



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA  
SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**

**Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de los  
extractos acuosos de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”  
en colonias de *Escherichia coli*, Arequipa 2016.**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:  
Centeno Flores, Pohl William**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
Químico Farmacéutico**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2016**

## DEDICATORIA

*El presente trabajo, está dedicado a Dios por darme la oportunidad de vivir, por darme unos padres tan maravillosos que son mi razón de ser y por estar conmigo en cada paso que doy.*

*A Fortunato y Regina, por ser padres ejemplares que me inculcaron valores, consejos con mucho amor, que me ha permitido ser una persona de bien, para mí un ejemplo a seguir ya que son personas con enormes deseos de superación, gran calidad moral y eterno apoyo para lograr cada meta trazada en mi vida.*

*A Jessica mi hermana, que con cariño y sus sabios consejos me ha sabido dirigir con las experiencias que ella ha tenido en la vida para poder alcanzar mis metas, ya que todo en esta vida se alcanza con perseverancia, humildad y dedicación.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Alas Peruanas, por ser la casa de estudios que me abrió las puertas a mi formación profesional.*

*A la directora de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas; Mg Q.F Alexandra Fernández Gambarini por su apoyo incondicional.*

*A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica quienes compartieron sus conocimientos y experiencia profesional durante el transcurso de toda mi carrera profesional.*

*Quiero agradecer a mi asesora de tesis Q.F. Liset Ramírez Díaz por su paciencia y por sus conocimientos que han sido de gran ayuda para la culminación de mi tesis.*

## RESUMEN

En la presente investigación, se determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* a partir de los extractos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" en colonias de *Escherichia coli*.

La recolección de la zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*", se realizó en el departamento de Madre de Dios; identificada por el Herbarium Arequipense (HUSA); con rizomas de la zarzaparrilla se preparó extractos acuosos por maceración e infusión, a los que se realizó un análisis fitoquímico, que determinó en ambos extractos la presencia de terpenos, esteroides, azúcares reductores, taninos y saponinas los cuales se les atribuye actividad antimicrobiana.

Una vez preparados los extractos acuosos y determinada la presencia de metabolitos secundarios, se realizó diluciones seriadas para determinar la concentración inhibitoria mínima, la cual representa el crecimiento bacteriano y la ausencia de turbidez representa la inhibición microbiana; los resultados observados fue inhibición microbiana a la concentración de 100ug/mL y 50ug/mL del extracto por maceración, sin embargo, el extracto por infusión produjo la inhibición en las concentraciones de 100ug/mL, 50ug/mL, 25ug/mL y 12,5ug/mL pudiendo observar la ausencia de turbidez.

En la determinación de la concentración bactericida mínima se observó ausencia de crecimiento microbiano de *Escherichia coli* a la concentración de 100ug/mL lo que significa que el extracto a esta concentración tiene efecto bactericida. Sin embargo el extracto por infusión presentó efecto bactericida a las concentraciones de 100ug/mL, 50ug/mL y 25ug/mL; la concentración de 12,5ug/mL no presentó efecto bactericida ya que se observó crecimiento del microorganismo en las placas.

Para determinar la sensibilidad o resistencia microbiana se aplicó el método de Kirby Bauer (Antibiograma) utilizando el método de siembra por superficie, se colocó discos

impregnados del extracto acuoso preparado por maceración a la concentración de 100ug/mL de acuerdo a la concentración bactericida mínima, obteniéndose un halo promedio de 10 mm, lo que significa que el extracto no presentó sensibilidad ni efecto antibacteriano frente a la bacteria *Escherichia coli*.

El extracto acuoso por infusión de zarzaparrilla; presentó efecto bactericida que fueron a las concentraciones de 100ug/mL, 50ug/mL y 25ug/mL, en las que se determinó halos promedios de 22mm (100ug/mL), 18,5mm (50ug/mL) y 10mm (25ug/mL) significando así que el extracto tiene efecto antimicrobiano a una concentración de 100ug/mL y 50ug/mL; dichos resultados fueron basados en intervalos estandarizados.

**PALABRAS CLAVES:** Antibiograma, antimicrobiano, *Smilax officinalis L.*, halos, extracto.

## ABSTRACT

In the present investigation, the antimicrobial effect was determined in vitro from the extracts of zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" in colonies of *Escherichia coli*.

The collection of zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*", was carried out in the Department of Madre de Dios; identified by the Herbarium Arequipense (HUSA); aqueous extracts by maceration and infusion prepared with sarsaparilla Rhizome, the presence of terpenes, steroids, sugars, tannins and saponins which is attributed to those who underwent a phytochemical analysis, which determined in both extracts antimicrobial activity.

Once prepared the aqueous extracts and determined the presence of secondary metabolites, was serial dilutions to determine minimal inhibitory concentration, which represents the bacterial growth and the absence of turbidity represents microbial inhibition; the results observed was microbial inhibition to the concentration of 100ug/mL and 50ug/mL of the extract by maceration, however, extract by infusion produced inhibition at concentrations of 100ug/mL, 50ug/mL, 25ug/mL and 12,5ug/mL and can observe the absence of turbidity.

Minimum bactericidal concentration determination noted absence of microbial growth of *Escherichia coli* to 100ug/mL concentration which means that this concentration extract has bactericidal effect. However the extract by infusion presented effect bactericide to the concentrations of 100ug/mL, 50ug/mL and 25ug/mL; the concentration of 12,5ug/mL did not give bactericidal effect since there was growth of the micro-organism in the plates.

To determine the sensitivity or antimicrobial resistance the Kirby Bauer (Antibiogram) method was applied using the method of sowing area, was placed disks impregnated with aqueous extract prepared by maceration at 100ug/mL according to the bactericidal

minimum, obtaining an average 10mm halo, which means that the summary did not provide sensitivity or antibacterial effect against the bacterium *Escherichia coli*.

The aqueous extract by infusion of zarzaparrilla; this presented effect bactericide which were concentrations of 100ug/mL, 50ug/mL and 25ug/mL, which was determined halos averages of 22mm (100ug/mL), 18,5mm (50ug/mL) and 10mm (25ug/mL) meaning so extract has antimicrobial effect at 100ug/mL and 50ug/mL concentration; These results were based on standardized intervals.

**KEYWORDS:** Antibiogram, microbial, *Smilax officinalis L.*, Halos, extract.

**ÍNDICE**

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICO.....	xv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	xvii

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1. Descripción de la realidad problemática.....	1
1.2. Delimitaciones y definición del problema.....	2
1.2.1. Delimitaciones .....	2
1.2.2. Definición del problema .....	3
1.3. Formulación del problema .....	3
1.4. Objetivos de la investigación.....	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos .....	4
1.5. Hipótesis de la investigación.....	4
1.6. Variables e indicadores.....	5
1.7. Justificación de la investigación.....	6
1.8. Limitaciones de la investigación.....	7
1.9. Tipo y nivel de investigación.....	7
1.9.1. Tipo de investigación: .....	7
1.9.2. Nivel de investigación: .....	7
1.10. Método y diseño de la investigación.....	7
1.10.1. Métodos de la investigación .....	7
A. Métodos para el procesamiento del vegetal.....	7
B. Obtención del extracto de zarzaparrilla.....	11
C. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L</i> ”.....	14
D. Aislamiento y selección de <i>Escherichia coli</i> .....	20
E. Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	21
F. Determinación de la concentración bactericida mínima.....	22

G. Estandarización del inóculo: Kirby – Bauer.....	22
H. Preparación de los discos de sensibilidad.....	24
I. Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana.....	25
1.10.2. Diseño de la investigación.....	26
1.11. Técnicas e instrumentos de recolección de información.....	26
1.11.1. Técnicas .....	26
1.11.2. Instrumentos .....	26
1.12. Cobertura de estudio.....	27
1.12.1. Universo.....	27
1.12.2. Muestra.....	27

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos.....	28
2.2. Marco conceptual.....	31
2.2.1. Zarparrilla, <i>Smilax officinalis</i> L.....	31
A. Descripción botánica.....	31
B. Descripción Taxonómica.....	31
C. Nombres vulgares.....	32
D. Descripción morfológica.....	32
E. Distribución.....	34
F. Composición química.....	34
G. Etnomedicina.....	34
H. Otros usos.....	35
2.2.2. Métodos de extracción de drogas .....	35
2.2.2.1. Técnicas de extracción sólido-líquido.....	37

2.2.3. Enterobacterias.....	39
2.2.4. <i>Escherichia coli</i> .....	40
A. Descripción.....	40
B. Taxonomía.....	40
C. Aspectos epidemiológicos.....	41
D. Patogénesis.....	42
E. Manifestaciones.....	43
F. Diagnóstico.....	43
G. Tratamiento.....	44

### CAPÍTULO III

#### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Población y muestra.....	45
3.2. Tamaño de la muestra representativa.....	45
3.3. Análisis e interpretación de resultados.....	46
3.3.1. Ensayos fisicoquímicos del rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	50
3.3.2. Ensayo fitoquímico cualitativo del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax     officinalis L.</i> ”.....	48
3.3.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	50
3.3.4. Determinación de Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	53
3.3.5. Prueba de susceptibilidad de los extractos acuosos de zarzaparrilla “ <i>Smilax     officinalis L.</i> ”.....	55

**CAPÍTULO IV****CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

4.1. Conclusiones.....	60
4.2. Recomendaciones.....	62
Bibliografía.....	63
Anexos.....	66
Glosario de términos.....	93

**ÍNDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo I:</b> Constancia de determinación de muestra vegetal.....	66
<b>Anexo II:</b> Certificado de cepa ATCC .....	67
<b>Anexo III:</b> Medios de cultivo.....	69
<b>Anexo IV:</b> Medios de diferenciación bioquímica.....	71
<b>Anexo V:</b> Pruebas bioquímicas.....	78
<b>Anexo VI:</b> Diferenciación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> .....	83
<b>Anexo VII:</b> Inhibición con discos de antibiótico en colonias de <i>Escherichia coli</i> .....	84
<b>Anexo VIII:</b> Valores de significancia del extracto de infusión y antibióticos (prueba t de student).....	85
<b>Anexo IX:</b> Equipos de laboratorio utilizados para investigación.....	87
<b>Anexo X:</b> Figuras del proceso de investigación.....	88
<b>Anexo XI:</b> Estándar de discos de sensibilidad antimicrobiana.....	90
<b>Anexo XII:</b> Fichas para recolección de datos.....	91

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1:** Definición conceptual y operacional de las variables.....4

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Recolección de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	8
<b>Figura 2:</b> Deseccación del rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	9
<b>Figura 3:</b> Trituración del rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	9
<b>Figura 4:</b> Pesado del rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” .....	12
<b>Figura 5:</b> Obtención del filtrado de rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	12
<b>Figura 6:</b> Rizoma triturado de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	13
<b>Figura 7:</b> Infusión de rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	13
<b>Figura 8:</b> Identificación de Terpenos.....	14
<b>Figura 9:</b> Reacción de Fehling.....	15
<b>Figura 10:</b> Reacción de Shinoda.....	16
<b>Figura 11:</b> Identificación de Taninos.....	17
<b>Figura 12:</b> Identificación de Alcaloides.....	18
<b>Figura 13:</b> Identificación de Saponinas.....	19
<b>Figura 14:</b> <i>Escherichia coli</i> en Agar Mac Conkey.....	20
<b>Figura 15:</b> Diluciones seriadas del extracto acuoso de zarzaparrilla.....	21
<b>Figura 16:</b> Diseminación de inóculo con espátula de digralsky.....	22
<b>Figura 17:</b> Escala de McFarland .....	23
<b>Figura 18:</b> Preparación de discos de sensibilidad.....	24
<b>Figura 19:</b> Planta de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” .....	33
<b>Figura 20:</b> Rizoma de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	33

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Halos de inhibición promedio producidos por diferentes concentraciones de principio activo sobre colonias <i>Escherichia coli</i> .....	62
<b>Gráfico 2:</b> Halos de inhibición promedio producidos por diferentes principios activos sobre colonias <i>Escherichia coli</i> . ....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Determinación de humedad.....	50
<b>Tabla 2:</b> Determinación de cenizas.....	50
<b>Tabla 3:</b> Descripción organoléptica de los extractos de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	51
<b>Tabla 4:</b> Determinación de los parámetros físicos del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” preparado por maceración.....	51
<b>Tabla 5:</b> Identificación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ”.....	53
<b>Tabla 6:</b> Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” obtenido por maceración.....	54
<b>Tabla 7:</b> Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” obtenido por infusión.....	56
<b>Tabla 8:</b> Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” obtenido por maceración.....	57
<b>Tabla 9:</b> Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” obtenido por infusión.....	58
<b>Tabla 10:</b> Determinación de la sensibilidad microbiana del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” obtenido por maceración en colonias de <i>Escherichia coli</i> .....	60
<b>Tabla 11:</b> Determinación de la sensibilidad microbiana del extracto acuoso de zarzaparrilla “ <i>Smilax officinalis L.</i> ” obtenido por infusión en colonias de <i>Escherichia coli</i> .....	61

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana, es un fenómeno previo al descubrimiento y uso médico de los antibióticos, generado principalmente por el uso indiscriminado e inapropiado de éstos. La prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, mientras que el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que los controlen es cada vez más lenta, lo que constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial.

Uno de los principales organismos de interés médico es la *Escherichia coli*, la cual puede producir múltiples enfermedades como son las infecciones gastrointestinales, infecciones de vías urinarias, meningitis y sepsis.

En los últimos años las plantas medicinales como la zarzaparrilla, son aprovechadas popularmente por la población, gracias a las propiedades terapéuticas que se le atribuye.

La zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" es una planta medicinal, distribuida en diferentes países del mundo con regiones tropicales. Es oriunda de América y Europa conocida por sus propiedades curativas y terapéuticas. En el Perú "*Smilax officinalis L.*", se encuentra distribuida en suelos ligeramente húmedos los cuales podemos encontrarlos

en la amazonia peruana en los departamentos de Madre de Dios, Ucayali, Loreto, Amazonas, San Martín, a una altitud entre 215 y 2300 m.s.n.m.

En el Perú, se usa la zarzaparrilla de forma popular en forma de maceración o infusión; para ello se utiliza el rizoma de zarzaparrilla. Los usos medicinales más comunes de esta planta son, en caso de artritis, reumatismo, calambres, adormecimientos, asma, inflamaciones, infecciones urinarias, infecciones intestinales, cistitis, amibiasis, cólicos, entre otros. Con el presente trabajo se pretende demostrar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto acuoso de rizoma de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" en colonias de *Escherichia coli*.

El presente trabajo de investigación está estructurado de la siguiente manera:

En el primer capítulo, se presenta los métodos e instrumentos a usar en la investigación.

En el segundo capítulo, se desarrolla el marco teórico y antecedentes investigativos del estudio.

En el tercer capítulo se expone los resultados en tablas, cuadros, gráficos, que resumen el trabajo de investigación. Asimismo, en el cuarto capítulo se menciona las conclusiones y recomendaciones del trabajo referido.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

#### 1.1. Descripción de la realidad problemática

En la actualidad podemos observar con frecuencia que los antimicrobianos han disminuido su eficacia contra bacterias patógenas, debido a la resistencia antimicrobiana la cual se debe a tratamientos incompletos y automedicación.

La resistencia a los antibióticos se refleja principalmente en los índices de mortalidad y mayor tiempo de hospitalización (morbilidad). En los últimos años se ha puesto interés al empleo de las plantas medicinales, con la finalidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos frente a la *Escherichia coli*, que es una bacteria que se caracteriza por producir infecciones urinarias, pudiendo ser mortal en algunos pacientes, debido a la resistencia que presentan frente a los antibióticos convencionales.

También se conoce que los medicamentos convencionales, pueden tener reacciones adversas peligrosas, numerosas contraindicaciones e interacciones de cuidado, dado que existen casos en los que se debe evaluar el riesgo beneficio y por último pero no menos importante que las demás, es el acceso por

parte de la población de escasos recursos en zonas alejadas y la difícil obtención de los medicamentos, ya que por lo general estos son de costo elevado por encontrarse en esas zonas.

## **1.2. Delimitaciones y definición del problema**

### **1.2.1. Delimitaciones**

#### **A. Delimitación espacial:**

El presente estudio se ejecutó en los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas - Filial de Arequipa.

#### **B. Delimitación temporal:**

El presente estudio fue realizado entre los meses de mayo a julio del 2016.

#### **C. Delimitación social:**

Esta investigación está dirigida a la población en general promoviendo el uso de la fitoterapia para beneficiar a la población afectada por patologías asociadas al agente infeccioso *Escherichia coli*.

#### **D. Delimitación conceptual:**

##### **1. Área:**

Ciencias de la salud

##### **2. Campo:**

Farmacia y Bioquímica

##### **3. Línea:**

Fitoterapia y microbiología

##### **4. Tema general:**

Efecto antimicrobiano de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" en colonias de *Escherichia coli*.

## 5. Tema específico:

Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos acuosos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" en colonias de *Escherichia coli*, Arequipa 2016.

### 1.2.2. Definición del problema

La *Escherichia coli* es un agente infeccioso, gram negativo que suele hospedarse en diferentes órganos del ser humano principalmente en las vías urinarias afectando directamente a los riñones. El presente trabajo fue elaborado para dar una alternativa fitoterapéutica a infecciones producidas por *Escherichia coli* principalmente a las infecciones urinarias; que pueden producir problemas renales, llegando a ser mortal.

### 1.3. Formulación del problema

¿Qué efectos tendrán los extractos acuosos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" sobre colonias de *Escherichia coli*?

¿Existen metabolitos secundarios en los extractos acuosos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*"?

¿A qué concentración tendrá efecto antimicrobiano los extractos acuosos de zarzaparrilla sobre las bacterias de *Escherichia coli*?

¿A qué concentración tendrá efecto bactericida los extractos acuosos de zarzaparrilla sobre las bacterias de *Escherichia coli*?

¿Son efectivos los extractos acuosos de zarzaparrilla sobre las bacterias de *Escherichia coli*?

## 1.4. Objetivos de la investigación

### 1.4.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos acuosos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" en colonias de *Escherichia coli*.

### 1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar los metabolitos secundarios de los extractos acuosos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*".
- Definir la concentración inhibitoria mínima de los extractos acuosos, preparados por maceración e infusión del rizoma de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*".
- Determinar la concentración bactericida mínima de los extractos acuosos, preparados por maceración e infusión del rizoma de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*".
- Determinar la sensibilidad o resistencia de *Escherichia coli* frente a los extractos acuosos, preparados por maceración e infusión del rizoma de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" por el método de Kirby Bauer, antibiograma por difusión en medio sólido.

## 1.5. Hipótesis de la investigación

En vista que el rizoma de zarzaparrilla está compuesto por saponinas esteroidicas, saponocidos, estigmasterol, beta sitosterol, taninos, entre otros; es probable que los extractos acuosos de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*", tengan efecto antimicrobiano sobre colonias de *Escherichia coli*.

## 1.6. Variables e indicadores

**Cuadro 1:** Definición conceptual y operacional de las variables

Variable	Dimensión	Indicadores	Escala	Ítems	Unidad/ Categoría
Efecto antimicrobiano de los extractos de zarzaparrilla " <i>Smilax officinalis L.</i> "	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	0,4 – 100 ug/mL	Intervalo	3	Cuantitativa continua
	Concentración Bactericida Mínima (CBM)	30 – 300 UFC/mL	Intervalo		
	Kirby Bauer	6 – 30 mm	Intervalo		

**Fuente:** Elaboración propia

## 1.7. Justificación de la investigación

La *Escherichia coli* es una enterobacteria que posee una amplia virulencia; la mayor parte de las *Escherichia coli* causan enfermedades digestivas y extraintestinales, estos bacilos gramnegativos son los responsables de más del 70% de infecciones de las vías urinarias adquiridas en la comunidad y del mismo número infecciones hospitalarias. La mayor parte de las infecciones son endógenas, de tal forma que *Escherichia coli* de la microbiota normal del paciente consigue ocasionar infecciones cuando las defensas se alteran. Mientras que muchas bacterias pueden ser eliminadas rápidamente, existen también gran parte de microorganismos que se resisten; los cuales son capaces de producir infecciones sistémicas, con frecuencia son resistentes a los agentes bactericidas.<sup>1</sup>

Actualmente la resistencia a los fármacos se da por diversos factores como; uso irracional de medicamentos, tratamientos incompletos y automedicación. Debido a esto, las infecciones producidas por este microorganismo cada vez se hace más difícil combatirlas y a consecuencia de ello se ve afectado gran parte de la población femenina por diferentes causas externas.

La importancia de la investigación radica en experimentar el efecto antimicrobiano del extracto de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*", pudiendo ser una alternativa fitoterapéutica para el tratamiento de infecciones producidas por dicho patógeno. Al formar parte del reino vegetal y ser utilizado de forma natural, este estudio es relevante dentro del campo de la fitoterapia.

El uso de la terapia a base de plantas medicinales; constituye un campo de estudio interesante ya que se observa a menudo que los productos naturales utilizados, en su gran mayoría son seguros y eficaces.

---

<sup>1</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. 6<sup>ta</sup> edición. España: Editorial El Servier. 2009. pág. 303 - 304.

## 1.8. Limitaciones de la investigación

- La principal limitación fue el no contar con un rotavapor para poder realizar un estudio más amplio del efecto antimicrobiano de la zarzaparrilla en otros tipos de extractos orgánicos.

## 1.9. Tipo y nivel de investigación

### 1.9.1. Tipo de investigación:

Investigación de tipo experimental.

### 1.9.2. Nivel de investigación:

Campo aplicativo de laboratorio.

## 1.10. Método y diseño de la investigación

### 1.10.1. Métodos de la investigación

#### A. Métodos para el procesamiento del vegetal

##### 1. Recolección e identificación

La especie vegetal zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*", se recolectó del margen derecho de la vía interoceánica Perú - Brasil de la Amazonía de Madre de Dios distrito de Laberinto, Perú, la cual fue identificada por el Herbarium Arequipense (HUSA). <sup>(Anexo 1)</sup>

**Figura 1:** Recolección de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”



*Fuente:* Elaboración propia

## 2. Desinfección

La desinfección se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 5%; diluido en una proporción de 1/1000mL de agua sumergido durante 15 minutos, posteriormente colocados en papel craft para el oreado.

## 3. Estabilización

Se utilizó el método de inactivación enzimática, mediante calor seco a una temperatura de 60°C durante 48 horas. Para tal fin, se utilizó como instrumento una estufa marca Nahita Drying Oven Modelo 631/4 de laboratorio<sup>2</sup>.

## 4. Desección

Se utilizó el método por desecación artificial, utilizando una estufa al vacío con temperatura controlada, colocando el rizoma de la planta en el interior en unas bandejas la cual es utilizada para desecar a pequeña escala, en una temperatura de 25°C, durante 48 horas<sup>3</sup>. (Ver figura 2)

---

<sup>2</sup> Kuclinsky Cl. Farmacognosia “Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural”. 2<sup>da</sup> edición. Barcelona: Editorial Omega. 2006. Pág. 16.

<sup>3</sup> Kuklinsky Cl. Farmacognosia “Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural”. 2<sup>da</sup> edición. Barcelona: Editorial Omega. 2006. Pág. 15.

**Figura 2:** Deseccación del rizoma de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”



*Fuente: Elaboración propia*

## 5. Trituración

Se utilizó el método de molienda por trituración manual y mecánica, hasta obtener partículas uniformes. (Ver figura 3)

**Figura 3:** Trituración del rizoma de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”



*Fuente: Elaboración propia*

## 6. Determinación de Porcentaje de Humedad

**Método:** Gravimétrico

**Fundamento:** Se basa en la pérdida del peso de la muestra por evaporación del agua, un exceso de agua puede provocar el crecimiento microbiano, la presencia de hongos, insectos o el deterioro, seguido de la hidrólisis de los principios activos.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.140.

**Procedimiento:** Se pesó 10g material vegetal en una cápsula previamente tarada, se llevó a estufa y se sometió a temperatura de 80°C, hasta peso constante para determinar el contenido de humedad. La cápsula con el residuo se dejó en un desecador y luego se pesó. El peso del residuo final se utilizó para calcular el porcentaje de humedad.

**Cálculos:**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{cápsula} + \text{muestra}) - (\text{cápsula} + \text{residuo})}{(\text{cápsula} + \text{muestra}) + (\text{cápsula})} \times 100$$

**7. Determinación del Porcentaje de Cenizas**

**Método:** Gravimétrico por incineración.

**Fundamento:** Se basa en la destrucción de la materia orgánica al someter la muestra a elevadas temperaturas (500 a 600 ° C) hasta obtener cenizas completamente blancas; quedando como residuo la cantidad de componentes inorgánicos presentes en la muestra.<sup>5</sup>

**Procedimiento:** Se pesó 1g de muestra vegetal seca obtenida de la determinación de humedad y se colocó en crisol limpio y tarado.

Se llevó a mufla y se sometió a 550 ° C por una hora aproximadamente hasta observar la aparición de cenizas blancas. Se dejó enfriar llevando al desecador, luego se pesó. El peso del residuo se utilizó para calcular el porcentaje de cenizas.

**Cálculos:**

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{crisol} + \text{cenizas})}{(\text{crisol} + \text{muestra}) - \text{crisol}} \times 100$$

---

<sup>5</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.139.

## B. Obtención del extracto de zarzaparrilla

### 1. Método: Maceración

**Fundamento:** La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial.<sup>6</sup>

#### 1.1. Procedimiento:

##### a) Maceración de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" al 40%

Se pesó 40 gr. del rizoma de zarzaparrilla debidamente triturado, luego se introdujo en un recipiente de vidrio color ámbar. Agregando 100mL de agua destilada. (Ver Figura 4)

Se llevó a maceración durante siete días y en constante agitación durante el proceso. Pasados los siete días, se tomó un recipiente de vidrio, embudo y papel filtro para realizar la separación de la maceración mediante un filtrado, obteniendo la parte del extracto líquido que contiene los principios activos. (Ver Figura 5)

Se procede a verter en un recipiente ámbar y rotular.

---

<sup>6</sup> Kuklinsky Cl. Farmacognosia "Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural". 2<sup>da</sup> Edición. Barcelona: Editorial Omega. 2006. Pág. 34.

**Figura 4:** Pesado del rizoma de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”



**Fuente:** Elaboración propia

**Figura 5:** Obtención del filtrado de rizoma de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”



**Fuente:** Elaboración propia

## 2. Método: Infusión

**Fundamento:** Es un método que consiste en la separación de principio activo de drogas, por acción del aumento de temperatura del disolvente empleado, logrando eliminar proteínas y enzimas que ayudan a la fermentación.<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup> Kuklinsky CI, Farmacognosia “Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural”, 2<sup>da</sup> Edición, Barcelona, Editorial Omega, 2006, Pág. 35.

## 2.1. Procedimiento

### a) Infusión de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" al 40%

Se pesó 40 gr. del rizoma de zarzaparrilla debidamente triturado, luego se colocó a vaso de precipitado. (Ver Figura 6)

Paralelamente se puso agua en un vaso de precipitado hasta que alcance temperatura próxima a ebullición, se trasvasó 100 mL de agua sobre el recipiente que contenía la droga vegetal y se cubrió con una luna de reloj durante un periodo de 15 minutos. (Ver Fig. 7)

Pasados los 15 minutos se tomó un recipiente de vidrio, embudo y papel filtro para realizar la separación de la infusión mediante un filtrado, obteniendo la parte del extracto líquido que contiene los principios activos.

Se procedió a verter en un recipiente ámbar a rotular.

**Figura 6:** Rizoma triturado de Zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*"



**Fuente:** Elaboración propia

**Figura 7:** Infusión de rizoma de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*"



**Fuente:** Elaboración propia

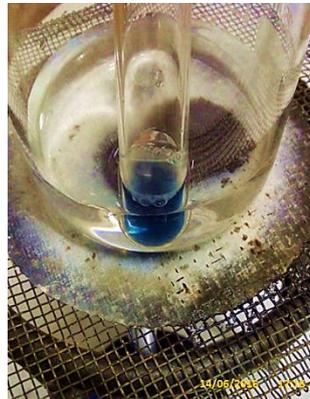
**C. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”**

**1) Identificación de Terpenos y esteroides (Liebermann- burchard)**

**Fundamento:** La prueba de Liebermann y Burchard es un ensayo utilizado para una prueba colorimétrica para detectar terpenos, lo que da un color azul intenso. Se debe a que el grupo hidroxilo (-OH) del terpeno que reacciona con los reactivos y el aumento de la conjugación de la saturación en el anillo fusionado.<sup>8</sup>

**Procedimiento:** Se tomó 2 mL de extracto en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en baño maría y el residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1mL de anhídrido acético y se mezcló vigorosamente. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2 o 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido a color verde, azul verdoso (vira rojo o azul). (Ver Figura 8)

**Figura 8:** Identificación de Terpenos



*Fuente: Elaboración propia*

**2) Identificación de Azúcares Reductores:**

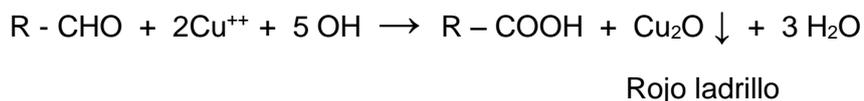
**Reacción con Reactivo de Fehling:**

**Fundamento:** Se fundamenta en la reducción del ión  $\text{Cu}^{++}$  en medio alcalino, por parte de los azúcares reductores, que se aprecia por la formación de un precipitado rojo ladrillo. La solución de sulfato cúprico

<sup>8</sup> Wade JR. Química Orgánica. 5ta Edición. España: Editorial Pearson Prentice Hall. 2004. Pág. 1127.

se comporta como una solución de Oxido cúprico (CuO), el cual oxida el azúcar y se reduce a Oxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O), que es un precipitado color rojo ladrillo.<sup>9</sup>

### Reacción Química



**Procedimiento:** Se midió 1mL de solución A con 1mL de solución B del Reactivo de Fehling en un tubo de ensayo, se mezcló con 1mL de extracto disuelto y se calentó a baño maría. La aparición de un precipitado color rojo ladrillo indica que la reacción es positiva. (Ver Figura 9)

**Figura 9:** Reacción de Fehling



*Fuente: Elaboración propia*

### 3) Identificación de Flavonoides

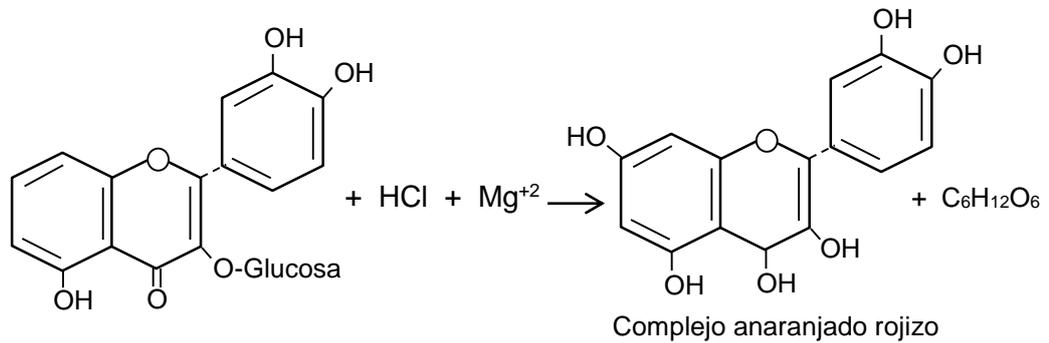
#### Reacción de Shinoda

**Fundamento:** Se basa en la formación de quelatos entre flavonoides y el magnesio metálico, dando lugar a la aparición de diferentes coloraciones que dependen de la estructura química del flavonoide presente.<sup>10</sup>

<sup>9</sup> Wade JR. Química Orgánica. 5ta Edición. España: Editorial Pearson Prentice Hall. 2004. Pág. 1073.

<sup>10</sup> Wade JR. Química Orgánica. 5ta Edición. España: Editorial Pearson Prentice Hall. 2004. Pág. 1074.

### Reacción Química



**Procedimiento:** En un tubo de ensayo se colocó 1mL de extracto, se agregó un trozo de cinta de Magnesio metálico y gotas de ácido clorhídrico concentrado hasta reacción completa. La aparición de color indica la presencia de Flavonas, Flavonoles (amarillo a rojo), Flavonoles (rojo a magenta), Flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul); las isoflavonas, chalconas y auronas no dan coloración. (Ver Figura 10)

**Figura 10:** Reacción de Shinoda



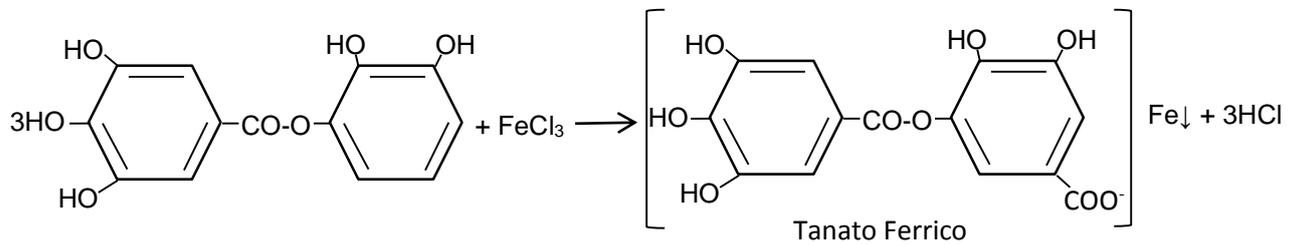
*Fuente: Elaboración propia*

#### 4) Identificación de Taninos con Cloruro Férrico

**Fundamento:** Se fundamenta en que al reaccionar los taninos con el  $\text{FeCl}_3$  van a formar complejos de  $\text{Fe}^{+3}$  produciendo diferentes coloraciones (verde a azul) dependiendo de los taninos presentes en el tubérculo a investigar formándose así el Tanato Férrico.<sup>11</sup>

<sup>11</sup> Wade JR. Química Orgánica. 5ta Edición. España: Editorial Pearson Prentice Hall. 2004. Pág. 1089.

### Reacción Química



**Procedimiento:** En un tubo de ensayo, se agregó 1mL de extracto, se le añadió 0.5ml de solución de  $\text{FeCl}_3$  5% hasta la formación de complejos coloreados (color verde oscuro indica presencia de taninos catéquicos, mientras que la coloración azul indica presencia de taninos gálicos). (Ver Figura 11)

**Figura 11:** Identificación de taninos



**Fuente:** *Elaboración propia*

## 5) Identificación de Alcaloides

### Reacción de Dragendorff

**Fundamento:** Se basa en la reacción de los alcaloides en medio alcalino, para dar lugar a la formación de sales insolubles, las cuales se evidencian por la presencia de precipitados anaranjados.<sup>12</sup>

<sup>12</sup> Wade JR. Química Orgánica. 5ta Edición. España: Editorial Pearson Prentice Hall. 2004. Pág. 1066.

### Reacción Química

- $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 + 3\text{KI} \rightarrow \text{BiI}_3 + 3\text{KNO}_3$   
Trinitrato de Bismuto
- $\text{BiI}_3 + \text{KI} \rightarrow \text{K}(\text{BiI}_4)$   
Tetrayodo Bismutato de Potasio
- $\text{K}^+(\text{BiI}_4)^- + \text{H}_3\text{NRCl}^- \rightarrow (\text{BiI}_4)\text{H}_3\text{NR}\downarrow + \text{KCl}$   
Alcaloide                      Tetrayodo Bismutato de alcaloide

**Procedimiento:** En un tubo de ensayo se adicionó 1mL de extracto, después se agregó gota a gota el Reactivo de Dragendorff. Si se observa la formación de un precipitado naranja, indica la presencia de Alcaloides y compuestos nitrogenados. (Ver figura 12)

**Figura 12:** Identificación de alcaloides



**Fuente:** Elaboración propia

## 6) Identificación de Saponinas

### Determinación del índice de Espuma o afrosimétrico:

**Procedimiento:** En un tubo de ensayo de igual diámetro, se colocó en orden progresivo de 1 a 10mL del extracto acuoso, completando la diferencia con agua destilada hasta 10mL. Esto quiere decir que en el primer tubo donde se colocó 1mL de solución de saponinas se completará con 9mL de agua destilada y en el segundo tubo donde se colocaron 2mL de solución de saponinas van 8mL de agua destilada y así sucesivamente.<sup>13</sup>

Agitar vigorosamente durante un minuto cada tubo y dejar reposar por treinta minutos. Finalmente, observar cuál de los 10 tubos de ensayo presenta 1cm de espuma. (Ver Figura 13)

**Figura 13:** Identificación de saponinas



**Fuente:** *Elaboración propia*

---

<sup>13</sup> Miranda M. Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.139.

## D. Aislamiento y selección de *Escherichia coli*

### 1) Preparación de Agar Mac conkey

- Se suspendió 5g del medio Macconkey en 100 mL de agua destilada. Se calentó con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a una temperatura entre 45 - 50°C.

### 2) Sembrado de *Escherichia coli*

#### Procedimiento:

- Se sembró la muestra de *Escherichia coli*, en placa de agar MacConkey y sembrándose en zig –zag.
- Se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas para su incubación.
- Las colonias se percibieron de color rosado que indican que la bacteria *Escherichia coli* es fermentadora de lactosa.
- Al sembrar *Escherichia coli* se produce ácido debido a que degrada la lactosa ocasionando el viraje del indicador rojo neutro a un color rosáceo.

**Figura 14:** *Escherichia coli* en Agar Mac Conkey



**Fuente:** *Elaboración propia*

### E. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Se preparó una suspensión del germen problema procedente de un cultivo de 24 horas, se ajustó esa suspensión con el 0,5 de la escala turbidimétrica de McFarland equivalente a  $10^8$  UFC por ml.

Se realizó una dilución posterior 1:100 para obtener una concentración  $10^6$  UFC/mL.

Se realizaron diluciones seriadas del antimicrobiano a probar desde 100 ug/mL hasta 0,4 ug/mL en una serie de diez tubos que contenían igual cantidad de caldo de enriquecimiento. El tubo número diez no posee antimicrobiano y sirve como control de crecimiento. (Ver Figura 21)

Se agregó 1ml de la suspensión microbiana con  $10^6$  UFC/ml a la serie de diez tubos y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 – 24 horas.

Una vez transcurrido el lapso de tiempo se procedió a observación a simple vista de los tubos y la interpretación de los resultados obtenidos.<sup>14</sup>

**Figura 15:** Diluciones seriadas del extracto acuoso de zarzaparrilla



**Fuente:** Elaboración propia

<sup>14</sup> Negroni M. Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica. 2<sup>da</sup> edición. Argentina: Editorial medica panamericana. 2009. pág. 562 – 564.

## F. Determinación de la concentración bactericida mínima

Se tomó un inóculo de 0,1mL del tubo testigo inmediatamente después de ser sembrado y se disemina con espátula de digralsky sobre una placa de Mueller-Hinton, incubar durante 18 horas. (Ver Figura 22)

Trascurrido dicho tiempo, se determinó el número real de UFC del inóculo para obtener un resultado con precisión estadística suficiente se aplica la siguiente formula:

$$CBM = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias obtenidas por el factor de dilucion}}{\text{ml sembrados en la placa}}$$

De cada uno de los tubos con caldo que no presentaron turbidez luego de la incubación, se sembró 0,1mL en placas de Mueller-Hinton, se incubo durante 18 horas. <sup>15</sup>

**Figura 16:** Diseminación de inóculo con espátula de digralsky



**Fuente:** Elaboración propia

## G. Estandarización del inóculo: Kirby – Bauer<sup>16</sup>

Se utilizó la escala turbidimétrica, se enumeraron según la concentración de microorganismos que se requiera, por lo tanto el inóculo se ajusta al patrón de referencia por medio de comparación

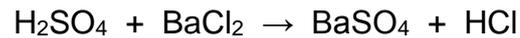
<sup>15</sup> Negroni M. Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica. 2<sup>da</sup> edición. Argentina: Editorial medica panamericana. 2009. pág. 564.

<sup>16</sup> Granados R, Villaverde C. Microbiología, Bacteriología medios de cultivo y pruebas bioquímicas micología general parasitología general. España: Editorial Paraninfo. 1998. pág. 157.

visual aproximada, o por espectrofotometría haciendo coincidir la absorbancia o turbidez.

La escala utilizada y aceptada mundialmente es la escala de McFarland en la que se origina una turbidez debida a la reacción de ácido sulfúrico con cloruro bórico que forma un precipitado blanco de sulfato de bario.

**Formula:**



**Escala de McFarland**

**Procedimiento:**

- Se sembró cinco colonias iguales en 5 mL de solución salina y se incubó a 37°C durante 2 – 6 horas, hasta que se produzca una ligera opacidad.
- Se ajustó visualmente con solución salina hasta una turbidez igual a la que presenta la mitad del estándar número uno de McFarland.
- Este estándar se preparó añadiendo 0,5 mL de cloruro bórico 0,048M a 99,5 mL de ácido sulfúrico 0,18M. (Ver Figura 23)

**Figura 17:** Escala de McFarland



**Fuente:** Elaboración propia

## H. Preparación de los discos de sensibilidad

### Procedimiento:

- Los discos de sensibilidad utilizados en antibiograma son de papel whatman N° 5, el cual es usado y estandarizado por la NCCLS (Clinical And Laboratory Standards Institute). Los discos de sensibilidad tienen un diámetro de 6mm.
- Para la preparación de discos de sensibilidad, se impregnaron en los discos estériles la solución del agente antimicrobiano (extracto), el cual se realizó de forma manual con la ayuda de una micropipeta. Inoculando de 10uL. (Ver Figura 24)
- Los discos fueron registrados de acuerdo al tipo de extracto y concentración del mismo, fueron colocados en placas estériles para su absorción del extracto durante unos minutos.
- El almacenamiento de los discos de sensibilidad se realizó a una temperatura controlada entre 4 – 8°C.<sup>17</sup>

**Figura 18:** Preparación de discos de sensibilidad



**Fuente:** Elaboración propia

<sup>17</sup> Stephen J, Marie B. Manual de Suceptibilidad Antimicrobiana. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washintong Seatle. 2005. page. 39.

## I. Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana

### Antibiograma por difusión en medio sólido<sup>18</sup>

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

#### Procedimiento:

- Se preparó el medio de cultivo Mueller – Hinton, por ser el medio que ofrece una composición homogénea en todos los lotes, y gran reproductibilidad, no presenta efectos antagónicos y permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.
- Se preparó el inóculo según el estándar 0,5 de la escala McFarland.
- Se depositó en placas Petri el medio de cultivo con un espesor de 4 mm.
- Se sembró e inóculo por la técnica de Kirby – Bauer, se dejó secar durante 4 – 5 minutos antes de colocar los discos de sensibilidad.
- Se implantan los discos que son de papel whatman N° 5, impregnados con el agente antimicrobiano. Su diámetro es de 6 mm y tienen una concentración de agente antimicrobiano que está perfectamente estandarizada según las recomendaciones de la FDA (Federación de Drogas y Alimentos) o la OMS (Organización Mundial de la Salud).

---

<sup>18</sup> Granados R, Villaverde C. Microbiología, Bacteriología medios de cultivo y pruebas bioquímicas micología general parasitología general. 1<sup>ra</sup> edición. España: Editorial Paraninfo. 1998. pág. 162.

- La actividad del agente antimicrobiano se comprobó mediante la medición del halo formado o la ausencia de este, se clasifica como resistente, moderado/intermedio, sensible.

### **1.10.2. Diseño de la investigación**

La investigación corresponde al diseño experimental por el método de Concentración mínima inhibitoria (CIM), Concentración mínima bactericida (CBM) y antibiograma por difusión en medio solido (extracto de zarzaparrilla a distintas concentraciones), un control negativo (discos en blanco).

## **1.11. Técnicas e instrumentos de recolección de información**

### **1.11.1. Técnicas:**

Observación directa de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM).

La técnica para recolectar la información de la sensibilidad antimicrobiana se realizó por el método; antibiogramas por difusión en medio sólido.

### **1.11.2. Instrumentos:**

Como instrumento para la recolección de datos se utilizó fichas de recolección de datos. (Ver anexo XII)

Para la medición de los halos se utilizó una regla milimetrada, cámara fotográfica, escala de MacFarland.

## **1.12. Cobertura de estudio**

### **1.12.1. Universo:**

El universo o población es la totalidad del fenómeno a estudiar que posee características comunes, para lo cual será el género "*Smilax*"

### **1.12.2. Muestra:**

La muestra de estudio fue el rizoma de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" utilizado en la investigación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

##### 2.1.1. Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Zingiber officinalis roscoe* (Jengibre) obtenido por extracción con fluidos supercríticos, Arequipa 2013.

**Autor:** Vanessa N. Vargas Aguilar

**Institución:** Universidad Católica de Santa María

**Año:** 2013

#### **Resumen:**

En el trabajo de investigación, se evaluó el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Zingiber officinale roscoe* "jengibre" obtenido por extracción con fluidos supercríticos. La determinación de la concentración inhibitoria mínima para *Escherichia coli* no tuvo diferencia significativa para ambos extractos (probabilidad = 0.333); por tanto ambos extractos producen un mismo efecto antimicrobiano.

**2.1.2. Determinación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” de la *Annona muricata* guanábana sobre bacterias gram negativas encontradas en infecciones urinarias, obtenidas en los Hospitales del Departamento de Arequipa, 2003.**

**Autor:** Charles H. Arce Yáñez, Christian Ortega Ortega.

**Institución:** Universidad Católica de Santa María.

**Año:** 2004

**Resumen:**

En el trabajo de investigación realizaron la evaluación de la actividad antibacteriana de la *Annona muricata* sobre bacterias gram negativas, dichas cepas fueron proporcionadas por el Hospital Goyeneche y ESSALUD de la ciudad de Arequipa; se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto seco por el método de dilución en caldo. La determinación de la CMI para la bacteria de *Escherichia coli* fue 31,25 mg/mL, la CMI de la bacteria *Citrobacter freundii* fue 62,5 mg/mL, la CMI de *Klebsiella sp.* Fue 125mg/mL, la CMI de *Proteus mirabilis* fue 15,25 mg/mL.

**2.1.3. Producción, caracterización y formulación de un extracto de zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willd., *Smilacaceae*).**

**Autor:** Ana Cristina Hentze Móvil

**Institución:** Universidad de San Carlos de Guatemala

**Año:** 2012

**Resumen:**

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo producir, caracterizar y formular un producto a base de rizoma de *S. domingensis* para mejorar el rendimiento físico. Se utilizaron los métodos de reperlación, concentración y secado para extraer los metabolitos secundarios de interés, entre ellos los flavonoides y las saponinas esteroidales y se obtuvo como producto final un extracto seco (4:1). Se realizaron análisis fisicoquímicos, fitoquímicos y microbiológicos y se prepararon cápsulas de gelatina de 300 mg. Se escogió esta forma

farmacéutica por su uso común y su aceptación entre las personas. El producto Fitoterapéutico obtenido se evaluará en futuras investigaciones para determinar su actividad ergogénica. Las cápsulas de zarzaparrilla contienen una gran cantidad de flavonoides, lo que les confiere propiedades antioxidantes. La presencia de saponinas esteroidales les otorga también propiedades estimulantes y tónicas y en conjunto, pueden ayudar a incrementar la condición física en las personas.

**2.1.4. Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major L*, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica.**

**Autor:** Verónica Alvarado Villanueva

**Institución:** Universidad Mayor de San Marcos

**Año:** 2010

**Resumen:**

La investigación determinó la actividad antibacteriana de tres extractos hidroalcohólicos de *Plantago major L*, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis*; sobre patógenos de importancia estomatológica; *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*. El estudio se realizó a diferentes concentraciones de 25ul/mL y 50ug/mL, presentando actividad antibacteriana frente a estos microorganismos.

**2.1.5. Efecto del extracto hidroalcohólico de la *Tropaeolum tuberosum* “*mashua ó añu*” *in vitro* frente a microorganismos Uro patógenos”.**  
**Arequipa – 2006**

**Autor:** Nilda E. Bornaz Urquiza.

**Institución:** Universidad Católica de Santa María

**Año:** 2007

### Resumen:

El presente trabajo de Investigación se determinó la actividad antibacteriana del Extracto Hidroalcohólico de *Tropaeolum tuberosum* “*Mashua*” sobre microorganismos uropatógenos. Para ello se emplearon los tubérculos previamente seleccionados y desecados, cuyo producto seco fue sometido a un proceso de extracción por percolación ó lixiviación con etanol de 35° G.L., obteniéndose el Extracto Hidroalcohólico con un porcentaje de rendimiento de 17.86%. Las reacciones químicas para el reconocimiento de las funciones orgánicas en el Extracto Hidroalcohólico han demostrado la presencia de Compuestos fenólicos, Flavonoides, Saponinas, Azucares Reductores, Alcaloides y Glicósidos.

## 2.2. Marco conceptual

### 2.2.1. Zorzaparrilla, *Smilax officinalis* L.

#### A. Descripción botánica

La zorzaparrilla es un arbusto, cuyo nombre botánico es derivado del griego smile, raspado, hace alusión a la aspereza del tallo de algunas especies. Como toda lileacea se reconocen por sus flores de seis piezas perianticas, por lo general petaloides y seis estambres, con ovario supero compuesto por tres carpelos y la placentación axilar.

#### B. Descripción Taxonómica

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Liliopsida
Subclase	: Liliidae
Orden	: Liliales
Familia	: Liliaceae
Género	: <i>Smilax</i>
Especie	: <i>Smilax officinalis</i> L. <sup>19</sup>

<sup>19</sup> Mariño L. Departamento Académico de Biología – Herbarium Arequipense (HUSA).

### C. Nombres vulgares

Conocida con nombres comunes como: zarzaparrilla, zarza morisca, uva de perro, salsaparilla, salsapariglia, nannari, mermasangre.

### D. Descripción morfológica

- 1) **Raíz:** Son nudos largos por lo general, redondas o algo angulosas, se rompen con dificultad, pero tienden a henderse, su superficie presenta estrías y surcos longitudinales y de color gris rojizo. La sección transversal presenta una zona periférica separada de la parte leñosa por una serie de células agrupadas, triangulares o cuadrangulares, de color pardo. La corteza está formada por dos zonas de células de las cuales la parte interna es más rica en fécula y menos compacta. El leño es de color blanco amarillento, fibroso, sin radios medulares; la medula es blanca y menos gruesa.<sup>20</sup>
- 2) **Tallo:** El subterráneo es el rizoma, nudoso y leñoso, con prolongaciones aéreas, aspera, leñosas, flexibles, ramificadas, trepadoras, enredadera, con nudos y zarcillos axilares. Espinas en las ramas en forma de ganchos.
- 3) **Hojas:** Alternas, pecioladas, simples, acuminadas, cordiformes, lanceoladas, penninervadas, asperas, con haz de color verde oscuro y lustroso envés verde claro con nervadura pronunciada y caducifolia.
- 4) **Flores:** Inflorescencia de ocho a diez flores. De seis piezas perianticas, seis estambres, inflorescencia en racimos y axilares, hermafroditas y unisexuales, actinomorfas, pequeña. Cáliz con tres andreceo con seis estambres libres. Gineceo con ovario ínfero: unicarpelar, unilocular, uniovular.<sup>21</sup>
- 5) **Frutos:** Son bayas pequeñas con una sola semilla.

---

<sup>20</sup> Albareda J. M. Medicamenta Guía Teórico – Práctica para Farmacéuticos y Médicos. 6<sup>ta</sup> edición. Barcelona: Editorial Labor S.A. 1982. pág. 1415.

<sup>21</sup> Vicuña Z. Inventario de Plantas Medicinales del Tahuantinsuyo 1<sup>ra</sup> Edición. Perú: Editorial Cecys. 2011. Pág. 1298

**Figura 19:** Planta de Zarzaparrilla *Smilax officinalis* L.



*Fuente: Elaboración Propia*

**Figura 20:** Rizoma de Zarzaparrilla "*Smilax officinalis* L."



*Fuente: Elaboración Propia*

## E. Distribución

Con el nombre de zarzaparrilla se designan más de 200 especies del género *Smilax*, repartidas por las regiones cálidas y húmedas de la superficie terrestre, se sabe que sus estructuras son distintas, aunque poseen efectos similares. Suelen recibir el nombre de su lugar de origen cómo zarzaparrilla de México, del Perú, del Brasil, de Europa.

## F. Composición química

El rizoma de zarzaparrilla está compuesto por saponinas esteroideas; como la esnilasaponina, sarsaponina, parigyna, salesparina, esnilagenina, saponocidos y espirosan-saponoglicosidos; ftosteroles como ftosterol, estigmasterol y el beta sitosterol, principios amargos denominados esmilacina, aceite graso, resina, taninos, almidón y azucares.<sup>22</sup>

## G. Etnomedicina

La zarzaparrilla puede presentar diferentes aplicaciones farmacológicas. Las principales acciones reconocidas para saponinas de diversas especies son:

Acción irritante de las células, efecto anti edematoso y antiinflamatorio, acción antihemorroidal y cicatrizante, acción adaptógena, efecto antimicrobiano, antivírico, antimicótico y molusquicida. Las saponinas se utilizan como expectorantes, diuréticas y venotrópas.

Antes de nuestros tiempos, la zarzaparrilla ya era utilizada por los indígenas de Centroamérica, para el tratamiento de la impotencia sexual, reumatismo, enfermedades de la piel y como tónico para la debilidad física. Dioscórides, en su obra de materia médica hablaba de las propiedades antiveneno que tenía esta planta: “Las hojas y el fruto de esta planta son remedio eficaz contra el veneno a condición de beberlas tras de él o antes.” Debido a esta propiedad, muchos emperadores romanos la tomaban para evitar los envenenamientos que se producían, tan frecuentes en esta época, durante las comidas.

---

<sup>22</sup> Vicuña Z. Inventario de Plantas Medicinales del Tahuantinsuyo. 1<sup>ra</sup> Edición. Perú: Editorial Cecys. 2011. Pág. 1298.

## H. Otros usos

En la industria farmacéutica se emplean como agentes espumantes y emulgentes. Las saponinas estereoídicas se utilizan sobre todo industrialmente para obtener los aglicones estereoídicos, que son los precursores por hemisíntesis de los fármacos estereoídicos (hormonas sexuales, glucocorticoides, etc.)<sup>23</sup>

### 2.2.2. Métodos de extracción de drogas

#### Concepto

La extracción es una operación que forma parte de un grupo importante de operaciones unitarias conocidas como operaciones disfuncionales o de transferencia de materia. Es la técnica empleada para separar un producto orgánico o para aislarlo de sus fuentes naturales.

De acuerdo con el método empleado, la extracción puede ser de tres tipos:

- a) Extracción mecánica
- b) Extracción por destilación
- c) Extracción mediante disolventes<sup>24</sup>

#### A. Extracción mecánica

Consiste en extraer de los tejidos vegetales o animales, los principios en los líquidos que impregnan dichos tejidos. Los principales métodos de extracción mecánica pueden reducirse a los siguientes: Extracción por incisión, extracción por calor, extracción por expresión.<sup>25</sup>

---

<sup>23</sup> Hentze Movil A. Producción, Caracterización y formulación de un extracto de zarzaparrilla – *Smilax*, universidad de San Carlos de Guatemala. 2012. pág. 43.

<sup>24</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.147.

<sup>25</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.147.

## B. Extracción por destilación

Esta operación puede constituir tanto un método de extracción como de separación. La destilación es una operación que mediante el cambio de estado líquido a vapor, permite separar un sólido de un líquido o líquidos miscibles entre sí, sobre la base de su diferente volatilidad.

Como el método de extracción, el más empleado es la destilación por corriente de vapor, el cual consiste en la vaporación a menor temperatura de los componentes volátiles de mezclas líquidas, por inyección directa de una corriente de vapor.<sup>26</sup>

## C. Extracción mediante disolventes

Los procesos de extracción con disolventes se clasifican en dos tipos: sólido-líquido y líquido-líquido. A su vez, cada uno de ellos puede clasificarse en: continuos o dinámicos y discontinuos o estáticos.<sup>27</sup>

**Extracción líquido-líquido:** Esta operación consiste en la separación de los componentes de una solución por contacto con otro líquido o disolvente no miscible con él. Si la extracción se realiza de forma discontinua, en un único contacto o etapa, se alcanzara el equilibrio entre las dos fases al cabo de cierto tiempo. Esta extracción se conoce como extracción simple.<sup>28</sup>

**Extracción sólido-líquido:** La extracción de sólidos con disolventes es uno de los procesos más utilizados desde el punto de vista farmacéutico y se refiere conceptualmente a la separación de las porciones medicinalmente activas, a partir de los tejidos de las plantas y animales de los componentes inertes de los mismos,

---

<sup>26</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.148.

<sup>27</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.148.

<sup>28</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.149.

mediante el uso de disolventes selectivos denominados menstros, utilizando procedimientos establecidos y correctamente estandarizados.

Los extractos como preparación se denominan popularmente como galénicos en honor a galeno, el cual dio grandes aportes en su época al desarrollo de la farmacia y la medicina, y por lo general se obtienen como líquidos, semisólidos o sólidos relativamente impuros. La extracción es un proceso complejo que contempla varios fenómenos o por separado o en conjunto como son: la diálisis, la desorción, la disolución y la difusión. Para ejecutar un proceso de extracción puede trabajarse con material fresco o seco.<sup>29</sup>

### **2.2.2.1. Técnicas de extracción sólido-líquido**

En dependencia de la naturaleza química de la sustancia a extraer y el uso que se dará al extracto, así se seleccionará el tipo de extracto a preparar y la técnica de extracción a utilizar. En concordancia, cada tipo de extracto tiene su sistema de equipamiento particular que responde a la calidad requerida para el proceso y la calidad final esperada para el extracto. Dentro de las técnicas de extracción sólido-líquido podemos encontrar:<sup>30</sup>

**A. Infusión y decocción:** Ambos métodos de extracción utilizan el agua como menstro, la infusión se realiza poniendo la droga en contacto con agua caliente o fría durante 15 minutos y la decocción hirviendo la droga conjuntamente con el agua durante 30 minutos; todos los calentamientos se realizan en baño de agua o de vapor de agua. Cualquiera de los métodos se utiliza recipientes de cristal, esmaltados o de acero inoxidable cerrados adecuadamente. Ambos métodos, además del principio activo, extraen cantidad de sustancia acompañantes o inactivas.<sup>31</sup>

---

<sup>29</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.149.

<sup>30</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.149.

<sup>31</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.149.

**B. Maceración:** La maceración es un método que consiste en remojar la droga con la cantidad de menstruo preestablecida, a temperatura ambiente, en un recipiente cerrado durante un tiempo de entre 2-14 días; si no se conoce el tiempo necesario para una droga en particular, se sugiere 7 días como promedio para el proceso.

La maceración es un método de extracción de elección cuando los principios activos pueden sufrir alteración por el calor o por el aire y son solubles a temperatura ambiente en un menstruo que no debe ser volátil. También cuando no puede aplicarse el método de lixiviación que se considera uno de los métodos más aplicados en preparaciones galénicas.<sup>32</sup>

**C. Lixiviación o percolación:** Es un método de extracción muy relacionado con el desarrollo de la farmacia. La importancia de este método se evidencia en la farmacopea de los Estados Unidos lo acepta como procedimiento oficial desde 1840. se utiliza para la preparación de uno de los extractos más difundidos en preparaciones galénicas, los extractos fluidos.

Los extractos fluidos son extractos líquidos de materias vegetales, de tal manera preparada, que la cantidad de extracto final en volumen es equivalente a la de la droga desecada al aire en peso, o sea, la relación peso de droga/volumen final de extracto 1 es a 1.

Este método de extracción utiliza un equipo denominado lixivador o percolador que retiene la droga por medio de la cual se hace fluir el menstruo en forma descendente.<sup>33</sup>

---

<sup>32</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág.150.

<sup>33</sup> Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. Pág. 147-162.

### 2.2.3. Enterobacterias

La familia entero bacterias es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica. Se ha descrito más de 40 géneros y cientos de especies y subespecies. Estos géneros se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación del ARNr 16S. a pesar de la complejidad de esta familia, son relativamente pocas las especies responsables de la mayor parte de las enfermedades humanas.

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universas en el suelo, el agua y la vegetación y también en la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, como el 30% al 35% de las bacteriemias, más del 70% de las infecciones de las vías urinarias (IVU) y muchas infecciones intestinales.

Algunos microorganismos (*Salmonella typhi*, *Shiguella*, *Yersinia pestis*) se asocian a enfermedades en el ser humano, mientras que otros (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la microflora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas. Existe un tercer grupo de enterobacterias: normalmente son microorganismos comensales, pero se pueden convertir en patógenas cuando adquieren genes con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad. Las infecciones por enterobacterias se pueden originar de un reservorio animal, de un portador humano o de la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente vulnerable y pueden afectar virtualmente a todas las zonas corporales.<sup>34</sup>

---

<sup>34</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica 6ta Edición. España: Editorial El Servier. 2009. Pág. 301.

## 2.2.4. *Escherichia coli*

### A. Descripción

*Escherichia coli* pertenece a las enterobacterias que constituyen una gran familia y diversa de bacilos gram negativos, de la que son miembros tanto microorganismos de vida libre como los de la flora autóctona del hombre y los animales. Unos cuantos están adaptados solo para vivir en el ser humano. Las enterobacterias crecen con rapidez bajo condiciones aerobias o anaerobias y son activas desde el punto de vista metabólico. Su difusión hacia la sangre produce choque endotoxico gramnegativo, una complicación muy temida y a menudo fatal.

*Escherichia coli* es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades, incluida la gastroenteritis e infecciones extra intestinales, como las infecciones de las vías urinarias, meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia. *Escherichia coli* es la causa más frecuente de colitis hemorrágica.<sup>35</sup>

### B. Taxonomía

Reino	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gamaproteobacteria
Orden	: Enterobacteria
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>Escherichia coli</i> <sup>36</sup>

<sup>35</sup> Kenneth J, George C. Microbiología medica introducción a las enfermedades infecciosas. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill. México. 2005. pág. 373.

<sup>36</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. Sexta edición. España: Editorial el Servier. 2009. pág. 302.

### C. Aspectos epidemiológicos

La mayor parte de las enterobacterias es colonizadora primaria de la parte distal del tubo digestivo del hombre y los animales. Muchas especies sobreviven con facilidad en la naturaleza y viven libremente en cualquier sitio en el que existan fuentes de agua y energéticas mínimas. En el hombre son los componentes facultativos principales de la flora colonizadora transitoria de la piel. Las enterobacterias son escasas en las vías respiratorias de los individuos sanos; sin embargo, su población puede aumentar en pacientes hospitalizados que sufren de enfermedades debilitantes crónicas. *Escherichia coli* es la especie de las enterobacterias que se encuentra en la flora autóctona con más frecuencia.

En el tubo digestivo existen grandes cantidades de *E. coli*. Aunque estos microorganismos pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando los intestinos se perforan y las bacterias acceden a la cavidad peritoneal, la mayor parte de *E. coli* que causan enfermedad digestiva y extraintestinal lo hacen porque han adquirido factores de virulencia secundarios codificados en plásmidos, islotes de patogenicidad o en ADN de bacteriófagos.

La eficacia de *E. coli* como patógeno se ilustra por el hecho de que estas bacterias son: 1) los bacilos gramnegativos que con más frecuencia se aíslan de pacientes con sepsis; 2) responsables de más del 80% de las infecciones de las vías urinarias adquirida en la comunidad y del mismo número de las infecciones hospitalarias, y 3) una causa destacada de gastroenteritis en los países en vías de desarrollo. La mayor parte de las infecciones son endógenas, de forma que *E. coli* de la propia flora microbiana normal del paciente consigue ocasionar infección cuando sus defensas se alteran.<sup>37</sup>

---

<sup>37</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. Sexta edición. España: Editorial el Servier. 2009. pág. 304.

## D. Patogénesis

*Escherichia coli* posee una amplia variedad de factores de virulencia, además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia *enterobacteriaceae*, las cepas de *Escherichia coli* poseen unos factores de virulencia especializados que se pueden clasificar en dos categorías generales: adhesinas y exotoxinas. La función de estos factores se comenta en profundidad en los siguientes apartados.

### Infecciones Oportunistas

A menudo se considera que las *enterobacterias* aprovechan su abundante presencia en el ambiente y la flora normal para producir enfermedad, y en cuanto logran acceso a los sitios del cuerpo estériles en condiciones normales. Se sabe que sus estructuras superficiales como pili, ayudan a este proceso en algunas especies, y sin duda lo hacen en muchas otras.

Se comprende poco su capacidad para persistir y producir lesión una vez que se encuentran en los tejidos más profundos, salvo por la acción de la endotoxina LPS y las especies de las que se sabe producen exotoxinas o capsulas.

La infección oportunista protípica es la infección de vías urinarias (IVU), en la que las enterobacterias logran acceso a la vejiga urinaria a causa de traumatismos menores como los producidos por maniobras instrumentales.

Las cepas capaces de adherirse a la célula uro epitelial pueden persistir a multiplicarse en la orina rica en nutrientes, y en ocasiones difundirse por los uréteres hasta las pelvis renales y los riñones. De igual manera los traumatismos de las mucosas de la piel pueden servir de vía de acceso hacia los tejidos blandos, así como la aspiración hacia los pulmones, cuando un sitio importante queda colonizado por especies de esta familia.<sup>38</sup>

---

<sup>38</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. Sexta edición. España: Editorial el Servier. 2009. pág. 303.

## E. Manifestaciones

Las enterobacterias producen la variedad más amplia de infecciones causadas por cualquier grupo de agentes microbianos, entre ellas los dos estados infecciosos más frecuentes en el hombre: infecciones de vías urinarias (IVU) y diarrea aguda. Las IVU se manifiestan como disuria y micción frecuente cuando están limitadas a la vejiga, mas fiebre y dolor en el flanco cuando el proceso infeccioso se difunde hacia el riñón. Las bacterias de esta familia son, con gran ventaja, las causas más frecuentes de IVU, y la especie productora principal es *Escherichia coli*.<sup>39</sup>

## F. Diagnóstico

El cultivo es el método de diagnóstico primario; toda las enterobacterias se aísla con facilidad en medios habituales casi bajo cualquier condición de incubación.

A menudo se emplean medios indicadores especiales, como agar MacConkey, para el aislamiento primario, a fin de acelerar la separación de muchas especies; por ejemplo en dicho medio los agentes patógenos ordinarios *E. coli* y *Klebsiella* fermentan la lactosa con rapidez y producen colonias acidas (rosadas), en tanto que los agentes patógenos intestinales *Salmonella* y *Shigella* no.

Para distinguir los agentes patógenos intestinales de todas las demás enterobacterias que se encuentran en el excremento se requieren medios altamente selectivos que solo tienen esta finalidad.<sup>40</sup>

---

<sup>39</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. Sexta edición. España: Editorial el Servier. 2009. pág. 304.

<sup>40</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. Sexta edición. España: Editorial el Servier. 2009. pág. 305.

## G. Tratamiento

El tratamiento antimicrobiano es de gran importancia para combatir las infecciones producidas por *Escherichia coli*. Suelen ser resistentes a las concentraciones elevadas de penicilina G, eritromicina y clindamicina. Pero pueden ser susceptibles a los antibióticos beta lactámicos de amplio espectro; aminoglicosidos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, quinolonas, nitrofurantoina y antibióticos polipeptidos.

Como es probable que la resistencia varía entre los géneros y en las diferentes condiciones epidemiológicas. Debe determinarse la susceptibilidad de cualquier cepa, en particular mediante estudios *in vitro*.<sup>41</sup>

---

<sup>41</sup> Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. Sexta edición. España: Editorial el Servier. 2009. pág. 305.

### CAPÍTULO III

#### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

##### 3.1. Población y muestra

**Población:** Esta expresado en el género “*Smilax*” distribuido en el departamento de Madre de Dios.

**Muestra:** Se define al rizoma de “*Smilax officinalis L.*” el cual fue materia de investigación para dicho estudio.

##### 3.2. Tamaño de la muestra representativa

Muestra no probabilística, en el cual la muestra reúne las características establecidas.

### 3.3. Análisis e interpretación de resultados

#### 3.3.1. Ensayos fisicoquímicos del rizoma de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”

**Tabla 1**  
**Determinación de Humedad**

Valor	Límite Permisible
12%	10 - 12%

**Fuente:** Elaboración propia.

Los datos de la tabla, muestra el valor obtenido, de la determinación de humedad que fue de 12% valor que se encuentra dentro de los establecidos por la Farmacopea Europea, lo que indica que las condiciones de conservación y almacenamiento de la muestra fueron las adecuadas, debido a que el contenido de humedad nos permite conocer la estabilidad de la materia prima y la seguridad que los principios activos se conservan, si existe menor cantidad de agua se evita la proliferación bacteriana y micótica.

**Tabla 2**  
**Determinación de cenizas**

Valor obtenido	Limite Permisible
3%	<5%

**Fuente:** Elaboración propia

Los valores muestran, el resultado obtenido de la determinación de cenizas totales que fue de 3% indicando la ausencia de metales pesados, valor que se encuentra dentro de los límites permisibles establecidos en el libro de Farmacognosia y Productos Naturales capítulo seis: Métodos de análisis de drogas.

**Tabla 3**  
**Descripción organoléptica de los extractos de zarzaparrilla**  
**“*Smilax officinalis L.*”**

<b>Características organolépticas</b>	<b>Descripción Maceración al 40%</b>	<b>Descripción Infusión al 40%</b>
<b>Aspecto</b>	Líquido	Líquido
<b>Color</b>	Amarillo pálido	Amarillo
<b>Olor</b>	Característico	Característico
<b>Sabor</b>	insípido	Insípido

**Fuente:** *Elaboración propia*

La tabla 3 muestra los resultados de las características organolépticas del extracto acuoso por maceración de zarzaparrilla que tuvo una coloración amarillo pálido, con un olor característico de aspecto ligeramente opaco y de sabor insípido, dando las mismas características para el extracto de infusión con una ligera diferencia en el color amarillo.

**Tabla 4**  
**Determinación de los parámetros fisicoquímicos del extracto**

<b>Parámetro</b>	<b>Descripción Maceración al 40%</b>	<b>Descripción Infusión al 40%</b>
<b>Densidad</b>	1.036g/mL	1.028g/mL
<b>pH</b>	6.5	6.5
<b>Viscosidad</b>	1.383cp	1,376cp

**Fuente:** *Elaboración propia*

Los valores de la tabla muestra los resultados de las características fisicoquímicas, donde se describe la densidad, pH y viscosidad de acuerdo a la temperatura del agua a 20° C, los valores fisicoquímicos obtenidos fueron (densidad 1.036g/mL), (viscosidad 1.383cp) y un pH de 6,5 del extracto por maceración.

Los valores del extracto por infusión fue: (densidad 1.028g/mL), (viscosidad 1.376cp) y un pH de 6.5, esto indica que ambos extractos, son ligeramente ácidos, con una densidad y viscosidad mayor al agua.

### **3.3.2. Ensayo fitoquímico cualitativo del extracto acuoso de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”**

El análisis fitoquímico preliminar se realizó mediante reacciones de coloración conforme a las técnicas descritas en el capítulo I, obteniendo los siguientes resultados (Ver tabla 5).

**Tabla 5**  
**Identificación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto acuoso de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”**

Aplicación	Ensayo	Fenómeno observado	RESULTADOS	
			Extracto por Maceración	Extracto por infusión
Terpenos y esteroides	Liberman bouchard	Precipitado de color azul	Positivo	Positivo
Azúcares reductores	Reactivo de Fehling	Precipitado rojo ladrillo	Positivo	Positivo
Taninos	Cloruro férrico FeCl <sub>3</sub>	Precipitado verde oscuro	Positivo	Positivo
Saponinas	Prueba de espuma	Formación de espuma	Positivo	Positivo

**Fuente:** *Elaboración propia*

Lo expuesto señala que se identificó en los extractos acuosos por maceración e infusión la presencia de terpenos y esteroides, azúcares reductores, taninos y saponinas. La presencia de éstos puede contribuir al efecto antimicrobiano asociado al vegetal.

### 3.3.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Se define concentración inhibitoria mínima, como la menor concentración a la que un antimicrobiano puede inhibir el desarrollo in vitro de las bacterias; se realiza utilizando el método de dilución en caldo que consiste en disminuir la concentración de la droga utilizando tubos, se interpreta tomando en cuenta la ausencia o presencia de la turbidez que indica inhibición microbiana cuando presenta turbidez, indicando el punto de quiebre.<sup>42</sup>

**Tabla 6**

**Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto acuoso de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" obtenido por maceración**

N° de tubo	Concentración del extracto acuoso por maceración en el medio de cultivo (ug/mL)	CULTIVOS	
		Cantidad de bacteria por tubo de acuerdo a escala McFarland	Medio Líquido (CIM)
			Turbidez
1	100	10 <sup>6</sup>	-
2	50	10 <sup>6</sup>	-
3	25	10 <sup>6</sup>	+
4	12,5	10 <sup>6</sup>	+
5	6,25	10 <sup>6</sup>	+
6	3,12	10 <sup>6</sup>	+
7	1,6	10 <sup>6</sup>	+
8	0,8	10 <sup>6</sup>	+
9	0,4	10 <sup>6</sup>	+
10	Control +	10 <sup>6</sup>	+

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) 100

**Fuente:** *Elaboración propia*

La información de la tabla 6 muestra los resultados por diluciones realizadas en diez tubos para determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto acuoso por maceración sobre microorganismos de *Escherichia coli*; los tubos

<sup>42</sup> Alonso B, Aragon V, Bengoechea J, et al. Manual Práctico de Microbiología. 2<sup>da</sup> Edición. Barcelona: Editorial Masson. 2003. Pág. 136.

contenían una cantidad de *Escherichia coli* equivalente a  $10^6$ , de tal forma que la concentración mayor del extracto equivale a 100ug/mL el primer tubo, descendiendo de forma progresiva hasta una concentración de 0,4ug/mL para el tubo número nueve.

El tubo 10 no contenía extracto, el cual fue denominado como tubo control; demostrando el crecimiento microbiano mediante la presencia de turbidez.

Se observó ausencia de turbidez en los tubos uno y dos, los cuales contenían una concentración del extracto de 100ug/mL, 50ug/mL, respectivamente, indicando la inhibición microbiana del extracto por maceración de acuerdo a las concentraciones mencionadas. Los tubo tres y cuatro en adelante, presentaron turbidez indicando crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*.

**Tabla 7**  
**Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto acuoso de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*” obtenido por infusión**

N° de tubo	Concentración del extracto acuoso por infusión en el medio de cultivo (ug/mL)	CULTIVOS	
		Cantidad de bacteria por tubo de acuerdo a escala McFarland	Medio Liquido (CIM)
			Turbidez
1	100	10 <sup>6</sup>	-
2	50	10 <sup>6</sup>	-
3	25	10 <sup>6</sup>	-
4	12,5	10 <sup>6</sup>	-
5	6,25	10 <sup>6</sup>	+
6	3,12	10 <sup>6</sup>	+
7	1,6	10 <sup>6</sup>	+
8	0,8	10 <sup>6</sup>	+
9	0,4	10 <sup>6</sup>	+
10	Control +	10 <sup>6</sup>	+

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

**Fuente:** *Elaboración propia*

Se puede apreciar los resultados por diluciones realizadas en diez tubos para determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto acuoso por maceración sobre microorganismos de *Escherichia coli*; todos los tubos contenían una cantidad de *Escherichia coli* equivalente a 10<sup>6</sup>, de tal forma que la concentración mayor del extracto equivale a 100ug/mL el primer tubo, descendiendo de forma progresiva hasta una concentración de 0,4ug/mL para el tubo número nueve. El tubo 10 no contenía extracto, el cual fue denominado como tubo control; demostrando el crecimiento microbiano mediante la presencia de turbidez.

Se observó ausencia de turbidez en los tubos uno, dos, tres y cuatro, los cuales contenían una concentración del extracto de 100ug/mL, 50ug/mL, 25ug/mL y 12,5ug/mL respectivamente, indicando la inhibición microbiana del extracto por infusión de acuerdo a las concentraciones mencionadas. El tubo cinco, seis, siete en adelante presentaron turbidez indicando crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*.

### 3.3.4. Determinación de Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se denomina concentración bactericida mínima a la menor concentración del agente antimicrobiano que permite sobrevivir a menos del 0,1% del inóculo original. El método más utilizado para determinar la sensibilidad de una bacteria es la difusión en agar (antibiograma) y la dilución en caldo o agar.<sup>43</sup>

**Tabla 8**

**Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" obtenido por maceración**

N° de tubo	Número de placas por tubo	Cantidad de bacteria inoculada por placa (mL)	CULTIVOS	
			Medio Solido (CBM) Agar Mueller-Hinton	
			N° de Colonias	Crecimiento microbiano
1	1	0,1	0	-
	2	0,1	0	-
	3	0,1	0	-
2	1	0,1	52	+
	2	0,1	49	+
	3	0,1	61	+
10	1	0,1	Incontables	+
	2	0,1	Incontables	+
	3	0,1	Incontables	+

Concentración Bactericida Mínima (CBM) 0,1

**Fuente:** *Elaboración propia*

Muestra los resultados observados en placas de agar Mueller-Hinton con colonias de *Escherichia coli*, a las cuales se diseminó 0,1mL de los tubos uno y dos; éstos no presentaron turbidez de la prueba realizada CIM (tabla 6); para la determinación de la concentración bactericida mínima se sembró tres placas diferentes por cada tubo.

Los resultados obtenidos de las placas de agar Mueller-Hinton en las que se diseminó 0,1mL del tubo uno (100ug/mL); se observó ausencia de crecimiento

<sup>43</sup> Alonso B, Aragon V, Bengoechea J, et al. Manual Práctico de Microbiología. 2<sup>da</sup> Edición. Barcelona: Editorial Masson. 2003. Pág. 136

microbiano en las tres placas (Ver anexos), indicando que el extracto acuoso por maceración a una concentración de 100ug/mL tiene efecto bactericida sobre las colonias de *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos de las placas de agar Mueller-Hinton se diseminó 0.1mL del tubo dos (50ug/mL); se observó crecimiento de colonias de *Escherichia coli* en todas las placas, indicando que la concentración a 50ug/mL, el extracto por maceración no tiene efecto bactericida.

El tubo control (10) se observó una sobrepoblación de colonias ya que este tubo, no contenía extracto, siendo colonias incontables. (Ver anexos)

**Tabla 9**

**Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" obtenido por infusión**

N° de tubo	Número de placas por tubo	CULTIVOS		
		Cantidad de bacteria inoculada por placa (mL)	Medio Solido (CBM) Agar Mueller-Hinton	
			N° de Colonias	Crecimiento microbiano
1	1	0,1	0	-
	2	0,1	0	-
	3	0,1	0	-
2	1	0,1	0	-
	2	0,1	0	-
	3	0,1	0	-
3	1	0,1	0	-
	2	0,1	0	-
	3	0,1	0	-
4	1	0,1	55	+
	2	0,1	46	+
	3	0,1	62	+
10	1	0,1	Incontables	+
	2	0,1	Incontables	+
	3	0,1	Incontables	+

Concentración Bactericida Mínima (CBM)

**Fuente:** Elaboración propia

La tabla 9 muestra los resultados observados en placas de agar Mueller-Hinton con colonias de *Escherichia coli*, a las cuales se diseminó 0,1ml de los tubos uno, dos, tres y cuatro, los cuales no presentaron turbidez de la prueba realizada CIM (tabla 7); para la determinación de la concentración bactericida mínima se sembró tres placas diferentes por cada tubo.

Los resultados obtenidos de las placas de agar Mueller-Hinton en las que se diseminó 0,1mL del tubo uno, dos y tres (100ug/mL, 50ug/mL y 25ug/mL respectivamente) se observó ausencia de crecimiento microbiano en las placas uno y dos para cada tubo, indicando que el extracto acuoso por infusión a una concentración de 100ug/mL, 50ug/mL y 25ug/mL tiene efecto bactericida sobre las colonias de *Escherichia coli*.

En los resultados obtenidos de las placas de agar Mueller-Hinton se diseminó 0.1ml del tubo cuatro (12,5ug/mL), se observó crecimiento de colonias de *Escherichia coli* en toda las placas, indicando que la concentración del 12,5ug/mL, el extracto por infusión, no tiene efecto bactericida.

En el tubo control (10) se observó una sobrepoblación de colonias ya que este tubo, no contenía extracto, siendo colonias incontables.

### **3.3.5. Prueba de susceptibilidad de los extractos acuosos de zarzaparrilla “*Smilax officinalis L.*”**

Son estudios in vitro que se realizan y nos permiten determinar la resistencia o grado de sensibilidad de los microorganismos frente a los diferentes antimicrobianos; en lo posible tratan de reproducirse en las condiciones que se encuentre.

Tabla 10

Determinación de la sensibilidad microbiana del extracto acuoso de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" obtenido por maceración en colonias de *Escherichia coli*

Concentración (ug/mL)		Diámetro de Halos del extracto por maceración en colonias de <i>Escherichia coli</i> (mm)						
		Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5	Disco 6	PROMEDIO
Placa 1	100	11	09	10	10	11	09	10
Placa 2	100	10	11	09	11	09	10	10
Placa 1	Control Negativo	0	0	0	0	0	0	0

**Fuente:** Elaboración Propia

Los datos de la tabla 10 muestra los resultados de sensibilidad de colonias de *Escherichia coli* frente al extracto acuoso preparado por maceración sembrados en tres placas Petri de agar Mueller-Hinton, en la cual se sembró el inóculo de las colonias de *Escherichia coli* por el método de superficie en forma homogénea, en la placa uno y dos se colocaron discos impregnados con el extracto acuoso preparado por maceración a la concentración de 100ug/mL, observándose que la placa uno y dos se obtuvo como promedio un diámetro 10mm de halo en cada placa.

Los resultados obtenidos muestran que a la concentración de 100ug/mL del extracto por maceración, no presenta sensibilidad a la *Escherichia coli*.

La placa de control negativo de agar Mueller-Hinton con colonias de *Escherichia coli*, no se le añadió el extracto acuoso, dicha placa sirvió como control en la que no se observó presencia de halos.

Tabla 11

Determinación de la sensibilidad microbiana del extracto acuoso de zarzaparrilla "*Smilax officinalis L.*" obtenido por infusión en colonias de *Escherichia coli*

Concentración (ug/mL)		Diámetro de Halos del extracto por Infusión en colonias de <i>Escherichia coli</i> (mm)						
		Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5	Disco 6	PROMEDIO
Placa 1	100	24	23	21	19	22	23	22mm
Placa 2	100	20	23	24	22	23	20	22mm
Placa 1	50	18	19	17	20	18	19	18,5mm
Placa 2	50	18	17	19	19	18	20	18,5mm
Placa 1	25	9	10	10	10	8	11	10mm
Placa 2	25	10	11	11	9	10	9	10mm
Placa 1	Control Negativo	0	0	0	0	0	0	0mm

**Fuente:** Elaboración propia

Se aprecia en la tabla 11 los resultados de sensibilidad de colonias de *Escherichia coli* frente al extracto acuoso preparado por infusión, sembrados en placas Petri de agar Mueller-Hinton, en el que se sembró el inóculo de las colonias de *Escherichia coli* por el método de superficie en forma homogénea, en la placa uno y dos se colocaron discos impregnados con el extracto acuoso preparado por infusión. La formación de halos de sensibilidad de 100ug/mL de concentración fue de 22mm de promedio, a una concentración de 50ug/mL formo halos de 18,5mm de diámetro en promedio y para la tercera concentración de 25ug/mL se observó una formación de halos de 10mm de promedio.

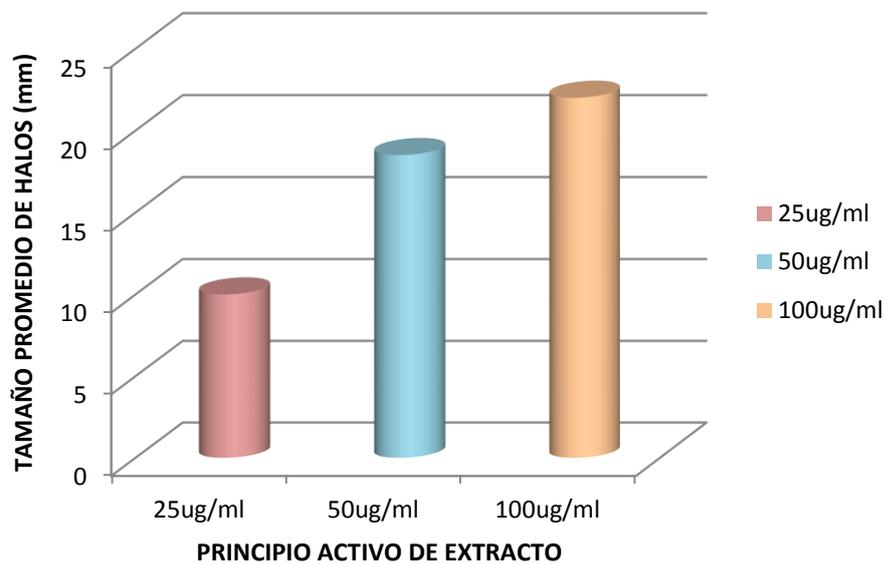
Los resultados muestran que a concentraciones de 100ug/mL y 50ug/mL el microorganismo en estudio, muestra sensibilidad antimicrobiana del extracto por

infusión, sin embargo, a la concentración de 25ug/mL el tamaño de formación de halo está por debajo de los estándares de sensibilidad microbiana.

La placa de agar Mueller-Hinton fue control negativo con colonias de *Escherichia coli*, a la cual no se le añadió el extracto acuoso, dicha placa sirvió como control en la que no se observó presencia de halos.

**Gráfico 1**

**HALOS DE INHIBICIÓN PROMEDIO PRODUCIDOS  
POR DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  
PRINCIPIO ACTIVO SOBRE COLONIAS DE  
*Escherichia coli***

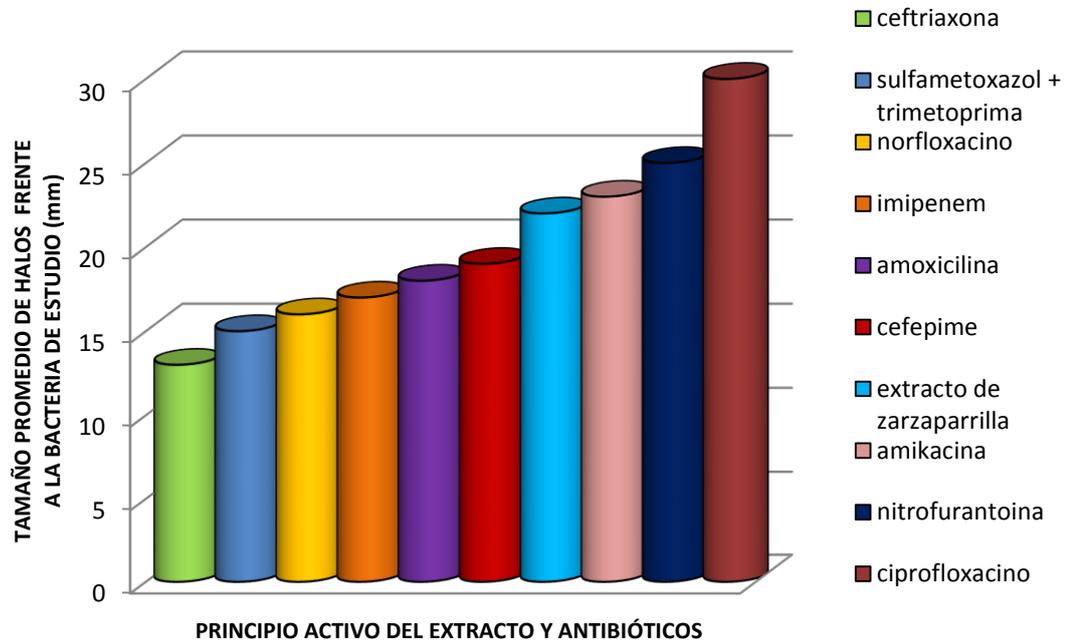


**Fuente:** *Elaboración Propia*

En el gráfico 1 Se observa las diferentes concentraciones de principio activo del extracto acuoso obtenido por infusión, se tomaron concentraciones de 100ug/mL, 50ug/mL y 25ug/mL dichas concentraciones poseen efecto antimicrobiano sobre las colonias de *Escherichia coli*. Se puede observar que a mayor concentración de principio activo se obtiene mayor diámetro de halo. Estos resultados llevan a confirmar que la infusión de zarzaparrilla tiene un efecto antimicrobiano frente a colonias de *Escherichia coli* en las concentraciones mencionadas, logrando superar las expectativas planteadas y confirmando la acción de sus componentes químicos de dicha especie vegetal, con lo cual queda comprobada la hipótesis.

Gráfico 2

**HALOS DE INHIBICIÓN PROMEDIO PRODUCIDOS POR DIFERENTES PRINCIPIOS ACTIVOS SOBRE COLONIAS DE *Escherichia coli***



**Fuente:** *Elaboración propia*

Se aprecia la formación de halos de diferentes antibióticos y el extracto obtenido por infusión de zarzaparrilla frente a colonias de *Escherichia coli* que fueron sembrados por superficie, de los cuales se obtuvo diferentes medidas de diámetros de halos; ceftriaxona 13mm, sulfametozaxol+trimetoprima 15mm, norfloxacino 16mm, imipenem 17mm, amoxicilina 18mm, imipenem 19mm, extracto de zarzaparrilla 22mm, amikacina 23mm, nitrofurantoina 25mm y ciprofloxacino 30mm.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. CONCLUSIONES:

**Primera:** El extracto acuoso por infusión de zarzaparrilla tiene efecto antimicrobiano sobre las colonias de *Escherichia coli*, con efectividad a las concentraciones de 100ug/mL, 50ug/mL y 25ug/mL, sin embargo, el extracto por maceración, tiene menor efecto antimicrobiano a una concentración de 100ug/mL.

**Segunda:** La evaluación fitoquímica comprobó la presencia de metabolitos secundarios como terpenos y esteroides, azúcares reductores, taninos catéquicos y el alto contenido de saponinas.

**Tercera:** Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de zarzaparrilla *Smilax officinalis L.* (maceración) frente a *Escherichia coli* se pudo obtener la CIM del extracto a concentraciones de 100ug/mL y 50ug/mL.

**Cuarta:** La concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de zarzaparrilla *Smilax officinalis* L. (infusión) se observó a concentraciones de 100 ug/mL, 50ug/mL, 25ug/mL y 12,5ug/mL. El efecto antimicrobiano del extracto se determinó mediante ausencia de turbidez de dichas concentraciones.

**Quinta:** La determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) se demostró observando la ausencia de crecimiento microbiano a las concentraciones de 100ug/mL, 50ug/mL del extracto por infusión y para el extracto por maceración, solo hubo ausencia de crecimiento a la concentración de 100ug/mL.

**Sexta:** La sensibilidad microbiana se determinó por la formación de halos aceptables en concentraciones de 100ug/mL y 50ug/mL del extracto por infusión, siendo la concentración de 100ug/mL más efectiva por la formación de halos de hasta 22mm en promedio, posteriormente a la concentración de 50ug/mL con la formación de halos hasta 18,5, demostrando así, que el extracto por infusión tiene mayor cantidad de principios activos y actúa efectivamente como antimicrobiano frente al microorganismo de estudio.

#### **4.2. RECOMENDACIONES:**

1. Continuar el estudio para darle una forma farmacéutica aprovechando sus propiedades terapéuticas de la especie vegetal.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano frente a un grupo diferente de microorganismos patógenos ya que dicha especie vegetal, tiene gran cantidad de principios activos.
3. Se recomienda, la obtención de principios activos por otros métodos extractivos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Albareda J. Medicamenta Guía Teórico – Práctica para Farmacéuticos y Médicos. 6<sup>ta</sup> edición. Barcelona: Editorial Labor S.A. 1982.
2. Alonso B, Aragon V, Bengoechea J, Diaz R, Gamazo C, Garcia I, Hernaez S, Irigoyen A, Leiva J, Lopez G, Marrodán T. Manual Práctico de Microbiología. 2<sup>da</sup> Edición. Barcelona: Editorial Masson. 2003.
3. Casares, A. Tratado de Farmacia Teórico y Práctico. 3<sup>ra</sup> Edición. España: Editorial Martínez. 1947.
4. Deza J, Muñoz S. Metodología de la investigación científica. Perú: Centro de investigación, Fondo editorial; 2008.
5. Granados R, Villaverde C. Microbiología, Bacteriología medios de cultivo y pruebas bioquímicas micología general parasitología general. 2<sup>da</sup> Edición. España: Editorial Paraninfo. 1998.

6. Guerci A. Laboratorio Métodos de análisis clínicos y su interpretación. 3<sup>ra</sup> Edición. Buenos Aires: Editorial el Ateneo. 1985.
7. Hans G. Microbiología General. 1<sup>ra</sup> Edición. España: Editorial Omega. 1997.
8. John Spicer W. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. 2<sup>da</sup> Edición. Barcelona: Editorial El Servier. 2009.
9. Kuklinsky Cl. Farmacognosia “Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural”. 2<sup>da</sup> Edición. Barcelona: Editorial Omega. 2006.
10. Merck E. Manual de medios de cultivos. 2<sup>da</sup> Edición. Alemania: Editorial Darmstadt. 1994.
11. Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 2001.
12. Negroni M. Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica. 2<sup>da</sup> Edición. Argentina: Editorial medica panamericana. 2009.
13. Patrick R, Ken S, Michael A. Microbiología médica. 6<sup>ta</sup> Edición. España: Editorial El Servier. 2009.
14. Stephen J, Marie B. Manual de Susceptibilidad Antimicrobiana, Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washintong Seatle. 2005.
15. Vicuña Z. Inventario de Plantas Medicinales del Tahuantinsuyo. 1<sup>ra</sup> edición. Perú: Editorial Cecys, 2011.
16. Wade JR. Química Orgánica. 5<sup>ta</sup> Edición. España: Editorial Pearson Prentice Hall. 2004. Pág. 1066.

## TESIS

1. Arce Yañez Ch, Ortega Ortega C. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de la *Annona muricata* Guanábana sobre bacterias Gram negativas encontradas en infecciones urinarias, obtenidas en los hospitales del departamento de Arequipa. Universidad Católica de Santa María. 2003.
2. Bornaz Urquiza N. Efecto del Extracto Hidroalcoholico de la *Tropaeolum tuberosum* “Mashua o añu” in vitro frente a Microorganismos Uro patógenos. Universidad Católica de Santa María. 2009.
3. Hentze Movil A. Producción, Caracterización y formulación de un extracto de zarzaparrilla – *smilax*. Universidad de San Carlos de Guatemala, 2012.

## WEBGRAFÍA

1. Angurell I, Casamitjana N, Caubet A. Extracción con disolventes. [Sede Web]. Universidad de Barcelona. [Actualizado 22 de julio del 2016]. Disponible en: <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index1.html>
2. Barnola P, Alarcon P, Maza M. Características de la zarzaparrilla. [Sede Web]. Universidad de Texas. [Actualizado 10 de agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalszarzaparrilla.htm>
3. Laboratorio de alimentos I. Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos. [Sede Web] Facultad de Química, UNAM. [Actualizado 12 de noviembre 2015]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS\\_12286.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf)
4. Perez M. Susceptibilidad antimicrobiana. [Sede Web] Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” [Actualizado 20 de agosto 2012]. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58\\_3\\_06/mtr06306.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58_3_06/mtr06306.htm)

## ANEXOS

## ANEXO I



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



## CONSTANCIA 2016-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 una muestra fresca de plantas traídas de la Localidad de Laberinto, Departamento de Madre de Dios para su Tesis titulada: **Determinación del efecto antimicrobiano del extracto acuoso in vitro de "Zarzaparrilla" *Smilax officinalis* L. en colonias de *Escherichia coli***, ejecutado por **Pohl William Centeno Flores** de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas- Arequipa.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA  
 CLASE: LILIOPSIDA  
 SUBCLASE: LILIIDAE  
 ORDEN: LILIALES  
 FAMILIA: LILIACEAE  
 GENERO: *Smilax*  
 ESPECIE: *Smilax officinalis* L.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Arequipa 15 de Julio del 2016.

  
 Blgo. Leoncio Mariño Herrera  
 DIRECTOR  
 Herbarium Arequipense (HUSA)







Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p><b>Specifications</b>  <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli  <b>Catalog Number:</b> 0335  <b>Lot Number:</b> 335-94  <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™*  <b>Purity:</b> &lt; 0.1% Total Pellet CFU  <b>Recovery:</b> &gt; 1000 CFUs per Pellet  <b>Passage from Reference:</b> 4</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2017/01  <b>Release Information:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon  <b>Release Date:</b> 2015/3/5</p>
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p><b>Note for Vitek®:</b> Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p>  <span style="margin-left: 20px;">(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</span> </p> <p>  </p> <p>TESTING CERT #2655.01 <span style="margin-left: 20px;">(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</span></p>	

## ANEXO III

### MEDIOS DE CULTIVO

#### AGAR MUELLER - HINTON

##### FUNDAMENTO:

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) también llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad microbiana.

##### COMPOSICION (g/L):

- Infusión de Carne	2.0
- Hidrolizado de Caseína	17.5
- Almidón	1.5
- Agar-agar	13.0

pH:  $7.4 \pm 0.2$  a 25° C.

##### PREPARACION

Disolver 34 g/L, autoclavar durante (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. 16-20ml).

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre +15 y +25° C. Proteger de la luz. Una vez abierto hasta la fecha de caducidad.

##### INTERPRETACIÓN:

Se emplea este medio sólido para el crecimiento de muchos microorganismos, apreciando colonias de color crema.

## AGAR MAC CONKEY

### FUNDAMENTO:

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

### COMPOSICION (g/L):

- Peptona de Caseína	17g	Sales Biliares	1.5g
- Lactosa	10g	Cloruro de Sodio	5g
- Peptona de carne	3g	Rojo Neutro	0.03g
- Agar-agar	12.5	Cristal Violeta	0.001g

pH: 7.1 ± 0.2 a 25° C.

### PREPARACIÓN:

Disolver 48 g/L, autoclavar durante (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. 16-20ml).

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre +15 y +25° C. Proteger de la luz. Una vez abierto hasta la fecha de caducidad.

### INTERPRETACIÓN:

Colonias Lactosa positivas producen coloraciones rojizas, la bacteria degrada lactosa y produce ácido virando el indicador del medio (rojo neutro) a rojizo. *E. coli*. El género *Enterobacter* son colonias rojas, *Klebsiella* da colonias rosadas, mucosas, grandes, acidificando el medio. Las colonias Lactosa negativo dan colonias incoloras o crema blanco y hasta producen un olor fuerte y fétido.

## ANEXO IV

### MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA

#### TSI (Triple Sugar Iron Agar)

##### FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones  $Fe^{3+}$ , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

##### COMPOSICIÓN (g/L):

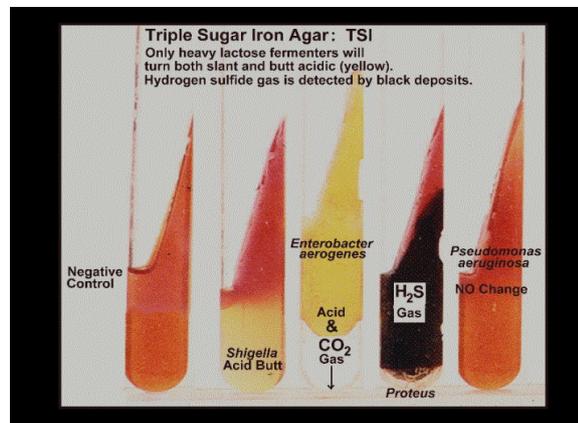
Extracto de carne	3g.	Citrato Férrico Amoniaca	0.5g.
Extracto de Levadura	3g.	Cloruro de Sodio	5g.
Peptona de Caseína	15g.	Tiosulfato de Sodio	0.5g.
Peptona de carne	5g.	Rojo fenol	0.024g.
Lactosa	10g	Agar agar	12g.
Sacarosa	10g.	pH 7.4 ± 0.2 a 25° C.	
Glucosa	1g.		

##### PREPARACIÓN:

Disolver 65 g/L, autoclavar durante (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en Tubos de ensayo, dejar el medio en plano inclinado hasta coagulación. Se puede conservar los medios en congelador.

## INTERPRETACIÓN:

La acidez se pone de manifiesto por su cambio al color amarillo y se simboliza con A. La alcalinidad se manifiesta por su cambio al grosella y se simboliza con K. **K/A**: La degradación de Glucosa se manifiesta por la alcalinidad en la parte inclinada (K) y la acidez en el fondo (A). (Microorganismo no fermentador de Lactosa). **A/A**: La degradación de Lactosa y/o Sacarosa se manifiesta por el cambio total del medio a amarillo. **K/K**: La no degradación de ninguno de los azúcares presentes se manifiesta por el no cambio de color del medio. Microorganismo no fermentador. La presencia de gas se manifiesta por el resquebrajamiento del medio. El Hierro es indicador para poner en evidencia la producción de  $\text{SH}_2$  que se manifiesta por el color negro.



## LIA AGAR (Lisina Iron Agar)

### FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8.

Por decarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. La decarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesaria que la glucosa sea previamente fermentada.

Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo.

La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas cepas de *Morganella*, desaminan la lisina, esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio.

### COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona	5g.	Extracto de Levadura	3g.
Dextrosa	1g.	Tiosulfato de Sodio	0.04g.
L-Lisina	10g.	Purpura de Bromocresol	0.02g
Agar agar	15g.	Citrato de Amonio Férrico	0.5g.

pH  $6.7 \pm 0.2$  a 25° C.

## **PREPARACIÓN**

Disolver 32 g/L, autoclavar durante (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en Tubos de ensayo, dejar el medio en plano inclinado hasta coagulación. Se puede conservar los medios en congelador.

## **INTERPRETACIÓN**

El desarrollo de un color amarillo en el fondo del tubo indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha disminuido lo suficiente para activar la descarboxilasa.

El retorno de un color azul púrpura del tubo indica que contiene el aminoácido y es una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación (se ha formado la cadaverina). K/K: se lee Lisina Positiva. La desaminación empieza en la parte inclinada, variando esta porción al color rojo vino, el fondo se tornará amarillo. Se lee como R/A y es Lisina Negativa. Se puede observar ennegrecimiento del medio indica presencia de SH<sub>2</sub>.

## CALDO MR-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer)

### FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la pluripeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol). Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros.

Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo.

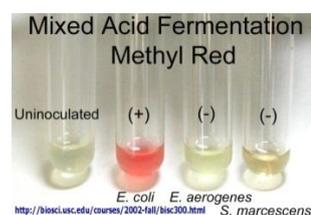
### COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona	7g.	Fosfato dipotásico	5g.
Dextrosa	5g.	pH 6.9 ± 0.2 a 25° C.	

**PREPARACIÓN.-** Disolver 17 g/L, llevar a ebullición suavemente. Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en Tubos de ensayo, Se puede conservar los medios en congelador pero se sugiere prepararlos el día de su utilización.

### INTERPRETACIÓN:

MR: Cuando la formación de ácidos es tan intensa que el pH del medio se encuentra por debajo 4.4, el indicador rojo de metilo toma un color rojo y constituye una prueba positiva *Escherichia coli*. VP: Algunos microorganismos degradan glucosa contenida en el medio produciendo una serie de productos intermedios (Acetoína), reacción de *Voges Proskauer* positiva.



## MEDIO SIM (Sulfuro Indol Movilidad)

### FUNDAMENTO

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

### COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona de Caseína	20g.	Amonio y Hierro III	
Peptona de Carne	6.6g.	Citrato	0.2g
Tiosulfato de Sodio	0.2g.	Agar agar	3g.
pH 7.3± 0.2 a 25° C.			

### PREPARACIÓN

Disolver 30 g/L, autoclavar suavemente (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en Tubos de ensayo, dejar el medio hasta coagulación. Se puede conservar los medios en congelador.

### INTERPRETACIÓN:

El microorganismo se siembra con una asa en punta por picadura en la columna del medio del cultivo. Incubar a 37° C por 24 horas. La motilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura. La no motilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La producción de SH<sub>2</sub> se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento. Para la demostración del Indol se agrega posteriormente a los tubos el Reactivo de Kovacs, con una coloración rojo-violácea (compuesto quinoidal) en la capa del reactivo.

## AGAR CITRATO DE SIMMONS

### FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

### COMPOSICIÓN (g/L)

Fosfato monoamónico	1g	Citrato de Sodio	2g
Fosfato dipotásico	1g	Azul de Bromotimol	0.08g
Cloruro de Sodio	5g	Agar agar	12g
Sulfato de Magnesio	0.2g	pH 6.6±0.2 a 25° C.	

### INTERPRETACIÓN

La degradación del Citrato contenido en el medio, conlleva la formación de una serie de ácidos intermedios los que finalmente se volatilizan quedando el catión sodio en el medio y por consiguiente, presencia de radicales oxidrilo, alcalinizando el medio y el medio inicial que es verde se torna azul por el indicador azul de bromotimol, permitiendo diferenciar los coliformes fecales y bacterias del grupo de *Enterobacter* y *Citrobacter*. (*Escherichia coli* es Citrato negativo).

## ANEXO V

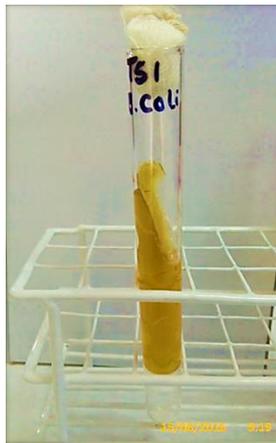
### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

#### 1) Triple Azúcar Hierro (TSI):

##### Procedimiento:

- Se sembró la muestra de *Escherichia coli*, en agar TSI (pico – fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas.
- Al realizar la siembra de *Escherichia coli* se produce la degradación de los tres hidratos de carbono, produciendo un pH ácido y ocasionado el viraje del medio a amarillo
- **A/A + -** : Lactosa (+)  
Sacarosa (+)  
Glucosa (+)  
CO<sub>2</sub> (+)  
H<sub>2</sub>S (-)

Prueba de TSI



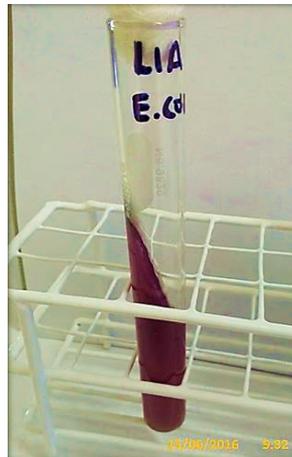
**Fuente:** Elaboración propia

## 2) Agar Lisina Hierro (LIA):

### Procedimiento:

- Se sembró la muestra de *Escherichia coli*, en agar LIA (pico – fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
  - Se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas.
  - En el caso de la *Escherichia coli* se presentó como; K/K-. al producirse la descarboxilación de la Lisina produciéndose cadaverina el indicador Purpura de Bromocresol va a retornar a su color purpura lo que se interpreta como lisina positiva.
- 
- **K/K - :** Lisina (+)  
Descarboxilación (+)  
Desaminación (-)  
H<sub>2</sub>S (-)

Prueba de LIA



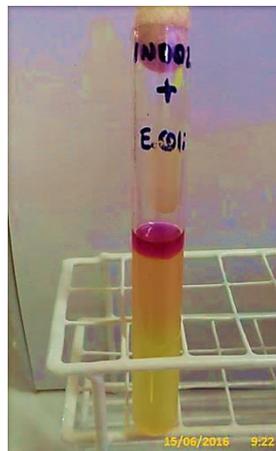
**Fuente:** Elaboración propia

### 3) PRUEBA INDOL

#### Procedimiento:

- Se cargó el asa de Kollé con colonias de *Escherichia coli* y se agregó al caldo peptonado, agitándolo.
- Se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas.
- Luego de la incubación se agregó una gota del reactivo de Kovacs.
- La aparición de un anillo de color rojo grosella indicará que la prueba es positiva.

Prueba de Indol



*Fuente: Elaboración propia*

### 4) Prueba de Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP):

#### Procedimiento:

- Se inoculó la muestra de *Escherichia coli* en el caldo MR-VP luego se incubó por 24 horas a 37°C.
- Finalizado el tiempo de incubación se transfirió 1ml de caldo para Voges Proskauer.
- En el caldo restante se reveló rojo de metilo, agregando 4 a 8 gotas del indicador rojo de metilo.
- Para revelar Voges Proskauer se agregó 10 gotas de  $\alpha$ -naftol al 5% y una gota de KOH al 5%.
- Se agitó cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 min.

La prueba rojo de metilo es positiva al observarse un color rojo estable, esto indica que la producción de ácido es suficientemente fuerte para producir el viraje del indicador, lo que significa que el microorganismo fermenta la glucosa por la vía de ácido- mixta. (Ver prueba rojo metilo)

La prueba Voges – Proskauer es negativa por que no desarrolla un color rojo – fucsia, indicando la ausencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína. (Ver prueba voges proskauer)

Prueba Rojo de metilo



**Fuente:** Elaboración propia

Prueba Voges proskauer



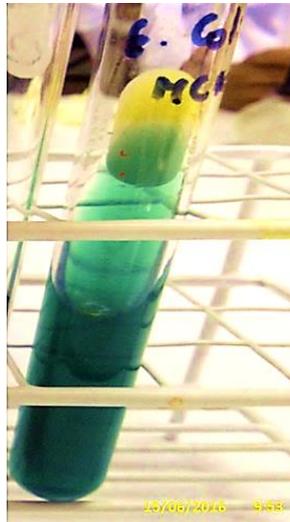
**Fuente:** Elaboración propia

## 5) Agar Citrato de Simmons:

### Procedimiento:

- Se sembró la muestra de *Escherichia coli* en agar Citrato de Simmons (pico – fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas.
- La prueba es negativa (-) cuando el medio no cambia de color manteniendo su color verde.

Prueba Citrato de Simmons (-)



**Fuente:** Elaboración propia

## ANEXO VI

DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

	TSI	LIA	IMVIC			
			INDOL	ROJO METILO	VOGES PROSKAUER	CITRATO
<b>INDICADOR</b>	Rojo fenol	Purpura de bromocresol	Reacción de covacs	Rojo fenol	Rojo metilo	Azul de bromotimol
<b>RESULTADO</b>	<b>A/A</b>	<b>k/k</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Fuente:** Elaboración propia

Se observa la diferenciación bioquímica de *Escherichia coli*; A/A indica que los microorganismos degradan la lactosa y glucosa produciendo grandes cantidades de ácido, la cual es suficiente para contrarrestar la reacción alcalina producida por la degradación de proteínas. k/k indica que contiene el aminoácido y es una reacción positiva debido a la reacción de aminos por descarboxilación (lisina positiva).

La reacción de Indol positivo indica la degradación del triptófano, interpretado por la formación de un anillo de color rojo en la superficie del medio.

Rojo metilo positivo se da por la fermentación de la glucosa por vía ácido mixta con producción de ácidos orgánicos, interpretado por la formación de un color rojo.

Voges proskauer negativo, ya que no hubo cambio de coloración del medio de cultivo.

Citrato negativo, debido que no hubo cambio de coloración y ausencia del crecimiento microbiano, interpretado por el color verde del medio de cultivo.

## ANEXO VII

INHIBICIÓN CON DISCOS DE ANTIBIÓTICO EN COLONIAS DE *Escherichia coli*

Discos de Antibiótico	Concentración de antibiótico ug/mL	Formación de halos de inhibición sobre colonias de <i>Escherichia coli</i>
		Tamaño de halo (mm)
Amikacina	30	23
Amoxicilina	30	18
Cefepime	30	19
Ceftriaxona	30	13
Ciprofloxacino	5	30
Imipenem	10	17
Nitrofurantoina	300	25
Norfloxacino	30	16
Sulfametoxazol + trimetoprima	1,25/23,75	15

**Fuente:** Elaboración propia

Se observa los resultados del antibiograma de *Escherichia coli*, los cuales fueron colocados los discos de antibiótico de diferentes concentraciones según expresa la tabla y se obtuvo resultados por la formación de halo según se puede observar.

## ANEXO VIII

**VALORES DE SIGNIFICANCIA DEL EXTRACTO DE INFUSIÓN Y ANTIBIÓTICOS  
(PRUEBA T DE STUDENT)**

Antibióticos	Formación de halos de inhibición sobre colonias de <i>Escherichia coli</i> con antibióticos	Formación de halos de inhibición sobre colonias de <i>Escherichia coli</i> del extracto (infusión) al 100ug/mL	P *
	Tamaño de halos (mm)	Tamaño de halos (mm)	
Amikacina	23	22	0.000(P<0.05) S.S
Amoxicilina	18	22	0.000(P<0.05) S.S
Cefepime	19	22	0.000(P<0.05) S.S
Ceftriaxona	13	22	0.000(P<0.05) S.S
Ciprofloxacino	30	22	0.000(P<0.05) S.S
Imipenem	17	22	0.000(P<0.05) S.S
Nitrofurantoina	25	22	0.000(P<0.05) S.S
Norfloxacino	16	22	0.000(P<0.05) S.S
Sulfametoxazol + trimetoprima	15	22	0.000(P<0.05) S.S

N.S: No es significativo

S.S: Si es significativo

**Fuente:** Elaboración propia

La tabla muestra los valores de significancia de acuerdo a la prueba realizada; el extracto acuoso por infusión a una concentración del 100ug/mL es significativo, ya que presento una mayor efectividad respecto a (amoxicilina, cefepime, ceftriaxona, imipenem, sulfametoxazol+trimetoprima y norfloxacino), sin embargo; ciprofloxacino, amikacina y nitrofurantoina tienen mayor efectividad, ello indica que es significativa respecto al extracto de zarzaparrilla.

## ANEXO IX

### EQUIPOS DE LABORATORIO UTILIZADOS PARA INVESTIGACIÓN

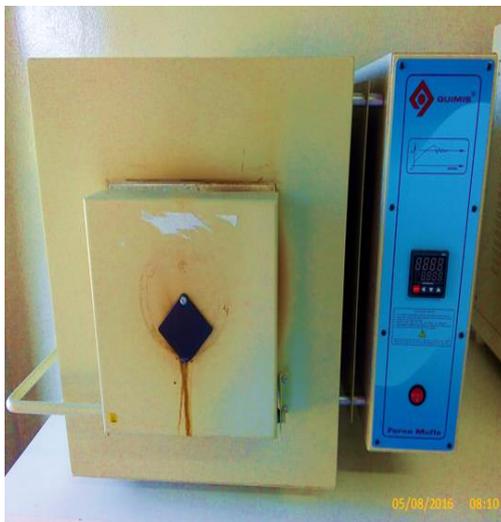
Autoclave modelo LS – B50L



Estufa Modelo Nahita 631/4



Mufia modelo QUIMIS



Balanza modelo CP124S sartorius



## ANEXO X

### FIGURAS DEL PROCESO DE INVESTIGACIÓN

CIM maceración



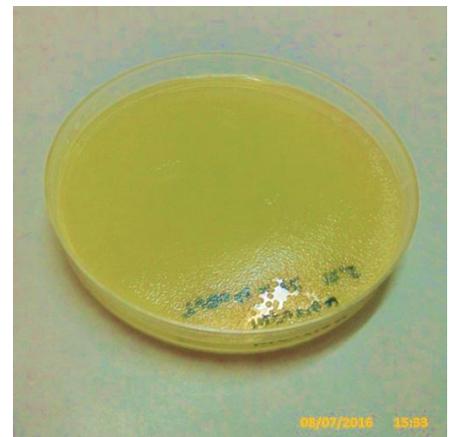
CIM infusión



Concentración bactericida mínima (extracto por maceración)



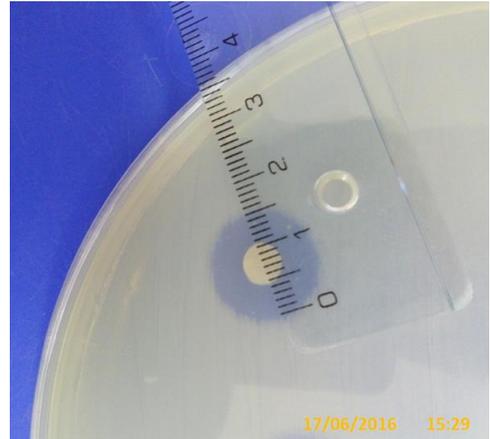
Concentración bactericida mínima (extracto por infusión)



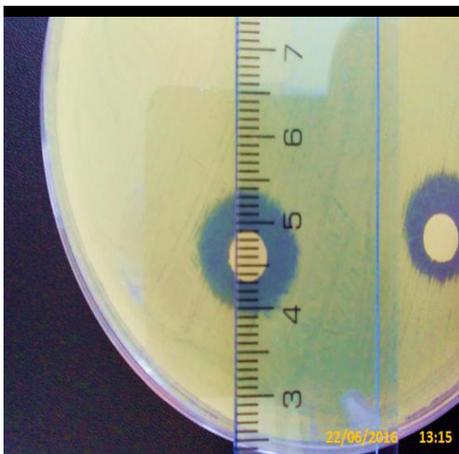
Antibiograma maceración



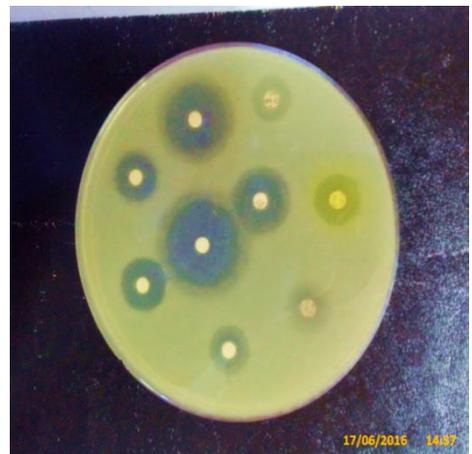
Antibiograma infusión



Antibiograma infusión



Antibiograma con discos de antibióticos



Preparación de discos con extracto



Medición de halos



## ANEXO XI

## ESTANDAR DE DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Antibióticos	Cantidad de Antibiótico	Diámetro de Halo Estándar (mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina	30	<14	15 – 16	>17
Amoxicilina	30	<13	14 – 17	>18
Cefepime	30	<14	15 – 16	>17
Ceftriaxona	30	<13	14 – 20	>21
Ciprofloxacino	5	<15	16 – 20	>21
Imipenem	10	<13	14 – 15	>16
Nitrofurantoina	300	<14	15 – 16	>17
Norfloxacino	30	<12	13 – 16	>17
Sulfametoxazol + trimetoprima	1,25/23,75	<10	11 – 15	>16

**Fuente:** Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washintong Seattle. 2005.

## ANEXO XII

## FICHAS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA ESPECIE VEGETAL

DATOS	
<b>TAXONOMÍA</b>	
Familia	
<b>DETERMINACIONES</b>	
Nombre científico	
<b>GEOGRAFÍA</b>	
País	
Departamento	
Localidad	
msnm	
<b>COLECTA</b>	
Fecha y hora de recolección	

## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE CIM

N° de tubo	Concentración del extracto acuoso en el medio de cultivo (ug/mL)	CULTIVOS	
		Cantidad de bacteria por tubo de acuerdo a escala McFarland	Medio Líquido (CIM)
			Turbidez
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Antibiograma:** Es un estudio que se realiza in vitro para determinar la resistencia o el grado de sensibilidad a los microorganismos frente a los diferentes antimicrobianos.

**CIM:** Concentración inhibitoria mínima

**CBM:** Concentración bactericida mínima

**Fitoterapia:** es el uso de productos de origen vegetal para la prevención, la curación o el alivio de una amplia variedad de síntomas y enfermedades.

**Halo:** Se refiere a la zona alrededor del disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce el crecimiento microbiano en una placa de agar inoculada con el germen.

**Incubación:** Es el proceso de mantener y hacer crecer cultivos microbiológicos o cultivos celulares manteniendo la temperatura, la humedad y otras condiciones en grado óptimo.

**Inóculo:** Microorganismo de estudio debidamente disuelto a una concentración conocida.

**Principio Activo:** son las sustancias presentes en el vegetal a la cual se debe el efecto farmacológico de dicha especie.

**Rizoma:** es un tallo subterráneo con varias yemas que crecen de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos.

**IVU:** Infección de vías urinarias