:

1.3.1 Objetivo General

- Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre el crecimiento de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la medida del halo de inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923.
- Determinar la medida del halo de inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC *Escherichia coli* 25922.

1.4 Hipótesis de la Investigación:

1.4.1 Hipótesis General

- El extracto acuoso liofilizado obtenido de las hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) presenta significativo efecto antibacteriano in vitro sobre el crecimiento de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.

1.4.2 Hipótesis Secundarias

- El extracto acuoso liofilizado de hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) presenta un halo de inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923.
- El extracto acuoso liofilizado de hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) presenta un halo de inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC *Escherichia coli*.

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación

El Perú es un país que posee una gran variedad de especies de plantas medicinales y los habitantes sobre todo en el área rural, aprovechan los recursos de la flora, a todos los que retribuyen propiedades medicinales.

El estudio sobre este tipo de plantas como es caso del *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre), es de interés ya que presentaría una alternativa, para combatir infecciones, que puedan ayudar a personas de bajos recursos.

Y por otro lado cabe resaltar que en estos tiempos el uso indiscriminado de antibióticos ha ido dando lugar a la aparición de bacterias más resistentes, por estos motivos el tratamiento con plantas (Nabo silvestre) en estos momentos resulta de mucha ayuda ya que se presenta como una alternativa.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación:

2.1.1. Antecedentes Nacionales

Según, autor: Martínez Rodríguez, A. (2010), en su trabajo, “AISLAMIENTO DE PROTEINAS (GLOBULINAS, ALBUMINAS Y GLUTELINAS), DE SEMILLA DE BRASSICA RAPA L. “NABO SILVESTRE” CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFUNGICAS”. . Donde se concluyeron que las fracciones proteicas obtenidas (globulinas, albuminas y glutelinas). Mostraron actividad antibacteriana y acción antifúngica; lo cual fue revelado por su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*) y hongos dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Microsporun canis*) utilizados en el presente trabajo.¹¹

Según, el autor: Ríos, N. Dávila, R. “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE *Geranium ayavacense* SOBRE *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET – ESSALU - 2013”. El objetivo principal del presente trabajo es evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso liofilizado del *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, La actividad antibacteriana se determinó mediante la prueba de sensibilidad, utilizando la técnica de disco en medio sólido.¹³

2.1.2. Antecedentes Internacionales

Según, el autor: Milin K. Agrawal, Deepa Rathore. (2013). En su trabajo: “EFICACIA ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRATOS DE HOJA, TALLO Y RAIZ DE BRASSICA

CAMPESTRIS”. El estudio comprobó que los extractos elaborados a base de etanol de todas las partes de la planta demostró ser altamente eficaz, en comparación con los extractos de éter de petróleo, acetato de metilo y metanol que tuvieron una actividad relativamente buena, esto en comparación con los extractos de benceno y cloroformo ya que mostraron menos actividad antibacteriana contra los microorganismos ensayados (*S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *S. epidermidis*).¹⁹

Según, el autor: Amira Mohammed Beltagy. (2014). En su trabajo: “INVESTIGACION DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BRASSICA RAPA L.”. Se evaluó actividad antimicrobiana (Gram positivos Gram negativos y hongos) y actividad antioxidante, donde se encontraron que el extracto acuoso de *Brassica rapa l.* mostro tener mayor actividad antioxidante un poco menos que la vitamina C y un efecto antibacteriano. Dando como resultado una actividad antibacteriana donde se ve que hay mayor susceptibilidad las bacterias Gram positivas que las Gram negativas.²⁰

Según, el autor: Thaira Z., Riffat F., Muhammad A., Khalid M. (2013), en su trabajo, IN – VITRO EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTO DE METANOL DE *BRASSICA OLERACEA* FRENTE A BACTERIAS SELECCIONADAS. Demostró que el extracto de metanol de la *Brassica oleracea* extrae mucho mejor metabolitos secundarios tales como el glucosinolato los cuales pueden ejercer mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y un menor efecto sobre *Staphylococcus aureus*.²³

Según, el autor: Velasco, P., Fransisco, M., Moreno, D. Ferreres, F. Garcia-viguerab, C. y Cartea, M., en su trabajo,

(2011). “HUELLAS DIGITALES FITOQUIMICO DE VERDURAS BRASSICA OLERACEA Y BRASSICA NAPUS POR IDENTIFICACION SIMULTANEA DE GLUCOSINOLATOS Y FENOLICOS promueven que la col rizada, col y hojas, demuestran que son una buena fuente de glucosinolatos y antioxidantes fenólicos. En el estudio realizado se ha tomado en cuenta la presencia de sus metabolitos secundarios como fuente de su acción antibacteriana. ¹²

2.2 Bases teóricas

2.2.1 GENERALIDADES DE *Brassica rapa* L. (Nabo silvestre)

La *Brassica rapa* L. subsp. *Campestris* (L.) Clapham “mostaza”. “mostacilla”. “pacchoy”. Originaria de Europa y Asia, pero adventicia en América. Hierva con flores amarillas. Común en lugares pedregosos y terrenos de cultivo donde crece entre los 40 – 3270 m.s.n.m. en los departamentos de la Libertad y Cajamarca. Las semillas se usan como alimento de los “canarios”. Tiene una variedad originaria de la China, que se denomina: Chinencis oleífera “colza”, de cuyas semillas se extrae un aceite que actualmente se está usando como comestible.⁶

Brassica rapa L. pertenece a la familia Brassicaceae, también llamadas crucíferas, son plantas angiospermas, desde anuales hasta perennes, raramente subarbustos. Existen unas 3000 especies, repartidas por todo el mundo, aunque son más abundantes en las regiones templadas y frías. El género *Brassica* más destacable por incluir muchas e importantes especies cultivadas de agricultura y horticultura”. “El género es nativo del Oeste de Europa, del clima Mediterráneo y regiones templadas de Asia. Además de las

especies cultivadas, que se producen mundialmente, muchas de las especies silvestres son malezas, especialmente en Norteamérica, Sudamérica y Australia. ¹¹

2.1.1.1 Clasificación Taxonómica

Brassica rapa L. (Nabo silvestre) presenta la siguiente clasificación taxonómica.

SINONIMIA CIENTÍFICA: *Bassica campestris* .L.

SINONIMIA VULGAR: “mostaza”, “jitcka”, “labanus”, “rapush”, “yuyo”, “mostacilla”, “pacchoy”

TABLA N° 1 : Clasificación Taxonómica de *Brassica rapa* L. (Nabo silvestre)

DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Dilleniidae
ORDEN	Capparales
FAMILIA	Brassicaceae
GÉNERO	: Brassica
ESPECIE	<i>Brassica rapa subsp campestris</i> (L.) Clapham

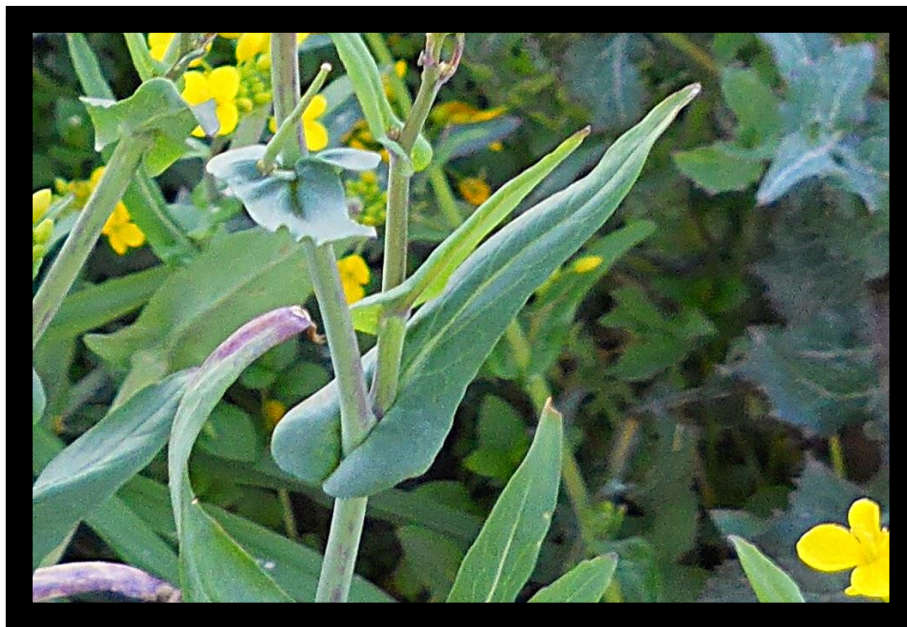
Fuente: *Herbarium arequipense*

Gráfico N° 1: *Brassica rapa* L. (Nabo silvestre)



Fuente: http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_brrar.pdf/

Gráfico N° 2: *Brassica rapa* L. (Nabo silvestre)



Fuente: <http://plantaslujan-a.blogspot.pe/2015/01/brassica-rapa.html>

2.2.1.2 Descripción Morfológica

Hierba anual erecta de hasta 1.20 m de alto. Tallo ramificados, cilíndricos, glabros o esparcidamente pilosos. Hojas inferiores cortamente pecioladas, lirado-pinnatifidas; intermedias pinnatilobas, con lóbulo terminal irregularmente dentado, muy grande y lóbulos laterales pequeños, triangulares; y las superiores abrazadoras y cordadas en la base, lanceoladas, enteras. Flores pedunculadas, dispuestas en racimos terminales, de 7 a 12 mm. Sépalos verdó amarillentos. Pétalos amarillos obovados, anchamente unguiculados. Estambres 6, tetradínamos. Gineceo de ovario supero, coronado por un estigma ancho. Silicua, con rostro delgado. Semillas en una sola hilera, globosas, castaño-rojizas.⁷

2.1.1.3 Eco geografía

a) Características Edáficas:

- ✓ Suelos: Arcilloso, areno-arcilloso, limo-arcilloso, franco-areno-arcilloso, franco-limo-arcilloso.
- ✓ Hábitat: Especie muy difundida como malezas de los cultivos, en los rastrojos, escombros, bordes de caminos, pastizales, campos abiertos, laderas, etc.

b) Características Climáticas:

- ✓ Clima: Cálido, templado y frío.
- ✓ Temperatura (°C): 8-26
- ✓ Precipitación (mm): 500-3000.
- ✓ Humedad Atmosférica (%): 60-90.

c) Características Fitogeográficas:

- ✓ Distribución altitudinal: 10-4500 m.n.m.
- ✓ Distribución latitudinal: 5°- 13° L.S.

- ✓ Distribución por departamentos: Cajamarca, La Libertad, Ancash y Lima.

d) Características fenológicas:

- ✓ Época de Floración: A lo largo de todo el año
- ✓ Época de fructificación: A lo largo de todo el año
- ✓ Formas de propagación: Semillas

e) Información Etno medicinal:

- ✓ Parte usada de la planta: Tallo, hojas y semillas.

f) Forma de preparación:

- ✓ Cocimiento.⁷

g) Usos Etno Medicinales:

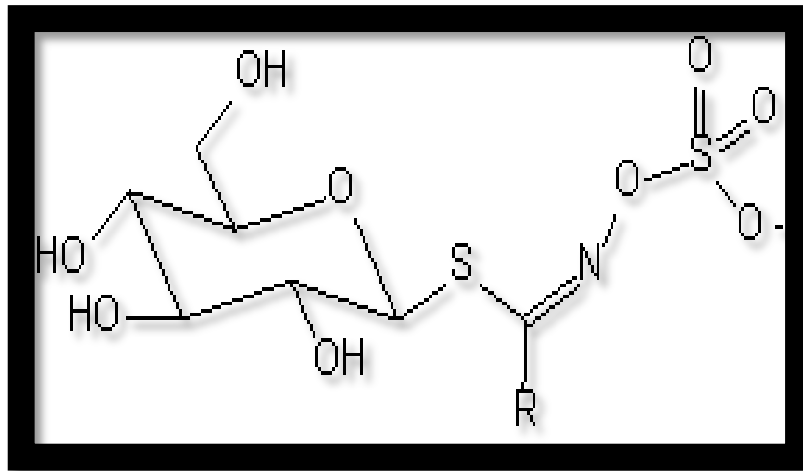
Las semillas contienen un glucósido, la gluconapina, ácido erucico, diversos aceites esenciales y una cantidad importante de aceite graso (40%). De las semillas, así mismo se extrae un aceite que actualmente se está usando como comestible.⁷

h) Composición Química:

Además de la presencia de abundante mucilago y de una importante cantidad de lípidos. El principio activo es el sinigrosido o alil glucosinolato.⁸

Los glucosinolatos se encuentran en plantas dicotiledóneas, y son especialmente abundantes en la familia de las Brassicaceae. Constituyen un mecanismo de defensa para la planta.²³

Gráfico N° 3: Estructura general de un glucosinolato.



Fuente: www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c6.htm

2.2.2 Método de Extracción

La extracción es una de las operaciones farmacéuticas por medio del cual se obtienen los principios activos de una manera más concentrada; los componentes solubles contenidos en un material vegetal debidamente preparado se disuelven en uno o más solventes o líquidos extractores formando así un extracto crudo o total el cual va a tener la mayor cantidad de principio activos, pigmentos vegetales y metabolitos primarios.³

Dentro de los procedimientos de extracción tenemos: ³

- ✓ Infusión
- ✓ Decocción o cocimiento
- ✓ Maceración
- ✓ Digestión
- ✓ Lixiviación o Percolación
- ✓ Soxhlet

2.2.2.1 Extracción por Decocción o Cocimiento

Se pone en contacto la droga con el disolvente (agua caliente) y se mantiene dicha ebullición, el tiempo de decocción dependen de las características de la droga, es menor para drogas vegetales blandas (hojas, flores, etc.) y mayor para drogas vegetales duras (corteza, semillas, etc.).⁴

2.2.2.2 Liofilización

Es el método que reduce más la cantidad de agua de la droga. Consiste en congelar rápidamente la droga a temperaturas muy bajas entre -40 °C y -80 °C, luego sublimar el agua aplicando el vacío y calentando. El agua pasa directamente del sólido (hielo) a vapor y la droga queda con una cantidad de agua muy baja y adquiere una consistencia esponjosa. Este método se aplica principalmente en el caso de líquidos extractivos acuosos.¹⁴

2.2.3 Identificación cromatografía

La cromatografía es un proceso fisicoquímico que va a permitir la separación de los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por absorción de estos sobre una superficie estacionaria móvil.⁴

2.2.3.1 Cromatografía de Capa Fina

La cromatografía en capa fina o más comúnmente llamado TLC (thin layer chromatography), una técnica cromatografía utilizada, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla.¹⁵

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente un

disolvente) y a una fase estacionaria (llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, Lo cual permite su separación e identificación. Lográndose eluir primero a los componentes que tiene mayor afinidad por la fase móvil y posteriormente eluirán los componentes con mayor afinidad por la fase estacionaria. ¹⁵

- ❖ **Taninos:** Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa y gelatina). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente. Tales propiedades condicionan su uso. ²¹
- ❖ **Sesquiterpenlactonas:** Son isoprenoides que poseen C₁₅ y se encuentran en aceites esenciales. Son sustancias amargas que se encuentran en todas partes de la planta, siendo las concentraciones mayores en las hojas. Presentan acción citotóxica, antitumoral, analgésica, inhibidores del crecimiento de bacterias, entre otras. ²¹
- ❖ **Flavonoides:** Los flavonoides y los compuestos relacionados (antocianos, catequinas y leuco antocianidinas) proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. Se encuentran principalmente en hojas, flores, frutos.⁴ Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicosidos aun de las

diferentes clases siendo este último el más común, destacaremos así mismo la actividad antimicrobiana.²¹

- ❖ **Saponinas terpenoidales:** Las saponinas son heterósidos (azúcar, aglicón) que se caracterizan por su capacidad de producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua. Son por lo tanto tensioactivos naturales.⁴
- ❖ **Monoterpenos:** Constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales.²¹ Hay dos tipos: El primero son los regulares que se encuentran en los aceites esenciales y en las oleorresinas y el segundo son los irregulares, aquí se encuentran en los iridoides, secoiridoides y piretrinas. Presentan también diversos grupos funcionales y pueden encontrarse bajo la forma de agliconas y glicosidos.²¹
- ❖ **Diterpenos:** Estos isoprenoides poseen C₂₀. Que puede presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos, siendo estos últimos conocidos desde tiempo atrás como ácidos resínicos y obtenidos como componentes de las oleorresinas exudadas por cortes en los troncos de pinos y abetos.²¹
- ❖ **Alcaloides:** Son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Tiene una estructura generalmente compleja y ejercen las acciones fisiológicas diversas

a dosis muy bajas. Son muy tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos.⁴

Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; en estado libre o como glicosidos, o formando sales ácidos orgánicos.²¹

2.2.4 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 a 5 um, por lo general) y diversa formas incluyendo esferas, barras y hélices.

Las bacterias son procariotas, generalmente poseen una pared celular compuestas de péptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

Existen 4 morfologías para las bacterias, células esféricas o cocos, en forma de bastón, espiraladas y en forma de comas llamadas vibriones.

Además de su tamaño, forma y disposición celular otra o criterio de diferenciación de bacterias se basa sobre sus características de tinción con la tinción de Gram con esta técnica de tinción la mayor parte de las bacterias pueden ser clasificadas como Gram positivas y Gram negativas.¹⁵

2.2.4.1 Bacterias Gram positivas

Se denominan Gram positivas aquellas bacterias que se tiñen por la tinción Gram.

Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular. La envoltura celular de las bacterias Gram positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior.¹⁵

La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico; la capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción Gram. A diferencia de las Gram negativas, estas bacterias no presentan una segunda membrana lipídica externa.¹⁵

✓ **Membrana citoplasmática:**

Es una fina estructura que rodea completamente a la célula; la estructura general es una capa lipídica, los fosfolípidos poseen tanto unidades altamente hidrofílicas (ácidos grasos) como unidades hidrofóbicas (glicerol).¹⁵

✓ **Capa gruesa de peptidoglicano:**

Está constituida por N-Acetil murámico y N-Acetil glucosamida unidos por compuestos peptídicos es el responsable de que la capa este muy polarizada y que la bacteria y tenga una gruesa superficie hidrofílica.¹⁵

✓ **Ácidos teicoicos y lipoteicoicos:**

Los ácidos teicoicos son polisacáridos ácidos que contienen glicerol fosfato o residuos de ribitol, que estabilizan la pared celular. Los ácidos lipoteicoicos son aquellos ácidos teicoicos que están unidos a los lípidos de la membrana.¹⁵

A. *Staphylococcus aureus*

a) Morfología

Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos cuyo diámetro varía de 0.8 a 1.0 μm . En cultivos sólidos, se desarrollan formando racimos, sin embargo en medios líquidos forman a menudo cadenas cortas.¹⁵

Las colonias de *Staphylococcus aureus* son circulares de 2 a 8 mm de diámetro, convexas, desde translúcidas a opacas grises blanquecinas, amarillas.¹⁵

Gráfico N° 4: Colonias de *Staphylococcus aureus* en agar Muller Hinton



Fuente:

<https://www.google.com.pe/search?q=pdf+imagenes+de+estafilococos+aureus&espv=2&biw=1024&bi>

b) Enzimas: *Staphylococcus aureus* producen varias enzimas que pueden contribuir a su virulencia.

- ✓ **Catalasa:** La producción de catalasa por parte de estos microorganismos puede actuar para inactivar el peróxido de hidrogeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de las células fagocitas después de la ingestión de estos microorganismos.
- ✓ **Coagulasa:** Tanto la coagulasa libre como la unida (también denominada factor de agregación) pueden recubrir las células bacterianas con fibrina y tornarlas resistente a la opzomización y la fagocitosis.
- ✓ **Fibrinolisin (Estafiloquinasa):** Estas pueden degradar coágulos de fibrina y permitir la diseminación de la infección a los tejidos contiguos.
- ✓ **Hialuronidasa:** Hidroliza la matriz intercelular mucopolizacaridos en los tejidos y por lo tanto puede actuar diseminando los microorganismos a zonas adyacentes.
- ✓ **Lipasa:** Las cuales son activadas sobre una variedad de sustratos incluyendo plasma, grasas y aceites que se acumulan en la superficie del cuerpo, lo cual explica la intensa colonización del *Staphylococcus* por las áreas sebáceas de mayor actividad.
- ✓ **Nucleasa:** La elaboración de una nucleasa resistente al calor parece estar asociada con cepas de *Staphylococcus aureus*. Se halla en la célula o en la superficie de ella.¹⁵

c) Toxinas:

Toxinas citolíticas

- ✓ Alfa hemolisina: Es una proteína que puede producir lisis de los eritrocitos y lesionar las plaquetas.
- ✓ Beta hemolisina: Degrada la hemolisina y es tóxica para muchas clases de células, incluso los eritrocitos
- ✓ Leucosidinas: Toxina que puede matar a los leucocitos expuestos de muchos animales.¹⁵

Enterotoxinas

Hay por lo menos seis toxinas solubles designadas de la A-F producidas por el *Staphylococcus aureus*, estas son termoestables resistentes a la ebullición por 30 minutos y a la acción de las enzimas intestinales; son causas importantes del envenenamiento con alimentos.

¹⁵

Toxina exfoliativa o epidermolítica

Esta toxina está constituida por lo menos por dos proteínas que producen la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada.¹⁵

d) Epidemiología

Los *Staphylococcus aureus* explican su patogenicidad, que puede asumir varias formas. Crecen relativamente bien en condiciones de presión osmótica elevada y húmeda reducida, lo que explica en parte que puedan desarrollarse y sobrevivir en secreciones nasales (varios de nosotros somos portadores nasales de esta bacteria) y en la piel. Esto también explica porque *S. aureus* puede crecer en ciertos alimentos con presión osmótica elevada (como el jamón y otras carnes

curadas) o en alimentos poco húmedos que tienden a inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Es probable que pigmento amarillo le confiera cierta protección ante los efectos antimicrobianos de la luz solar.²

S. aureus produce varias toxinas que contribuyen a su patogenicidad porque aumentan su capacidad para invadir el cuerpo o dañar los tejidos. La infección de las heridas quirúrgicas por *S. aureus* es un problema frecuente en hospitales.²

S. aureus produce la toxina causante del síndrome del shock una infección grave caracterizada por fiebres elevadas vómitos y en ocasiones causar la muerte. *S. aureus* una enterotoxina que al ser ingerida genera náuseas y vómitos y es una de las causa más comunes de intoxicación.²

e) Patogenicidad

- ✓ Síndrome de la piel escaldada por estafilococos: Es un síndrome caracterizado por la descamación diseminada del epitelio de los recién nacidos y lactantes.⁹
- ✓ Intoxicación alimentaria: Proviene de la inoculación de una cepa toxígena en los alimentos por manipuladores colonizados. La toxina queda después incluida en productos que favorece su proliferación, como natillas, ensaladas de papa o de carnes preparadas. Aunque se destruya la bacteria por calentamiento, la toxina termoestable se conserva. Enfermedad comienza en forma rápida y sus manifestaciones surgen en el plazo de 1 a 6 horas después de la ingestión del alimento contaminado. El cuadro se caracteriza por náuseas y

vómitos, aunque también pueden surgir diarrea, hipotensión y deshidratación.⁹

- ✓ Absceso cutáneo: Es una acumulación de pus que puede darse en piel y mucosas. También puede darse en diferentes órganos (pulmón, hígado, riñón y cerebro) mediante la diseminación bacteriemia.¹⁵
- ✓ Impétigo: infección cutánea localizada por la presencia de vesículas purulentas sobre la base eritematosa. Se da en niños, en zonas expuestas, en especial la cara.¹⁵
- ✓ Folliculitis: es una infección restringida a los orificios de los folículos pilosos y se acompaña por la presencia de lesiones dolorosas rojizas y pequeñas sin síntomas sistémicos.¹⁵
- ✓ Furunculosis y ántrax: son piodermas profundos que se presentan como lesiones elevadas, firmes dolorosas y son centros necróticos que contienen material purulento.¹⁵
- ✓ Endocarditis: Es la principal complicación de la bacteriemia. Aparición de acumulaciones de pus o supuración en tejidos de otras localizaciones.⁹
- ✓ Osteomielitis: infección y destrucción ósea, en especial en la metáfisis de los huesos largos de los niños y la columna vertebral en adultos mayores.¹⁵
- ✓ Meningitis: infección del sistema nervioso, se presenta en pacientes con antecedentes de traumatismos, cirugías inmunodeficiencias, neoplasias malignas e hidrocefalia.¹⁵
- ✓ Infecciones de vías respiratorias: infecciones graves en recién nacidos y lactantes, causando disnea, fiebre e insuficiencia respiratoria. En adultos en pacientes intubados que se atienden en unidades de cuidados intensivos; los pacientes generan volúmenes crecientes

de esputo purulento y terminan por mostrar un cuadro disneico con fiebre y nuevos infiltrados pulmonares.⁹

f) Diagnóstico: Las infecciones por *S. aureus* pueden diagnosticarse con facilidad por medio de la tinción de Gram y por el examen microscópico del contenido del absceso o del tejido infectado. El cultivo sistémico del material infectado suele generar resultados positivos, y los cultivos de sangre son a veces positivos incluso cuando la infección se localiza en zonas extravasculares. Para el diagnóstico rápido de la infección por el microorganismo mencionado se ha aplicado métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa que se utilizan cada vez más en los laboratorios de microbiología clínica.⁹

Hasta la fecha, los métodos serológicos no han sido útiles para el diagnóstico de las infecciones estafilocócicas. Sigue siendo un gran problema diagnóstico dilucidar si las personas con bacteriemia corroborada por *S. aureus* también tienen endocarditis infecciosa o algún foco metastásico infeccioso. De manera invariable, los hemocultivos positivos sugieren una infección endovascular del tipo de la endocarditis.⁹

g) Pruebas diagnósticas de Laboratorio

- ✓ Muestras: Frotis superficiales, pus, sangre, material aspirado de la tráquea, o líquido cefalorraquídeo, para cultivo, según la localización del proceso.¹⁰
- ✓ Frotis: En los frotis teñidos de pus o esputo se observan los estafilococos típicos que aparecen como cocos Gram positivos en forma de racimos con tinción Gram.¹⁰

- ✓ Cultivo: Las muestras sembradas a 37°C en placas de agar sangre producen colonias típicas en 18 horas, pero no pueden presentar hemólisis y producción de pigmento sino hasta varios días después y ambos procesos son óptimos a temperatura ambiente. El *S. aureus*, fermenta el manitol. El agar sal y manitol se emplean para detectar portadores nasales de *S. aureus*. El agar de sal manitol así como los medios de cultivo cromogénicos comercialmente disponibles se utilizan en el escrutinio de portadores nasales de *S. aureus* y en pacientes con fibrosis quística.¹⁰
- ✓ Prueba de la catalasa: Al entrar en contacto el H₂O₂ con la enzima catalasa va descomponer al mismo, ocasionando la aparición de burbujas de gas que indica que la reacción es positiva.¹⁵

Esta prueba es utilizada en la búsqueda de enzimas del complejo citocromo oxidasa. Se coloca una gota de solución de peróxido de Hidrogeno al 3% sobre un portaobjetos y una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano es colocado en la solución. La formación de burbujas (producción de oxígeno) es indicativo de una prueba positiva.¹⁰

- ✓ Prueba de la coagulasa en porta objeto: El fibrinógeno presente en el plasma al entrar en contacto con la enzima coagulasa del *S. aureus* provoca su aglutinación. Dando así coagulasa positiva.¹⁵
- ✓ Prueba de la Coagulasa en tubo: La enzima coagulasa que presenta la bacteria al entrar en contacto con el plasma va a activar los factores de coagulación produciendo así un coagulo visible en el medio. Dando coagulasa positiva.¹⁵

- ✓ Tinción Gram: Al observarse en el microscopio van a presentar una coloración violeta el cual nos indica que es positivo a la tinción Gram: teniendo una disposición de racimo.¹⁵
- ✓ Fermentación del manitol: El consumo de manitol por *Staphylococcus aureus* hace virar el color del indicador presente del medio a amarillo lo que se interpreta como manitol positivo.¹⁵

h) Tratamiento

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son causadas por cepas productoras de B- Lactamasas y por tanto resistentes a las penicilinas, el tratamiento de elección es la administración de una penicilina resistente a la penicilinas. Como medicamento de primera elección se utiliza Cloxacilina también puede utilizar Cefalosporinas, Quinolonas, Amoxicilina asociada a inhibidores de betalactamasa, Macrólidos y Clindamicina. Si el *Staphylococcus aureus* es resistente a la Meticilina el antibiótico de elección es la Vancomicina.¹⁰

Tratamiento oral de las infecciones de la piel y tejidos blandos, sensible a la Meticilina: Dicloxacilina (500mg/6 horas), Cefalexina (500mg/6 horas).¹⁰

2.2.4.2 Bacterias Gram Negativas

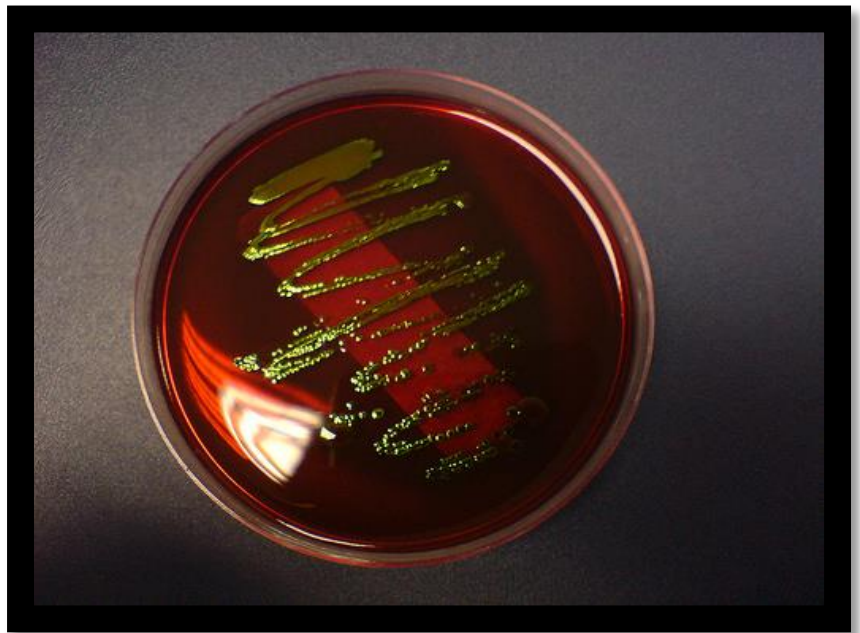
A. *Escherichia coli*

a) Morfología

Se presenta como un bacilo corto de extremos redondeados anaerobio facultativo, Gram negativo no forma espora; presenta movilidad flagelos peritricos, no delicados

capaz de tolerar la bilis. Crece a 44°C en medios de gran simplicidad por lo que son poco exigentes en necesidades nutritivas y realmente resistentes a los agentes externos; forma colonias redondas, convexas y lisas con bordes definidos.¹⁵

Gráfico N° 5: Colonias de *E. coli* en agar EMB



Fuente:

https://www.flickr.com/photos/last_sorrows/21106149

62

b) Patogenicidad

✓ *Escherichia coli* enteropatogenica (ECEP)

Escherichia coli enteropatogenica es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven países en vía de desarrollo. Interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida

como “adherencia/desnutrificación” o lesión.

15

✓ *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC)

Se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vía de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados.¹⁵

✓ *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECET)

Es móvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis.¹⁵

✓ *Escherichia coli* enterohemorrágica o verotoxigenica (ECEH)

Producen verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica. Luego síndrome hemolítico ureico (lo anterior más infecciones del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocito

penicatrombotica (lo de antes más infección del sistema central).¹⁵

✓ *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA)

La capacidad de las cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas.¹⁵

✓ *Escherichia coli* Adherencia difusa (ECAD)

Se adhiere a la totalidad de superficie de las células y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o mal nutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad ni en adulto.¹⁵

c) Pruebas diagnósticas de Laboratorio

- ✓ Muestra: Orina, secreción, heces.
- ✓ Tinción de Gram: Al observar al microscopio va a presentar una coloración roja o rosada la cual nos indica que es negativo a la tinción Gram, se van a observar bacilos cortos de color rojo o rosado.
- ✓ Sensibilidad en medios de cultivo.¹⁵

- ❖ Agar Mac Conkey: se van a presentar colonias pequeñas de un color rosado ya que la bacteria fermenta la lactosa y produce ácido haciendo que el indicador del medio vire a un color rosado.
- ❖ Agar Eosina Azul de Metileno: se observa colonias de color verdoso con brillo metálico debido a la fermentación de la lactosa.¹⁵
- ✓ Pruebas de diferenciación Bioquímica
- ❖ Triple azúcar hierro (TSI): Al haber el consumo de los tres azúcares presentes en este medio va a ocasionar el viraje del indicador rojo neutro a una coloración amarilla (pico y fondo) con o sin producción de CO₂.¹⁵
- ❖ Agar Lisina Hierro (LIA): *Escherichia coli* va a presentar una coloración morada del medio (k/k) por lo que indica la descarboxilación de la lisina
- ❖ Prueba de Indol: la formación de un anillo de color rojo grosella después de haber agregado el reactivo Kovacs nos dará una prueba de indol positiva para *Escherichia coli* la que quiere decir que dicha bacteria posee la enzima triptófano.¹⁵
- ❖ Rojo de Metilo- Voges Proskauer: a prueba de rojo de metilo es positiva ya que se desarrolla un color rojo estable esto indica que el microorganismo fermenta la glucosa por la vía de los ácidos mixtos.¹⁵

Mientras que la prueba de voges proskawer es negativa ya que se observa una coloración amarilla. Lo cual nos indica que no hay presencia de diacetilo.¹⁵

❖ Citrato de Simmons: Se observara una coloración verde lo que indica de que no hay consumo o utilización de citrato como fuente de carbono por lo tanto la prueba es negativa.¹⁵

d) Tratamiento

El tratamiento de la gastroenteritis por *E. coli* se basa en la hidratación, en cuanto a la profilaxis la doxiciclina es útil. En las infecciones urinarias bajas sin sepsis como sistitis o bacteriemia asintomática hasta la administración de cotrimoxazol.¹⁵

Las sulfonamidas y los antisépticos urinarios como la nitrofurantoina (100 mg cada 6 horas), el ácido nalidixico (0,5 a 1g cada 6 horas), o el norfloxacin que es una quinolona con cierta penetración son suficientes; la duración del tratamiento convencional es de 5 días.¹⁵

Por el contrario en las infecciones que se acompaña con fiebre y alteraciones de estado general (todas las cuales cursan en su momento u otro de su evolución con bacteriemia) y por definición en la bacteriemia con dicho patógeno hay que

administrar antibióticos de preferencia bactericidas.¹⁵

2.2.5 Método de difusión en agar

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de la técnica cuando trabajaba con penicilina en los años cincuenta. En ese tiempo, había tantos procedimientos diferentes en uso como microbiológicos.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966 ellos publicaron su estudio cimero describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

El NCCLS adopto los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer como el método de preferencia para difusión por disco. Estos pasos deben de seguirse en forma minuciosa para obtener resultados precisos.¹⁶

2.3 Definición de términos Básicos:

- ✓ **Extracto:** Preparación en agua de la sustancia de una planta o un animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular.
- ✓ **Rubefaciente:** Producto que aplicado sobre la piel produce irritación y enrojecimiento.
- ✓ **Antibacteriano:** Fármaco capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos

- ✓ **Antibiótico:** Que destruye los microorganismos que producen enfermedades e infecciones.
- ✓ **Liofilizado:** La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido
- ✓ **Cepas Certificadas:** Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.
- ✓ **Cromatografía:** Técnica de análisis que consiste en separar las sustancias disueltas en una mezclas por absorción o concentración selectiva de forma que produce manchas de diferente color en ellas.

CAPÍTULO III:

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de Investigación

Aplicativa

3.2 Nivel de Investigación

Explicativo: Porque busca explicar el efecto antibacteriano del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre), sobre cepas de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.

3.3 Método de Investigación

- ❖ Analítico: El objeto de estudio es la determinación del efecto del extracto de hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).sobre cepas de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.
- ❖ Inductivo: Se partió de algo particular para luego poder generalizarlo.
- ❖ Experimental: Porque se pudo manipular todas las variables y a su vez pudieron ser controladas.

- ❖ Estadístico: Se realizaron los análisis estadísticos para observar el grado de significancia que presenta el *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.
- ❖ Laboratorio: Porque se realizó en el laboratorio de la Universidad Mayor de San Marcos.
- ❖ El método que se realizó es el método de excavación-placa-cultivo. descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS).

3.4 Diseño de Investigación

- ❖ **Experimental:** Porque se pueden manipular las variables y pueden ser controladas.

3.5 Población y Muestreo de la Investigación

3.5.1 Población

- ❖ **Población vegetal**

Constituido por el conjunto de plantas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).

- ❖ **Población bacteriana**

Cepas de colonias de bacterias identificadas específicas de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922, provenientes de la UNMSM.

3.5.2 Muestra

A. Muestra Vegetal

400 g de pulverizado de la planta de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).

Criterios de inclusión.

- ❖ Plantas adultas.
- ❖ Plantas sanas.
- ❖ Plantas en buen estado de conservación.
- ❖ Plantas libre de excremento animal.

Criterios de exclusión.

- ❖ Plantas infestadas por microorganismos.
- ❖ Plantas secas o en mal estado de conservación.
- ❖ Plantas con resto de excremento animal.

B. Muestra Bacteriana

Colonias de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922; que se emplearán para la preparación del inóculo bacteriano.

(No probabilístico definida por la técnica.)

Criterios de inclusión.

- ❖ Colonias que reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- ❖ Colonias con resultado positivo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.

Criterios de exclusión.

- ❖ Colonias que no reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- ❖ Colonias con resultado negativo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.
- ❖ Colonias con presencia de contaminantes.

3.6 Variables e Indicadores

3.6.1 Variables

3.6.1.1 Variable Independiente (Y)

Efecto antibiótico del extracto acuoso Liofilizado de hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto, producto seco obtenido por liofilización, previa extracción de las hojas.

Definición operacional:

- ❖ Naturaleza: Cuantitativa.
- ❖ Medición: Directa
- ❖ Escala: De razón o proporción.
- ❖ Instrumento de medición: Balanza analítica.
- ❖ Procedimiento de medición: Se pesó el extracto seco (gr) luego se realizó su dilución con agua destilada.
- ❖ Indicadores: Diluciones seriadas porcentuales.
- ❖ Expresión final: %.

3.6.1.2 Variable Dependiente (X)

Crecimiento de las cepas *Staphylococcus aureus* 25923.

Crecimiento de las cepas *Escherichia coli* 25922.

Definición conceptual: Es la capacidad inherente a una sustancia de origen sintético o natural de inhibir el crecimiento de la bacteria.

Definición operacional:

- ❖ Naturaleza: Cualitativa
- ❖ Medición: Directa.
- ❖ Escala: De razón y nominal.
- ❖ Instrumento de medición: visual.
- ❖ Procedimiento de medición: Se midió los halos en las placas por las diferentes concentraciones del extracto.
- ❖ Indicador: Ausencia o presencia de la formación del halo del crecimiento bacteriano.
- ❖ Expresión final: crecimiento del Halo

3.6.2 Indicadores

Indicadores de la variable independiente

- ✓ Concentración del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).

Indicadores de la variable dependiente

- ✓ Diámetro del Halo de inhibición del extracto acuoso de hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).
- ✓ Presencia de turbidez.

3.6.3.- Variables Implicada

Cepas bacterianas puras de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922.

Variables Intervinientes

De la planta:

- ❖ Lugar de recolección: Distrito de Chiguata Departamento de Arequipa
- ❖ Parte de la planta a estudiar: hojas
- ❖ Tipo de extracción: Decocción
- ❖ Solvente usado: Agua.

TABLA N° 2: Variable independiente

VARIABLE	DIMENCION	INDICADORES	UNIDAD / CATEGORIA
Extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>brassica rapa l.</i> (nabo silvestre).	Cantidad de extracto disuelto /cantidad de agua.	Materia seca	Independiente cuantitativa

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 3: Variable Dependiente

VARIABLE	DIMENSION	INDICADORES	UNIDAD / CATEGORIA
Efecto antibacteriano del extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>Brassica Rapa I.</i> (Nabo silvestre) sobre <i>Escherichia Coli</i> y <i>Staphylococcus Aureus</i>	Método de difusión en agar sólido por excavación	Diámetro en milímetros (mm) del halo inhibición.	Dependiente cualitativa

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 4: Tabla de Variable Implicada

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD/CATEGORÍA
Cepas bacterianas puras de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Observación	Crecimiento bacteriano	Cualitativa

FUENTE: Elaboración Propia

3.7 Procedimiento, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos:

3.7.1 Procedimientos

3.7.2 Técnicas

A. Recolección de la muestra vegetal

Recolección: Las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) se recolectó en la provincia de Chiguata, Departamento de Arequipa.

B. Tipificación de la muestra vegetal

La muestra fue llevada al HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA) para ser identificada.

C. Preparación del pulverizado vegetal

Se usó las hojas de planta.

Secado: Una vez recolectadas las hojas se trasladaron, en un depósito a un ambiente ventilado donde no llegue la luz para su desecación por un espacio de una semana.

Molienda: Las hojas secas se pulverizaron en mortero de porcelana (previamente lavado y desinfectado con lejía al 0.5%) hasta la obtención de partículas uniformes y se tomó su peso.

Pulverizado: Se guardó el producto obtenido en frascos oscuros, seco, bien rotulado y cerrado hasta su posterior uso.¹³

D. Preparación del Extracto acuoso

Desengrasado de la muestra: Se desengraso con bencina de petróleo (con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de sus principios activos).

Decocción o cocimiento: Se llevó a cabo la decocción del pulverizado a una temperatura de 70-80°C de las hojas de planta durante cinco minutos, empleando como líquido extractivo el agua; luego se filtró y se dejó en refrigeración.⁴

E- Liofilización

Las muestras se colocaron en frascos especiales que soporten grandes presiones.

Se llevó a congelar las muestras a una temperatura de -4°C.

Luego se colocó en el equipo de liofilización por un tiempo de 72 horas.

Se retiró para su conservación en medio ambiente.¹⁴

E. Análisis fitoquímico en Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Donde la fase estacionaria es un sólido poderoso dispuesto, formando una capa delgada, sobre una placa metálica o de vidrio. Una vez se ha depositado la muestra

sobre la placa se coloca verticalmente en un recipiente hermético que tiene el diluyente (fase móvil) en el fondo del recipiente. La fase móvil fluye en sentido ascendente arrastrando los diferentes componentes de la mezcla a velocidades diferentes, con lo que se consigue una separación. Las sustancias que se están analizando pueden controlarse visionando las placas en el visible o en el ultravioleta, o utilizando reactivos reveladores específicos para los distintos tipos de sustancias. ³

❖ **Preparación de la fase móvil**

Mezclar en la cuba de cromatografía los solventes elegidos en las porciones indicadas (para la respectiva identificación). Tapar la cuba y dejar en reposo.

❖ **Preparación de la placa cromatografía**

La fase estacionaria (F. E.) empleada consiste en cromatofólios de sílica gel con base de aluminio, cortadas en un tamaño de 10 x 5 cm, se traza una línea a 1cm del borde inferior; al que se le aplica el extracto a concentración de 1mg/MI y se aplica sobre la línea en banda con capilares, dejando una distancia de 1 cm entre cada extracto.

Dejar secar y posteriormente colocar la placa en la cuba con la fase móvil. ¹⁵

❖ **Desarrollo Cromatográfico**

Luego se colocan en una cámara que se prepara 30 minutos antes para obtener una buena saturación del medio; se utiliza 5 mL de la fase móvil (F.M.) cubriendo el fondo hasta 0.3 cm de altura, se desarrolla el Cromatograma hasta que la fase móvil llegue a 1cm del extremo superior de la placa, para luego retirarlas y dejar secar durante 30 minutos y se observa a la luz 254 nm,

delimitando las zonas donde se pudieran visualizar los componentes de extracto. ¹⁵

❖ **Revelado**

Pulverizar la placa con sus respectivos reveladores y someterla a 100°C durante 5 minutos.²¹

❖ **Interpretación**

Identificación del compuesto en general: Terpenos, Flavonoides, Alcaloides y Taninos. ²¹

❖ **Identificación de componentes**

✓ **Identificación general**

Fase móvil

Acetato de etilo: Metanol: Agua (80:15:5)

Reactivos reveladores

Sol A: Ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto.

Sol B: vainilla al 1% en etanol absoluto.

Fase estacionaria

Placa de sílica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm.

Revelador

Luz UV 254 nm.

✓ **Identificación de Terpenos**

Fase móvil

Tolueno. Acetato de Etilo (90:10)

Reactivos reveladores

Sol. A: Ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto.

Sol. B: Vainillina al 1% en etanol absoluto.

Revelador

Luz UV 254 nm.

✓ **Identificación de Taninos**

Fase móvil

Metanol: Agua (90:10)

Reactivos reveladores

Cloruro Férrico al 1% en etanol.

✓ **Identificación de Flavonoides**

Fase móvil

Acetato de Etilo: metanol: Agua (80:15:5)

Reactivos revelador

Cloruro de Aluminio al 1% en etanol, luz ultravioleta
365 nm

Revelador

Luz UV 254 nm.

✓ **Identificación de Alcaloides**

Fase móvil

Acetato de etilo: metanol 80: 20

Reactivo revelador

Draggendorf. ²¹

❖ **Factor de referencia (RF)**

Es un número que permite identificar sustancias considerando las distancias recorridas en un Cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene Rf único y específico, por medio del cual se les identifica. ¹⁵

F. Preparación de los extractos a diferentes concentraciones

- ✓ Se procedió a hacer el cálculo de las concentraciones para cada extracto a utilizar.
- ✓ Se pesó 5 gr. De extracto liofilizado y se disolvió en 5 ml de sulfóxido de dimetilo para obtener la solución stock con una concentración 100 mg/ml.
- ✓ A partir de esta solución stock se procedió a preparar las siguientes concentraciones: 50 mg/ml, 25 mg/ml.²²

G. Estándar de turbidez para la preparación del inóculo

- ✓ Se tomó una alícuota de 0,5 ml de BaCl₂ al 1% se agregó 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% con agitación constante para mantener la suspensión.
- ✓ La suspensión de sulfato de bario se transfirió a 4 a 6 ml a tubos con tapa rosca del mismo tamaño.²²

H. Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland)

El presente trabajo de utilizo como referencia para preparación de las suspensiones bacterianas el tubo número 0,5 en la escala de Mc Farland cuyas características recaen en su preparación estandarizada ya que esta se realizó con la mezcla de 0,5 ml de una solución de cloruro de bario 0,048M o al 1,1175% p/v con 99,5 ml de Ácido Sulfúrico 0,18 M (0,36 N) o 1% v/v. La misma que se comprobó dando una absorbancia de 0,08 a 0,1 a la longitud de onda de 625 nm. La propiedad principal de esta solución es que un mililitro de nuestro cultivo bacteriano comparado con el estándar nos equivale a 1.5×10^8 UFC. ⁵

I. Preparación del agar Muller Hinton

- ✓ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 34gr en 1lt de agua destilada.
- ✓ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el agar.

- ✓ A continuación se auto clavó a 121 °C y 1 atm de presión durante 15min.
- ✓ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- ✓ Luego se repartió el medio en placas Petri colocando entre 25 a 30ml del medio para las placas de 100 mm de diámetro interno, de manera que el grosor del agar en la placa fue de 4mm.
- ✓ Se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- ✓ Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.²²

J. Preparación del caldo Muller Hinton

- ✓ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 21gr en 1lt de agua destilada.
- ✓ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el polvo.
- ✓ A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- ✓ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- ✓ Luego se repartió el medio en tubos de ensayo y se dejó reposar a temperatura ambiente.
- ✓ Se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.²²

K. Selección de los discos de sensibilidad antibiótica (control positivo)

La selección del antibiótico que se utilizó como control positivo se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- ✓ Eficacia clínica documentada.
- ✓ Representatividad de una familia de antibióticos.
- ✓ Disponibilidad de criterios técnicos fiables para la determinación *in vitro* de su eficacia clínica.
- ✓ Estabilidad de la molécula en los discos para antibiograma.
- ✓ Presencia en el mercado nacional.
- ✓ Importancia para la vigilancia de la resistencia bacteriana.²²

L. Preparación del inóculo

- ✓ Se tomó de 3 a 5 colonias bien aisladas del agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con una asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 5ml de caldo Muller Hinton.
- ✓ El caldo de cultivo se incubo a 37°C hasta que alcance la turbidez del estándar de 0,5 Mc Farland. Esto resulta una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UCF/mL.⁵

LL. Inoculación de placas por el Método de excavación-placa-cultivo

- ✓ Se utilizó placas Petri estéril descartable de 90 x15 mm las cuales fueron preparadas con agar Mueller Hinton (MH) (Merck)

- ✓ Se agregó 1ml de suspensión del inoculo (Mac Farland $0.5=3 \times 10^8$ UFC/ml) por cada 100 ml del medio de cultivo, se mezcló asépticamente, luego se repartió en las placas a razón de 25 ml por placa y se dejó solidificar. Una vez que el agar solidificó se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de 10 mm de diámetro externo, se agregaron 100 mg/ml; 50 mg/ml y 25 mg/ml. Luego se colocó el control positivo (discos de Gentamicina) y el control negativo 100ul de DMSO (Dimetil sulfoxido), y se reposó durante 15 minutos y luego fueron incubadas a 35°C por 24 horas. El ensayo fue repetido por tres veces.¹⁶

M. Aplicación del disco

- ✓ Se colocó el disco individual sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar siendo este el control positivo.

- ✓ Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm (el diámetro de los discos según las normas de la OMS debe ser de 6 mm).²²

M. Incubación

- ✓ Se incubó las placas entre 35°C por 24 horas.
- ✓ Luego del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada pozo.²²

N. Lectura de las placas e interpretación de los resultados

- ✓ Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro de la excavación), usando una regla o calibrador. Se mantiene iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Se observara la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo.²²
- ✓ El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo verlo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.²²

Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.

$$\%INHIBICIÓN: \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro del control}}$$

TABLA N° 5: Porcentaje de inhibición

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	<40% mg/ml
Poco activo	40 – 50% mg/ml
Moderado activo	51 – 75% mg/ml
Buena actividad	>76% mg/ml

3.7.3 Instrumentos

3.7.3.1 Materiales de vidrio

- ✓ Baguetas
- ✓ Embudo
- ✓ Frascos de color ámbar
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- ✓ Vasos de precipitado de 100y 200 ml.
- ✓ Placas Petri
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Pinzas

3.7.3.2 Equipos de Laboratorio

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Mechero
- ✓ Microscopio binocular Primo Star Zeiss
- ✓ Autoclave
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Estufa de incubación J.P. Selecta
- ✓ Cocina eléctrica J.P. Selecta

3.7.3.3 Reactivos

- ✓ BaCl₂
- ✓ H₂SO₄
- ✓ Etanol al 70%
- ✓ Bencina
- ✓ Agua destilada
- ✓ Hipoclorito de sodio al 0.5% (Legía)

3.7.3.4 Medios de cultivos

- ✓ Caldo le Muller Hinton.
- ✓ Agar Muller Hinton.
- ✓ Agar Mac Conkey
- ✓ Caldo Mueller Hinton

3.7.3.5 Material biológico

- ✓ Hojas de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).
- ✓ Cepas de *Staphylococcus aureus* 25923y
Escherichia coli.

3.7.3.6 Otros

- ✓ Algodón
- ✓ Papel kraft
- ✓ Gasa
- ✓ Gradillas para tubos de ensayo
- ✓ Guantes quirúrgicos
- ✓ Jeringas
- ✓ Mortero
- ✓ Papel filtro
- ✓ Trípode
- ✓ Barbijo

CAPÍTULO IV:

PRESENTACIÓN, ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados

TABLA N° 6 : Porcentaje de inhibición para *Staphylococcus aureus*

Concentración	Medida de halos de <i>S. aureus</i>	Control positivo	Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i>
100 mg	30 mm	25 mm	120%
	29 mm	25 mm	116%
	30 mm	25 mm	120%
50 mg	27 mm	25 mm	108%
	27 mm	25 mm	108%
	28 mm	25 mm	112%
25 mg	25 mm	25 mm	100%
	24 mm	25 mm	96%
	25 mm	25 mm	100%

Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACIÓN: en la siguiente tabla se observa los porcentajes de inhibición obtenidos de las concentraciones 100 mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml en relación con el control positivo.

TABLA N° 7: Porcentaje de inhibición para *Escherichia coli*

Concentración	Medida de halos de <i>E.coli</i>	Control positivo	Porcentaje de inhibición de <i>E.coli</i>
100 mg	14 mm	25 mm	56%
	13 mm	25 mm	52%
	14 mm	25 mm	56%
50 mg	9 mm	25 mm	36%
	10 mm	25 mm	40%
	10 mm	25 mm	40%
25 mg	8 mm	25 mm	32%
	7 mm	25 mm	28%
	8 mm	25 mm	32%

Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACIÓN: en la siguiente tabla se observa los porcentajes de inhibición obtenidos de las concentraciones 100 mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml en relación con el control positivo.

TABLA N° 8: Resultados de determinación de la presencia de metabolitos secundarios según la metodología thin layer chromatography (TLC).

Determinación de Metabolitos secundarios	
Metabolitos secundarios	Resultados
Taninos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Alcaloides	Negativo
Sesquiterpenlactonas	Positivo
Saponinas terpenoidales	Positivo
Mono terpenos	Positivo
Di terpenos	Positivo

Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACIÓN: Los metabolitos secundarios que se encontraron presentes fueron: Taninos, flavonoides, Sesquiterpenlactonas, Saponinas Terpenoidales. Mono terpenos, Di terpenos.

TABLA N° 9: Diámetros de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) sobre *Stahylococcus aureus*.

Concentración del extracto acuoso liofilizado	CONTROL POSITIVO (Gentamicina)	DROGA (mm)		CONTROL NEGATIVO (Dimetil sulfoxido)
		X	DS	
25 mg/ml	25 mm	24,6 ± 0,58		0 mm
50 mg/ml	25 mm	26,6 ± 0,58		0 mm
100 mg/ml	25 mm	29,6 ± 0,58		0 mm

Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACIÓN: En la siguiente tabla se observa que en las diferentes concentraciones hubo halos de inhibición igual y más elevada que la muestra patrón

TABLA N° 10: Diámetros de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre *Escherichia coli*.

Concentración del extracto acuoso liofilizado	CONTROL POSITIVO (Gentamicina)	DROGA (mm)		CONTROL NEGATIVO (Dimetil sulfoxido)
		X	DS	
25 mg/ml	25 mm	7,6 ± 0,58		0 mm
50 mg/ml	25 mm	9,6 ± 0,58		0 mm
100 mg/ml	25 mm	13,6 ± 0,58		0 mm

Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACIÓN: En la siguiente tabla se observa que en las diferentes concentraciones hubo halos de inhibición inferiores a la muestra patrón.

ANOVA

A fin de verificar la performance del compuesto propuesto *Brassica rapa L.* (nabo silvestre) en las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 será considerado un estudio ANOVA. Así, fueron considerados 3 réplicas ($i = 1; 2; 3$) y 3 niveles de concentración de nabo silvestre, 100mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml así como un grupo control (Gentamicina) ($j = 1; 2; 3; 4$).

El modelo ANOVA es dado por

$$y_{ij} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, 3 \quad j = 1, 2, 3, 4 \quad (1)$$

En que

- y_{ij} representa las medidas observadas que en este trabajo es el diametro del disco
- μ es una constante e indica la respuesta media de todos los niveles.
- α_j es el efecto del nivel j .
- ϵ_{ij} es el error no observado y es considerado una variable aleatoria con distribucion normal con media cero y varianza σ^2

El analisis ANOVA descompone la variación total de la muestra, en dos componentes:

$$\text{Variación Total} = \text{Variación Entre} + \text{Variación Intra}$$

La igualdad anterior indica que la variación total es igual a la suma de la variación o dispersión entre los grupos, más la variación o dispersión dentro de cada grupo. Los grupos están definidos por los niveles de factor.

Los grados de libertad (número de observaciones – parámetros a estimar) correspondientes a cada uno de los componentes de la variación total son:

- Variación Entre: $4 - 1$
- Variación Intra: $12 - 4$
- Variación Total: $12 - 1$

El Anova busca saber si los distintos niveles de un factor influye en los valores de una variable continua (diámetro del disco), para que efectivamente sí haya diferencias en los valores de la variable continua según el nivel del factor, se tiene que dar simultáneamente que el comportamiento de la variable continua sea lo más distinto posible para los distintos niveles del factor, y a su vez, que dentro de cada grupo (determinado por los niveles del factor) los valores sean lo más homogéneos posibles.

Por tanto, se espera observar que la variación intragrupos sea mínima, y que la variación entre-grupos sea máxima.

En este contexto, en el ANOVA se tiene que la hipótesis nula a contrastar establece la igualdad de efectos

$$H_0 : \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0 \quad (2)$$

siendo la hipótesis alternativa (H_1) que alguno de los efectos diferenciales sea distinto de cero.

El estadístico utilizado para realizar la prueba de hipótesis es dado por

$$E \left[\frac{\text{Variación entre}/(4 - 1)}{\text{Variación intra}/(12 - 4)} \right] \approx F_{3,8}, \quad (3)$$

En que $F_{3; 8}$ sigue una distribución F con 3 grados de libertad en el numerador y 8 grados de libertad en el denominador. Ver Gráfico N°6 en anexos

A continuación en la tabla a seguir se muestra la estadística F calculada.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Niveles	3	47.00	15.67	62.67	0.0000
Residuals	8	2.00	0.25		

VERIFICACIÓN DE LA HOMOGENIDAD DE LA VARIANZA

A fin de verificarla homogeneidad de la varianza entre los diferentes grupos (3 niveles de concentraciones 100, 50, 25) será considerado una prueba de hipótesis para tener evidencia sobre la homogeneidad de la varianza de los errores no observados. Recordemos que el modelo de ANOVA es dado por

$$y_{ij} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, 3 \quad j = 1, 2, 3, 4 \quad (1)$$

En que:

- y_{ij} representa las medidas observadas que en este trabajo es el diámetro del disco (E. coli y S. aureus)
- μ es una constante e indica la respuesta media de todos los niveles.
- α_j es el efecto del nivel j , osea, las diferentes concentraciones.
- ϵ_{ij} es el error no observado y es considerado una variable aleatoria con distribución normal con media cero y varianza σ^2

Se debe notar que se está asumiendo que la varianza σ^2 es igual para todos los grupos. Una vez que se asume esto, será verificado esta suposición utilizando el test de Levene's. Las hipótesis para este test son:

$$H_0 : \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \sigma_4$$

H_1 : Las varianzas no son iguales,

En que el nivel de significancia generalmente es fijada en $\alpha = 0.05$. Caso el p-valor del test de Levene's sea menor que 0.05 entonces se tiene evidencia para rechazar la hipótesis de homogeneidad de la varianza, esto es, los grupos tienen diferentes varianzas σ_j^2 $j = 1, 2, 3, 4$. Sin embargo, si el p-valor es mayor que 0,05 entonces de acuerdo con los datos no se tienen evidencia para afirmar que las varianzas son diferentes. Nota: Fue utilizado el software R para el análisis estadístico junto con la librería car. Además, el valor del p-valor en este software es dado en $\text{Pr}(>F)$.

Table 3: Resultados para aureus con nabo

	Df	F value	Pr(>F)
group	3	0.33	0.8018
	8		

Table 4: Resultados para coli con nabo

	Df	F value	Pr(>F)
group	3	0.33	0.8018
	8		

Interpretación: Se puede observar que el p- valor para el caso de *aureus* (0,8018) y para el caso de *E. coli* (0,8018) son iguales y mayores que 0,05. Esto indica que no se tiene evidencia para rechazar la hipótesis nula, esto, suponer que la homogeneidad de la varianza es plausible, por lo tanto, el ANOVA proporcionó resultados coherentes.

Note se que $F_{3;8} = 62,67$ y el p valor es menor que 0,05. De acuerdo con el p- valor, se tiene que existe evidencia para rechazar H_0 y considerar H_1 , esto indica que los efectos de cada nivel es diferente en la bacteria *Staphylococcus aureus* (diferentes diámetros).

A fin de saber si existe diferencia entre los diferentes niveles (comparaciones) será considerado la prueba HSD de Tukey. Sera denotado por A al nivel 100, B al nivel 50, C al nivel 25 y por D al grupo control.

	diff	lwr	upr	p adj
B-A	-3	-4.30735	-1.69265	0.000367
C-A	-5	-6.30735	-3.69265	8.6E-06
D-A	-4.66667	-5.97402	-3.35931	1.45E-05
C-B	-2	-3.30735	-0.69265	0.005234
D-B	-1.66667	-2.97402	-0.35931	0.014916
D-C	0.333333	-0.97402	1.640688	0.845201

De acuerdo con la tabla anterior se puede observar que existe diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de nabo silvestre y el grupo control (D). En este sentido, cuando se tiene una concentración de 100 se observa que este supera el efecto del grupo control. Así, estadísticamente se tiene evidencia que la concentración de nabo al 100 y 50 tiene un mejor desempeño al del grupo control (diámetro del disco). La concentración a un nivel 25 no muestra este comportamiento, sin embargo existe evidencia para indicar que efecto al nivel 25 y el grupo control son iguales. Ver gráfico N°7 en anexos

Para el caso de la bacteria *Escherichia coli* se tiene los siguientes resultados. Ver Gráfico N°8 en anexos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Niveles	3	514.92	171.64	686.56	0.0000
Residuals	8	2.00	0.25		

Así, de acuerdo con la tabla anterior se tiene que el p-valor es menor que 0,05 y por lo tanto se evidencia para rechazar la hipótesis H_0 y considerar la hipótesis alternativa, o sea, que los diferentes niveles *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) tiene efectos diferentes (diámetros en el disco)

A la luz del resultado anterior, será considerada las operaciones de Tukey.

	diff	lwr	upr	p
B-A	-3.66667	-4.97402	-2.35931	8.73E-05
C-A	-6.66667	-7.97402	-5.35931	0.000001
D-A	10.66667	9.359312	11.97402	0
C-B	-3	-4.30736	-1.69265	0.000367
D-B	14.33333	13.02598	15.64069	0
D-C	17.33333	16.02598	18.64069	0

De acuerdo con la tabla a continuación, se tiene que ninguna de las concentraciones tiene un desempeño mejor que el de grupo control.

Observación: Puede ser considerado una comparación de Duncan, sin embargo el objetivo es comparar los diferentes niveles en la relación con el grupo control, y esa perspectiva es más conveniente utilizar la comparación de Tukey o de Dunnett. Ver gráfico N°9 en anexos

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se logró realizar los diversos ensayos para demostrar el efecto antibacteriano del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que son de mucha importancia médica por ser causante de enfermedades y además infecciones.

A pesar de que se han hecho estudios acerca de las propiedades medicinales de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) en otras partes del mundo, mas cabe resaltar que en nuestro país no ha sido tan estudiada, por lo que es necesario profundizar su estudio y dar a conocer sus aplicaciones como producto natural para la preparación de medicinas.

En la actualidad el uso de productos naturales es una de las estrategias más importantes para el descubrimiento de nuevas medicinas. ⁽¹¹⁾

El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre), demostró la presencia de los metabolitos secundarios antibacterianos presentes en el Nabo silvestre.

Los metabolitos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Brassica rapa L.* (nabo silvestre) tienen buen efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* llegando a presentar halos de inhibición de hasta 30mm de diámetro los cuales han superado al control positivo (Gentamicina) que presentó diámetros de hasta 25 mm de diámetro, lo que indica que el nabo silvestre que crece en el Departamento de Arequipa también posee compuestos antibacterianos efectivos contra bacterias de *Staphylococcus aureus* tal como lo afirma también Martínez . (2010) En su trabajo de Aislamiento de proteínas (globulinas, glutelinas y albuminas), de semillas de *Brassica rapa L.* “Nabo silvestre” con propiedades antibacterianas y anti fúngicas, quien trabajó con el nabo silvestre que crece en el mismo Departamento, y que además demuestra también que tiene muy buen efecto anti fúngico.

La técnica que se eligió para la extracción de los metabolitos que cumplen el efecto antibacteriano fue la del extracto acuoso liofilizado es una técnica poco utilizada, pero tiene buenos resultados ya que la liofilización es una técnica que ayuda a conservar mejor la presencia de los metabolitos antibacterianos, lo que podemos observar muy claramente en los resultados obtenidos así como también lo corrobora el trabajo de Rios N., Davila R.(2013), en su trabajo Actividad antibacteriana in vitro de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Quien también utiliza la técnica del liofilizado para preparar su extracto acuoso y donde tiene buenos resultados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en la comparación de los efectos antibacterianos de las diferentes concentraciones (100 mg/ml, 50mg/ml y 25 mg/ml) del extracto acuoso de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre), en la (Tabla N°6 y Tabla N°7) indica que el mayor porcentaje de inhibición lo exhiben frente a las bacterias de *Staphylococcus aureus* y el menor porcentaje de inhibición lo exhiben frente a *Escherichia coli*. Se presume que esto se debe a que el extracto acuoso de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) extrajo metabolitos antibacterianos más efectivos para *Staphylococcus aureus* que para *Escherichia coli*. Tal como lo afirma Milin K. (2013) en su trabajo Eficacia bacteriana de la raíz *Brassica campestris*, tallo y hojas extractos, que utilizando el método de difusión en disco contra cinco bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) demuestra que el extracto de Etanol en comparación con otros extractos, incluido el extracto acuoso, es el más efectivo para demostrar la actividad antibacteriana ya que los diámetros de inhibición van hasta 25 mm de diámetro tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherichia coli*.

Amira M. (2014) en su trabajo Investigación de nuevos antimicrobianos de la actividad antioxidante de *Brassica rapa l.* Demostró el efecto inhibitorio del extracto acuoso de la *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) tanto de la raíz como de las partes aéreas de la planta frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) como Gram negativas (*Escherichia coli*) donde

afirma que el efecto antibacteriano de la planta se debe a la presencia de polifenoles los cuales son capaces de ejercer los efectos antibacterianos eficaces sobre todo en *Staphylococcus aureus* lo cual es concordante con los resultados de nuestro trabajo ya que también el extracto acuoso de nabo silvestre también tuvo mayor efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*.

Thaira Z., Riffat F., Muhammad A., Khalid M. (2013) en su trabajo In vitro evaluación de la actividad antibacteriana de extracto de metanol de *Brassica oleracea* frente a bacterias seleccionadas. Demostró que el extracto de metanol de la *Brassica oleracea* extrae mucho mejor metabolitos secundarios tales como el glucosinolato los cuales pueden ejercer mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y un menor efecto sobre *Staphylococcus aureus*; esto a diferencia del extracto acuoso el cual es más efectivo para *Staphylococcus aureus*.

Los estudios realizados a la familia de Brassicas, las cuales son muy consumidas alrededor del mundo, han demostrado que son una muy buena fuente de Ac. fólico, carotenoides, compuestos fenólicos, selenio, vitamina C y glucosinolatos siendo muy beneficiosas para combatir enfermedades de (cáncer).⁽¹⁷⁾

Velasco P., Francisco M., Moreno d., Ferreres F., Garcia C., Cartea M. en su trabajo Toma de huellas dactilares fitoquímico de *Brassica oleracea* y *Brassica napus* vegetal y por la identificación simultánea de glucosinolatos y compuestos fenólicos. También afirma que las Brassicas son una familia con muy buena fuente de antioxidantes fenólicos y glucosinolatos. Lo que se puede decir que esta gran fuente de antioxidantes cumplen la función de ser buenos antibacterianos. Cabe resaltar que para obtener buenos resultados en este tipo de estudios hay que tener muy en cuenta la técnica que se va a utilizar para extraer los metabolitos como también las partes utilizadas de la planta ya que las concentraciones de principios activos varían en cada parte de esta.

CONCLUSIONES

- El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) presenta efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. El efecto antibacteriano fue evidenciado en los ensayos realizados DS (Desviación Estándar), ANOVA y la prueba de Tukey que demuestran la inhibición del crecimiento producida por el extracto acuoso liofilizado de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) sobre el crecimiento de estas bacterias.
- El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) tiene efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Con un halo de inhibición de 30 mm a las 24 horas a una concentración de 100 mg/ml presentando mayor porcentaje de inhibición con respecto a la inhibición producida por el control positivo (Gentamicina) tal como lo demuestran los ensayos de DS (Desviación Estándar), ANOVA y la prueba de Tukey.
- El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre) tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922. Con un halo de inhibición de 14 mm a las 24 horas a una concentración de 100 mg/ml presentando menor porcentaje de inhibición con respecto a la inhibición producida por el control positivo (Gentamicina) tal como lo demuestran los ensayos de DS (Desviación Estándar), ANOVA y la prueba de Tukey.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda continuar con estudios de efecto antibacteriano de plantas medicinales de uso popular como es el nabo silvestre y comparar con las diferentes variedades de Brassicaceas.
- ❖ Se recomienda posteriores estudios con otras bacterias de la línea de Gram positivas sobre todo en la especie de estafilococos, para poder determinar el porcentaje de efectividad de esta especie.
- ❖ Realizar estudios de sus principales compuestos químicos que determinan su efectividad antibacteriana.
- ❖ Realizar estudios con el aceite esencial de la planta entera de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rivera C. Coloración Bacteriana. 1° Edición. Arequipa – Perú: Editorial Universidad Católica Santa María; 2013.
2. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke y Christine I. Case. Introducción a la Microbiología. 9° edición. Editorial médica panamericana; 2007.
3. KUKLINSKI C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona – España: Ediciones Omega S.A.; 2000.
4. KUKLINSKI C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona – España: Ediciones Omega S.A.; 2003.
5. Negroni, M. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guías prácticas. 2da Edición; 2009.
6. Dr. Mostacero J., Dr. Mejía F. y Msc. Gamarra O. Fanerógamas del Perú. Taxonomía, Utilidad y Ecogeografía. 1^{ra} Edición. Trujillo-Perú: Edita CONCYTEC; 2009.
7. Dr. Mostacero J., Dr. Castillo F., Dr. Mejía F., M.S.C. Gamarra O., Charcape J., Dra. Ramírez R. Plantas medicinales del Perú. Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Edición Asamblea Nacional de Rectores. Trujillo-Perú: Fondo editorial; 2011.
8. Bruneton J. Fitoquímica y de Farmacognosia. Apartado 466 España: Editorial ACRIBIA S.A.; 1991.
9. MD. Longo D. Harrison. Principios de la medicina interna. 18^{ava} Edición. D.F. – México: Mc Graw-Hill interamericana editores S.A. de C.V.; 2012.
10. Geo F., Brooks, Karen C., Carroll, Janet S., Stephen A., Morse. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19^{ava} edición. D.F.- México: Editorial el manual Moderno S.A. de C.V. CIUDAD; 2007.

11. Martínez Rodríguez A. Aislamiento de proteínas (globulinas, albuminas y glutelinas), de semilla de *brassica rapa* L. "nabo silvestre" con propiedades antibacterianas y antifúngicas. [Tesis]. Arequipa – Perú: 2010
12. Velasco P., Francisco M., Moreno D., Ferreres F., García Cristina y Cartea, María E. Huellas digitales fitoquímico de verduras brassica oleracea y brassica napus por identificación simultanea de glucosinolatos y fenólicos. [Tesis]. -Perú 2011
13. Ríos Gómez N., Dávila Valles R. Actividad antibacteriana in vitro de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET – ESSALU – 2013. [Tesis]. Iquitos- Perú 2014. Pag. 2
14. Cavalieri S, Harbeck R, McCarter Y, Rankin I. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana [Revista en línea]. 2005.
15. Rodríguez Lira G. Determinación del efecto antibacteriano in vitro de la *Rivina humilis* L. flor blanca sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis]. Arequipa-Perú 2013. Pag.15, 18-26, 31, 41-44, 46, 47,60-64.
16. Cavalieri S, Harbeck R, McCarter Y, Rankin I. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana [Revista en línea]. 2005.
17. Kumar, S. y Andy, A. Promover minireview salud fitoquímicos bioactivos de brassica. Inter jour of Pharm (Ind) 2012; (6): 122-130
18. Md. Mamun Or Rashid, Mohammad Ruhul Amin, Mohammed Mehadi, Hassan Chowdhury, Md Arifur Rahman, Md. Shamim. Estudio comparativo sobre la actividad antibacteriana de cuatro plantas medicinales con hojas de diferentes edades. Intern jour of Pharma Scien (Banglad) 2014; (3) : 26-32
19. Milin k. Agrawal, Deepa Rathore. Eficacia antibacteriana de los extractos de hoja, tallo y raíz de *brassica campestris*. Inter. Jour of Advan Resear (Ind) 2013;(1):131-135

20. Amira Mohammed Beltagy. Investigación de nuevos antimicrobianos y de actividad antioxidante de brassica rapa I. Inter Jour Pharma and Pharmaceu Scien (Egyp) 2014; (6): 84-88
21. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Método de estudio de los productos naturales. 2^{da} edición. Lima-Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Católica del Perú; 1994. Pag. 53
22. Murray K.Pfller M. Microbiología Médica. 5^a Edición. Madrid-España: editorial El sevier: 2009. P 86.
23. Thaira Z., Riffat F., Muhammad A., Khalid M., In – vitro Evaluación de la Actividad Antibacteriana de Extracto de metanol de *Brassica oleracea* frente a bacterias seleccionadas. Journal of Liaquat University of Medical & Health Sciences.(Pakistan) 2013;(12): 177-181.

ANEXOS
GRÁFICO N° 6: MATRIZ DE CONSISTENCIA

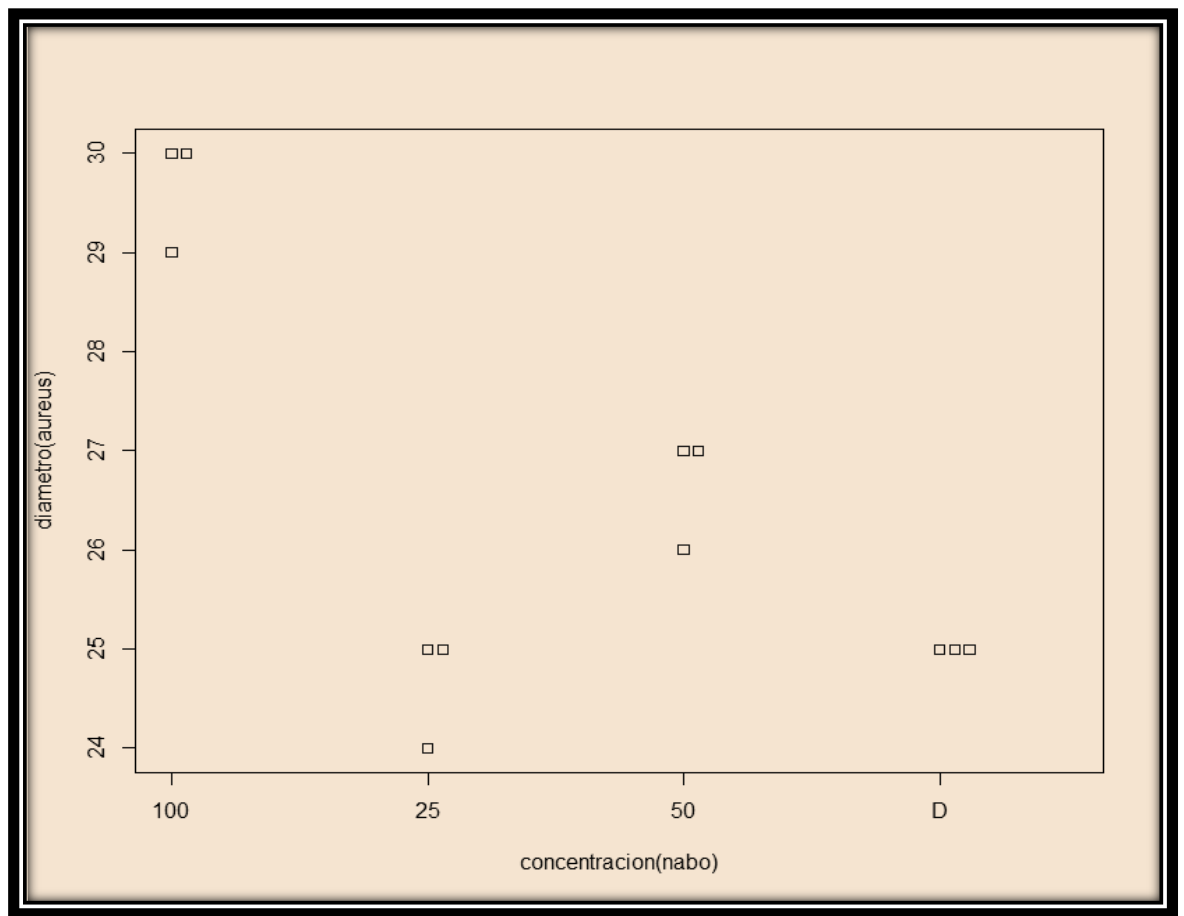
TÍTULO DE TESIS:” EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”

PRESENTADO POR: RAMOS QUISPE, RUTH

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	VARIABLES	POBLACIÓN Y MUESTRA
<p>¿Tendrá efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre) sobre cepas ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>?</p> <p>Problemas Específicos</p> <p>P.E.1: ¿Tendrá efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre) sobre cepas ATCC <i>Staphylococcus aureus</i>?</p> <p>P.E.2: ¿Tendrá efecto antibacteriano in vitro el extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre) sobre cepas ATCC de <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre) sobre el crecimiento de las cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>Q.E.1: Determinar la medida del halos de inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Q.E.2: Determinar la medida del halos de inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>El extracto acuoso liofilizado obtenido de las hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre) presenta efecto antibacteriano in vitro sobre cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Hipótesis Específicas</p> <p>H.E.1: El extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre), presenta un halo inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>H.E.2: El extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre), presenta un halo inhibición del crecimiento bacteriano sobre cepas ATCC de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Tipo de investigación: Aplicativa</p> <p>Nivel de investigación:</p> <p>Explicativo: Porque busca explicar el efecto antibacteriano del extracto acuoso liofilizado de las hojas de <i>Brassica rapa l.</i> (Nabo silvestre) sobre cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Método de investigación: Es Analítico e Inductivo.</p> <p>El método estandarizado de difusión en disco descrito por el laboratorio Internacional de Referencia (National Committee For Clinical Laboratory Standars NCCLS)</p> <p>Diseño de investigación: Experimental</p>	<p>Variable Independiente (Y)</p> <p>Y: Concentración del extracto.</p> <p>Indicadores:</p> <p>Y1: Cantidad del extracto disuelto.</p> <p>Y2: Cantidad del agua disuelta (ml).</p> <p>Variable Dependiente (X):</p> <p>X: Actividad antibiótica.</p> <p>Indicadores:</p> <p>X1: Diámetro del halo (mm).</p>	<p>Variable Independiente (Y)</p> <p>Y: Concentración del extracto.</p> <p>Indicadores:</p> <p>Y1: Cantidad del extracto disuelto.</p> <p>Y2: Cantidad del agua disuelta (ml).</p> <p>Variable Dependiente (X):</p> <p>X: Actividad antibiótica.</p> <p>Indicadores:</p> <p>X1: Diámetro del halo (mm).</p>

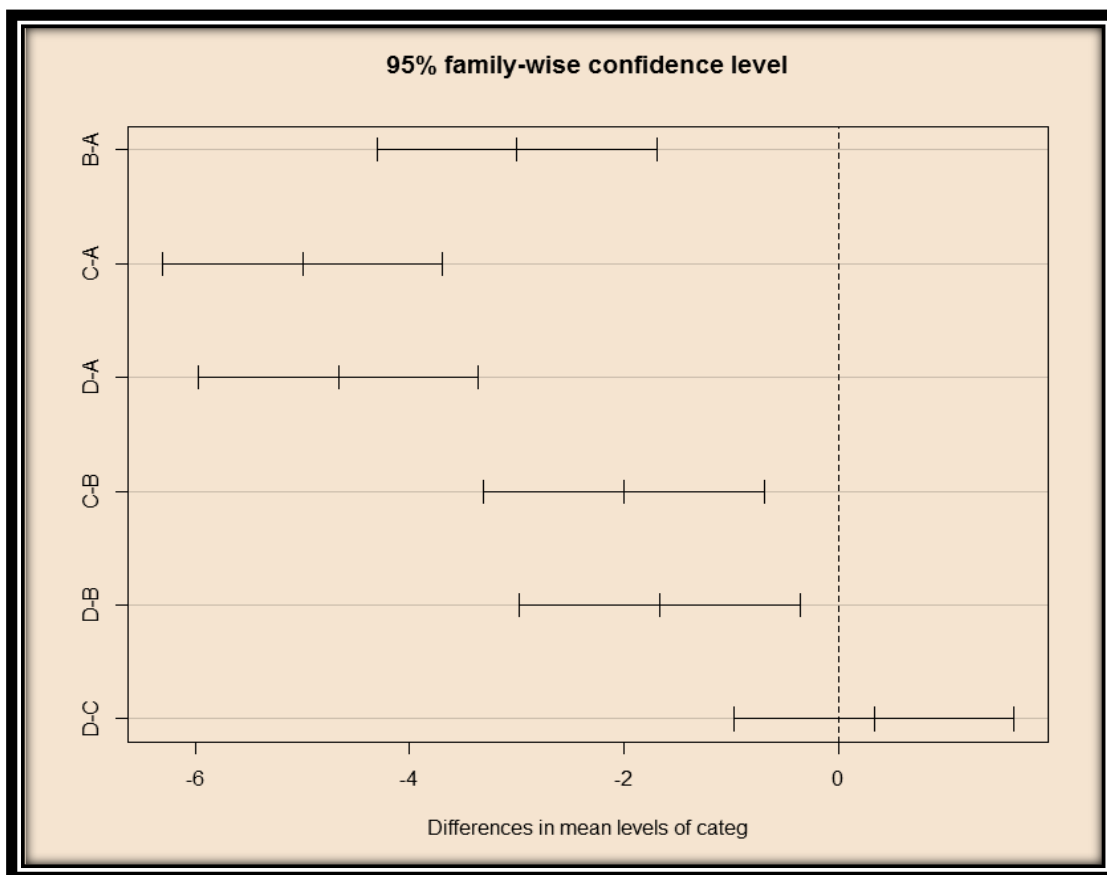
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 7 : Prueba de ANOVA del *Staphylococcus aureus*



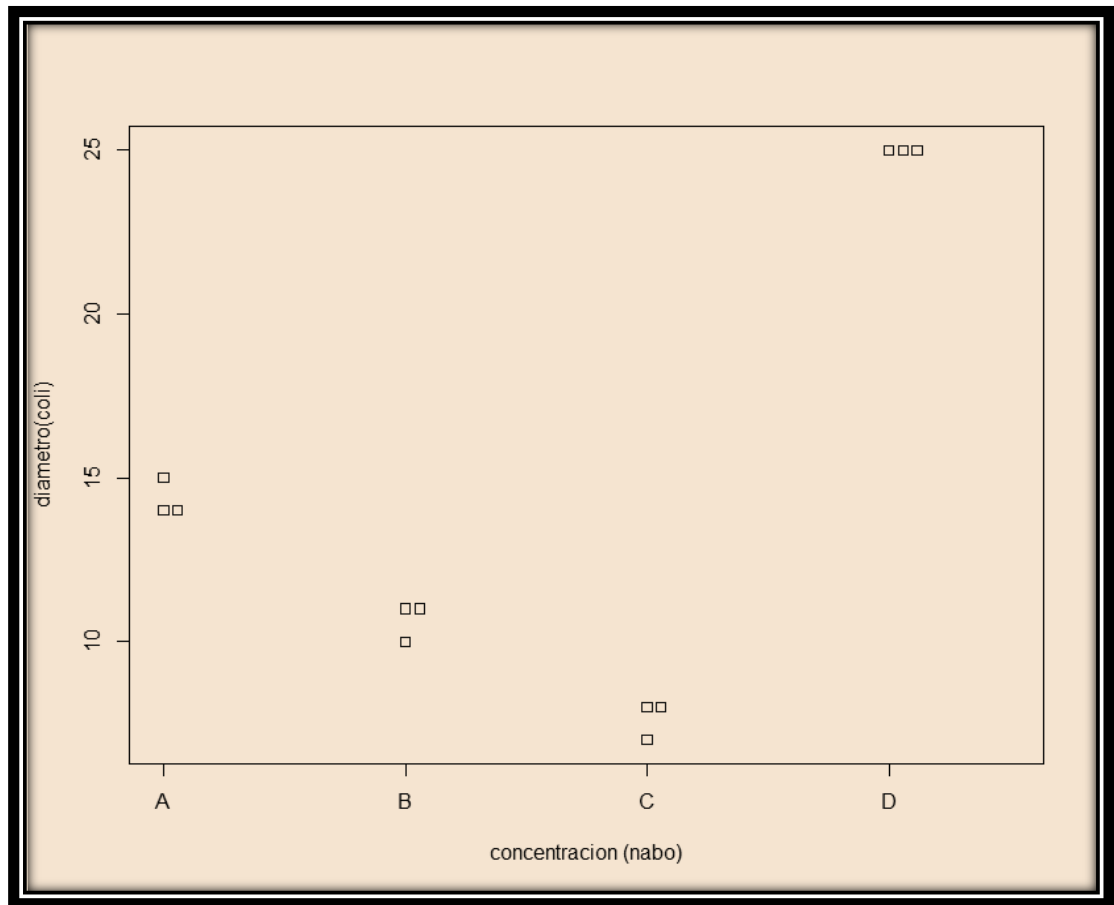
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 8: Prueba de Tukey del efecto antibacteriano del extracto acuoso Liofilizado de *Brassica rapa* L. (Nabo silvestre) a diferentes concentraciones sobre *Staphylococcus aureus*.



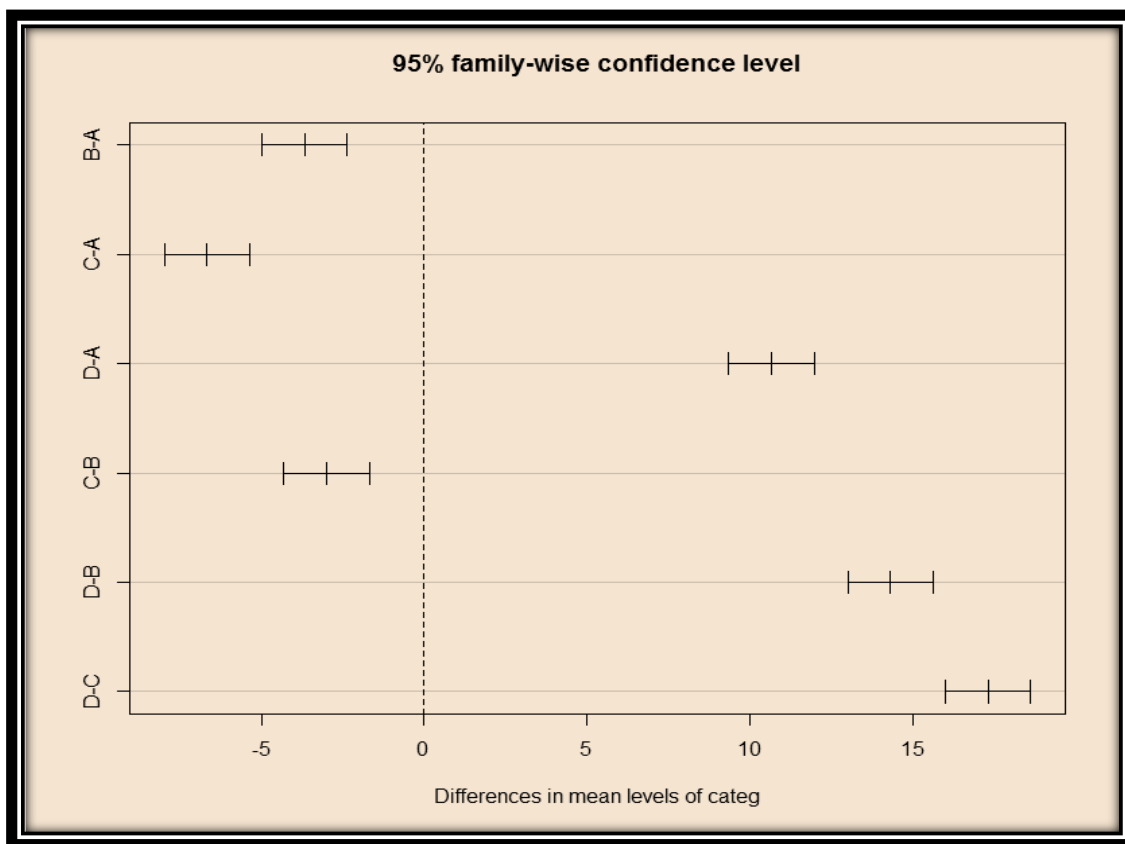
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 9: Prueba de ANOVA de *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 10 : Prueba de Tukey del efecto antibacteriano del extracto acuoso Liofilizado de *Brassica rapa l.* (Nabo silvestre) a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli*.



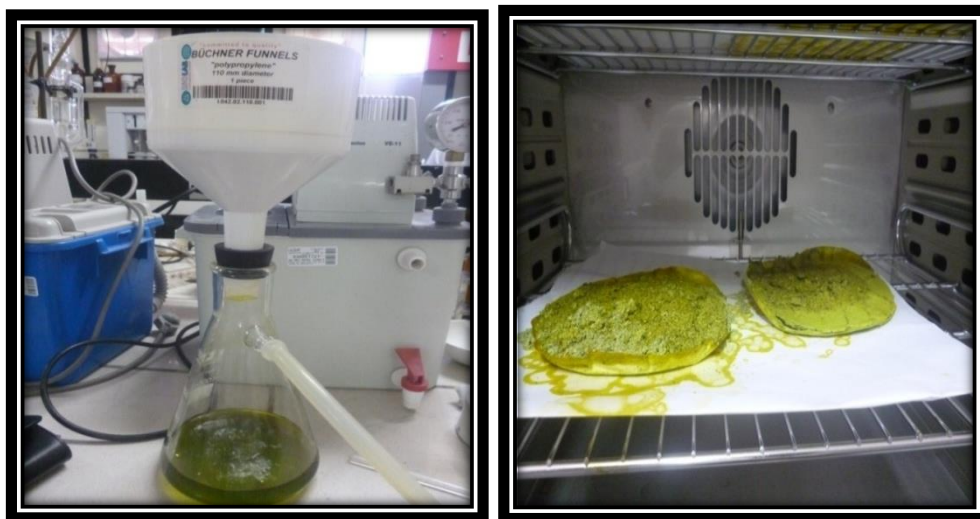
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 11: Imágenes de planta en estudio *Brassica rapa L.* (Nabo silvestre), recolectada en el Distrito de Chiguata - Arequipa.



Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 12: Proceso de desengrasado de la planta



Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 13: Se observa las corridas de cromatografía de capa fina.



Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 14: Liofilización de la muestra.



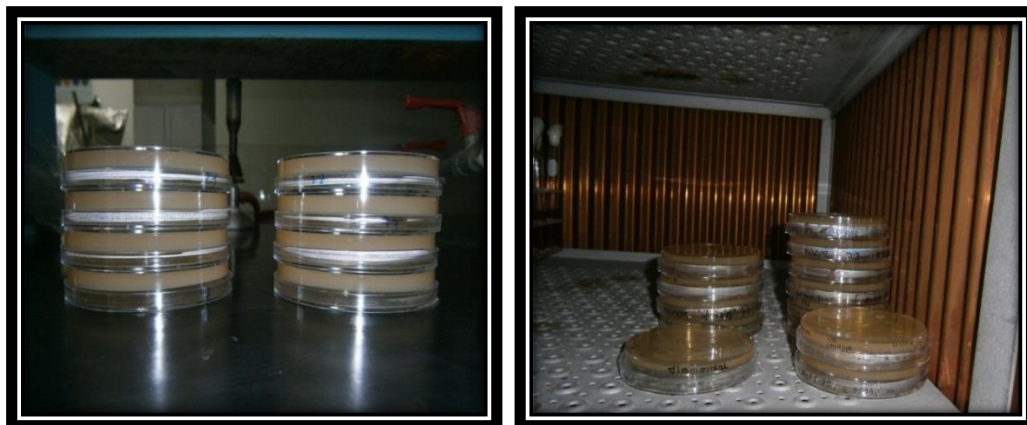
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 15: Autoclave utilizada para esterilización del material.



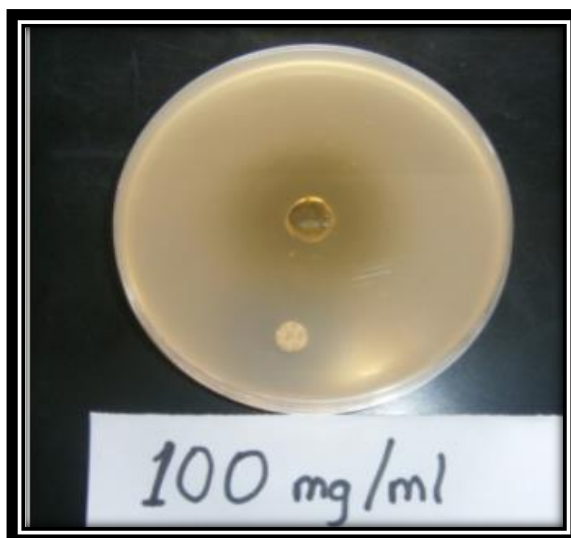
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 16: Placas sembradas con bacterias y colocadas con sus respectivos discos.



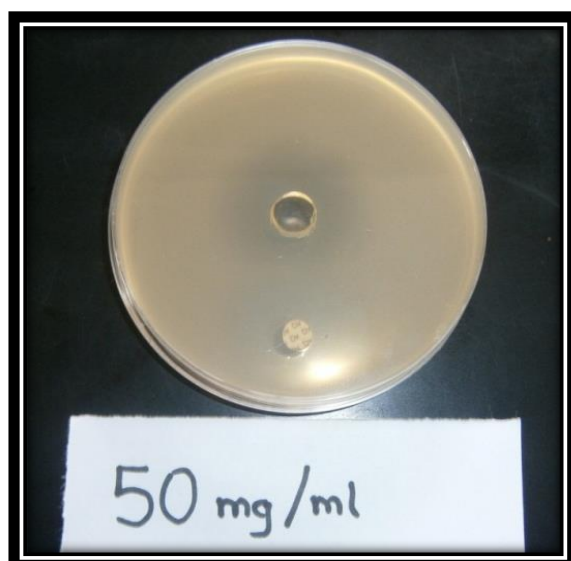
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 17: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Brassica rapa* l. sobre *Staphylococcus aureus*.



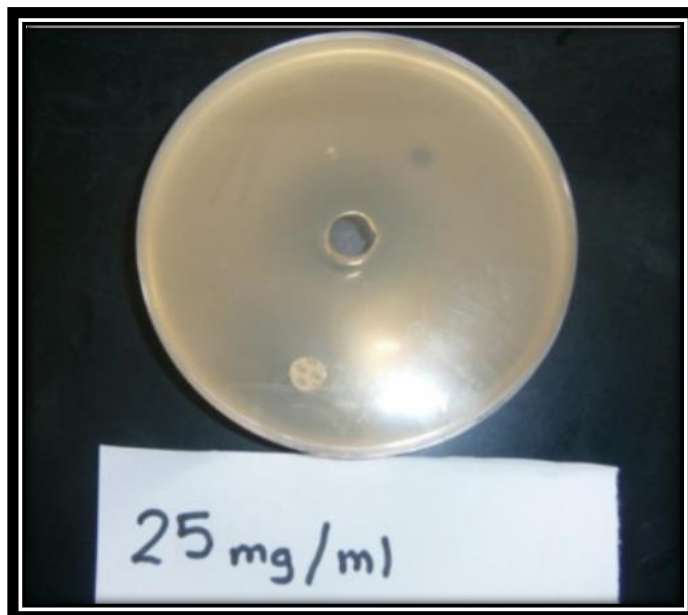
Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 18: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Brassica rapa* l. sobre *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 19: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Brassica rapa* l. sobre *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 20: Lectura de inhibición de los halos a las diferentes concentraciones con el control positivo y negativo



Fuente: Elaboración propia

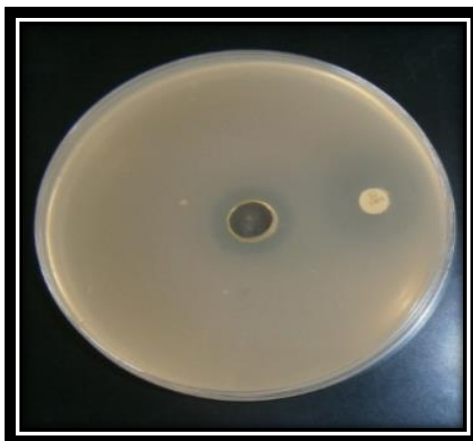
Gráfico N° 21: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Brassica rapa* L. sobre *Escherichia coli*.



100 mg/ml

Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 22: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Brassica rapa* L. sobre *Escherichia coli*.



50 mg/ml

Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 23: Lectura de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Brassica rapa* l. sobre *Escherichia coli*.



25 mg/ml

Fuente: Elaboración propia



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA)



"AÑO DE LA INVERSIÓN PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA"

CONSTANCIA N° 025-2015-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que en el Laboratorio de Botánica se ha logrado determinar dos muestras frescas de plantas traídas , 1). de la Localidad de Chiguata- 2) del mercado San Camilo para el estudio de Identificación Biológica y Tipificación para la ejecución de investigación ejecutado por RUTH RAMOS QUISPE de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas .

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: Capparales

FAMILIA: Brassicaceae

GENERO: Brassica

ESPECIE: *Brassica rapa subsp campestris* (L.) Clapham

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

Arequipa 4 de Noviembre del 2015.


Bigo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José 3/4 Urbanización CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 (0) 302030 AREQUIPA 1988
E-mail: laboratorioensayo@ucsm.edu.pe ☉ http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1250
AREQUIPA - PERU



El que suscribe, Jefe del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la U.C.S.M.

CERTIFICA

Que la elaboración del desengrasado del material vegetal, fue realizado en nuestro laboratorio, para el trabajo de tesis titulado:

"EFECTO ANTIBIOTICO IN VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Brassica rappa* L. (Nabo silvestre) SOBRE CEPAS DE *E.coli* y *S. aureus*"

Lo cual, fue solicitado por la Bach. Ruth Ramos Quispe.

Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada para los fines que estime por conveniente.

Arequipa, 12 de enero de 2016


Q.F. Ricardo A. Abril Ramiro,
CGFBA 00624
JEFE DE LABORATORIO LICR





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
 AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA19A16.002068

Nombre del Cliente	: RUTH RAMOS QUISPE
Dirección del Cliente	: CONGATA SECTOR 2 LOTE 8 MZ B UCHUMAYO
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: NABO SILVESTRE <i>Brassica rapa L.</i>
Tamaño de muestra	: 150 g
Fecha de Recepción	: 19/01/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 19/01/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 26/01/2016
Página	: 1 de 5

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANALISIS	RESULTADO
Determinación de Metabolitos Secundarios Metodología thin layer chromatography (TLC)	Se determinó Presencia de : Taninos, sesquiterpenlactonas, flavonoides, saponinas terpenoidales, Mono terpenos, di terpenos Ausencia de: alcaloides

 Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
 CQFDA 00624
 JEFE DE LABORATORIO LECC





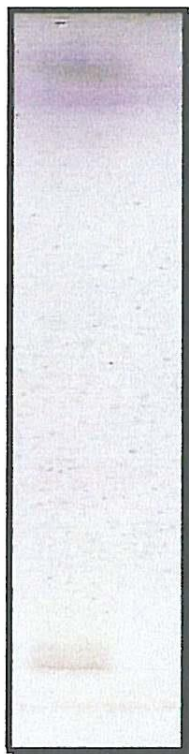
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA19A16.002068

Nombre del Cliente	: RUTH RAMOS QUISPE
Dirección del Cliente	: CONGATA SECTOR 2 LOTE 8 MZ B UCHUMAYO
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: NABO SILVESTRE <i>Brassica rapa L.</i>
Tamaño de muestra	: 150 g
Fecha de Recepción	: 19/01/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 19/01/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 26/01/2016
Página	: 2 de 5



DETERMINACIÓN GENERAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS: TLC

Fase Móvil: Acetato de etilo: metanol: agua 80:15:5

Revelador: Vainillina (1%) Acido Sulfúrico (5%)



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA19A16.002068

Nombre del Cliente	: RUTH RAMOS QUISPE
Dirección del Cliente	: CONGATA SECTOR 2 LOTE 8 MZ B UCHUMAYO
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: NABO SILVESTRE <i>Brassica rapa L.</i>
Tamaño de muestra	: 150 g
Fecha de Recepción	: 19/01/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 19/01/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 26/01/2016
Página	: 3 de 5



DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES: TLC
Fase Móvil: Acetato de etilo: metanol 80 : 20
Revelador: Dragendorff





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apldo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA19A16.002068

Nombre del Cliente	: RUTH RAMOS QUISPE
Dirección del Cliente	: CONGATA SECTOR 2 LOTE 8 MZ B UCHUMAYO
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: NABO SILVESTRE <i>Brassica rapa L.</i>
Tamaño de muestra	: 150 g
Fecha de Recepción	: 19/01/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 19/01/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 26/01/2016
Página	: 5 de 5



DETERMINACIÓN DE TANINOS: TLC
Fase Móvil: metanol: agua 90 : 10
Revelador: Cloruro Férrico 1 % En Etanol



OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> 📄 Apldo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA19A16.002068

Nombre del Cliente	: RUTH RAMOS QUISPE
Dirección del Cliente	: CONGATA SECTOR 2 LOTE 8 MZ B UCHUMAYO
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: NABO SILVESTRE <i>Brassica rapa L.</i>
Tamaño de muestra	: 150 g
Fecha de Recepción	: 19/01/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 19/01/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 26/01/2016
Página	: 4 de 5



DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES: TLC
Fase Móvil: Acetato de etilo: metanol: agua 80:15:5
Revelador: Cloruro de Aluminio al 1 % en etanol, luz ultravioleta 365 nm



CONSTANCIA

El que suscribe, Jefe (e) del Departamento Académico de Ingeniería de Industrias Alimentarias, Facultad de Ingeniería de Procesos, de la Universidad Nacional de San Agustín; hace constar:

Que la Sra. **RUTH RAMOS QUISPE**, Bachiller de la Universidad ALAS PERUANAS, Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha realizado pruebas de liofilización de 1000 mL de extracto acuoso de *Brassica rapa* L. (Nabo silvestre) en los laboratorios de nuestra Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias.

Se le expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que crea por conveniente.

Arequipa, 03 de Febrero del 2016


JEFE (E)
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
UNSA

