



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

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO *IN
VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO DEL ISAÑO
“*Tropaeolum tuberosum*” EN CEPAS DE *Escherichia coli* Y
Pseudomonas aeruginosa ATCC Y CLÍNICAS
CAUSANTES DE INFECCIONES DEL TRACTO
URINARIO EN LA UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS -
AREQUIPA, 2016.**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
CANDIA AUCCAILLE, CINTHYA BARBARA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AREQUIPA – PERÚ

2016

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado principalmente a DIOS por ser mi guía espiritual por haberme permitido culminar otra meta de mi vida.

A mi madre querida ESTEFANIA por haberme dado su apoyo incondicional, a ti mamita gracias por ser como eres y por ofrecerme tu paciencia y comprensión.

A la personita más importante en mi vida, mi hijo FABRIZIO, por quien me encuentro aquí culminando un sueño más, a ti hijo querido por ser mi aliento, mis ganas de luchar y de seguir adelante. Gracias por existir.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Alas Peruanas por la calidad y el compromiso educativo que ofrece a sus estudiantes.

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

A los docentes de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica por las enseñanzas brindadas a lo largo de toda mi carrera profesional.

Un agradecimiento especial a mi asesora de tesis la Q.F. Shaneri Marcilla Truyenque, quien me brindó su apoyo, dedicación y ante todo paciencia al momento de responder mis dudas e inquietudes.

Además agradezco a las personas que de uno u otro modo colaboraron en el desarrollo mi tesis, ya que sin su apoyo no habría sido posible la realización de la misma.

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en cepas causantes de infecciones del tracto urinario a concentraciones de 10, 25, 50 y 75mg/mL. Para el estudio se utilizó cepas ATCC y clínicas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La recolección del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" se realizó en el departamento de Puno y cuya identificación se realizó en el herbario botánico Arequipense – HUSA, Universidad Nacional de San Agustín.

En la determinación de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de disco difusión (Kirby-Bauer), utilizando como control negativo de crecimiento un disco de gentamicina de 10 ug, y como control positivo un disco con agua destilada; al analizar los resultados se observó que el extracto acuoso del isaño tuvo efecto antibacteriano a concentraciones de 50 y 75mg/mL para ambas bacterias, demostrando ser mejor frente a cepas ATCC que para cepas clínicas. Se obtuvo halos de inhibición promedio de 22 y 23 mm de diámetro para cepas ATCC de *Escherichia coli* y 16 mm de diámetro para cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) se utilizó la técnica turbidimétrica de dilución en caldo donde se observó que la cepa ATCC de *Escherichia coli* obtuvo efecto bacteriostático a una concentración de 18.75mg/mL, mientras que la cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 37.5mg/mL

Para determinar la concentración bactericida mínima (CMB) se sembró 0.1 mL de muestra de los tubos sin turbidez del CMI en placas de Mueller Hinton donde se determinó el efecto bactericida a la concentración de 75mg/mL para ambas cepas ATCC.

Además se realizó un análisis fitoquímico al extracto acuoso del isaño, el cual reveló la presencia de flavonoides, taninos, esteroides, alcaloides, y glicósidos; los cuales evidencian actividad antibacteriana sobre microorganismos.

Palabras claves: Isaño "*Tropaeolum tuberosum*", actividad antibacteriana, *in vitro*, extracto acuoso, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

In the present investigation it was determined their *in vitro* antibacterial effect of the aqueous extract of isaño "*Tropaeolum tuberosum*" in strains causing urinary tract infections at concentrations of 10, 25, 50 and 75mg/mL. For the study was used ATCC strains and clinics of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The collection of the isaño "*Tropaeolum tuberosum*" was held in the department of Puno and whose identification was made in the herbarium botanist Arequipense - HUSA, National University of San Agustín.

In the determination of the antibacterial activity was used the technique of Kirby-Bauer disk diffusion, using as a negative control of growth a disc of gentamicin 10 ug, and as a positive control a disc using distilled water; to analyze the results it was observed that the aqueous extract of isaño had antibacterial effect at concentrations of 50 and 75mg/mL for both types of bacteria, proving to be better compared to strains ATCC that for clinical isolates. It was obtained inhibition halos average of 22 and 23 mm diameter for ATCC strains of *Escherichia coli* and 16 mm diameter for ATCC strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

In the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) technique was used in broth dilution turbidimétrica where it was noted that the ATCC strain of *Escherichia coli* obtained bacteriostatic effect to a concentration of 18.75mg/mL, while the ATCC strain of *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 37.5mg/mL

To determine the minimal bactericidal concentration (MBC) was planted 0.1 mL sample of the pipes without turbidity of the WCC in plates of Mueller Hinton where it was determined the bactericidal effect of the concentration of 75mg/mL for both strains ATCC.

An analysis was also conducted to phytochemical aqueous extract isaño, which revealed the presence of flavonoids, tannins, steroids, alkaloids, and glycosides; which show antimicrobial activity against microorganisms.

KEY WORDS: Isaño "*Tropaeolum tuberosum*", antibacterial activity in vitro, aqueous extract, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	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.....	3
1.2.1. Delimitaciones.....	3
1.2.2 Definición del problema.....	4
1.3 Formulación del problema a investigar.....	4
1.4 Objetivos de la investigación.....	5
1.4.1 Objetivo general.....	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
1.5 Hipótesis de la investigación.....	5
1.6 Variables e indicadores.....	6
1.7 Justificación e importancia 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	
A. Identificación, recolección y acondicionamiento del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ":	7
B. Preparación de los extractos acuosos del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ":	8

C. Características organolépticas del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "	9
D. Características fisicoquímicas del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "	9
E. Análisis fitoquímico del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "	12
F. Preparación del material biológico.....	17
G. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".	21
1. Prueba de susceptibilidad difusión- disco (Kirby bauer).....	21
2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	22
3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	23
1.10.2 Diseño de la investigación.....	25
1.11 Técnicas e instrumentos de recolección de información.....	25
1.12 Cobertura del estudio.....	26
1.12.1 Universo.....	26
1.12.2 Muestra.....	26

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos.....	27
2.2 Marco conceptual.....	30
2.2.1 Isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "	30
A. Características taxonómicas del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "......	31
B. Características botánicas del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "......	31
C. Composición del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "......	32

D. Distribución del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	33
E. Usos del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	34
2.2.2. Efecto antibacteriano o antimicrobiano.....	35
2.2.3. Efecto antibacteriano de metabolitos secundarios de plantas.....	36
2.2.4. Infecciones del tracto urinario.....	37
2.2.5. Bacterias.....	39
A. <i>Escherichia coli</i>	39
B. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41

CAPÍTULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Población y muestra.....	43
3.2. Tamaño de la muestra representativa.....	43
3.3. Análisis e interpretación de resultados.....	43

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones.....	53
4.2. Recomendaciones.....	54
Bibliografía.....	59
Anexos.....	64
Glosario de términos.....	91

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Recolección del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	64
Anexo 2: Escala de Mc Farland.....	65
Anexo 3: Estandarización de cepas con la Escala 0.5 de Mc Farland.....	66
Anexo 4: Acondicionamiento de los discos para antibiograma – Kirby Bauer.....	67
Anexo 5: Medios de cultivo.....	68
Anexo 6: Escala N°0.5 de Mc Farland.....	77
Anexo 7: Inóculo.....	78
Anexo 8: Discos de sensibilidad.....	79
Anexo 9: Estadístico de hipótesis (T de Student) entre cepas clínicas y ATCC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
Anexo 10: Estadístico de hipótesis (T de Student) entre cepas clínicas y ATCC de <i>Escherichia coli</i>	81
Anexo 11: Estadístico de hipótesis (ANOVA): densidad del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	82
Anexo 12: Estadístico de hipótesis (ANOVA): viscosidad del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	83
Anexo 13: Estadístico de hipótesis (ANOVA): pH del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	84
Anexo 14: Fichas de recolección de datos.....	85
Anexo 15: Certificados de cepas ATCC	87
Anexo 16: Certificados botánico del isaño.....	88
Anexo 17: Diseño de la investigación.....	89
Anexo 18: Concentración mínima inhibitoria y bactericida.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Operacionalización de la variable.....	6
Cuadro 2: Contenido de energía, vitaminas y minerales del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	32
Cuadro 3: Contenido de aminoácidos del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	32
Cuadro 4: Principales grupos fitoquímicos identificados en las raíces y tubérculos andinos.....	33
Cuadro 5: Metabolitos secundarios con efecto antibacteriano.....	36
Cuadro 6: Bacterias causantes de infecciones del tracto urinario.....	38
Cuadro 7: Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	40
Cuadro 8: Preparación de la escala de Mc Farland.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Identificación del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	8
Figura 2: Reacción de Libermann- Burchard.....	12
Figura 3: Reacción de Shinoda.....	13
Figura 4: Reacción con cloruro férrico.....	14
Figura 5: Reacción de Dragendorff.....	14
Figura 6: Determinación del índice de espuma.....	15
Figura 7: Reacción de Borntrager.....	16
Figura 8: Reacción de Molish.....	16
Figura 9: Cepas de <i>Escherichia coli</i> en agar EMB.....	18
Figura 10: <i>Escherichia coli</i> en agar TSI.....	18
Figura 11: <i>Escherichia coli</i> en agar Citrato de Simmons.....	19
Figura 12: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Cetrimide.....	20
Figura 13: Prueba de Oxidasa para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 14: Halo de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC.....	22
Figura 15: CMI de <i>Escherichia coli</i>	23
Figura 16: CMI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Figura 17: CMB de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 18: CMB de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figura 19: Isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	30
Figura 20: Recolección del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	64
Figura 21: Escala Mc Farland	65
Figura 22: Estandarización de cepas con la Escala 0.5 de Mc Farland	66
Figura 23: Placas petri con discos de papel Whatman N° 5.....	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Propiedades fisicoquímicas del extracto acuoso del “isaño” <i>Tropaeolum tuberosum</i>	46
Gráfico 2: Porcentaje de inhibición de los extractos en referencia al disco de gentamicina.....	50
Gráfico 3: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB)	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características organolépticas del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	44
Tabla 2: Análisis fisicoquímico del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".....	45
Tabla 3: Análisis fitoquímico del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> ".	47
Tabla 4: Susceptibilidad antibacteriana por difusión - disco (Kirby Bauer).	48
Tabla 5. Porcentaje de inhibición de los extractos acuoso del isaño en referencia al disco de gentamicina.....	49
Tabla 6: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB).....	51

INTRODUCCIÓN

Las infecciones urinarias constituyen la segunda causa de infección en el ámbito de la atención de salud. La *Escherichia coli* es la causa más frecuente de infecciones urinarias, mientras la *Pseudomonas aeruginosa* es una causa importante de infecciones oportunistas y nosocomiales que aunque no sea la causa más común puede causar infecciones severas, particularmente en pacientes cateterizados y/o con anormalidades del trato urinario.

Las infecciones del tracto urinario (ITU'S) en general son tratadas con antibióticos. Si bien en algunos casos las infecciones se resuelven fácilmente y sin complicaciones, algunos pacientes no responden a esta terapia o sufren una infección recurrente luego de un tratamiento aparentemente exitoso. La evolución en los patrones de resistencia a los diferentes antibióticos empleados para el tratamiento de las infecciones urinarias presenta un grave problema de salud pública. La sensibilidad a los antibióticos de las bacterias que causan ITU a evolucionado durante décadas de tratamiento que favorecieron la aparición de cepas multiresistentes de diversos uropatógenos. Por ello es necesario buscar opciones terapéuticas diferentes, además de hacer un uso más racional de la antibioticoterapia en los episodios de ITU'S.¹

El interés científico se ha intensificado en la búsqueda de nuevas drogas provenientes de fuentes naturales, las cuales constituyen una excelente fuente de metabolitos secundarios,

¹ Astete S, Flores F, Buckey D. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el hospital Nacional Arzobispo Loayza. Rev. Soc. Per. Med. Int. [online]. 2004 [Consultado 28 jul 2016]; 17(1). pág. 2

convirtiéndose en una medicina alternativa para infecciones bacterianas y fúngicas. Particularmente el tubérculo del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" también conocido con el nombre de mashua es utilizado para el tratamiento de infecciones urinarias "mal de orina".

Por consiguiente, la investigación pretende evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" frente a cepas causantes de infección del tracto urinario, para así resaltar, y rescatar los valores ancestrales sobre su uso, posibilitando en un futuro su cultivo sostenible para la elaboración y comercialización como medicamento, brindando una nueva alternativa económica en el control, prevención y tratamiento en infecciones del tracto urinario. Así mismo, los resultados obtenidos servirán como base para el inicio de muchas otras investigaciones referente a esta especie muy poco estudiada.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1 Descripción de la realidad problemática:

Las infecciones del tracto urinario (ITU'S) son consideradas como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas. Las vías urinarias pueden ser afectadas por bacterias, hongos y parásitos, entre estas las ITU'S de tipo bacteriana son las que se desarrollan mayoritariamente, el agente etiológico más frecuente de ITU'S es la *Escherichia coli* responsable del 75% al 80% de casos, el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, siendo esta última la causante más común de ITU hospitalaria o nosocomial debido al cateterismo vesical.²

Entre las infecciones más importantes del ser humano, las ITU'S constituyen un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año, es la segunda causa de infección más frecuente en los humanos, y es solo superada por las infecciones del tracto respiratorio; estas ocurren a cualquier edad de la vida, aunque el principal impacto es en mujeres, hombres en los dos extremos de la vida, pacientes con trasplante renal, anomalías estructurales o funcionales del riñón y/o del tracto

² Prats Guillem. Microbiología clínica. 1º edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2005. Pág. 239

urinario, la proporción de frecuencia de ITU entre mujeres y hombres jóvenes es de 30:1; sin embargo, conforme el hombre envejece, esta proporción tiende a igualarse.

Se estima que globalmente ocurren al menos 150 millones de casos de ITU por año; en E.E. U.U., 7 millones de consultas son solicitadas cada año por ITU; en el Perú se desconocen cifras exactas pero es muy probable que sean similares, sin embargo, es difícil determinar su incidencia real debido a que no es una enfermedad reportable, esto se agrava por el hecho de que un diagnóstico certero requiere tanto de la clínica como del urocultivo positivo, en el contexto ambulatorio el diagnóstico se hace por lo general sin urocultivo. Las infecciones urinarias asociadas con sondas vesicales constituyen el 35% a 40% de todas las infecciones nosocomiales en general.³

Muchas veces el uso excesivo de antibióticos, pudiendo señalar específicamente el grupo terapéutico de las quinolonas que son ampliamente utilizadas para tratar este tipo de infecciones, facilitan la resistencia a este grupo antibiótico quedando imposibilitado su uso en posteriores infecciones y también agotando de alguna forma las alternativas para su tratamiento.

Comparativamente con los medicamentos convencionales que son desarrollados por avanzadas industrias farmacéuticas, poseen efectos adversos que promueven muchas veces el uso de alternativas fitoterapéuticas, tal es el caso del isaño, el cual es comercializado y recomendado para las infecciones del tracto urinario.

³ Astete S, op cit., pág. 5

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 Arequipa.

B. Delimitación temporal:

El estudio fué realizado entre los meses de julio a noviembre del 2016.

C. Delimitación social:

Aporte científico acerca del posible efecto antibacteriano del isaño "*Tropaeolum tuberosum*", en tanto que los resultados del estudio estarán a disposición de los profesionales de la salud, como de las personas en general.

D. Delimitación conceptual

1. **Área:** Ciencias de la salud.

2. **Campo:** Farmacia y Bioquímica.

3. **Línea:** Fitoterapia

4. **Tema general:** Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* de extracto vegetal en cepas bacterianas causantes de infección de tracto urinario.

5. **Tema específico:** Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso del isaño en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario.

1.2.2 Definición del problema:

Las infecciones del tracto urinario constituyen un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año, es la segunda causa de infección más frecuente solo superada por las infecciones del tracto respiratorio.⁴ La presente investigación tiene como fin brindar una alternativa fitoterapéutica a las infecciones del tracto urinario, las cuales pueden producir serios problemas de salud.

1.3 Formulación del problema a investigar

¿Se podrá evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso del isaño, “*Tropaeolum tuberosum*”, en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infección del tracto urinario, Arequipa 2016?

1.3.1 Subproblemas

- ¿Cuál es la actividad antibacteriana en la prueba de difusión de Kirby Bauer del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*” en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, Arequipa 2016?
- ¿Cuál es concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*” en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, Arequipa 2016?
- ¿Cuál es concentración bactericida mínima del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*” en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, Arequipa 2016?

⁴ Astete S. *Op. Cit.*, pág. 1.

1.4 Objetivo de la investigación:

1.4.1 Objetivo general:

- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, Arequipa 2016.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Identificar la actividad antibacteriana del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, por el método de disco - difusión de Kirby Bauer, Arequipa 2016.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, Arequipa 2016.
- Determinar la concentración mínima bactericida del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario, Arequipa 2016.

1.5 Hipótesis de la investigación

Dado que el isaño posee isotiocianatos (producto de degradación de los glicosinolatos) los cuales presentan actividad antibacteriana es probable que el extracto acuoso de isaño "*Tropaeolum tuberosum*" posea efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas causantes de infecciones de tracto urinario - Arequipa 2016.

1.6 Variables e indicadores:

Cuadro 1: Operacionalización de la variable

Variable	Dimensiones	Indicadores	Tipo de variable	Escala	Item
Efecto antibacteriano del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> "	Difusión en disco: Kirby Bauer	Medición de halos de inhibición (mm)	Cualitativa	Nominal	3
	CIM	Turbidimetría (%)	Cuantitativa continua	Razón	
	CBM	Presencia/ausencia de crecimiento bacteriano (UFC)	Cuantitativa continua	Razón	

Fuente: Elaboración propia

1.7 Justificación e importancia de la investigación

El isaño es un tubérculo que resiste condiciones climáticas adversas, de poco uso, con un bajo costo de cultivo, es usada en los andes por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y antibacterianas, tiene un amplio uso en las prostatitis, enfermedades renales y hepáticas así como infecciones urinarias, preferentemente debido a la cantidad de isotiocianatos (producto de la hidrólisis del glicosinolato que se encuentra en el isaño, el cual se descompone por acción de la mirosinasa, enzima que permite la degradación de este metabolito secundario como respuesta a cortes o agresión externa) presentes en su composición.⁵

Es precisamente debido a este uso empírico que se realiza la investigación para comprobar su efecto antibacteriano, ya que ésta podría representar una alternativa terapéutica a futuro y con estudios posteriores, un importante precedente para el tratamiento de infecciones urinarias comunes e intrahospitalarias.

⁵ Huamani A. Composición físico – química de la mashua [Tesis]. Ayacucho – Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014

Al formar parte del reino vegetal y ser utilizado de forma natural, este estudio será de mucha importancia dentro del campo de la fitoterapia, constituyendo una opción de tratamiento frente a patologías urinarias dentro del campo de la medicina alternativa y medicina en general, ya que de comprobarse su efecto *in vitro* se podría evaluar la viabilidad de darle una forma farmacéutica y tratar esas enfermedades.

1.8 Limitaciones de la investigación

Escasez bibliográfica de investigaciones científicas sobre el isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en el campo de la salud.

1.9 Tipo y nivel de investigación:

1.9.1 Tipo de investigación

Investigación observacional, aplicada.

1.9.2 Nivel de investigación

Nivel de investigación básico, explicativo.

1.10 Método y diseño de la investigación

1.10.1 Métodos de la investigación

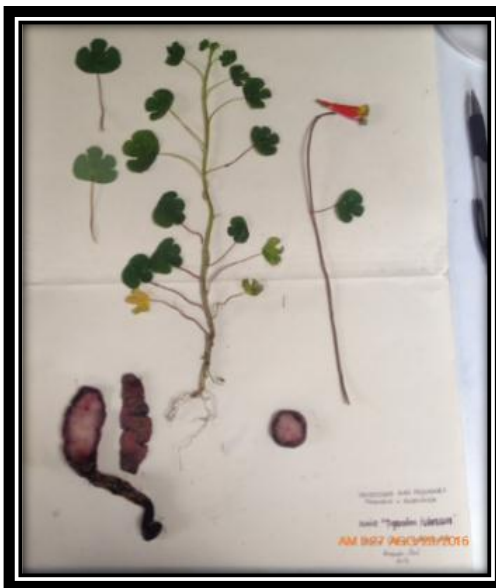
A. Identificación, recolección y acondicionamiento del isaño "*Tropaeolum tuberosum*":

La identificación del isaño se hizo en el herbario botánico Arequipense – HUSA (Anexo 19). La planta se recolectó, de terrenos de cultivo areno-arcilloso establecidos a 3.850 m.s.n.m. en el distrito de llave, provincia de Collao, en el departamento de Puno, Perú.

La cantidad de material vegetal que se recolectaron aproximadamente fue 5 Kg. los cuales se colocaron en una lata de 22 cm. de diámetro, conservadas a temperatura ambiente en un lugar fresco y a la sombra para su identificación. El material vegetal se lavó previamente con agua destilada, luego se desinfectó con

hipoclorito de sodio 1% y con tiempo de inmersión de 10 minutos por tratarse de tuberosas. Se secó y almacenó en un lugar fresco y sin humedad, a la sombra.⁶

Figura 1: Identificación del isaño "*Tropaeolum*"



Fuente: Elaboración propia

B. Preparación de los extractos acuosos del isaño "*Tropaeolum tuberosum*":

Se utilizó el método de extracción con disolventes (decocción), el cual se basa en el traslado de sustancias que se encuentran dentro de la célula hacia el exterior, a través de una membrana celular porosa.⁷

Se realizó cuatro extractos acuosos de las concentraciones siguientes: 10, 25, 50 y 75mg/mL, para lo cual se cortó en pequeñas partes el isaño, luego se pesó 10 mg del material vegetal, por otro lado se midió 100 ml de agua destilada con una probeta, luego se trasvasó a un vaso de precipitados y se colocó el material vegetal para su decocción por 15 minutos, finalmente se envasa el extracto en un frasco ámbar. Seguidamente se repite el mismo procedimiento para las demás concentraciones siendo estas: 25mg en 100 ml, 50mg en 100 ml, y 75mg en 100.

⁶ Martínez M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1ra Edición. Cuba: Editorial Félix Varela; 2001. Pág. 40

⁷ *Ibit.*, pág. 152

C. Características organolépticas del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

Es una prueba objetiva que se basa en la percepción a través de los sentidos del investigador⁸

1. Color:

Se procedió a colocar cada extracto en un vaso beaker y se observó el color a tras luz.

2. Olor:

Se tomó una tira de papel filtro de aproximadamente 1 cm. de anchura por 10 cm. de longitud y se introdujo un extremo en la muestra. Se olió y se determinó la característica del extracto.

3. Sabor:

Se tomó una alícuota y a través del sentido del gusto se probó el extracto.

D. Análisis fisicoquímico del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

1. pH (Potencial de hidrogeniones)

Se utilizó el método potenciométrico el cual se fundamenta de que entre dos disoluciones con distinta $[H^+]$ se establece una diferencia de potencial. Esta diferencia de potencial determina que cuando las dos disoluciones se ponen en contacto se produzca un flujo de $[H^+]$ o en otras palabras, una corriente eléctrica. El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una muestra.⁹

Para lo cual se procedió primero a calibrar el potenciómetro utilizando dos soluciones buffer de pH conocido (4 y 7), luego se enjuagó con agua destilada y

⁸ Martínez M, op. cit.,pág. 139

⁹ Rodríguez, Nancy. Manual de laboratorio azucarero. 1ª Edición. Habana: Editorial Pueblo y educación; 1998. Pág. 50

se secó con papel filtro el electrodo; luego se lava un tubo de ensayo, se seca y se enche con el extracto. Se espera 3 minutos después de cada medición, se enjuaga cuidadosamente el electrodo con agua destilada. Las pruebas se realizaron por triplicado.

2. Densidad

Se utilizó el método del picnómetro el cual se fundamenta en la ligereza o pesadez de una sustancia es decir, cuando mayor sea la densidad de un cuerpo, más pesado nos parecerá.¹⁰

Primero se pesó el picnómetro de 25 mL vacío y se anotó su masa (M_1); luego se pesó el picnómetro con cada una de las muestras del extracto acuoso del isaño y se anotó su masa (M_2). El picnómetro se enrasó (llenarlo completamente, evitando la formación de burbujas en su interior) con cada una de las muestras y al tapanlo se secó el agua que rebosó por fuera con papel filtro. Las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se calcularon según fórmula.

$$\rho = (M_2 - M_1) / VP$$

Donde:

ρ : Densidad de la muestra.

M_1 : peso del picnómetro vacío (g)

M_2 : peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (mL)

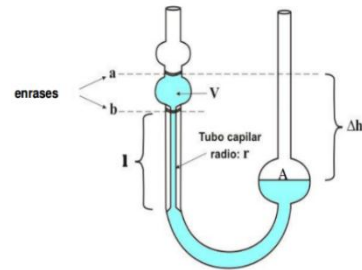
¹⁰ Atarés L. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro [Sede web]. Universidad Politécnica de Valencia. [Consultado el 8 de agosto del 2016]. pág 11

3. Viscosidad

Se utilizó el método de medición de viscosidad, el cual se fundamenta en la resistencia de los líquidos a fluir.¹¹

Se hizo uso del viscosímetro de Ostwald; con una pipeta se introdujo alcohol en la ampolla hasta más de la mitad de la misma, se insufló para que el líquido llene el volumen quedando un poco más arriba del engrase; se dejó escurrir el líquido poniendo en marcha el cronómetro en el momento en que la superficie del líquido sobrepasa, luego se dejó que seque; para después hacer lo mismo con el agua destilada y después con las diferentes muestras del extracto acuoso del isaño. Las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se calcularon según fórmula.

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{\rho_1 * t_1}{\rho_2 * t_2}$$



Donde:

η_1 = Viscosidad del agua (Líquido de referencia).

η_2 = Viscosidad del líquido problema.

ρ_1 = Densidad del agua.

ρ_2 = Densidad del líquido problema.

t_1 = Tiempo en pasar el agua por las marcas a y b.

t_2 = Tiempo en pasar el líquido problema entre las marcas a y b.

¹¹ Rodríguez, Nancy. Manual de laboratorio azucarero. 1^{ra} Edición. Habana: Editorial Pueblo y educación; 1998. Pág. 51

E. Análisis fitoquímico del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*".

1. Identificación de Terpenos y esteroides

Se utilizó el reactivo de **Libermann- Burchard** (prueba colorimétrica), el cual se fundamenta debido al grupo hidroxilo [-OH] que al reaccionar con los reactivos y el aumento de la conjugación de la instauración en el anillo fusionado adyacente.¹²

Para lo cual 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 mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2 o 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo da verde que varía hasta el azul petróleo indica reacción positiva para esteroide. Si da desde amarillo naranja hasta pardo amarronado, es positiva para triterpenos.

Figura 2: Reacción de **Libermann- Burchard**



Fuente: Elaboración propia

¹² Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da Edición. Perú: Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994. Pág. 187

2. Identificación de Flavonoides

Se utilizó el reactivo de **Shinoda**; la cual 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.⁹ Para lo cual 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.

Figura 3: Reacción de **Shinoda**



Fuente: Elaboración propia

3. Identificación de Taninos

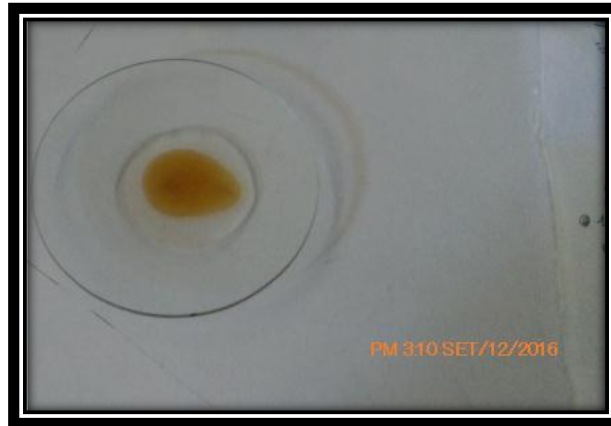
La identificación se realizó con **cloruro férrico**, esta prueba se fundamenta en que al reaccionar los taninos con el FeCl_3 van a formar complejos de Fe^{+3} produciendo diferentes coloraciones (verde a azul) dependiendo.¹³

En un tubo de ensayo, a 1 mL de extracto, se le añadió 0.5 mL de solución de FeCl_3 5% hasta la formación de complejos coloreados (color verde oscuro indica

¹³ Kuklinsky, Claudia. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2da Edición. España: Editorial Omega; 2006. Pág. 115

presencia de taninos catéquicos, mientras que la coloración azul indica presencia de taninos gálicos).

Figura 4: Reacción con cloruro férrico



Fuente: Elaboración propia

4. Identificación de Alcaloides

Se utilizó el reactivo de **Dragendorff**, el cual 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.⁹

Se probó en un tubo de ensayo donde se adicionó 1 mL de extracto, después se agregó gota a gota el reactivo de Dragendorff. La prueba es positiva si se observa la formación de un precipitado naranja.

Figura 5: Reacción de **Dragendorff**



Fuente: Elaboración propia

5. Identificación de Saponinas

Se realizó a través de la determinación del **índice de espuma** el cual se basa en disminuir la tensión superficial del agua, formando espuma abundante.¹⁴ Para lograrlo en un tubo se colocó 2 mL de extracto obtenido, se agitó vigorosamente durante un minuto, luego se observa la cantidad y persistencia de la espuma formada, Se mide la altura de la espuma a los 5 y 15 minutos. Se considera positiva cuando la espuma es mayor o igual a 0.5 cm y perdura 15 minutos o más. Si se forma abundante espuma estable aproximadamente 5 minutos, es prueba presuntiva de presencia de saponinas en la muestra.

Figura 6: Determinación del **índice de espuma**



Fuente: Elaboración propia

6. Identificación de Quinonas

Se usó el reactivo de **Borntrager**; el cual se fundamenta en el estado de resonancia de los hidroxilos fenólicos, quedando el núcleo libre.

Para lo cual se disolvió en 1 mL de cloroformo con 2 mL de extracto acuoso, se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua, se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su separación. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rojo o rosado el ensayo es positivo.

¹⁴Kuklinsky, Claudia, op. cit., pág. 116

Figura 7: Reacción de Borntrager



Fuente: Elaboración propia

7. Identificación de glicósidos

Se utilizó el reactivo de **Molish** la cual se fundamenta en que los azúcares, en medio ácido fuerte se deshidratan formando furfurales, estos furfurales al reaccionar con el α -naftol originan complejos de intenso color.

Para lo cual se colocó 1 mL de muestra luego se adiciona el reactivo de Molish posteriormente se adiciona ácido sulfúrico (H_2SO_4). Se considera positivo cuando se forma un precipitado rojo que al disolverse, colorea la solución.

Figura 8: Reacción de **Molish**



Fuente: Elaboración propia

F. Preparación del material biológico

Se trabajó con dos tipos de cepas:

- Cepas estándares ATCC (American Type Culture Collection) *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Cepas clínicas (Hospital Goyeneche) *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

6. Reactivación de las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Esta cepa pura fué adquirida comercialmente, la misma que se encuentra depositada en *American Type Culture Collection*

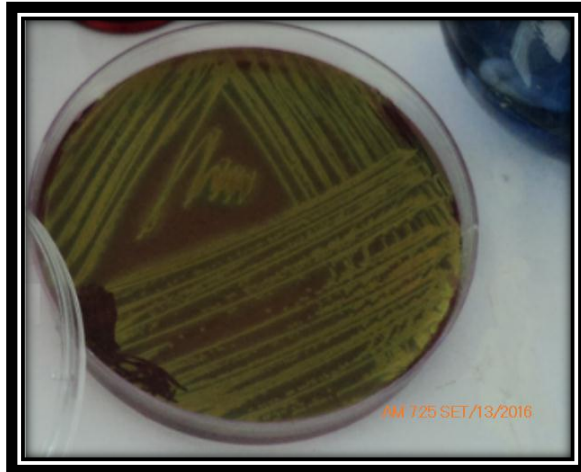
Para su reactivación se agitó el vial en forma de lapicero para diluir el liofilizado con el medio líquido que se encontraba en la parte opuesta distal del mismo, inmediatamente después con un hisopo se sacó una muestra del inóculo para luego transferirla a un medio de agar nutritivo (Mueller Hinton). Se incubó a 37°C durante 24 horas.

2. Cepas clínicas de *Escherichia coli*

a. Pruebas bioquímicas para reconocimiento de cepas de *Escherichia coli*

Se sembró la muestra, en agar Mueller Hinton, se incubó a 37°C por 24 horas, se obtuvo colonias cremas. Luego se sembró en agar EMB por 24 horas, las colonias de *Escherichia coli* fueron de color verde metálico.

Figura 9: Cepas de *Escherichia coli* en agar EMB



Fuente: Elaboración propia

- **Triple Azúcar Hierro (TSI):**

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. La degradación de los tres hidratos de carbono produjo un pH ácido ocasionando el viraje del indicador rojo fenol a amarillo. A/A + - Lactosa (+), Sacarosa (+), Glucosa (+), CO₂(+), H₂S(-).¹¹

Figura 10: *Escherichia coli* en agar TSI



Fuente: Elaboración propia

- **Agar Citrato de Simmons:**

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 positiva cuando el medio cambia de un color verde a un color azul; para el caso de la *Escherichia coli* es negativo.¹⁵

Figura 11: *Escherichia coli* en agar Citrato de Simmons



Fuente: Elaboración propia

b. Pruebas bioquímicas para reconocimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Utilizando el agar Mueller Hinton preparado anteriormente se sembró la muestra de *Pseudomonas aeruginosa*, se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas.

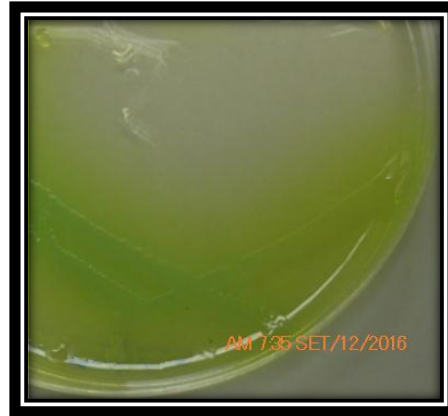
- **Sembrado de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimide**

Se sembró la muestra de *Pseudomonas aeruginosa*, en agar Cetrimide en placa, se dejó en la estufa a 37°C por 72 horas. Se verificó el crecimiento de

¹⁵ Granados R. Villaverde C. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general. 2º edición. España: Editorial paraninfo S. A; 1998. . pág. 133 - 139

las colonias por la producción de piocianina y fluoresceína, que muestran un aspecto verde fosforescente a las colonias.

Figura 12: *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimide



Fuente: Elaboración propia

- **Prueba de la oxidasa**

Se utilizó el reactivo de Kovacs (solución al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina) el cual tiñó las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* a púrpura (positividad de la reacción)¹⁶

Figura 13: Prueba de Oxidasa para *Pseudomonas aeruginosa*



Fuente: Elaboración propia

¹⁶ Granados R, *op cit.*, pág. 97

G. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

1. Prueba de susceptibilidad disco – difusión (Kirby bauer)

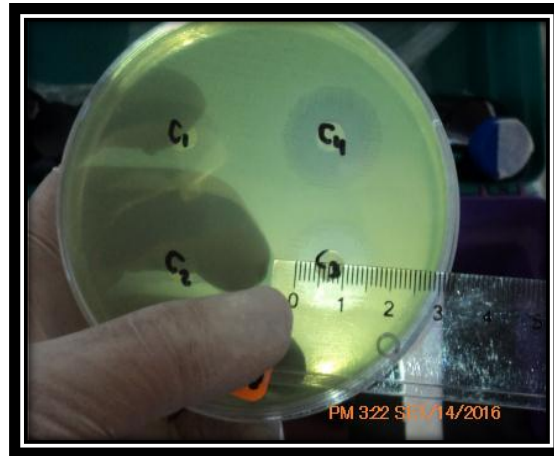
Se utilizó cepas ATCC y clínicas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* además de un disco de gentamicina de 10ug el cual se tomó como control negativo de crecimiento. Se evaluó tanto la potencia antibiótica en la muestra como la “sensibilidad” del microorganismo.

La técnica de Kirby Bauer se fundamenta en la difusión de sustancias activas en un medio sólido, y que se evidencia por la formación de halos de inhibición; para lo cual se prepararon placas con agar Mueller Hinton a las cuales con ayuda de un hisopo estéril se les inoculó una suspensión de los microorganismo (*E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a la escala 0.5 de Mc Farland.¹⁷ (Anexo 2)

Sobre las placas se colocaron discos de papel Whatman N° 5 (Anexo 4), conteniendo las concentraciones del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”: 10, 25, 50 y 75%. Las placas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente, luego del período de incubación se realizó la lectura de los halos de inhibición (mm). Todos los ensayos de actividad antibacteriana se realizaron por triplicado.

¹⁷ Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al. Manual práctico de microbiología. 2da Edición. España: Editorial Masson; 2003. pág. 136

Figura 14: Halo de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC



Fuente: Elaboración propia

2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se utilizó el método dilución en caldo, el cual se basa en la turbidez que las bacterias evidencian en los tubos debido al crecimiento de las mismas en medio líquido, para lo cual se realizaron diluciones seriada del extracto acuoso “madre”, en una serie de 15 tubos que contenían igual cantidad de caldo Mueller Hinton. El tubo número 15 no tenía extracto acuoso y sirvió de control positivo de crecimiento. Un tubo extra no tenía inóculo y sirvió de control negativo de inhibición. Se agrega 1 ml de la suspensión microbiana con 10^6 UFC/ml a la serie de 10 tubos y se incuba a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 horas.

El microorganismo crece en el tubo control positivo de crecimiento y en todos los otros que no contengan suficiente agente antibacteriano como para inhibir su desarrollo. Al término de la incubación, se observa el primer tubo de la serie que presenta turbidez, el tubo anterior a este (tubo que no presenta turbidez), es el que corresponde a la concentración mínima inhibitoria (CMI).¹⁸

¹⁸ Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al., *op. cit.*, pág. 140

Figura 15: CMI de *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

Figura 16: CMI de *Pseudomonas aeruginosa*



Fuente: Elaboración propia

3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Se tomó un inóculo de 0,1 mL del tubo testigo inmediatamente después de ser sembrado y se lo disemina con espátula de Digrasky sobre una placa de Mueller Hinton. Se incuba durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, puede

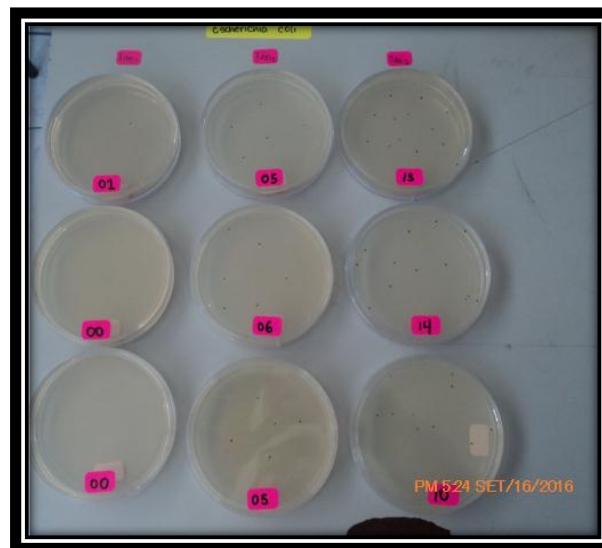
determinarse el número real de UFC del inóculo. Para obtener un resultado con precisión estadística suficiente se aplica la siguiente fórmula:

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

De cada uno de los tubos con caldo que no presenta turbidez luego de la incubación, se siembra 0,1 ml en placas con agar Mueller Hinton (la pequeña cantidad de antibacteriano selectivo que es llevada junto con el inóculo se considera despreciable por su difusión en el agar).

Se incuba por 18 horas. Se realiza el recuento del número de colonias que se desarrollan en los subcultivos y se aplica el cálculo anterior para obtener el número de UFC/mL y compararlo con el valor de cultivo original. La menor concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos del 0,1% del inóculo original se denominará concentración bactericida mínima o concentración letal mínima.¹⁹

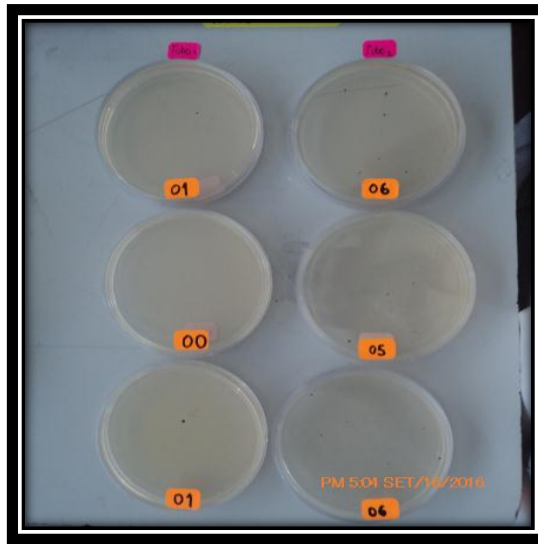
Figura 17: CMB de *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

¹⁹ Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al., *op. cit.*, pág. 141

Figura 18: CMB de *Pseudomonas aeruginosa*



Fuente: Elaboración propia

1.10.2 Diseño de la investigación

La investigación corresponde a un diseño explicativo. (Anexo 20)

1.11 Técnicas e instrumentos de recolección de información

a) Técnicas de muestreo:

Se utilizó el muestreo aleatorio simple para obtenerse una muestra de 5 Kg.

b) Técnicas para recolectar información:

Para la determinación del efecto antibacteriano del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" se tomó en cuenta:

• Fuentes primarias:

Para determinar algunas características botánicas se utilizó la observación directa, e identificación botánica en el Herbarium Arequipense HUSA además, para los análisis físico-químicos, se realizan pruebas por triplicado. Además de la experimentación para determinar el efecto antibacteriano del extracto del isaño

- **Fuentes secundarias:**

Para la recolección de datos, se tomó en cuenta material bibliográfico comprendido por libros, artículos o publicaciones, estas dos últimas en un rango no mayor de 5 años de antigüedad.

- c) **Técnicas estadísticas para el manejo de datos:**

Se usará el paquete estadístico SPSS con un nivel de confianza de 95%.

1.12 Cobertura del Estudio

1.12.1 Universo: Isaño "*Tropaeolum tuberosum*"

1.12.2 Muestra:

5 Kg de isaño del departamento de Puno, Perú a 3.850 m.s.n.m; las cuales fueron recolectadas el 10 de Agosto del 2016 a las 6:00 am.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos:

Compuestos antifúngicos en tubérculos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*). Lima-Perú 2010.

Autor: Noemí González Delgado

Institución: Universidad Mayor de san Marcos

Año: 2010

Resumen:

En el trabajo de investigación se pretendió extraer y purificar compuestos que presentasen actividad antifúngica o antibacteriana, a partir de tubérculos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*). Se trabajó, de manera independiente, con un extracto de proteínas de pared celular y con un extracto etanólico. En las pruebas realizadas con el extracto de proteínas de pared celular no se encontró ninguna actividad inhibitoria en *Candida albicans*, sino más bien un efecto contrario. Sin embargo, del extracto etanólico se logró purificar, con ayuda de diferentes técnicas cromatografías, un compuesto con actividad antifúngica permanente y actividad antibacteriana transitoria. En las pruebas de actividad biológica se ensayó con *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* y *Enterobacter sp*. El compuesto

purificado es incoloro, bastante volátil y con cierto olor a anís, muy hidrofóbico, soluble en cloroformo, acetonitrilo, metanol y etanol, pero insoluble en soluciones etanólicas con más de 30% de agua.

Relaciones estructura función de la actividad antimicrobiana de isotiocianatos de *Tropaeolum tuberosum* (mashua) y diversos análogos funcionales sintéticos. España 2011.

Autor: Karina Valer Saldaña.

Institución: Universidad Complutense de Madrid.

Año: 2011

Resumen:

Realizó una investigación denominada; en el trabajo se estudió el efecto inhibitorio y la relación estructura-función del isotiocianato mayoritario aislable de tubérculos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*), el 4-metoxibencilisotiocianato (4- MBITC) y de diversos análogos funcionales sintéticos, en los siguientes organismos: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Phytophthora sojae* cuantificando la actividad biológica. Para realizar el estudio de relación estructura-función se dividió la estructura del 4-MBITC en cuatro áreas funcionales, modificándolas de modo tal que se pudiera observar cuáles eran responsables de producir un mayor efecto inhibitorio. Se comprobó que los compuestos que presentaban mayor efecto inhibitorio eran los que tenían en su estructura el grupo aromático, el grupo isotiocianato y un grupo etileno como espaciador entre ambos. Los isotiocianatos alifáticos, saturados o insaturados, no presentaron el efecto inhibitorio que sí mostraron los aromáticos. También se comprobó que, de los organismos estudiados, *P. sojae*, un patógeno vegetal, era el que presentaba mayor sensibilidad frente a los isotiocianatos estudiados.

Determinación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*. Lima-Perú 2014

Autor: Jessica Flores Romero

Institución: Universidad Mayor de San Marcos.

Año 2014

Resumen:

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*. Se empleó el método de disco-difusión en agar. Se acondicionó discos de papel filtro Wathman n°5 de 6 mm de diámetro y un espesor de 0.02mm inoculándose 10 uL de cada una de las concentraciones del extracto. El sembrado se realizó en 14 placas con agar Müller-Hinton mediante la técnica de difusión, utilizando el aceite esencial en concentraciones de 10, 50 y 100%, y se procedió a la incubación en microaerofilia a 37 °C por 24 horas. Las concentraciones al 10, 50 y 100% presentaron un halo de inhibición promedio de 6.28, 7.88 y 8.66 mm respectivamente, la diferencia de promedios entre estas tres concentraciones mostró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Se concluye que las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, presentan actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.

Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas de Chile sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Chile 2012.

Autor: María Angélica Ocares Cerón.

Institución: Universidad Austral de Chile.

Año: 2012

Resumen:

En el presente trabajo se seleccionaron 13 especies de plantas nativas de Chile, con el objetivo de evaluar su capacidad antagonista frente a cepas de *Escherichia coli* y

Salmonella spp. Para conocer la relación existente entre la actividad antimicrobiana (tamaño de los halos de inhibición) y el pH de los extractos, se midió el pH de los extractos metanólicos y clorofórmicos de cada una de las especies analizadas; los extractos presentaron un pH ácido con valores que oscilaron entre 2,0 y 6,1. Sin embargo, la presencia de halos de inhibición en los extractos metanólicos y la ausencia de halos de inhibición en los clorofórmicos, permitió comprobar que el efecto del pH ácido no fué un factor determinante en las inhibiciones observadas, ya que los extractos clorofórmicos, que presentaron los valores de pH más bajos que corresponden a las especies de Canelo, Temu y Luma, no presentaron actividad antagonista.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Tropaeolum tuberosum* (isaño)

Figura 19: Isaño "*Tropaeolum tuberosum*".



Fuente: Elaboración propia

A. Características taxonómicas del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Rosidae

Orden Brassicales

Familia Tropaeolaceae

Género *Tropaeolum*

Especie *Tropaeolum tuberosum*²⁰

B. Características botánicas del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

1. **Tallos:** Planta herbácea erecta o semiprostrada, de tallos cilíndricos y hábitos rastreros.
2. **Hojas:** Esta planta posee un follaje compacto, con hojas de color verde oscuro en el haz y más claras en el envés. Las hojas tienen lámina redondeada y el peciolo inserto en el centro.
3. **Flores:** Flores solitarias de distintos colores que van desde el anaranjado hasta el rojo oscuro. El número de estambres varía de 8 a 13, y el tiempo que permanece abierta oscila entre 9 y 15 días.
4. **Tubérculos:** Los tubérculos miden de 5 a 15 cm de largo, tienen forma cónica alargada, yemas profundas, y variados colores como el amarillo, blanco, rojizo, morado, gris y negro, con jaspes oscuros en la piel. El tubérculo posee una textura arenosa y contiene 15 % de proteínas, con alto porcentaje de carbohidratos y 80 % de agua. Debido a la presencia de isotiocianatos, que también se encuentran en la mostaza y los rabanitos, el isaño tiene un sabor acre y picante, pero que desaparece con la cocción volviéndose dulce.²¹

²⁰ Mariño Leoncio. Identificación etnobotánica. pág. 1

²¹ Barrera V, Tapia C, Monteros A. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador [Sede web]. Ecuador [Consultado el 4 de agosto del 2016]. Pág. 15

C. Composición del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

Un estudio realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) en los Andes Peruanos, determina la siguiente composición:

Cuadro 2: Contenido de energía, vitaminas y minerales del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

Parámetro	Unidad	Valor
Humedad	%	88,70
Cenizas	%	4,81
Proteína	%	9,17
Grasa	%	4.61
Carbohidrato total	%	75,40
Ca	%	0,006
P	%	0,32
Mg	%	0,11
Na	%	0,044
Fe	%	42.00
Mn	ppm	7.00
Azucar total	%	42,81
Vitamina A	ug	10.03
Vitamina B1	mg	0.12
Vitamina B2	mg	0.12
Vitamina C	mg	76.50

Fuente: Banco de Germoplasma del INIAP (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria).2004. ²²

Cuadro 3: Contenido de aminoácidos del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

Aminoácido	Unidad	Isaño
Histidina	%	0.13
Isoleucina	%	0.10
Leucina	%	0.06
Metionina + Cistina	%	0.12
Treonina	%	0.07
Valina	%	0.11

Fuente: Banco de Germoplasma del INIAP (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria).2004. ¹⁷

En el siguiente cuadro se hace referencia de los principales metabolitos que se encuentran en el isaño “*Tropaeolum tuberosum*”:

²² Díaz F. Composición físico química de la mashua [Sede web]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. [Consultado el 9 de agosto del 2016]. Pág. 32

Cuadro 4: Principales grupos fitoquímicos identificados en las raíces y tubérculos andinos.

Metabolitos secundarios en el isaño "<i>Tropaeolum tuberosum</i>"	
Terpenos y esteroides	Las saponinas que son glicósidos de los triterpenos y esteroides se encuentran en todas las especies de raíces y tubérculos andinos, se han detectado en el isaño aunque no constituyen fuentes ricas de saponinas. Un ensayo preliminar por Griffing y colaboradores consultado por Domínguez (1986), aplicado a muestras de isaño, dio positivo la presencia de esteroides.
compuestos fenólicos	Casi todos los compuestos fenólicos poseen alguna actividad biológica o farmacológica. En general son desinfectantes, antisépticos urinarios y diuréticos. Mediante reacciones específicas de coloración, se detectó la presencia de flavonas en el isaño, las cuales tiene acción farmacológica más potente que las flavononas.
Alcaloides	En ninguna de las especies de raíces y tubérculos andinos (papa, oca olluco e isaño) se evidencia presencia de alcaloides a través del reactivo de Mayer, Wagner y Dragendorff.

Fuente: Espín S, Villacrés E, Brito B. Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de RT²³

Elaboración: Propia

D. Distribución del isaño "*Tropaeolum tuberosum*"

El isaño es una planta originaria de los Andes centrales. Crece en forma silvestre o cultivada; su cultivo se concentra a partir de los 1 500 hasta los 4 200 msnm y su distribución geográfica es desde Colombia hasta Bolivia. Es tolerante a bajas temperaturas y al ataque de insectos y plagas.²⁴

²³ Espín S, Villacrés E, Brito B. Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos [Sede web].Ecuador.2014.pág. 111

²⁴ Barrera V. *op. cit.* pág 20

El isaño es una planta de fácil cultivo que puede ser cosechada a los 6 u 8 meses de su siembra, y está asociada a la pobreza en vista que se desarrolla en pisos altitudinales elevados. Crece en suelos pobres y no requiere del uso de fertilizantes ni pesticidas, es resistente a las heladas, y en estado natural es capaz de repeler insectos y nematodos, ya que debido a un mecanismo de defensa, la planta produce isotiocianatos (producto de degradación de los glucosinolatos)²⁵

Los tubérculos pueden ser almacenados hasta seis meses en lugares fríos y ventilados, inclusive pueden ser guardados bajo el suelo para ser extraído cuando se necesiten. El cultivo del isaño es muy productivo, pudiendo llegar a rendir hasta 25 t/ha. En el Perú la mayor concentración se encuentra en las zonas agroecológicas de Puno. La producción anual de isaño se concentra en mayor volumen en la provincia de Azángaro con 1,704 toneladas que representa el 28%, Carabaya con 709 toneladas que representa el 12%, Huancané con 707 toneladas que representa el 12 %, Yunguyo con 550 toneladas que representa el 9 %, Puno 8 % y Sandía 8 %, la provincia de Melgar es la menor productora de isaño con 88 toneladas, donde generalmente se cultiva en mezcla con otros tubérculos.²⁶

E. Usos del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

En cuanto a la alimentación los tubérculos se consumen cocidos, los brotes tiernos y las flores se comen cocidos como verduras; también se consume en sopas, chupes, fritas, y algunos la mezclan con azúcar para preparar postres

En cuanto a ámbito de la medicina actúa contra los cálculos renales, contra afecciones del hígado y renales, se le emplea para combatir las dolencias génito urinarias, y contra la anemia, también es usado como **antiafrodisiaco**, se dice que reduce el deseo sexual al disminuir la cantidad de testosterona y

²⁵ Chabur Ortegón M. Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rhizoctonias en cultivo de papa [Tesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012. [Consultado el 8 Ago 2016]. Pág. 15

²⁶ Boletín de información estadística agraria. Tubérculos y raíces [Sede web]. Dirección de información agraria – Puno 2012. [Consultado el 13 de Ago del 2016]. Pág. 5

dihidrotestosterona en la sangre, se cuenta que las tropas incaicas consumían isaño como parte de su dieta, para aplacar el instinto sexual.

2.2.2. Efecto antibacteriano o antimicrobiano

A. Efecto bacteriostático

Inhiben el crecimiento y multiplicación de las bacterias. A partir de la exposición a un agente bacteriostático, las células en una población susceptible cesan su división. Sin embargo, si el agente es retirado, las células vuelven a multiplicarse.²⁷

B. Efecto bactericida

No solo inhiben el crecimiento de las células sino también desencadenan mecanismos dentro de la célula que conducen a la muerte celular. Las acciones de los agentes bactericidas son irreversibles por tanto una vez que las células susceptibles son expuestas al agente bactericida, estas mueren.²⁸

C. Mecanismo de acción de los antibacterianos

Los mecanismos por los que los antibióticos alteran la biología de los microorganismos se pueden dividir en:²⁹

- Inhibición de la síntesis de la pared celular, en fases diversas de la síntesis: β -lactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina, bacitracina.
- Desorganización de la membrana citoplásmica, lo que conduce a la desintegración celular: polimixinas, anfotericina B y nistatina.
- Inhibición de la síntesis de proteínas, por actuar sobre ribosomas; en la iniciación (subunidad 30 S): tetraciclinas; en la elongación (subunidad 50 S): cloranfenicol, eritromicina y lincosaminas; en ambas, con muerte bacteriana: aminoglucósidos.

²⁷ Stephen J. Manual de pruebas de suceptibilidad antimicrobiana. [online]. 2005 [Consultado 23 jul 2016]; 17(1). Disponible en: http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf.pág. 5

²⁸ *Ibit.*, pág. 6

²⁹ *Ibit.*, pág. 8

- Interferencia en la síntesis y/o el metabolismo de los ácidos nucleicos, rifampicina (ARN-polimerasa ADN-dependiente), quinolonas (ADN-girasas), metronidazol y antivíricos.
- Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico, sulfamidas, sulfonas, pirimetamina y trimetoprima.

2.2.3. Efecto antibacteriano de metabolitos secundarios de plantas

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.

Cuadro 5: Metabolitos secundarios con efecto antibacteriano

Metabolito secundario	Actividad farmacológica
Terpenos	Anticarcinogénicas, antiulcerosas, antibacterianas.
Taninos	Propiedades astringentes y antibacteriano, ligero antidiarreico
Alcaloides	Relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos
Flavonoides y quinonas	Leve efecto antibacteriano. Su actividad frente a microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas.
Glicósidos	Propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antimicrobianas.

Fuente: Kuklinsky Claudia. Farmacognosia.³⁰

Elaboración: Propia

Cabe mencionar que los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos. Es preciso de una bioactivación, por rotura celular

³⁰ Kuklinsky Claudia .op. cit., pág. 113

(Trituración o cortes por ejemplo) dando como resultado a la glucosa y los isotiocianatos, estos últimos responsables de sus propiedades como por ejemplo sabor y olor característico de las crucíferas. Los isotiocianatos son compuestos fitoquímicos y se encuentran en las crucíferas (isaño, coliflor, brócoli, repollo, rábano picante), son un tipo de compuestos azufrados y participan en la eliminación de toxinas, una enzima (mirosinasa) hidroliza los glucosinolatos a isotiocianatos.³¹

2.2.4. Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario están causadas en su mayoría por bacterias de la flora intestinal que, ascendiendo por la uretra, alcanzan la vejiga urinaria y en algunos casos progresan afectando a los uréteres y riñones.

Las infecciones de la vejiga urinaria, denominadas cistitis, dan lugar a un síndrome caracterizado por micción dolorosa y frecuente (disuria y polaquiuria) con sensación continua de necesidad de orinar (tenesmo) y escasa sintomatología general, ya que no suelen ocasionar fiebre o astenia intensa. Las infecciones que afectan a los uréteres y riñones (pielonefritis) se manifiestan por fiebre, dolor lumbar y afectación del estado general, asociadas a disuria, polaquiuria y tenesmo urinario cuando existe una cistitis concomitante.³²

En la orina además de las bacterias (bacteriuria), como expuesta a la infección, hay leucocitos (piuria) por lo que su aspecto es generalmente turbio y con frecuencia maloliente. El estudio microscópico del sedimento del centrifugado de la orina permite constatar la infección urinaria al visualizar la bacteriuria y la piuria. Las infecciones urinarias suelen darse con mayor frecuencia en las mujeres debido a la cortedad de la uretra que, además, desemboca en el introito vaginal que esta colonizado por la flora intestinal. Estas infecciones a menudo están relacionadas con el coito y también son más frecuentes durante el embarazo.

³¹ Domingo D, y López B. Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad española de quimioterapia. Revista Prous Science. [online]. 2016 [Consultado 13 Ago 2016]; 61(4): [385-393]. pág. 388

³² Prats Guillem., *op. cit.*, pág 239

Cuadro 6: Bacterias causantes de infecciones del tracto urinario

Algunos agentes causales de infecciones urinarias		
	Sin factores predisponentes ¹	Con factores predisponentes ²
Frecuentes	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Otras enterobacterias y BGN-NF ³ Enterococo <i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus epidermitis</i>
Poco frecuentes	<i>Enterococo</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Corynebacterium urealyticum</i> ⁴
<p>1. Las infecciones urinarias en personas sin factores predisponentes son generalmente monomicrobianas, siendo la <i>E. coli</i> el más frecuente.</p> <p>2. Las infecciones urinarias en las personas con factores predisponentes con frecuencia son polimicrobianas. Entre los factores predisponentes de infección urinaria algunos son fisiológicos, como el coito y el embarazo, y otros patológicos, como la litiasis renal, la hipertrofia de próstata, y el cistocele, el reflujo vesico-uretral, la vejiga neurógena, las alteraciones congénitas de la vía y el sondaje permanente.</p> <p>3. Entre las enterobacterias: <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i>, <i>Proteus</i>, <i>Morganella</i>, <i>Providencia</i>, <i>Citrobacter</i> y entre los bacilos gran negativos no fermentadores (BGN-NF): diversas especies de <i>Pseudomonas</i>, <i>Stenotrophomonas</i>. Cualquiera de las bacterias señaladas puede establecerse endémicamente en una sala, servicio u hospital durante periodos de tiempo variable, para ser suplantada después por otra; estas cepas con frecuencia son multirresistentes.</p> <p>4. Puede producir cistitis incrustante.</p>		

Fuente: Prats G. Microbiología clínica. 1ª edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2005. Pág 240

A. Tratamiento

En infecciones del tracto urinario superior y sin compromiso del estado general: se puede iniciar el tratamiento con trimetropin sulfametoxazol (160 mg/800 mg) 2 comprimidos como dosis inicial y luego un comprimido cada 12 horas 7 días. También se pueden utilizar la cefalexina 500 mg cada 6 horas; amoxicilina con ácido clavulánico, 500 mg cada 8 horas; o ciprofloxacina 500 mg, cada 12 horas por 10 a 14 días. En pacientes graves, la hospitalización es necesaria para administrar antibióticos por vía intravenosa. En este caso se prefiere la ampicilina o una cefalosporina más un aminoglucósido considerando la función renal y si existe la necesidad de ajustar la dosis. En todo caso, se considerara el resultado del urocultivo y antibiograma.³³

³³ Prats Guillem., *op. cit.*, pág 243

B. Bacterias causantes de infección del tracto urinario

Dentro de las principales bacterias causantes de infección del tracto urinario tenemos a la *Escherichia coli* y la *Pseudomonas aeruginosa*

a. *Escherichia coli*

1. Taxonomía ³⁴

Reino Bacteria Phylum Proteobacteria
Clase Gamma Proteobacteria
Orden Enterobacteriales
Familia Enterobacteriaceae
Género *Escherichia*
Especie *E. coli*

2. Morfología

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos que, en ocasiones, en cultivos jóvenes, se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 y 2 μm de ancho, y de 2 a 4 μm de largo. La presencia de una cápsula puede ser observada muy rara vez en algunas cepas de *Escherichia coli*.

No forman esporas; generalmente son no capsulados y Gram negativos. La temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* toleran temperaturas hasta de 42 °C. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno son aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Los requerimientos de nutrientes en el metabolismo de los miembros de esta familia no son altamente exigentes y crecen de manera muy similar, cualquiera de sus especies, en la mayoría de los medios que se utilizan, por lo general, en el laboratorio de microbiología clínica diagnóstica, desde un agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo.³⁵

³⁴ Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6° Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, pág. 259

³⁵ Murray P., *op. cit.*, pág. 261

3. Patogenicidad

La *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. 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 los riñones.³⁶

4. Clases de *Escherichia coli*

Cuadro 7: Clasificación de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	Patología
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Diarrea del viajero. El sistema predominante es una diarrea acuosa profunda, a menudo acompañada de contracciones abdominales leves. En algunos casos ocurre deshidratación y vómitos.
<i>E. coli</i> enteropatógena	Usualmente ocurre en infantes. Se caracteriza por fiebre de bajo grado, malestar, vómitos y diarrea, con una cantidad prominente de moco, pero sin mucha sangre.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Disentería: las características sobresalientes son fiebre colitis, tenesmo, sangre, moco y leucocitos en heces.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Diarrea sanguinolenta con leucocitos. A menudo sin fiebre. Es común el dolor abdominal.
<i>E. coli</i> enteroagregativa	Diarrea acuosa, vómitos, deshidratación y con menor frecuencia dolor abdominal.
<i>E. coli</i> difusamente adherente	Diarrea en niños de 1 – 5 años. Heces líquidas sin sangre ni leucocitos.

Fuente: Tortora F. Introducción a la microbiología. 9ª Ed. España: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2007.

³⁶ Murray P., *op. cit.*, pág. 261

5. Diagnóstico y tratamiento

El cultivo es el método de diagnóstico primario; toda las enterobacterias se aíslan con facilidad en medios habituales casi bajo cualquier condición de incubación. A menudo se emplean medios indicadores especiales, como agar Mac Conkey, para el aislamiento primario, a fin de acelerar la separación de muchas especies.

Para distinguir los agentes patógenos intestinales de todas las demás enterobacterias que se encuentran en las heces se requieren medios altamente selectivos que solo tienen esta finalidad. Las cepas de *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; aminoglucosidos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, quinolonas, nitrofurantoina y antibióticos polipeptidos.³⁷

b. Pseudomonas aeruginosa

Este microorganismo es un bacilo Gram negativo, no fermentador de lactosa, existen casi 200 especies de *Pseudomonas* pero la más importante es la *Pseudomonas aeruginosa*; los miembros de este género se encuentran en todas partes en el suelo, vegetación, agua e incluso en soluciones desinfectantes.

1. Taxonomía

Reino Bacteria
 Filo Proteobacteria
 Clase Gamma Proteobacteria
 Orden Pseudomonadales
 Familia Pseudomonadaceae
 Género *Pseudomonas*
 Especie *P. aeruginosa*³⁸

³⁷ Murray P. *op. cit.* Pág. 262

³⁸ *Ibit.* Pág. 288

2. Morfología

Bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvados en general móviles (0.5-1.0 por 1.5-5.0 μm), que se disponen típicamente en parejas. Aunque se describen como aerobios obligados, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para los electrones. La presencia de citocromo oxidasa se emplea para distinguirla de las enterobacteriaceae. Crece 30° a 37°, su fuente de energía: Oxidación de azúcares, no fermentadores, (no fermentan la glucosa), algunas especies producen pigmentos como piocianina (azul), pioverdina (verde amarillento) y piorrubina (pardo rojizo), que explican su aspecto característico en el cultivo y simplifican la identificación preliminar. Este patógeno es oportunista de individuos inmunocomprometidos..³⁹

3. Diagnóstico y tratamiento

Al microscopio se observan bacilos gramnegativos delgados sueltos o formando parejas. Dado que tiene exigencias nutricionales sencillas, es fácil recuperar esta bacteria en medios de aislamiento frecuente como agar sangre o agar MacConkey. Las colonias tienen pigmentación verdosa asociada a la producción de 2 pigmentos hidrosolubles piocianina – azul y fluoresceína- amarilla., pruebas bioquímicas rápidas por ejemplo reacción oxidasa positiva bastan para la identificación preliminar de las cepas. Forma colonias planas con bordes que se van extendiendo, B hemolisis, una pigmentación verdosa relacionada con la producción de los pigmentos azul y amarillo verdoso y un olor característico semejante a las uvas. El tratamiento antibacteriano es frustrante, debido a que las bacterias suelen presentar resistencia a la mayoría de los antibióticos y el paciente inmunosuprimido es incapaz de potenciar la actividad antibiótica. Incluso los microorganismos sensibles se pueden volver resistentes durante el tratamiento sin inducir la formación de enzimas que inactivan los antibióticos por ejemplo las betalactamasas. ⁴⁰

³⁹ Murray P. *op. cit.* pág. 263

⁴⁰ *ibid.*, pág. 289

CAPÍTULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. Población y muestra

3.1.1. Población: Isaño de los andes centrales del Perú

3.1.2. Muestra: Isaño del departamento de Puno, Perú a 3.500 m.s.n.m.

3.2. Tamaño de la muestra representativa:

Debido a ser un estudio no probabilístico, la muestra fue de tipo intencional. Fueron 5 Kg de isaño del departamento de Puno, Perú.

3.3. Análisis e interpretación de resultados

Los resultados están distribuidos en seis tablas, de las cuales las tres primeras hacen referencia a pruebas de caracterización del extracto acuoso del isaño en concentraciones de 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, que tienen como fin dilucidar parámetros fisicoquímicos y fitoquímicos que podrían afectar el efecto antibacteriano; mientras que las tres siguientes tablas hacen hincapié a los indicadores de las variables de estudio.

Tabla N°1: Características organolépticas del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

ASPECTO	Concentraciones del extracto acuoso del isaño “ <i>Tropaeolum tuberosum</i> ”.			
	10 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	75 mg/mL
COLOR	Morado	Morado	Morado	Morado
SABOR	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo
OLOR	Característico	Característico	Característico	Característico

Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar que no existe diferencia entre los resultados a las diferentes concentraciones del extracto ya que se trata de un análisis cualitativo basado en la percepción del investigador.

Los resultados nos indican que el decocto de isaño es de un sabor amargo lo cual puede ser una desventaja para el tratamiento de niños y el color morado podría indicarnos la presencia de flavonoides; dichos pigmentos se encuentran generalmente en mezcla con agliconas y/o glicósidos, siendo estos últimos los más comunes; por tanto se podría presumir que el extracto elaborado, presenta una mezcla de flavonoides unida a glicosidos coincidiendo Chabur Ortegón (2012) con la presencia de glucosinolatos a los cuales se les atribuye el efecto antibacteriano.

Los ensayos fisicoquímicos del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*” se encuentran en la tabla N°2, teniendo en cuenta que cada ensayo se realizó por triplicado y determinando la desviación estándar.

Tabla N°2: Análisis fisicoquímico del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

Concentración del extracto acuoso del “isaño”	Densidad (mg/mL) *	Viscosidad (Cp) *	pH*
10 mg/mL	1.0040 ± 0.01	1.0611 ± 0.0073	6.74 ± 0.0100
25 mg/mL	1.0054 ± 0.01	1.1563 ± 0.0147	6.64 ± 0.0071
50 mg/mL	1.0102 ± 0.00	1.1745 ± 0.0267	6.44 ± 0.0122
75 mg/mL	1.0128 ± 0.01	1.3917 ± 0.0927	6.43 ± 0.0122

Fuente: Elaboración propia. * Prueba por triplicado (n=3)

Se puede observar que los extractos presentaron valores de viscosidad y densidad relativamente parecidos a los estándares del agua, por tanto, se puede suponer que nuestro extracto no tendrá problemas de dilución en nuestras pruebas de sensibilidad antibacteriana, siendo innecesario el uso de tensioactivos (tween 20).

En cuanto al pH se presentó valores que oscilan entre 6.43 y 6.74 los cuales se encuentran dentro del rango óptimo de desarrollo bacteriano, por lo general las bacterias crecen en pH cercanos a la neutralidad (pH 6.5 a 7.5), aunque son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9.⁴¹ Por tanto se puede presumir que el pH del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*” no interfirió en los resultados de sensibilidad antibacteriana.

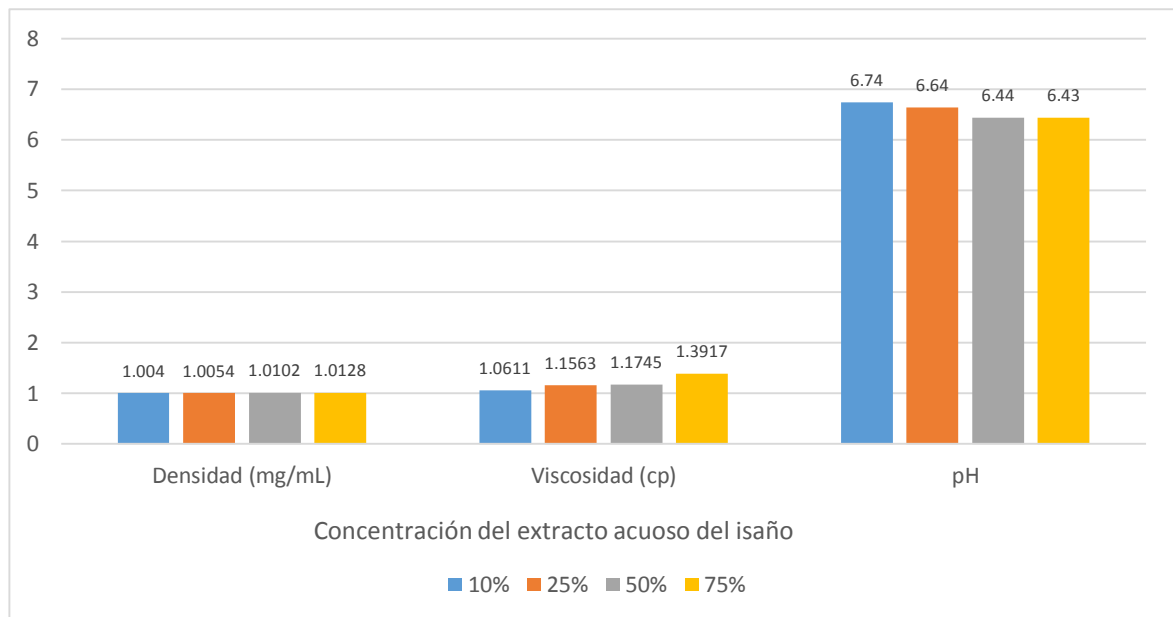
Los resultados del pH concuerdan con los obtenidos por Ocares (2012), quien analizó el efecto antibacteriano de extractos crudos de especies de plantas nativas de Chile sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, donde los resultados de la capacidad antibacteriana de los extractos frente a estas cepas bacterianas indicaron que a pH bajos y neutros, que

⁴¹ García P. Microbiología clínica aplicada. 1° edición. España: Editorial Díaz De Santos; 1997.Pag 5

corresponden a las especies de Canelo, Temu y Luma, no representó un efecto importante en el tamaño de los halos de inhibición para estos microorganismos.⁴² Además en el caso de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacterias que cuyo crecimiento óptimo es en pH neutros (6-7).

En cuanto a los resultados de la prueba de Anova, los valores de densidad, viscosidad, y pH arrojaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*". (Anexo 16)

Gráfico N° 1: Propiedades fisicoquímicas del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*"



Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N°3 podemos observar el análisis fitoquímico de metabolitos secundarios del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*", se consideran los extractos de 10 mg/mL y 75 mg/mL ya que son pruebas cualitativas y las concentraciones no son interfirientes. Estos resultados son importantes ya que nos pueden dar una idea de los metabolitos responsables del efecto antibacteriano.

⁴² Ocares María. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* [Tesis]. Chile: Universidad Austral de Chile; 2012, pág 29

Tabla N°3: Análisis fitoquímico del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

Metabolito secundario	Prueba	Reacción positiva	Extracto acuoso del isaño “ <i>Tropaeolum tuberosum</i> ”.	
			10 mg/mL	75 mg/mL
Flavonoides	Shinoda	Coloración en tonos rojos	+	+
Taninos	FeCl ₃	Coloración	+	+
Esteroides	Lieberman Burchard	Coloración violeta verde	+	+
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado rojo naranja	+	+
Saponinas	Espuma	Formación de espuma, mínimo 2 min	-	-
Quinonas	Borntrager	Formación de un anillo en la interfase	-	-
Glicosidos	Molish	Precipitado rojo.	+	+

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: (+) Presencia / (-) Ausencia

Como es sabido los flavonoides, taninos, esteroides, alcaloides y glicósidos que se encuentran en el isaño presentan efecto antibacteriano, cabe recalcar que a pesar de ser una prueba cualitativa, en el análisis de alcaloides y glicósidos el precipitado y el cambio de coloración respectivamente fué intenso. Por ello podríamos deducir que estos dos componentes se encuentran en altas concentraciones y a su vez podrían ser responsables del efecto antibacteriano.

Los resultados alcanzados coinciden con los obtenidos por la investigación realizada por Susana Espín, Elena Villacrés en su tema” Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos” en cuanto a los contenidos de flavonoides, taninos, esteroides y glicosidos.⁴³

⁴³ Espín S, Villacrés E, Brito B. Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos [Sede web].Ecuador.2014.pág. 111

Tabla N°4: Prueba de susceptibilidad difusión- disco (Kirby bauer)

Concentración del extracto acuoso del "isaño"	Halos de inhibición* (mm) del extracto frente a cepas causantes de infección del tracto urinario			
	Cepas clínicas		Cepas ATCC	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
10 mg/mL	-	-	-	-
25 mg/mL	-	-	-	-
50 mg/mL	-	09 ± 6.14	22 ± 0.00	16 ± 0.00
75 mg/mL	-	13 ± 0.00	23 ± 0.00	16 ± 0.00
Disco gentamicina	21	18	25	21
Disco H ₂ O	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia. * Prueba por triplicado (n=3)

Para evaluar el efecto antibacteriano, la primera prueba utilizada fue de susceptibilidad antibacteriana por difusión, para ver la mínima concentración por la cual las cepas clínicas y ATCC son sensibles frente al extracto acuoso del isaño y los resultados se presenta en la tabla N°4.

La prueba de actividad antibacteriana realizada por el método de difusión en disco, muestra que los extractos acuosos del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" de 50 y 75 g/mL presentaron actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mientras que el extracto a concentraciones de 10 y 25 g/mL no presentó acción ante estas bacterias, en ninguna de las tres réplicas. En cuanto a las cepas clínicas solo presento efecto antibacteriano contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Evaluando estos resultados mediante la prueba estadística de T de Student observamos que si existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), cuando se comparó la actividad del extracto, al enfrentar a cepas clínicas y cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Según estadístico también vemos que no existe diferencia significativa entre los diferentes extractos que tuvieron efecto antibacteriano. Por consiguiente para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida se utilizó cepas ATCC y la concentración del extracto al 75 g/mL (Anexo 12, 13)

Tabla N° 5. Porcentaje de inhibición de los extractos acuoso del isaño en referencia al disco de gentamicina

Concentración del extracto acuoso del "isaño"	Halo de inhibición del extracto sobre cepas ATCC							
	Cepas clínicas				Cepas ATCC			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%
50 mg/mL	0	0%	09	50%	22	88%	16	76.19%
75 mg/mL	0	0%	13	72.2%	23	92%	16	76.19%
Disco gentamicina	21	100%	18	100%	25	100%	21	100%

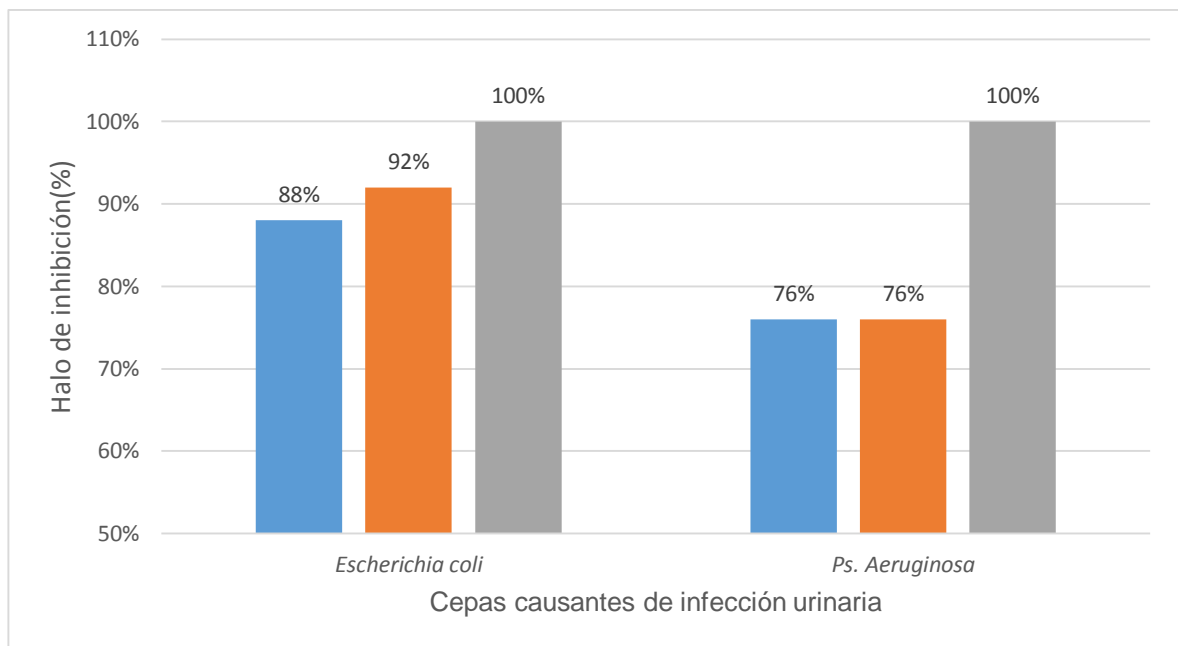
Fuente: Elaboración propia.

La gentamicina nos sirvió de control de crecimiento bacteriano, este antibiótico presenta amplio espectro y es un principio activo puro, por ello su efecto es mayor, sin embargo, en la tabla N°5 evaluamos el efecto de las concentraciones del 50 g/mL y 75 g/MI

El porcentaje de inhibición relativo del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" ante el control negativo de crecimiento (disco de gentamicina) a concentraciones de 50 y 75 g/mL fué de 88% y 92% respectivamente frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 mientras que frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785376 para ambas concentraciones (50 y 75 g/mL) fué de 79.16%.

El extracto al 75 g/mL tuvo un 92% de efectividad frente a la actividad de la gentamicina sobre cepas *Escherichia coli* y un 76,19% en el caso de la *Pseudomonas aeruginosa*; por tanto, nos podría indicar que el extracto del isaño al 75 g/mL puede presentar un buen efecto antibacteriano, a pesar de no ser un extracto concentrado o purificado.

Gráfico N° 2: Porcentaje de inhibición de los extractos en referencia al disco de gentamicina



Fuente: Elaboración propia.

Tabla N°6: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB)

Cepas causantes de infección del tracto urinario (ITU)	Concentración del extracto acuoso del isaño " <i>Tropaeolum tuberosum</i> " (g/mL)	
	CIM	CBM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	18.75 g/mL	75 g/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	37.5 g/mL	75 g/mL
Control + de crecimiento (inóculo y medio de cultivo)	T+	C+
Control - de crecimiento (medio de cultivo)	T -	C-

Fuente: Elaboración propia. * Prueba por triplicado (n=3) T(turbidez), C(crecimiento)

En la tabla N° 6 se observa el CMI y CMB del extracto acuoso del isaño frente a cepas ATCC; los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad antibacteriana de Kirby bauer nos indica que hay una diferencia entre las Cepas clínicas y ATCC siendo estas últimas las que no pueden presentar resistencia frente a antibacterianos, debido a que no han sido expuestas a ningún tratamiento, por tanto nos garantiza que no exista falsos negativos, ya que no sabemos el historial de las cepas clínicas frente a antibióticos.

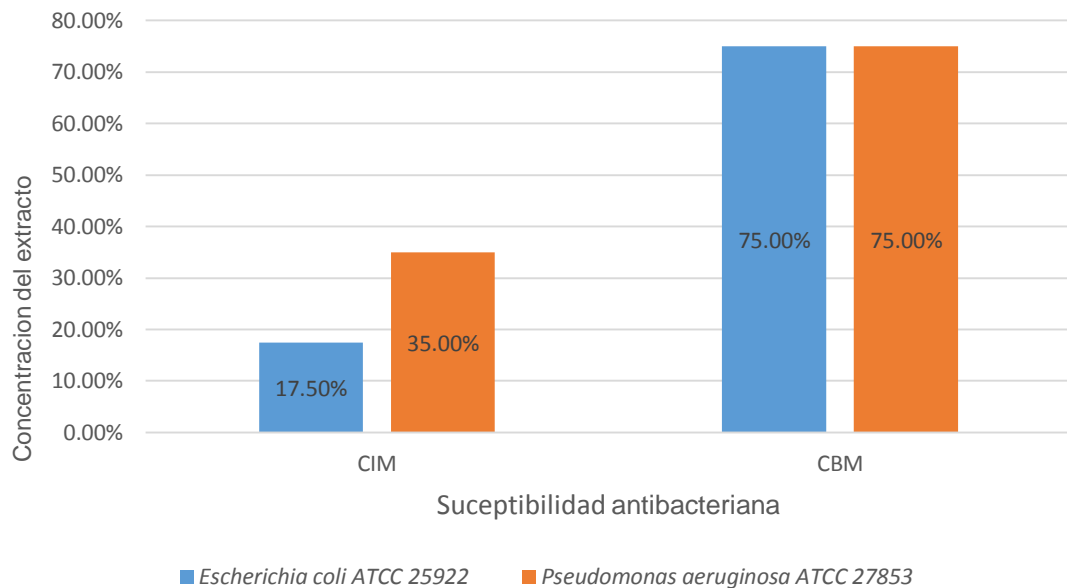
Además tenemos que existe diferencia en el CMI entre ambas cepas; en cuanto al CMB no presenta diferencia frente a estas dos cepas deduciendo que a la concentración del 75 g/mL el extracto capaz de actuar como bactericida para estas dos principales cepas causantes de infecciones del tracto urinario.

Al determinar la concentración mínima inhibitoria con la técnica de la dilución en caldo, se observó que el extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" mostró actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; a una concentración de 18.75 g/mL y 37.5 g/mL respectivamente. La CMI en tubo ó dilución en caldo, es considerada como el parámetro fundamental para comprobar

la sensibilidad de una bacteria frente a un antibacteriano, por tal razón, es la técnica más confiable para determinar las propiedades antibacterianas de una sustancia. ⁴⁴

En cuanto a la concentración mínima bactericida no presenta diferencia frente a estas dos cepas deduciendo que a la concentración del 75 g/mL el extracto es capaz de actuar como bactericida frente a estas dos principales cepas causantes de infecciones del tracto urinario.

Gráfico N° 3: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima bactericida (CMB)



Fuente: Elaboración propia.

⁴⁴ Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al., *op. cit.*, pág. 140

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

Primera: Se logró evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" en cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de infecciones del tracto urinario a través de la prueba de disco - difusión (Kirby Bauer), concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Concluyendo que el extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*" no ha demostrado tener efecto antibacteriano frente a las cepas mencionadas.

Segunda: Según la prueba de disco - difusión (Kirby Bauer), los extractos acuosos del isaño "*Tropaeolum tuberosum*", presentaron actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a concentraciones de 50 g/mL y 75 g/mL, del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*"; mientras que en las cepas clínicas no tienen actividad probablemente debido a ser cepas resistentes.

Tercera: El extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*", presentó efecto bacteriostático frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a concentraciones de 18.75 g/mL y 37.5 g/mL respectivamente.

Cuarta: El extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*", presentó un efecto bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a la concentración de 75 g/mL para ambas cepas.

4.2. RECOMENDACIONES

En vista de que el isaño "*Tropaeolum tuberosum*" es un tubérculo que tiene muchas propiedades aun no investigadas, se recomienda:

1. Aislar, concentrar e identificar los componentes activos del extracto acuoso del isaño, para la elucidación y cuantificación final de los compuestos responsables de la actividad biológica.
2. Evaluar el efecto toxicológico que puedan tener el extracto acuoso del isaño.
3. Estudiar el efecto antibacteriano del isaño con otros métodos de extracción y tipos de solventes.
4. Evaluar el efecto antibacteriano del isaño ante otras cepas bacterianas.
5. Conociendo la actividad antibacteriana del isaño y luego de un estudio más detallado es necesario la elaboración de un fitofármaco con propiedades antisépticas y contra enfermedades infecciosas.

Referencias bibliográficas

1. Astete S, Flores F, Buckey D. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el hospital Nacional Arzobispo Loayza. Rev. Soc. Per. Med. Int. [online]. 2004 [Consultado 28 jul 2016]; 17(1). pág.2
2. Prats Guillem. Microbiología clínica. 1^{ra} edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2005. Pág. 239
3. Astete S. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Rev. Soc. Per. Med. Int. [online]. 2004 [Consultado 28 jul 2016]; 17(1). pág. 5
4. Astete S. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Rev. Soc. Per. Med. Int. [online]. 2004 [Consultado 28 jul 2016]; 17(1). pág. 1
5. Huamani A. Composición Físico – Química de la Mashua [Tesis]. Ayacucho – Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014
6. Martínez M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1^{ra} Edición. Cuba: Editorial Félix Varela; 2001. Pág. 40
7. Martínez M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1^{ra} Edición. Cuba: Editorial Félix Varela; 2001. pág. 152
8. Martínez M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1^{ra} Edición. Cuba: Editorial Félix Varela; 2001. pág. 139
9. Rodríguez, Nancy. Manual de laboratorio azucarero. 1^{ra} Edición. Habana: Editorial Pueblo y educación; 1998. Pág. 50
10. Atarés L. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro [Sede web]. Universidad Politécnica de Valencia. [Consultado el 8 de agosto del 2016]. pág 11
11. Rodríguez, Nancy. Manual de laboratorio azucarero. 1^{ra} Edición. Habana: Editorial Pueblo y educación; 1998. Pág. 51
12. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2^{da} Edición. Perú: Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994. Pág. 187

13. Kuklinsky, Claudia. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2^{da} Edición. España: Editorial Omega; 2006. Pág. 115
14. Kuklinsky, Claudia. Farmacognosia. Estudio de drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2^{da} Edición. España: Editorial Omega; 2006. Pág. 116
15. Granados R. Villaverde C. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general. 2^{da} edición. España: Editorial paraninfo S. A; 1998. pág. 133 – 139
16. Granados R. Villaverde C. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general. 2^{da} edición. España: Editorial paraninfo S. A; 1998. pág. 97
17. Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al. Manual práctico de microbiología. 2da Edición. España: Editorial Masson; 2003. pág. 136
18. Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al., *op. cit.*, pág. 140
19. Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al. Manual práctico de microbiología. 2^{da} Edición. España: Editorial Masson; 2003. pág. 141
20. Mariño Leoncio. Identificación etnobotánica. pág. 1
21. Barrera V, Tapia C, Monteros A. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador [Sede web]. Ecuador [Consultado el 4 de agosto del 2016]. Pág. 15
22. Díaz F. Composición Físico-Química de Mashua [Sede web]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. [Consultado el 9 de agosto del 2016]. Pág. 32
23. Espín S, Villacrés E, Brito B. Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos [Sede web].Ecuador.2014.pág. 111
24. Barrera V, Tapia C, Monteros A. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador [Sede web]. Ecuador [Consultado el 4 de agosto del 2016]. pág 20
25. Chabur Ortegón M. Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rhizoctoniasis en cultivo de papa [Tesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012. [Consultado el 8 Ago 2016]. pág 15

26. Boletín de información Estadística Agraria.de Tubérculos y raíces [Sede web]. Dirección de información agraria/Puno 2012. [Consultado el 13 de Ago del 2016]. Pág. 5
27. Stephen J. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. [online]. 2005 [Consultado 23 jul 2016]; 17(1). Disponible en: http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf. pág. 5
28. Stephen J. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. [online]. 2005 [Consultado 23 jul 2016]; 17(1). Disponible en: http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf. pág. 6
29. Stephen J. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. [online]. 2005 [Consultado 23 jul 2016]; 17(1). Disponible en: http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf. pág. 8
30. Kuklinsky, Claudia. Farmacognosia. Estudio de drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2da Edición. España: Editorial Omega; 2006. pág. 113
31. Domingo D, y López B. Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad española de quimioterapia. Revista Prous Science. [online]. 2016 [Consultado 13 Ago 2016]; 61(4): [385-393]. pág. 388
32. Prats Guillem. Microbiología clínica. 1^{ra} edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2005. pág 239
33. Prats Guillem. Microbiología clínica. 1^{ra} edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2005. pág 243
34. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6^o Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, pág. 259
35. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6^o Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, pág. 261
36. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6^o Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, pág. 261
37. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6^o Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, Pág. 262
38. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6^o Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, Pág. 288

39. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6° Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, pág. 263
40. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 6° Edición, Editorial Elsevier, España, 2009, pág. 289
41. García P. Microbiología clínica aplicada. 1° edición. España: Editorial Díaz De Santos; 1997. Pag 5
42. Ocares María. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* [Tesis]. Chile: Universidad Austral de Chile; 2012, pág 29.
43. Espín S, Villacrés E, Brito B. Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos [Sede web].Ecuador.2014.pág. 111

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso B, Aragón V, Bengoechea J, Díaz R, Gamazo C, García I, et al. Manual práctico de microbiología. 2^{da} edición. España: Editorial Masson; 2003.
2. Deza J, Muñoz S. Metodología de la investigación científica. Perú: centro de investigación, fondo editorial; 2008.
3. García P. Microbiología clínica aplicada. 1^{ra} edición. España: Editorial Díaz De Santos; 1997.
4. Granados R. Villaverde C. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general. 2^{da} edición. España: Editorial Paraninfo S. A; 1998.
5. Kenneth J, Microbiología Médica, introducción a las enfermedades infecciosas, 4^{ta} edición, México: Editorial McGraw-Hill; 2005.
6. Kuklinsky Cl. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2^{da} edición. España: Editorial Omega; 2006.
7. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2^{da} edición. Perú: Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
8. Martínez M., Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. 1^{ra} edición. Cuba: Editorial Félix Varela; 2001.
9. Murray R. Microbiología Médica. 7^{ma} edición. España: Editorial Elsevier; 2013.
10. Negroni M. Microbiología estomatológica, Fundamentos y guía práctica. 2^{da} edición. España: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009.

11. Prats G. Microbiología clínica. 1^{ra} edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2005.
12. Tortora F. Introducción a la microbiología. 9^{na} edición. España: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2007.
13. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Propoc G, Woods G. Koneman diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. 6^{ta} edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana S. A; 2008.

TESIS:

14. Beltrán Sánchez A, Mera Pilco J. Elaboración del tubérculo mashua (*Tropaeolum tuberosum*) troceada en miel y determinación de la capacidad antioxidante. [Tesis]. Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2014. (Consultado 12 Agos 2016 6:30 pm) Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3504/1/1095.pdf>
15. Calva Beltrán C. Caracterización etnobotánica de tres especies andinas: melloco (*Ullucus tuberosus*), oca (*Oxalis tuberosa*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*), domesticadas en el cantón Saraguro. [Tesis]. Ecuador: Universidad Nacional de Loja; 2016. [Consultado 4 Agos 2016] Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11266/3/CARMEN%20IRENE%20CALVA%20BELTR%C3%81N.pdf>
16. Chabur Ortégón M. Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rizoctonias en cultivo de papa [Tesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012. [Consultado el 8 Agos 2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8961/1/188133.2012.pdf>.
17. Flores J. Determinación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis]. Lima – Perú:
18. Huamani A. Composición Físico – Química de la Mashua [Tesis]. Ayacucho – Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014 (Consultado el 9 Ago 2016). Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3690/1/Flores_rj.pdf

19. Ocares María. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* [Tesis]. Chile: Universidad Austral de Chile; 2012 (Consultado el 10 Ago 2016). Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fao.15a/doc/fao.15a.pdf>.
20. Astete S, Flores F, Buckey D. Sensibilidad antibiótica de los gérmenes causantes de infecciones urinarias en pacientes ambulatorios en el hospital Nacional Arzobispo Loayza. Rev. Soc. Per. Med. Int. [online]. 2004 [Consultado el 28 jul 2016]; 17(1). Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RMH/article/download/452/419>.
21. Atarés L. Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro [Sede web]. Universidad Politécnica de Valencia. [Consultado el 8 de agosto del 2016]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12655/11.%20Art%C3%Art%C3%ADculo%20docente.%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20densidad%20de%20un%20l%C3%ADquido%20con%20el%20m%C3%A9todo%20del%20picn%C3%B3metro.pdf?sequence=1>
22. Barrera V, Tapia C, Monteros A. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador [Sede web]. Ecuador [Consultado el 4 de agosto del 2016] Disponible en: <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Ra%C3%ADces%20y%20Tub%C3%A9rculos%20Alternativas%20para%20el%20uso%20sostenible%20en%20Ecuador.pdf>
23. Boletín de Información Estadística Agraria. Tubérculos y raíces [Sede web]. Dirección de Información Agraria – Puno 2012. [Consultado el 13 de agosto del 2016]. Disponible en: http://www.agropuno.gob.pe/sites/default/files/estadistica/boletines/boletin_tuberculos_2012.pdf
24. Cadima FX. Tubérculos [Sede web]. Universidad Mayor de San Andrés de Bolivia. [Consultado el 4 de agosto del 2016] Disponible en: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2022.pdf>
25. Diapositivas glucosinolatos. (Consultado el 13 de Ago de 2016 3:36 pm) Disponible en: <https://prezi.com/peplixpvxkp/copy-of-glucosinolatos/>
26. Díaz F. Composición Físico - Química de la Mashua [Sede web]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. [Consultado el 9 de agosto del 2016]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/102655012/MASHUA>

27. Domingo D, y López B. Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad Española de Quimioterapia. Revista Prous Science. [online]. 2016 [Consultado 13 Ago 2016]; 61(4): [385-393]. Disponible en: file:///C:/Users/usuario/Downloads/385.pdf
28. Echevarría ZJ, Sarmiento AE, Osorio PF. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Revista Scielo [online]. 2006[Consultado 12 Ago 2016]; 23(1): [26-31]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172006000100006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1728-5917.
29. Espín S, Villacrés E, Brito B. Caracterización Físico - Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos [Sede web]. Ecuador. [Consultado el 2 de agosto del 2016]. Disponible en: http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/06/R_TAs_Ecuador_04.pdf
30. Glicósidos [Side web]. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Disponible en massfarmacognosia/wp-content/uploads/2009/04/tp5_glicosidos_2009.pdf
31. Gonzales N. Compuestos antifúngicos en tubérculos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*). Revista de Química [online]. 2000 [Consultado 08 Ago 2016]; 14(2). Disponible en: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/viewFile/4747/4748>
32. Guía para la recolección y preservación de muestras botánicas en campo [Sede web]. [Consultado el 13 de agosto del 2016]. Disponible en: http://herbario.udistrital.edu.co/herbario/images/stories/Guia_Para_la_Recoleccion_Material_Vegetal.pdf
33. Lérica A. Desinfección de plantas medicinales - principios básicos [Sede web]. Cuba [Consultado el 13 de agosto de 2016] .Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-004.html>
34. Mostacedo B, Fredericks S. Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal [Sede web]. Bolivia [Consultado el 28 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.bio-nica.info/Biblioteca/mostacedo2000ecologiavegetal.pdf>
35. Murphy M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev [online]. 1999 [Consultado 12 Ago 2016]; 12(4): [564-582]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC25/>
36. Ochoa A, Marín J, Damari B. Caracterización Física y Química de extractos totales de *petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. Rev. Mex.Cienc. Farm. [online]. 2013

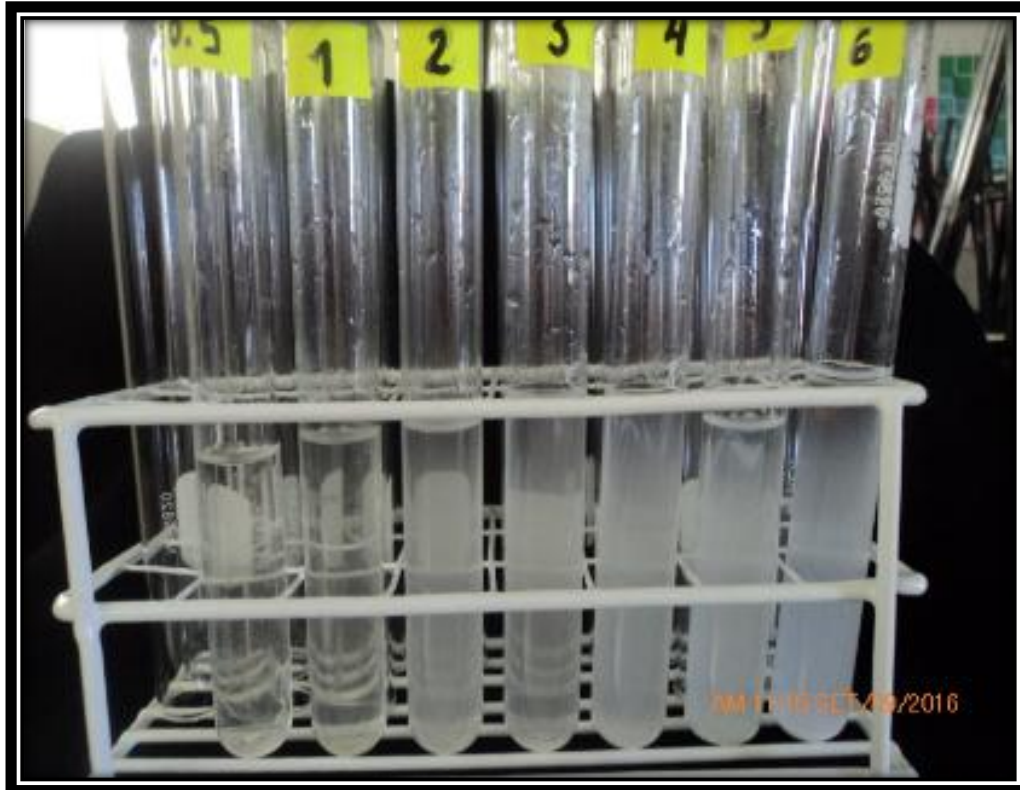
- [Consultado 10 Ago 2016]; 44(1): [52-59]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57929946007>
37. Roca W, Manrique I. Valorización de los recursos genéticos de raíces y tubérculos andinos para la nutrición y la salud. *Revista Agrociencia* [online]. 2005 [Consultado 22 jul 2016]; 9(1): [195-201]. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/viewFile/293/23>
 38. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. Raíces y tuberosas andinas [Sede web]. . [Consultado el 3 de agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s04.pdf>
 39. Rocha M, Sepúlveda G, Porta H. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* [online]. 2003 [Consultado 13 Ago 2016]; 21(3): [355-363]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
 40. Stephen J. Manual de Suceptibilidad Antimicrobiana [Sede web]. Departaments of laboratory medicine and Microbiology University of Washintong Seattle. 2005. [Consultado el 12 de Agosto del 2016]. Disponible en: www.paho.org/hq/index.php?option=comdocman&task=doc
 41. Valer K. Relaciones estructura - función de la actividad antimicrobiana de isotiocianatos de *Tropaeolum tuberosum* (mashua) y diversos análogos funcionales sintéticos [online]. 2001 [Consultado 08 Ago 2016]; 14(2). Disponible en: [file:///C:/Users/usuario/Downloads/4771-18300-1-PB%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/4771-18300-1-PB%20(4).pdf)
 42. Vázquez VA. Infección urinaria en el adulto. *Rev Cubana Med* [online]. 1998 [Consultado 28 jul 2016]; 34(2). Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol34_2_95/med06295.htm
 43. Zhang X. Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM) [Sede web]. OMS/Ginebra. [Consultado el 8 de agosto del 2016]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

ANEXO 1: Recolección del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”

Figura 20: Recolección del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 2: Escala de Mc Farland**Figura 21:** Escala Mc Farland

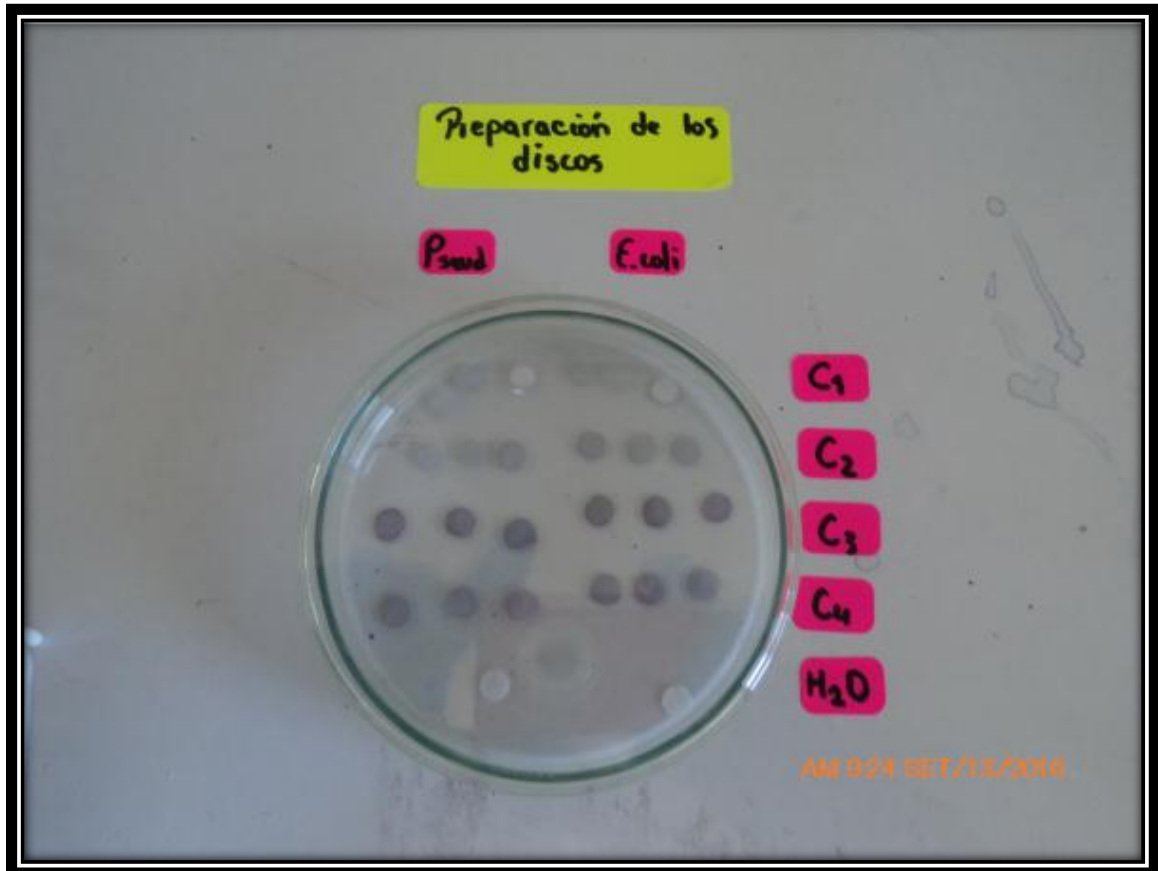
Fuente: Elaboración propia

ANEXO 3: Estandarización de cepas con la Escala 0.5 de Mc Farland

Figura 22: Estandarización de cepas con la Escala 0.5 de Mc Farland



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 4: Acondicionamiento de los discos para antibiograma – Kirby Bauer**Figura 24:** Placas petri con discos de papel Whatman N° 5

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 5: Medios de cultivo

Agar Mueller Hinton

El agar Mueller Hinton es el medio utilizado para realizar pruebas de susceptibilidad antibacteriana en microorganismos aeróbicos. Este medio también es conocido como Agar MH, y entre su composición se encuentra:

- Caseína ácida hidrolizada 17,50g
- Infusión de carne de res o corazón 2,00g
- Almidón, soluble 1,50g
- Agar 17.00g

Consideraciones

Se debe controlar el pH del medio de cada lote de preparación. Un pH fuera del rango de 7.2 a 7.4 a temperatura ambiente puede afectar la sensibilidad de la prueba. Algunos antibióticos parecen perder potencia mientras que en otros los efectos opuestos son posibles si el pH es demasiado alto.

Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino dará una falsa sensibilidad y, si es más grueso, dará una falsa resistencia. Humedad · Las placas deben mantenerse húmedas pero sin mostrar gotas sobre su superficie.

El exceso de humedad debe ser eliminado incubándolas a 35°C durante 10-30 min. Almacenamiento · Las placas de Mueller Hinton pueden conservarse en el refrigerador (2°C – 8°C) hasta 1 semana sin precauciones particulares. Si el tiempo de conservación debe superar los 7 días se recomienda sellarlas con parafilm y guardarlas en bolsas de plástico para evitar la desecación del agar (2°C – 8°C).

Preparación

El envase indica la preparación del Agar: por cada litro de agua destilada debe haber 38g de polvo, luego se coloca una luna de reloj sobre la balanza se tara y se pesa la cantidad de polvo y se diluye con agua destilada, durante el proceso se limpia la luna de reloj con agua destilada, se mezcla la preparación con una varilla de agitación tratando de no dejar grumos. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución. Una vez lista la preparación, se retira de la fuente de calor. Se lleva a autoclave a 121° C, durante 15 minutos. Se retira del autoclave con cuidado y se deja enfriar.

Agar Cetrimide

El agar Cetrimide es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Contiene Cetrimide, que es el agente selectivo contra flora microbiana alterna; este agar está compuesto:

- Digerido pancreático de gelatina 20,0 g,
- Cloruro de magnesio 1,4 g,
- Sulfato de potasio 10, g,
- Agar 13,6 g,
- Bromuro de N-cetil N,N,N- Trimetil amonio (Cetrimide) 0,3 g,
- Glicerina 10,0 mL,
- Agua destilada 1.000 mL,
- pH final $7,2 \pm 0,2$.

Preparación

Se lee el envase del polvo de la preparación según la cual por cada 1 L de agua destilada, deben haber 46.7 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.

Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación y se diluye con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos. Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor. Se esteriliza en autoclave a 121° C y luego se distribuye en placas.

TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Al ocurrir la degradación de cualquiera de los tres azúcares presentes, se forman ácidos que hacen virar el indicador Rojo de Fenol a un color amarillo (inicialmente el color del medio es rojo). La degradación de la Lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta), de la sacarosa en la parte intermedia, y la glucosa es fermentada en la parte profunda (fondo) y en condiciones anaeróbicas. El tiosulfato es reducido a sulfuro de Hidrógeno quien reacciona con la sal de hierro (Citrato férrico amoniacal) para dar formación de sulfuro de Hierro que es de color negro. La presencia de cavidades en el medio es debido a la formación de gas (CO₂) producto de la fermentación; este agar está compuesto:

- Extracto de carne 3g.
- Citrato Férrico Amoniacal 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 SH₂ que se manifiesta por el color negro.

Agar Citrato de Simmons

Medio de diferenciación bioquímica, permite comprobar la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato como única fuente exclusiva de carbono; este agar está compuesto:

- 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.

Preparación

Disolver 22 g/L, autoclavar durante (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en Tubos de ensayo (pico flauta), dejar el medio hasta coagulación. Se puede conservar los medios en congelador.

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).

Agar E.M.B. (Eosina and metileno blue)

Este medio también denominado E.A.M.(eosina y azul de metileno) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

Está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter* spp., presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras; este agar está compuesto:

- Digerido pancreático de gelatina 10,0 g
- Lactosa 5,0
- Sacarosa 5,0
- Fosfato dipotásico 2,0
- Agar 13,5
- Eosina Y 0,4
- Azul de metileno 0,065
- pH 7,2 +/- 0,2.

Preparación

Rehidratar 36 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en placas de Petri estériles. Conservar a temperatura ambiente.

Interpretación

- *Escherichia coli*: colonias de 2 a 3 mm, con brillo verde metálico en luz reflejada, y con centro púrpura en luz transmitida.

- *Enterobacter aerògenes*: colonias de 4 a 6 mm, mucosas y convexas, sin brillo metálico, con centro café-gris bajo luz transmitida.
- Bacterias no fermentadoras de lactosa: colonias incoloras, translucidas.
- *Candida albicans*: colonias plumosas o en forma de arañas, otras especies de *Candida* producen colonias levaduriformes típicas.

Las características del desarrollo observado no son suficientes para establecer el diagnóstico de la especie bacteriana. El usuario deberá aplicar pruebas de identificación para esta finalidad.

Prueba de la Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

Composición (g/L)

Diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

Solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs).

Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

Procedimiento:

* Agregar directamente 4-5 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.

* Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 seg.

Interpretación:

Con esta prueba determinamos la presencia de enzimas oxidasas presentes en *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Aeromonas*.

ANEXO 6: Escala N°0.5 de Mc Farland.

Es una escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Es la más usada, y se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% (V/V) y de cloruro de bario al 1,175% (p/V), para obtener soluciones con densidades ópticas específicas. El estándar 0,5 de Mac Farland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

Preparación

Cuadro 8: Preparación de la Escala de Mc Farland.

Estándar N°	Volumen (mL)		Equivalente en N° de bacterias /mL($\times 10^8$)
	BaCl ₂ (1.175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21

Fuente: Alonso B, et. al. Manual práctico de microbiología. 2^{da} edición. España: Editorial Masson; 2003.pág 54

En una gradilla disponer de 7 tubos de ensayos grandes, estériles y rotulados.

Sellar los tubos y mantenerlos en refrigerador. Cuando el fino precipitado blanco de sulfato de bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.

ANEXO 7: Inóculo

Fundamento

- Es la cantidad o número de microorganismos infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales.
- La cantidad de inóculo debe estar estandarizada por una técnica reconocida de modo que los controles sean comparables y reproducibles.
- No deje pasar más de 15 minutos después de preparar el inóculo.
- El inóculo se prepara por suspensión de las cepas en solución salina, equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (10^8 UFC/mL).

Preparación

Se utilizará una cepa joven, disponer de 1 tubo de ensayo, un aplicador y solución salina. Todo el material a utilizar debe encontrarse estéril.

Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina en un tubo estéril.

Utilizando un aplicador (estéril), tomar de cuatro a cinco colonias de la cepa seleccionada, de forma suave y tocando solamente la punta del aplicador.

Suspenderlas en la solución salina, para lograr una suspensión turbia. Mezclar bien y tapar el tubo.

Comparar la turbidez de la suspensión del microorganismo con el Patrón 0.5 de Mc Farland, para lo cual se debe colocar juntos la suspensión bacteriana y el tubo de Mc Farland, observándolos contra un fondo de rayas negras. Es muy importante agitar bien los tubos antes de realizar este paso.

ANEXO 8: Discos de sensibilidad

Fundamento

Se basa en colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antibacteriano, sobre un medio sólido inoculado con bacterias, el anti microbiano difundirá, tomándose un gradiente de concentración, el cual inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria.

La FDA (Food and Drug Administration) y la NCCLS recomienda las siguientes características para el papel filtro

- Se debe utilizar discos de color blanco con diámetro aproximado 6.5 +/- 0.5 mm.
- Espesor de 0.02mm

Preparación

Obtención de los discos mediante perforaciones con un perforador del papel filtro WHATMAN N° 5 de 6 mm de diámetro y se esterilizó en la autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

Se colocó los discos estériles en una placa petri, impregnarlos con 10 uL, luego eliminar el solvente con la ayuda de una estufa y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 uL de dilución, realizar el mismo procedimiento con cada una de las concentraciones del isañ, luego se colocó los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Se tuvo como control positivo de crecimiento bacteriano un disco de papel filtro WHATMAN N° 5 de 6 mm de diámetro impregnado con agua destilada.

Se tuvo como control negativo de crecimiento bacteriano un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria (gentamicina)

ANEXO 9: Estadístico de hipótesis (T de Student).entre cepas clínicas y ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*

Concentración del isañ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Cepas clínica	Cepas ATCC
50%	13	16
	13	15
	0	16
75%	13	16
	13	16
	13	16

Rpta: No hay diferencia

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	10.83333333	15.83333333
Varianza	28.16666667	0.16666667
Grados de libertad	5	
P(T<=t) una cola	0.036378827	
Valor crítico de t (una cola)	2.015048373	
P(T<=t) dos colas	0.072757654	
Valor crítico de t (dos colas)	2.570581836	

**ANEXO 10: Estadístico de hipótesis (T de Student).entre cepas clínicas y ATCC de
*Escherichia coli***

Concentración del extracto del isaño	<i>Escherichia coli</i>	
	Cepas clínica	Cepas ATCC
50%	0	22
	0	23
	0	22
75%	0	23
	0	23
	0	23

Rpta: Si hay diferencia

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0	22.66666667
Varianza	0	0.266666667
Grados de libertad	5	
Estadístico t	-107.51744	
P(T<=t) una cola	6.599E-10	
Valor crítico de t (una cola)	2.01504837	
P(T<=t) dos colas	1.3198E-09	
Valor crítico de t (dos colas)	2.57058184	

**ANEXO 11: Estadístico de hipótesis (ANOVA) para pruebas fisicoquímicas de:
densidad del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”**

Densidad			
C1	C2	C3	C4
1.0040	1.0055	1.0102	1.0128
1.0041	1.0054	1.0102	1.0128
1.0040	1.0054	1.0102	1.0127

Rstd estadístico (F>Fc) Si hay diferencia estadística

Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.05$)

<i>Origen de variacions</i>	<i>s. cuadrad</i>	<i>GL</i>	<i>P. cuadrad</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crít para F</i>
Entre grupos	0.0001	3	4.984E-05	19934.56	7.88E-16	4.07
Dentro de los grupos	2E-08	8	2.5E-09			
Total	0.0001495	11				

**ANEXO 12: Estadístico de hipótesis (ANOVA) para pruebas fisicoquímicas de:
viscosidad del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*"**

Viscosidad			
C1	C2	C3	C4
1.0569	1.1733	1.2044	1.4516
1.0696	1.1478	1.1660	1.2846
1.0569	1.1478	1.1531	1.4388

Rstd estadístico (F>Fc) Si hay diferencia estadística

Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.05$)

<i>Origen de variacions</i>	<i>s. cuadrat</i>	<i>GL</i>	<i>P. cuadrat</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crít para F</i>
Entre grupos	0.175538	3	0.05851	24.33	0.00022	4.07
Dentro de los grupos	0.019242			8	0.00241	
Total	0.19478	11				

**ANEXO 13: Estadístico de hipótesis (ANOVA) para pruebas fisicoquímicas de: pH
del extracto acuoso del isaño "*Tropaeolum tuberosum*"**

pH			
C1	C2	C3	C4
6.7300	6.6500	6.4500	6.4200
6.7500	6.6400	6.4300	6.4400
6.7400	6.6400	6.4300	6.4200

Rstd estadístico Si hay diferencia estadística

<i>Origen de variacions</i>	<i>S. de cuadd</i>	<i>Gl</i>	<i>Prom cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.21696667	3	0.07232222	723.22	4.48E-10	4.07
Dentro de los grupos	0.0008	8	0.0001			
Total	0.21776667	11				

ANEXO 14: Fichas de recolección de datos

Ficha de características organolépticas del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

ASPECTO	Concentraciones del extracto acuoso del isaño “ <i>Tropaeolum tuberosum</i> ”			
	10%	25%	50%	75%
COLOR				
SABOR				
OLOR				

Fuente: Elaboración propia.

Ficha de ensayos fisicoquímicos del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

Concentración del extracto acuoso del “isaño”		Medición n° 1	Medición n° 2	Medición n° 3	Promedio (\bar{x})	Desviación estándar ($\hat{\mu}$)
Viscosidad (cp)	10%					
	25%					
	50%					
	75%					
pH	10%					
	25%					
	50%					
	75%					
Densidad (mg/mL)	10%					
	25%					
	50%					
	75%					

Fuente: Elaboración propia.

Ficha de análisis fitoquímico del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

Metabolito secundario	Concentración del extracto acuoso del isaño “ <i>Tropaeolum tuberosum</i> ”.	
	10%	75%
Flavonoides		
Taninos		
Esteroides		
Alcaloides		
Saponinas		
Quinonas		
Glicosidos		

Fuente: Elaboración propia.

Legenda: (+) Presencia / (-) Ausencia

Ficha de Técnica de difusión (Kirby Bauer) del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

[] Extracto acuoso del isaño	Halos de cepas causantes de infección del tracto urinario (mm)															
	<i>Escherichia coli</i>								<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	ATCC 25922				Hospital				ATCC 27853				Hospital			
	M	M	M	\bar{x}	M	M	M	\bar{x}	M ₁	M ₂	M ₃	\bar{x}	M ₁	M ₂	M ₃	\bar{x}
10%																
25%																
50%																
75%																
Disco gentamicina																
Disco H ₂ O																

Fuente: Elaboración propia.

Ficha de CIM y CBM del extracto acuoso del isaño “*Tropaeolum tuberosum*”.

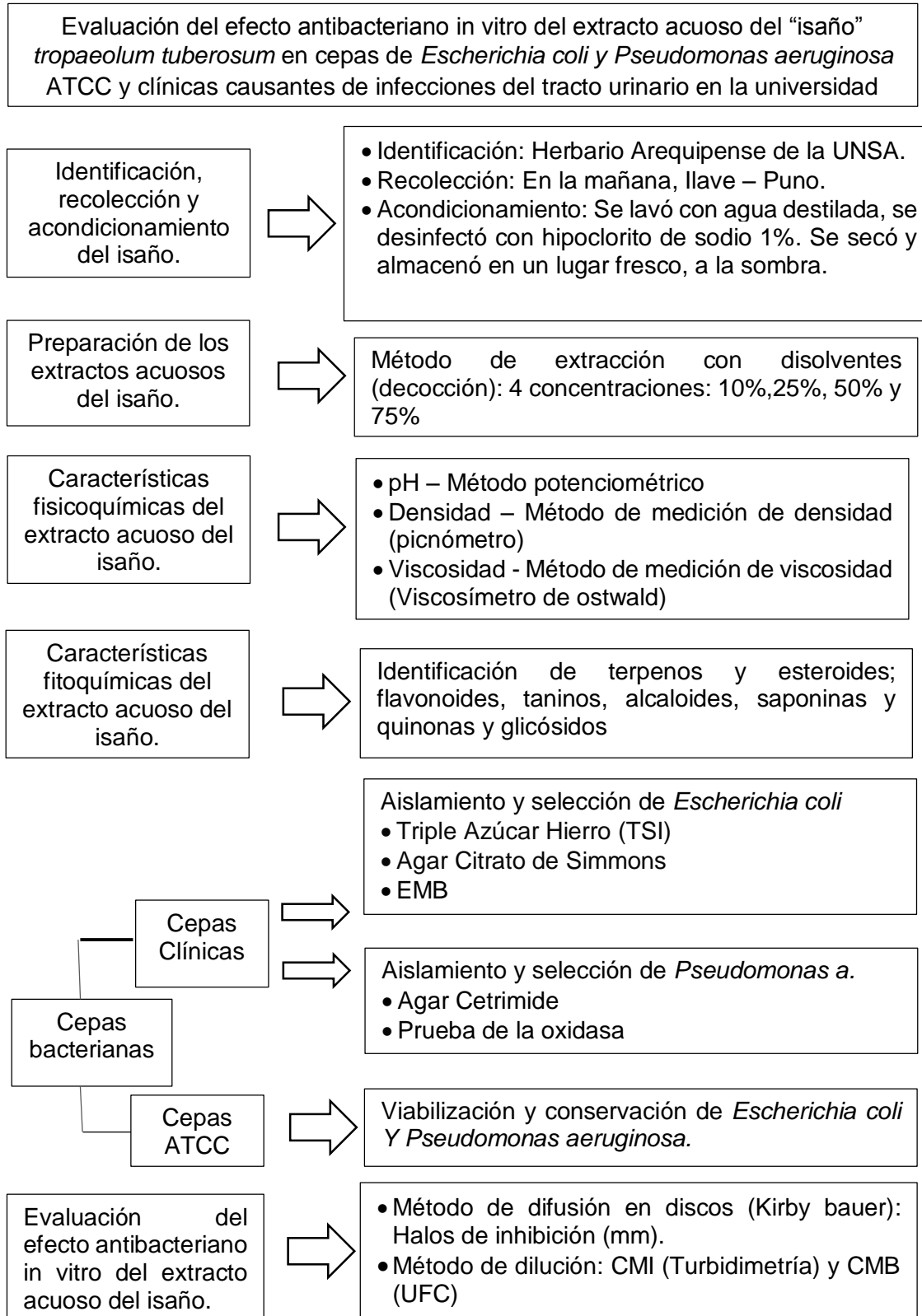
Cepas causantes de infección del tracto urinario (ITU)	CMI	CMB			
		M ₁	M ₂	M ₃	\bar{x}
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					

Fuente: Elaboración propia.

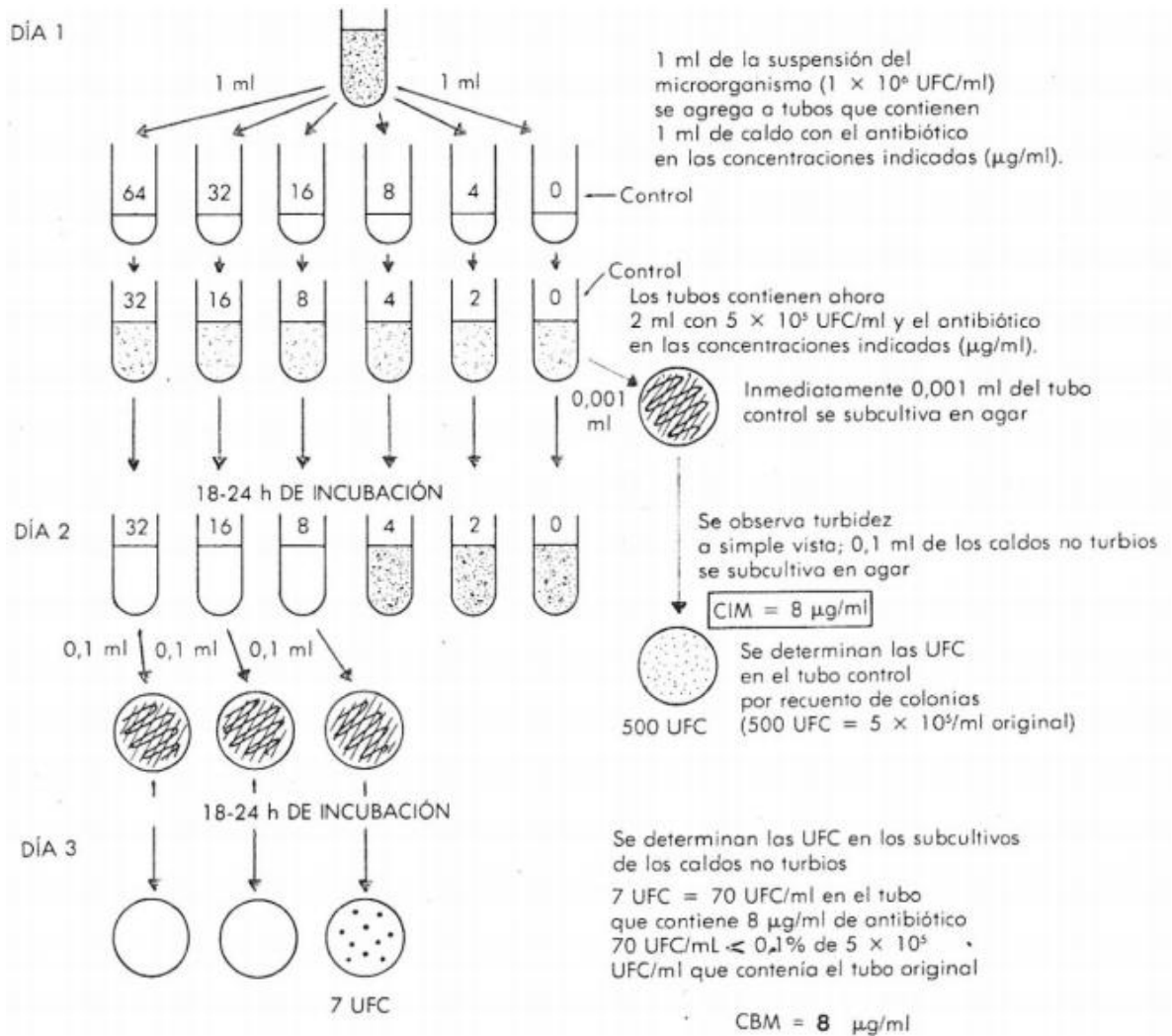
ANEXO 15: Certificados de cepas ATCC

ANEXO 16: Certificados botánico del isaño

ANEXO 17: Diseño de la Investigación



ANEXO 18: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)



Fuente: Universidad Nacional de San Luis. Microbiología general. Facultad de Química, Bioquímica y Ciencias biológicas. 2016

GLOSARIO DE TERMINOS:

Actividad Bacteriostática: Inhibe el crecimiento de un microorganismo.

Actividad Bactericida: Destruye a un microorganismo determinado.

Agar: Polisacárido complejo extraído de ciertas algas marinas, el cual no es digerido por la mayor parte de las bacterias. Está constituido por un 70% de agarosa y 30% de agar pectina. Se funde a temperaturas mayores a 100°C y se gelifica a 45-50°C.

Bacterias: Organismos unicelulares procarióticos sin núcleo diferenciado, aunque presentan un nucleoide, una estructura que contiene una molécula circular de ADN; sin organelos con membrana; presentan varias formas y se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente (suelos, aguas, aire, y como simbiosis o patógenos del humano, otros animales y plantas).

Bactericida: Propiedad por la cual un biocida (agente físico o químico) puede matar bacterias, con o sin lisis de éstas.

Bacteriostático: Propiedad por la cual un biocida puede inhibir la multiplicación bacteriana, que se reanuda una vez se remueve el agente.

Cepa: Asociación de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Cepas Bacterianas: una cepa es un conjunto de células homogéneas, o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias

Cepa ATCC: Cepas producidas por el American Type Culture Collection. Son cepas certificadas. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.

Cepa Hospitalaria: Cepa obtenida de paciente hospitalizado.

Crecimiento microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al de una población.

Decocción: Procedimiento extractivo en el cual la droga es extraída por ebullición en agua por al menos 5 minutos. El resultado de este proceso extractivo es también conocido como decocción.

Difusión de discos: Su utilización está limitada a bacterias aerobias y anaerobias facultativas de crecimiento rápido, en este caso se aplica un disco que contiene una cantidad especificada de antibacteriano, en una superficie del agar que ha sido recientemente inoculada con un microorganismo. El antibacteriano difunde en el medio a partir del disco de una zona de inhibición en el punto al que una concentración crítica del antibacteriano en el medio inhibe el crecimiento del microorganismo en un momento de tiempo determinado de 18 a 24 horas

Dilución: Es diluir un volumen conocido de soluto en un volumen conocido del solvente.

Discos de sensibilidad: Se tratan de pequeños discos de papel filtro los cuales contienen una cantidad específica del antibacteriano.

Fitoquímico: Estudio de los principios activos de las plantas, especialmente de los metabolitos secundarios y que pueden tener aplicación en la medicina o industria

Flavonoides: Son pigmentos fenólicos presentes en la mayor parte de los órganos vegetales

Halos de inhibición: Es lo que nos indica la sensibilidad del microorganismo ante un antibiótico.

In vitro: Técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Medicina tradicional: La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para que el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Metabolitos Secundarios: Compuestos químicos sintetizados por estas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario.

Método de Kirby Bauer: Método de difusión en agar empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico.

Microorganismo: Organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos.

Microorganismos liofilizados: Se trata de microorganismos a los cuales se les ha extraído el agua por sublimación previa congelación, bajo condiciones de alto vacío. Su ventaja radica en que los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

Organoléptico: Calificativo de ciertas propiedades, por ejemplo color, olor, sabor, que son susceptibles de medir por los órganos sensoriales.

Principio activo: Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga.

Sensibilidad antimicrobiana: El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

Testigo: Fracción de una muestra que se separa para que luego sirva de punto de comparación con las que han sido sometidas con algún tipo de experimento.

UFC: Unidad formadora de colonia

Célula bacteriana viva y aislada que en las condiciones adecuadas da lugar a la producción de una colonia de bacterias.

Viabilización de microorganismos: La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, desarrollando sus funciones de una manera normal