

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**VERIFICACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS DE
Ocimum campechianum (ALBAHACA) Y *Fernaldia pandurata* (LOROCO) EN
CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE QUESOS**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

**LUZ ADRIANA MARTINEZ VALENCIA
LETICIA IVETH ORELLANA HERNANDEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA**

JULIO 2019

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORAS DE AREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Coralía González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero agradecer primero a Dios por ser la luz incondicional que ha guiado mi camino y a todas las personas que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron conmigo en los momentos difíciles, alegres, y tristes.

Especialmente a mi mamá Mary Martínez, por su apoyo incondicional en todo momento, por poner todo su esfuerzo para poder estudiar y lograr culminar mi carrera.

A mi hermana Gaby por siempre estar cuando la necesito.

A mi tía Rosario y tía Ada que sin su apoyo esto no hubiera sido posible lograrlo.

A mis padrinos Daysi y Carlos por su constante apoyo durante toda la carrera.

A mi esposo Rosemberg por ser el apoyo incondicional en mi vida, que con su amor y respaldo, me ayuda a alcanzar mis objetivos.

Al resto de mi familia por las incontables veces que me brindaron su apoyo durante mis estudios.

A mis amigos con todos los que compartí, que gracias a su apoyo moral me permitieron permanecer y perseverar en esta lucha.

A nuestra asesora MsC. Coralia Gonzalez, por la paciencia y dedicación que tuvo con nosotras, en todo este proceso.

Al tribunal calificador MSc. Rocío Ruano y Licda. Ivonne Arévalo, por su paciencia y esmero para el desarrollo de trabajo.

A MSc. Cecilia Gallardo por su comprensión y apoyo incondicional en cada etapa de este proceso y lograr el mejor desarrollo de nuestro trabajo.

Al Laboratorio de Productos Naturales y al Lic. Ulises Castillo por el apoyo y dedicación recibidos para la elaboración de los extractos. No puedo dejar de agradecerte a ti Iveth, mi amiga y compañera fiel de Universidad, de tesis y ahora de corazón y vida.

ADRIANA

DEDICATORIA

A mi hija por ser el impulso y fuente de motivación para concluir mis estudios. A mi mamá, hermana, tías, primos y padrinos ya que sin el apoyo moral y económico de todos ellos no hubiera sido posible este triunfo. También a mis amigos que hice antes y durante mis estudios los llevo siempre en mi corazón. A mi esposo Rosemberg por su permanente cariño y comprensión.

ADRIANA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Miguel Orellana y Marisol Hernández, quienes han sido mi piedra angular, por todos sus esfuerzos por mí, por motivarme a cumplir mis sueños y por todo el amor que me han brindado, jamás podré expresarles con palabras lo mucho que los amo.

A mis hermanos, primos, tíos, abuelitos y a mi novio, por todo su apoyo y amor.

A mi amiga y compañera de tesis Adriana, por ser parte de esta aventura de principio a fin, por su paciencia, cariño, comprensión y disponibilidad.

A nuestra directora, MSc. Coralia González de Díaz, por toda la orientación, paciencia, dedicación y esfuerzo, por ser una fuente de inspiración durante nuestra carrera y por todo el cariño, infinitas gracias.

Al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, por facilitarnos sus equipos e instalaciones y al Lic. Ulises Castillo por brindarnos su asesoría técnica y apoyo para la preparación de los extractos vegetales.

Al tribunal calificador MSc. Rocío Ruano y Licda. Ivonne Arévalo, por su esfuerzo, disposición y conocimiento para la elaboración de nuestro trabajo.

A MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez por su infinita dedicación, esfuerzo, comprensión, paciencia y apoyo incondicional durante todo este proceso.

IVETH ORELLANA

DEDICATORIA

A mi padre Miguel Orellana, por todo el amor, esfuerzo, comprensión y apoyo incondicional que he recibido durante toda mi vida, y a mi madre Marisol Hernández cuya memoria florece en el centro de mi corazón y me inspira a ser cada vez mejor, mi mayor dicha ha sido nacer como su hija, los amo inmensamente.

A mis hermanos Yarissa y Miguel, quienes siempre han confiado en mis capacidades, me apoyaron y ayudaron a mantenerme firme a lo largo de mi vida.

A mis primos, Sandra Martínez y Henry Martínez, quienes han sido los hermanos que me otorgó la vida, por confiar en mí, por estar siempre que los necesito, por todo el esfuerzo y lucha a mi lado en todo este proceso y por enseñarme el valor de la vida.

A mi novio, Josué Delgado quién me ha acompañado a lo largo de la carrera, siendo mí amigo, compañero de estudios y confidente, por confiar en mí, por ser incondicional, por animarme siempre y dedicar tiempo para ayudarme a cumplir este sueño.

IVETH ORELLANA

INDICE GENERAL

Pág. N°

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION

xxii

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO

27

3.1 Uso de plantas

27

3.2 Características de las especies vegetales a utilizar

27

3.2.1 *Ocimum campechianum* (Albahaca)

27

3.2.1.1 Actividad antimicrobiana

29

3.2.1.2 Usos culinarios

29

3.2.1.3 Usos medicinales

29

3.2.2 *Fernaldia pandurata* (Loroco)

30

3.2.2.1 Actividad antimicrobiana

31

3.2.2.2 Usos culinarios

31

3.2.2.3 Usos medicinales

31

3.2.2.4 Toxicidad	32
3.3 Métodos de extracción	32
3.4 Preparación de extractos	33
3.5 Productos lácteos	34
3.6 Bacterias patógenas	35
3.6.1 Microorganismos Gram Negativos	35
3.6.1.1 Escherichia coli	36
3.6.2 Microorganismos Gram Positivos	36
3.6.2.1 Staphylococcus aureus	37
3.6.3 Tratamiento de infecciones causadas por <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.7 Pruebas para verificar la sensibilidad a antimicrobianos	39
3.7.1 Concentración Inhibitoria Mínima	40
3.7.2 Concentración Bactericida Mínima	41
3.7.3 Difusión en agar (Técnica de Kirby Bauer)	41
3.7.4 Método de Dilución en agar	43
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	46
4.1 Tipo de Estudio	46
4.2 Investigación Bibliográfica	46
4.3.1 Universo	47
4.3.2 Muestra	47

4.3.3	Tamaño de muestra	47
4.3.4	Tipo de muestreo	48
4.3.5	Obtención del material vegetal	48
4.3.6	Identificación taxonómica y certificación del material vegetal	48
4.4	Parte experimental	49
4.4.1	Procesamiento del material vegetal	49
4.4.1.1	Porcentaje de humedad del material vegetal	49
4.4.2	Preparación de los extractos etanólicos	50
4.4.3	Toma y transporte de muestras de quesos	51
4.4.4	Preparación de la muestra de queso para aislamiento de cepas salvajes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	52
4.4.5	Aislamiento e identificación macroscópica de <i>Escherichia coli</i>	52
	Determinación de Coliformes Totales	52
4.4.5.1	Identificación de cepas salvajes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de quesos	53
4.4.5.1.1	Aislamiento macroscópica e identificación de <i>Escherichia coli</i>	53
4.4.5.2	Pruebas bioquímicas para identificación de <i>Escherichia coli</i>	54
4.4.5.2.1	Reacción de Indol	54
4.4.5.2.2	Voges Proskauer	54
4.4.5.2.3	Rojo de metilo	55
4.4.5.2.4	Prueba de movilidad	55
4.4.5.2.5	Prueba en agar Triple Sugar Iron (TSI)	55

4.4.5.2.6 Prueba en agar citrato	56
4.4.5.3 Aislamiento macroscópica e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.4.5.3.1 Prueba Coagulasa	56
4.4.5.4 Identificación microscópica de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4.4.5.5 Tinción Gram	57
4.4.6 Preparación de la suspensión estandarizada de las cepas salvajes	58
4.4.7 Preparación del antibiótico de referencia	59
4.4.8 Determinación de la actividad antimicrobiana	60
4.4.8.1 Preparación de las concentraciones de extractos	60
4.4.8.2 Método de Kirby Bauer Modificado	62
4.4.9 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	63
4.4.9.1 Método de Macrodilución en caldo Müller-Hinton	63
4.4.10 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	64

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
5.1 Porcentaje de humedad del material vegetal ⁽⁹⁾	67
5.2 Rendimiento obtenido de la preparación de extractos	68
5.3 Cepas de referencia	69
5.4 Aislamiento e identificación macroscópica de <i>Escherichia coli</i> a partir de diferentes muestras de quesos	69

5.4.1	Determinación de coliformes totales	69
5.4.2	Determinación e identificación macroscópica de <i>Escherichia coli</i>	70
5.4.3	Resultados de pruebas bioquímicas	71
5.4.4	Identificación microscópica de <i>Escherichia coli</i>	72
5.5	Aislamiento e identificación macroscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	72
5.5.1	Prueba Coagulasa	73
5.5.2	Identificación microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	73
5.6	Verificación del método de estandarización de cepas salvajes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	74
5.7	Prueba de Antibiograma por el método de Kirby Bauer Modificado	75
5.8	Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Método de Macrodilución en Caldo Müeller-Hinton	80
5.9	Determinación de Concentración Bactericida Mínima (CBM)	81
CAPITULO VI		
6.0	CONCLUSIONES	83
CAPITULO VII		
7.0	RECOMENDACIONES	86
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. <i>Ocimum campechianum</i> (Albahaca)	27
2. <i>Fernaldia pandurata</i> (Loroco)	30
3. Tubos con caldo LMX y reactivo de Kovacs con formación de anillo violeta A). Tubos bajo luz UV, fluorescencia B).	70
4. Morfología característica en agar MacConkey de cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de muestra de queso.	71
5. Tinción Gram de <i>Escherichia coli</i>	72
6. Morfología característica de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de queso.	73
7. Prueba Coagulasa	73
8. Tinción Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	74

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Porcentajes de rendimiento de los extractos de <i>Ocimum campechianum</i> (Albahaca) y <i>Fernaldia pandurata</i> (Loroco)	69
2. Resultados de pruebas bioquímicas	71
3. Verificación del Método de Estandarización	75
4. Criterios para interpretación del antibiograma	77
5. Halos de inhibición de control negativo: agua estéril y positivo: Bencilpenicilina	77
6. Halos de inhibición de <i>Ocimum campechianum</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	78
7. Halos de inhibición de <i>Ocimum campechianum</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	78
8. Halos de inhibición de <i>Fernaldia pandurata</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	79
9. Halos de inhibición de <i>Fernaldia pandurata</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	80

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Identificación taxonómica del material vegetal.
2. Material, Equipo y Reactivos.
3. Esquema de procesamiento de material vegetal.
4. Procedimiento para determinar el porcentaje de humedad del material vegetal.
5. Esquema de preparación de extractos etanólicos.
6. Esquema de toma y transporte de muestras de queso hasta el lugar de trabajo.
7. Esquema de proceso de preparación de muestra de cada tipo de queso para aislamiento de cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
8. Esquema para Prueba de Coliformes Totales.
9. Esquema de identificación macroscópica y aislamiento de *Escherichia coli*.
10. Pruebas Bioquímicas para *Escherichia coli*.
11. Esquema de aislamiento e identificación macroscópica de *Staphylococcus aureus*.
12. Prueba Coagulasa.
13. Tinción Gram
14. Esquema de estandarización de cepas salvajes.
15. Preparación de los antibióticos de referencia.
16. Preparación de concentraciones de extractos.

17. Método Kirby Bauer Modificado.

18. Esquema de Método de Macrodilución en caldo Müller-Hinton.

19. Esquema de Concentración Bactericida Mínima.

ABREVIATURAS

°C	= grado Celcius
µg	= Microgramos
µL	= Microlitros
µm	= Micrómetros
AOAC	= Association of Official Analytical Chemists
APB	= Agua Peptonada Buferada
B1	= Bufer Fosfato 1
BaCl₂	= Dicloruro de Bario
BHI	= Brain- Heart- Infusion
CBM	= Concentración Bactericida Mínima
CENSALUD	= Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
CIM	= Concentración Inhibitoria Mínima
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
EMB	= Eosin – Metil - Blue
ETA'S	= Enfermedades de Transmisión Alimentarias
KBM	= Kirby Bauer Modificado
LMX	= Fluorocult
mg	= Miligramos
MIO	= Movilidad - Indol - Ornitina
NaCl	= Cloruro de Sodio
pH	= Potencial de Hidrógeno
RTCA	= Reglamento Técnico Centroamericano
<i>S. aureus</i>	= <i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	= Triple Sugar Agar

TSI = Triple Sugar Iron

UFC/mL = Unidades formadoras de colonia por mililitro

UV = Ultra Violeta

RESUMEN

En la presente investigación se realizaron dos ensayos para evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos secos obtenidos por maceración ultrasónica de las especies *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco). Se aislaron y estandarizaron cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de queso fresco, quesillo y queso duro, todas las muestras de queso analizadas presentaron contaminación con dichas bacterias, llevando como cepas control *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* caracterizadas previamente y se utilizó el método de Kirby Bauer Modificado para verificar si los extractos poseían efecto antibacteriano.

Para el ensayo inicial de Kirby Bauer Modificado, se utilizó Gentamicina como antibiótico de referencia, para la elaboración de los extractos la concentración inicial fue de 100 µg/mL, que es la concentración máxima deseada a la que se espera que tengan actividad antibacteriana, posteriormente se hicieron diluciones de cada extracto de acuerdo al método, las concentraciones ensayadas fueron 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.562 µg/mL, en las cuales no se observaron halos de inhibición superiores a 12 mm, para los extractos como para el antibiótico de referencia. Por lo que se realizó un segundo ensayo, aumentando las concentraciones de cada extracto a: 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL, para el cual no se observaron halos de inhibición mayores a 12 mm.

Se concluye que ambas especies vegetales no presentan actividad antibacteriana, por lo que no fue posible determinar la Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima.

Se recomienda ampliar el estudio de especies vegetales nativas, con el fin de encontrar plantas que puedan ser utilizadas como preservantes alimenticios naturales.

La investigación se realizó desde julio del 2018 hasta junio del 2019, desarrollando la parte experimental en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA's) son un grave problema para el país. Existen diversos alimentos que pueden transmitirlos, entre ellos tenemos los que se comercializan con escaso control higiénico, como los quesos sin pasteurizar, por lo que, el RTCA 67.04.50:17 exige la determinación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en ellos.

Recientemente, ha crecido la demanda por parte de la población por curarse de forma natural, en los últimos años han incrementado las investigaciones sobre especies vegetales. La población ve en las especies vegetales una alternativa para curar sus enfermedades ya que no siempre tiene la capacidad económica para adquirir medicamentos sintéticos.

Se investigaron dos especies vegetales comestibles de las cuales se tiene poca información científica a la fecha, sobre su actividad antibacteriana estas son *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco), con el fin de evaluar su utilización como preservantes alimenticios naturales.

El desarrollo experimental comprendió el proceso de recolección, identificación y secado de hojas de *Ocimum campechianum* (Albahaca) y flores de *Fernaldia pandurata* (Loroco), para la preparación de extractos etanólicos secos por maceración ultrasónica. También se recolectaron muestras de queso fresco, quesillo y queso duro del Mercado Central de San Salvador, de todas las muestras se aislaron cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que posteriormente fueron identificadas macro y microscópicamente previo a su estandarización por el método de Mac Farlan para ser empleadas en el ensayo de sensibilidad antimicrobiana de Kirby Bauer Modificado, utilizando cilindros de acero inoxidable de 6mm de diámetro interno x 1 mm de altura, en los cuales se

inocularon 200 μ L de cada solución de extracto evaluada.

Se realizó un ensayo inicial para cada extracto seco y con cada microorganismo aislado de los diferentes tipos de quesos, empleando el Método de Kirby Bauer Modificado, para ello se realizaron diluciones seriadas partiendo de una concentración de 100 μ g/mL, que es la concentración máxima deseada a la que se espera que los extractos tengan actividad antibacteriana, las concentraciones ensayadas fueron: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.562 μ g/mL, los resultados de inhibición obtenidos se compararon con un antibiótico de referencia sugerido por la Farmacopea de los Estados Unidos, Gentamicina.

Debido a que en los resultados obtenidos con las concentraciones iniciales no se observó actividad antibacteriana, se realizó un segundo ensayo para cada extracto seco y con cada microorganismo aislado de los diferentes tipos de quesos, empleando el Método de Kirby Bauer Modificado aumentando las concentraciones de cada extracto a: 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL, se compararon los resultados de inhibición obtenidos, utilizando otro antibiótico de referencia recomendado por la Farmacopea de los Estados Unidos, Bencilpenicilina, debido a la resistencia presentada por Gentamicina.

La investigación se llevó a cabo desde julio del 2018 hasta junio del 2019, desarrollando la parte experimental en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Verificar el efecto antibacteriano de extractos de *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco) en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Preparar extractos etanólicos de *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco).
- 2.2.2 Identificar las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de queso fresco, quesillo y queso duro, mediante su morfología microscópica, macroscópica y pruebas bioquímicas.
- 2.2.3 Determinar la actividad antibacteriana de los extractos a las concentraciones: 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL utilizando el método Kirby Bauer Modificado contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y el antibiótico de referencia.
- 2.2.4 Establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos que presenten actividad, mediante el Método de Macrodilución en tubos sobre las cepas en estudio.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Uso de plantas

Las plantas son herramientas de gran utilidad en la vida del ser humano, tienen múltiples aplicaciones, que van desde su utilización con fines ornamentales e industriales hasta su reciente aprovechamiento para la elaboración de fitocosméticos, fitomedicamentos y su tradicional uso en la industria alimentaria para la elaboración de distintos platillos.

Muchas especies vegetales son utilizadas por la población salvadoreña para la elaboración de diversos platillos de consumo diario, podemos destacar las tradicionales pupusas de queso con loroco, tortas de huevo con loroco, sopas con albahaca, entre otros.

3.2 Características de las especies vegetales a utilizar ⁽¹⁰⁾

3.2.1 *Ocimum campechianum* (Albahaca) ⁽¹⁰⁾



Figura N° 1. *Ocimum campechianum* (Albahaca)

- Familia

Lamiaceae

- Descripción botánica

Hierba arbustiva, hasta 1 m de altura, frecuentemente algo leñosa, al menos en la base, los tallos inconspicuamente puberulentos. Hojas simples, opuestas, láminas de 2 - 11,5 x 1 - 8 cm, elípticas, el ápice agudo, la base decurrente, el margen aserrado, inconspicuamente pubescentes, pecioladas. Inflorescencias espisciformes o paniculiformes, 4 - 7 cm de largo, con muchas flores pediceladas, cáliz 3 – 4,5 mm de largo, internamente glabro, labio superior con el ápice redondeado, labio inferior con dientes laterales deltoides, dientes inferiores largamente acuminados; corola rosada, purpúrea, azul, lila, (blanca o amarilla), con un tubo de 2- 2,5 mm de largo, el labio superior de 1,5 – 2 mm de largo, el labio inferior de 0,7 – 1,5 mm de largo. Cáliz fructífero de 7 –10 mm de largo, con varias semillas en su interior.

- Hábitat

Bosques secos en elevaciones de 0 - 900 m. En El Salvador, es muy frecuente y común en todo el país. En Costa Rica, se encuentra en las llanuras del norte, Guanacaste y la región del Golfo Dulce en el sur del país.

- Distribución geográfica

Del sur de Estados Unidos y las Antillas a Argentina.

- Fenología

Florece y fructifica de junio a febrero. En Costa Rica se ha visto florecer en enero y abril.

- Parte de la planta que se consume

Las hojas

3.2.1.1 Actividad antimicrobiana ^{(27), (6)}

Los aceites esenciales obtenidos a partir de las hojas de *Ocimum campechianum* provee mejor capacidad antibacteriana que *Ocimum basilicum* frente a las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.

En una investigación se extrajo el aceite esencial de las semillas de diferentes especies de albahaca, *Ocimum basilicum* variedad *purpurascens* presenta la actividad antimicrobiana más débil, mientras que los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* variedad *difforme*, *Ocimum campechianum* y *Ocimum kilimandscharicum*, inhibieron débilmente el desarrollo de las bacterias.

3.2.1.2 Usos culinarios

Las hojas se cortan y se agregan a las sopas de gallina “india”, preferentemente en la etapa del cocimiento, o según la receta casera también puede ser al principio. Por su intenso aroma y sabor se utiliza fresca en ensalada, preparar pesto o condimentos. En Nicaragua se usa para condimentar varios tipos de comida.

3.2.1.3 Usos medicinales

Se utiliza medicinalmente para dolores de oído, machacando las hojas y colocándolas en ese órgano. Las infusiones de las hojas se usan para tratar los dolores de estómago, fiebre, trastornos estomacales, disentería se puede utilizar hojas machacadas para tratar miasis nasal (enfermedad parasitaria), la cocción de la raíz para tratar problemas digestivos, esta planta contiene compuestos bioactivos que se utilizan de forma natural como insecticida nematicida, fungicida o antimicrobiano. ⁽⁵⁾

3.2.2 *Fernaldia pandurata* (Loroco) ⁽¹⁰⁾



Figura N° 2. *Fernaldia pandurata* (Loroco)

- Familia

Apocynaceae

- Descripción botánica

Bejuco trepador con látex acuoso, ramitas pubescentes a glabras. Hojas simples, opuestas, láminas de 3 - 17 x 1,5 - 9,5 cm, ovadas a elípticas, el ápice acuminado, la base truncada, abusa a cuneada, los márgenes enteros a ondulados, glabras a pubérulas en el envés, pecioladas. Inflorescencias racimos axilares, con pocas flores blancas o crema, pediceladas; sépalos cerca de 2 mm de largo, angostamente triangulares, glabros, lóbulos de 2-3,5 cm de largo. Frutos dos folículos de 24-33 cm de largo, al madurar cafés, con numerosas semillas con pelos en el ápice.

- Hábitat

Bosques húmedos y de galería, en elevaciones de 50-1.200 m. En Honduras se ha registrado en los departamentos de Choluteca, Comayagua, Copán, Cortez, El Paraíso, Francisco Morazán y Ocotepeque. En El Salvador, se encuentra en todo el país.

- Distribución geográfica

De México a Costa Rica.

- Fenología

Florece de mayo a octubre.

- Parte de la planta que se consume

Las flores

3.2.2.1 Actividad antimicrobiana

Los extractos de diclorometano y metanol realizados a partir de flores de loroco, se analizaron contra las bacterias *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli*, los cuales no presentaron actividad antibacteriana significativa para inhibir el crecimiento de dichos microorganismos. ⁽²⁸⁾

3.2.2.2 Usos culinarios. ⁽¹⁰⁾

Las flores se preparan con huevo, carne de res y pollo, en empanadas con queso o mezcladas en encurtidos y sopas. También se usan en caldo de frijoles, camarones con loroco sobre limón, crema de loroco, derretidos de loroco, lasaña de loroco, pescado con salsa de loroco, pollo a la parrilla con salsa de loroco, tallarines con queso y loroco. Los brotes jóvenes también se comen en sopas o en tamales.

3.2.2.3 Usos medicinales. ⁽¹⁰⁾

Las flores se utilizan para estimular la producción de leche materna. Se utiliza medicinalmente para dolores de oído, machacando las hojas y colocándolas en

ese órgano. En algunas partes de El Salvador, las hojas se usan para tratar los dolores de estómago.

3.2.2.4 Toxicidad ⁽¹⁹⁾

A pesar de ser pariente de otros miembros de la familia Apocynaceae que son tóxicas, los extractos de flores frescas y secas fueron negativos para glucósidos cardiotónicos y alcaloides indólicos. Sin embargo, se ha reportado que en Guatemala las raíces son utilizadas para envenenar animales nocivos. En un estudio en Brasil se encontró que el extracto del rizoma es capaz de inhibir la acción de la bradiginina en el útero de las ratas por lo que se atribuye su uso popular para tratar mordeduras de serpientes venenosas a esta propiedad.

3.3 Métodos de extracción ^{(14) (29)}

La extracción es el primer paso crucial en la preparación de formulaciones de plantas. Las plantas constituyen una fuente de nuevos compuestos químicos con diversas aplicaciones. Estos compuestos químicos se conocen como metabolitos secundarios y pueden ser alcaloides, esteroides, taninos, glicósidos, aceites esenciales, fenoles, y flavonoides, los cuáles se encuentran en partes específicas de la planta como las hojas, flores, semillas, frutos, raíces, etc. Los beneficios de las plantas típicamente vienen de la combinación de estos compuestos.

Por lo tanto es importante seleccionar el método de extracción que permita obtener la mayor eficiencia, es decir que permita obtener la mejor separación de los compuestos de interés.

Los procesos de extracción se pueden dividir en: a) procesos que dan como resultado un equilibrio entre la concentración del soluto y el residuo, y b) procesos que agotan completamente la droga.

La maceración es un proceso que da como resultado un equilibrio entre la concentración del soluto y el residuo, consiste en poner en contacto la droga y el solvente por varios días y depende de factores que están unidos a la droga como por ejemplo, su naturaleza, tamaño de partícula, contenido de humedad, y de factores unidos al solvente como por ejemplo, la selectividad. La velocidad con que se obtiene el equilibrio depende del tamaño de partícula de la droga molida, así como, del grado de hinchamiento de las células y de las propiedades del solvente, como su viscosidad y polaridad.

La maceración puede ser simple o dinámica, a temperatura ambiente o temperaturas más elevadas. El uso de la maceración estática ha sido prácticamente abolido, en la actualidad se utiliza la maceración dinámica, es decir, con algún tipo de agitación ya que esta disminuye considerablemente el tiempo de extracción, por ejemplo maceración ultrasónica.

3.4 Preparación de extractos ⁽⁹⁾

La cantidad de agua libre (humedad) que contiene el material vegetal debe ser inferior al 10% para una buena conservación del mismo, ya que de esta manera se evitan procesos enzimáticos, y permite la expresión de los principios activos con respecto a la materia seca. Para la determinación del porcentaje de humedad existen diversos métodos, uno de ellos es el gravimétrico, el cual consiste en colocar una cantidad exacta de droga en una estufa a alta temperatura y pesarla hasta que la variación no exceda los 5 mg. La diferencia entre el peso inicial y el final es el contenido de humedad. ⁽⁴⁾

Para la preparación de los extractos uno de los pasos más importantes es la elección del solvente a utilizar, para obtener la mayoría de los compuestos químicos de la planta se utilizan solventes de alta polaridad, como el alcohol

etílico. Para obtener una buena extracción se deben considerar diversas variables que afectan el proceso extractivo, estas son el estado de división de la droga, agitación, temperatura, pH, naturaleza del solvente y tiempo de extracción.

Teóricamente a menor tamaño de partícula mayor eficiencia en la extracción, sin embargo se recomienda la utilización de polvos moderadamente gruesos para el proceso de extracción debido a que polvos muy finos pueden pasar al extracto en la maceración y hacer necesario un proceso de filtración que no siempre es de fácil ejecución. La agitación desplaza el punto de saturación del solvente haciendo la extracción más efectiva, es por eso que se recomienda utilizar una buena agitación. La temperatura facilita el proceso de extracción pero puede destruir a los compuestos termolábiles. El pH es importante si se desea hacer por ejemplo, una extracción de sales con agua, éste debe ser bajo para permitir la formación de las sales solubles en agua. El tiempo de extracción se determina en función del solvente y el equipo seleccionado.

Posterior a la obtención del extracto, el secado (eliminación del solvente) es una parte muy importante ya que permite obtener extractos más estables químicamente y más fáciles de transportar y almacenar.

3.5 Productos lácteos

Según el Codex Alimentarius, por producto lácteo se entiende un “producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración”.

La diversidad de productos lácteos varía considerablemente de región a región y entre países de la misma región, según los hábitos alimentarios, las tecnologías disponibles de elaboración de la leche, la demanda de mercado y las

circunstancias sociales y culturales. Los productos lácteos procesados están adquiriendo una creciente importancia en muchos países.

Los quesos se obtienen mediante la coagulación de la proteína de la leche (caseína), que se separa del suero. Se producen centenares de variedades de queso, muchos de los cuales son característicos de una región específica del mundo.

Sin embargo, la mayoría de los quesos se producen en los países desarrollados. Los quesos pueden ser duros, semiduros, blandos madurados o no madurados.

Las distintas características de los quesos derivan de las diferencias en la composición de la leche y los tipos de esta, los procedimientos de elaboración aplicados y los microorganismos utilizados. ⁽²⁰⁾

3.6 Bacterias patógenas ⁽²⁹⁾

Son bacterias causantes de enfermedades infecciosas en los seres vivos, de vida libre, cosmopolita y patógena para el hombre y animales. Miden entre 1 y 10 μm .

3.6.1 Microorganismos Gram Negativos ⁽²⁵⁾

Las bacterias Gramnegativas son todas aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. Es por eso el nombre gram negativas o también Gram-negativas. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, ya que presenta doble membrana celular (una es externa y la otra citoplasmática) lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales supergrupos de bacterias.

3.6.1.1 *Escherichia coli* ⁽³⁰⁾

Escherichia coli forma parte de la flora habitual en el tracto digestivo de humanos, sin embargo, existen algunas cepas patógenas causantes de diarrea, se dividen en seis categorías principales de acuerdo a sus diferentes mecanismos de patogenicidad, su interacción con la mucosa intestinal, síntomas diarreicos y características epidemiológicas las cuales muestran al menos una propiedad relacionada con la virulencia en un plásmido. Estas son: enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (AAggEC), enterotoxigenica (ETEC) y difusiva-adherente (DAEC).

El método tradicional en el aislamiento de la bacteria, es tomarla directamente de materia fecal o con hisopo rectal. Después se siembra con la punta del hisopo en la parte superior de una placa de agar Mac Conkey u otro medio selectivo y, con una asa redonda de nicromel, se continúa el aislamiento, sembrando por estría cruzada; luego se incuba a 37 °C durante 18-24 h. Posteriormente se seleccionan de 5 a 10 colonias típicas de *E. coli* lactosa positivas.

En muestras provenientes de casos de diarrea con sangre se deben seleccionar también cepas lactosa negativa que pudieran ser EIEC.

La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubo como TSI, LIA, MIO, citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, Voges Proskauer, malonato y caldo manitol-rojo de fenol. Estas pruebas tienen su propia interpretación. Simultáneamente se siembra la cepa en tubos de agar base sangre (BAB), sin sangre para posteriormente hacer la serología.

3.6.2 Microorganismos Gram Positivos ⁽²⁵⁾

Se le denomina bacterias Gram-positivas, a aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente

ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son grupos principales de bacterias. Las bacterias Gram positivas cuentan con una envoltura celular que comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea a la interior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico, la capa de peptidoglucano confiere una gran resistencia a estas bacterias y una de las responsables de retener el tinte durante la tinción de Gram.

3.6.2.1 *Staphylococcus aureus* ⁽⁹⁾

Es un patógeno humano importante que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados y a personas inmunocompetentes produce diversas patologías diversas desde un absceso de piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico (SSTS). Puede ser causante de intoxicación por alimentos, debido a ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada producida por una cepa toxigénica. ⁽¹⁵⁾

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas.

La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. La mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, en los medios de cultivo tradicionales

formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. *S. aureus* se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5%).

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa. Sin duda, la prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada. Se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de la coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de *Estafilococos* coagulasa negativos.

3.6.3 Tratamiento de infecciones causadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ^{(2), (13)}

Para el tratamiento de las infecciones causadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, hay diversos antibióticos, entre estos tenemos Gentamicina y Bencilpenicilina.

Gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro. Actúa sobre bacterias Gram negativas aerobias, incluyendo enterobacteriáceas, *Pseudomonas* y *Haemophilus*. Actúa también sobre estafilococos (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) incluyendo cepas productoras de

penicilinas, tiene actividad muy limitada sobre estreptococos. Carece de actividad sobre bacterias anaerobias.

La Bencilpenicilina ejerce acción bactericida contra los microorganismos sensibles a la penicilina durante la etapa de multiplicación activa. Actúa mediante inhibición de la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular. No es activa contra bacterias productoras de penicilinas, entre las cuales figuran muchas cepas de Estafilococos. Se cuenta con los siguientes datos *in vitro*, sin embargo, su significado clínico se desconoce. La bencilpenicilina ejerce una intensa actividad *in vitro* contra Estafilococos (excepto las cepas productoras de penicilinas), estreptococos (grupos A, C, G, H, L y M) y neumococos.

3.7 Pruebas para verificar la sensibilidad a antimicrobianos ⁽²²⁾

El objetivo de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos *in vitro* es proporcionar una guía para el manejo terapéutico de las enfermedades infecciosas a través de la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a diferentes compuestos antimicrobianos.

Existen diferentes técnicas de laboratorio que pueden ser utilizadas para evaluar *in vitro* la resistencia de las bacterias a diferentes agentes antimicrobianos. Entre estas técnicas, la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer) es la más común, así como las pruebas de macrodilución en caldo y agar.

Para desarrollar todo el potencial con que se cuenta hay que cumplir con un requisito fundamental: es necesario lograr el aislamiento del agente productor del cuadro clínico mediante los cultivos correspondientes.

La prueba de sensibilidad a antimicrobianos adquiere una mayor importancia para algunas especies bacterianas que no presentan una sensibilidad predecible. Algunos ejemplos claros de este tipo de microorganismos

son: *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, y los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Otros microorganismos donde la prueba de sensibilidad ha adquirido una gran importancia, sobre todo en los últimos años, son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Existen diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de forma rutinaria, y de manera semicuantitativa, las CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados).

3.7.1 Concentración Inhibitoria Mínima ⁽²²⁾

La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente).

Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual. Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento. Intermedia, cuando el éxito terapéutico es impredecible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

3.7.2 Concentración Bactericida Mínima ⁽²²⁾

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

3.7.3 Difusión en agar (Técnica de Kirby Bauer) ⁽²²⁾

La técnica de difusión en agar, es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus* sp., o los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*.

En esta técnica, el inóculo bacteriano es llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarlan, se aplica sobre la superficie de una placa seca de agar Müeller-Hinton que tenga un pH entre 7,2 y 7,4 medido a temperatura ambiente y una vez solidificado el medio de cultivo. La cepa se debe estriar sobre la superficie del medio de solidificado el medio de cultivo de forma tal que se logre un crecimiento confluyente. Una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos, se procede a colocar los discos o las pastillas con el antibiótico.

Si se emplean placas de Petri de 100 mm de diámetro, el número máximo de discos a colocar es de 5. Luego, la placa se incuba a 35 – 37 °C en temperatura ambiente y por un periodo de 24 a 48 horas principalmente para lograr una mejor detección de la resistencia.

Cada placa es observada en una luz indirecta y cada halo de inhibición es medido utilizando un pie de rey o en su defecto una regla graduada en la forma adecuada. En el caso de que no se presente un halo, no se debe reportar 0 mm, se debe reportar 6 mm, ya que ese es el diámetro del disco.

Los diámetros alrededor de cada disco son medidos y su interpretación se basa en guías publicadas cada cierto tiempo, por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y el organismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico testado.

Cada antibiótico tiene su halo de inhibición específico y éste depende del tamaño de la molécula del antibiótico y su polaridad; de esta manera, un antibiótico con un peso molecular bajo como la penicilina, tendrá mucha capacidad para migrar, por lo tanto su halo, en el caso de una cepa sensible tendrá un diámetro muy amplio. Por ejemplo, en el caso de la vancomicina, que tiene una molécula muy grande y muy hidrofóbica, su halo de inhibición será muy pequeño. De esta manera, no se puede afirmar, que para una cepa determinada, ésta es más sensible a la penicilina que a la vancomicina, sólo porque el primero tenga un halo de inhibición mucho mayor.

La técnica de difusión en agar, presenta varias ventajas como:

- Es fácil de efectuar y de gran reproducibilidad
- Bajo precio
- No requiere equipo especial
- Resultados son fácilmente interpretados por los clínicos
- Es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar

Dentro de sus desventajas está el hecho de que brinda sólo información cualitativa. Otra desventaja y la más importante, es que esta técnica debe ser modificada para poderla emplear en organismos fastidiosos o de crecimiento lento.

3.7.4 Método de Dilución en agar ⁽²²⁾

Siendo la técnica de difusión en agar únicamente cualitativa, y teniendo en mente que en muchas oportunidades clínicas se hace necesario conocer con exactitud qué concentración de antibiótico es la necesaria para lograr controlar un proceso infeccioso dado, es evidente la necesidad de contar con metodología que solvante ese problema.

Se han desarrollado varios métodos en este campo como son las técnicas de la dilución en agar, la microtitulación y el E test. En éstas lo que se pretende es hacer un gradiente decreciente de la concentración de un antibiótico dado y probarlo contra un inóculo bacteriano estandarizado.

Al igual que la técnica de difusión, en las de dilución, hay que controlar el medio de cultivo, el inóculo bacteriano y el antibiótico.

De este tipo de técnicas podemos mencionar tres: la dilución en agar, la dilución en tubo y la microtitulación.

La dilución en tubo sigue siendo el estándar dorado de las pruebas de sensibilidad, o sea, es la técnica de referencia, aun cuando, ante todo presenta el problema de la contaminación y la dificultad para detectarla.

En la técnica de la dilución en agar, se preparan tubos con la concentración definida de antibiótico y se le agrega a cada tubo una cantidad conocida del agar Mueller-Hinton, este tubo se homogeniza y se vierte en una placa de Petri vacía con lo que se logra una placa de agar Mueller-Hinton con el antibiótico diluido a una concentración determinada.

Para inocular el medio de cultivo, se emplea un inoculador conocido como el inoculador de Steer. Este es una placa de metal de 32 pozos y una lámina de metal con 32 proyecciones que toman, cada una, 20 μ L del inóculo estandarizado

del agente y que se coloca sobre la superficie del agar con antibióticos. Adicional a esto, se inocula una placa de Müller-Hinton sin antibiótico, que sirve como control positivo de crecimiento. La placa se incuba a 35 °C por 18 a 24 horas y se revisa el crecimiento, siempre contra el control positivo.

Si la cepa logra crecer en la superficie del medio de cultivo, se reporta como resistente a esa concentración del antibiótico. Si, por el contrario, no crece, se reporta como sensible a esa concentración de antibiótico.

Con esta técnica, se puede obtener la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la que se define como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana determinada.

Preparar toda una gradiente de medios de cultivo con una concentración decreciente de antibiótico, hace que esta técnica sea muy engorrosa por lo que en realidad se utilizan sólo dos diluciones, una arriba del punto de quiebra del antibiótico y otra debajo de este valor. El punto de quiebra es un valor matemático, que expresa un punto o concentración arriba del cual la cepa se debe interpretar como resistente al antibiótico.

Basándose en este criterio, al escogerse dos concentraciones, una abajo y otra arriba del punto de quiebra, si la cepa crece en las dos concentraciones es resistente, si crece sólo en la concentración bajo el punto de quiebra, la cepa es intermedia y sensible si no crece en ninguna.

A un utilizando sólo dos concentraciones, esta técnica exige mucho trabajo técnico y es lenta para la interpretación de los resultados; por eso se ha empleado otra técnica derivada de ésta: la microtitulación.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de Estudio

- Exploratorio: Se utilizó para determinar si *Ocimum campechianum* y *Fernaldia Pandurata* poseen propiedades antibacterianas.
- Experimental: Se realizaron ensayos microbiológicos para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Ocimum campechianum* y *Fernaldia Pandurata* sobre dos cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos.
- De campo: Se recolectaron las especies vegetales y se hizo su certificación por medio de un técnico del Jardín Botánico Plan de La Laguna.

4.2 Investigación Bibliográfica

La investigación bibliográfica se realizó consultando las siguientes bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia Universidad de El Salvador
- Central de la Universidad de El Salvador
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- “P. Florentino Idoate, S.J.” de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas
- Bases de datos CBUES
- Internet.

4.3 Investigación de campo

Se realizó una visita en el municipio de San Marcos, se visitó un terreno con diferentes sembradíos y se autorizó la extracción de flores de Loroco. Para la obtención de Albahaca se visitó el cantón San Lorenzo del municipio de Sensuntepeque.

Las especies vegetales colectadas se presentaron a la sección técnico científica del Jardín Botánico Plan de La Laguna, el cual emitió las certificaciones correspondientes para su identificación taxonómica. (Ver Anexo N°1)

Se visitó el mercado Central de San Salvador y se seleccionaron al azar, tres establecimientos que comercializaban productos lácteos no pasteurizados de los cuáles se obtuvieron las muestras de queso fresco, queso duro y quesillo, una muestra de cada establecimiento.

4.3.1 Universo

Está formado por todas las especies vegetales que presentan actividad antimicrobiana.

4.3.2 Muestra

Especies vegetales seleccionadas: *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco).

4.3.3 Tamaño de muestra

Se recolectaron 600 g de Loroco y 300 g de Albahaca, cantidad suficiente para obtener 50 g de material vegetal seco de cada uno. Para cada combinación

extracto-bacteria, se utilizaron 7 concentraciones: 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL, utilizando el método de Kirby-Bauer Modificado. Posteriormente se verificó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) mediante el Método de Macrodilución en Caldo.

Se tomó 1lb por cada tipo de queso: queso fresco, quesillo y queso duro, los cuales se analizaron cada uno para aislar los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

4.3.4 Tipo de muestreo

Se realizó un muestreo dirigido y puntual a las especies vegetales *Ocimum campechianum* y *Fernaldia pandurata*.

4.3.5 Obtención del material vegetal

Se hizo la identificación preliminar de Albahaca y Loroco, en diferentes municipios. La Albahaca se recolectó en el cantón San Lorenzo, municipio Sensuntepeque, departamento de Cabañas y el Loroco se recolectó en el municipio de San Marcos a una latitud de 13,655321 metros y longitud - 89,173149 metros, departamento de San Salvador.

4.3.6 Identificación taxonómica y certificación del material vegetal

Para la identificación del material vegetal se procedió a presentar las especies vegetales colectadas a la sección técnica científica del Jardín Botánico Plan de la Laguna, el cual emitió las certificaciones correspondientes. (Ver Anexo N°1)

4.4 Parte experimental

El desarrollo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Material, equipo y reactivos. (Ver Anexo N° 2)

4.4.1 Procesamiento del material vegetal

El material vegetal se colectó en bolsas tipo Ziploc perforadas, identificado por un técnico del Jardín Botánico del Plan de La Laguna, transportado al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) donde fue lavado con agua destilada, el exceso de humedad se retiró con papel toalla. Las hojas de albahaca, se colocaron en una prensa a temperatura ambiente durante una semana para el secado. Las flores de loroco, se colocaron en estufa a 40 °C por 48 horas para secarlas, ya que tienen más humedad. Posteriormente se tomó aproximadamente 5 g de material vegetal, de cada muestra a examinar, para la determinación de humedad y finalmente se trituró con mortero y pistilo. El material vegetal seco se utilizó para la preparación de los extractos a las siguientes concentraciones 6.4 mg/mL, 3.2 mg/mL, 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL y 0.1 mg/mL. (Ver Anexo N° 3)

4.4.1.1 Porcentaje de humedad del material vegetal ⁽⁸⁾

La determinación del porcentaje de humedad del material vegetal se realizó mediante el método AOAC 934.91 (Association of Official Analytical Chemists). Este método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta masa constante en estufa. (Ver Anexo N° 4)

Procedimiento

- Colocar una cápsula de porcelana durante 1 hora en la estufa a la temperatura de 105 ± 2 °C
- Trasladar la cápsula al desecador utilizando pinzas y dejar enfriar durante 30 a 45 min.
- Pesar la cápsula de porcelana con una aproximación de 0.1 mg. Registrar este peso como "m1".
- Añadir a la cápsula de porcelana aproximadamente 5 g de muestra previamente homogeneizada. Registrar este peso como "m2".
- Colocar la cápsula con la muestra en la estufa a una temperatura de 105 °C por 5 horas.
- Retirar la cápsula con la muestra de la estufa, enfriar en desecador durante 30 a 45 min. Repetir el procedimiento de secado por una hora adicional, hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedan de 5 mg. Registrar este peso como "m3".
- Efectuar el análisis por duplicado.
- Cálculo y expresión de los resultados:

La humedad del producto expresada en porcentaje, es igual a:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{m2 - m3}{m2 - m1} \times 100$$

Donde:

m1: masa de la cápsula vacía (g)

m2: masa de la cápsula con la muestra antes del secado (g)

m3: masa de la cápsula más la muestra desecada (g)

4.4.2 Preparación de los extractos etanólicos ^{(6), (31)}

Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración ultrasónica utilizando etanol 95% v/v como solvente. (Ver Anexo N° 5)

Procedimiento

- Pesar 50.0 g de hojas de Albahaca o flores de Loroco secas.
- Colocar la muestra en un Erlenmeyer con capacidad para 1000 mL
- Medir en una probeta de vidrio 600 mL de etanol al 95% v/v y adicionarlo al erlenmeyer que contiene el material vegetal. (Cantidad necesaria para cubrir el material vegetal).
- Colocar el erlenmeyer en el equipo de ultrasonido durante 60 minutos.
- Dejar en reposo tapado con papel parafilm durante una semana, después filtrar el extracto por gravedad a través de gasa estéril.
- Evaporar utilizando un Rotaevaporador el extracto a 40 °C durante 16 horas.
- Transferir a vaso de precipitados de al menos 600 mL de capacidad y taparlo utilizando papel aluminio para evitar contaminación por agentes externos.
- Hacer agujeros en la tapa de papel aluminio para favorecer la evaporación del solvente y dejar reposar en cámara de gases a temperatura ambiente durante al menos dos semanas para que llegue a sequedad.
- Transferir cada extracto a viales de vidrio previamente pesados.
- Pesar los viales conteniendo el extracto y calcular el porcentaje de rendimiento obtenido para ambos extractos.
- Disponer los extractos obtenidos en un desecador a temperatura ambiente para su posterior análisis.

4.4.3 Toma y transporte de muestras de quesos (Ver Anexo N° 6)

Las muestras de queso fresco, quesillo y queso duro se recolectaron en el mercado Central de San Salvador, para cada tipo de queso, se eligió un establecimiento que comercializaba productos lácteos no pasteurizados al azar, y se recolectó 1 lb de cada matriz, se transportaron en hieleras con hielo hasta el

Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

4.4.4 Preparación de la muestra de queso para aislamiento de cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ^{(11), (23)}

Procedimiento (Ver Anexo N° 7)

- Pesar asépticamente 25 g de cada una de las muestras de los diferentes quesos directamente en una bolsa de polietileno.
- Añadir a cada muestra 225 mL de solución Agua Peptonada Buferada (APB).
- Agitar en Stomacher por 3 minutos a 260 rpm. (Esta será la dilución 10^{-1}).
- Añadir 10 mL de la dilución 10^{-1} a un frasco que contiene 90 mL de diluyente (esta será la dilución 10^{-2}).
- Añadir 10 mL de la dilución 10^{-2} a un frasco que contiene 90 mL de diluyente (esta será la dilución 10^{-3}).
- Agitar las diluciones durante 30 segundos.

4.4.5 Aislamiento e identificación macroscópica de *Escherichia coli*. Determinación de Coliformes Totales

Procedimiento (Ver Anexo N° 8)

- Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-1} e inocular en una serie de 3 tubos de Caldo LMX, previamente rotulados.
- Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-2} e inocular en una serie de 3 tubos de Caldo LMX, previamente rotulados.
- Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-3} e inocular en una serie de 3 tubos de Caldo LMX, previamente rotulados.
- Incubar los tubos de 24 a 48 horas a 44 °C.
- Observar viraje de color: azul verdoso indica prueba positiva.

4.4.5.1 Identificación de cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos ^{(11), (29)}

Para la identificación de *Escherichia coli* se sembró en agar selectivo Eosina-Azul de Metileno (EMB) para verificar sus características macroscópicas, sin embargo no se obtuvo colonias aisladas por lo que se estirió a partir del agar EMB en agar MacConkey. Además se realizaron seis pruebas bioquímicas comunes en el género Enterobacter, para establecer la presunta identidad de la cepa, las pruebas bioquímicas que se realizaron son: reacción de Indol, Voges Proskauer, Rojo de Metilo, Movilidad, Agar Hierro-Triple Azúcar (TSI) y Citrato. Para la identificación microscópica se realizó la tinción al Gram.

Para la identificación macroscópica de *Staphylococcus aureus* se utilizó el agar selectivo Baird Parker. Posteriormente se enriquecieron las colonias sospechosas en agar BHI y se realizó la prueba coagulasa ya que es una prueba muy sensible y específica para esta bacteria. Para la identificación microscópica se realizó la tinción al Gram.

4.4.5.1.1 Aislamiento macroscópica e identificación de *Escherichia coli* ⁽¹¹⁾

Para la identificación macroscópica de *Escherichia coli* aislada de queso, se utilizó como referencia una cepa de *Escherichia coli* caracterizada por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. (Ver Anexo N° 9)

Procedimiento

- De los tubos con caldo LMX, que den positiva la prueba para coliformes totales, observar la posible presencia de fluorescencia por medio de una lámpara de luz ultravioleta.

- Sembrar en medio selectivo agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) e incubar a 37 °C por 24 horas.
- Agregar dos gotas de reactivo de Kovac a los tubos que presenten fluorescencia, y observar formación de anillo color rojo, el cual confirma la presencia de *E. coli*.
- Sembrar colonias características en agar Mac Conkey e incubar a 37 °C por 24 horas.
- Realizar la verificación de la morfología macroscópica característica en ambos agares.
- Sembrar colonias aisladas en tubos conteniendo agar inclinado TSA.
- Incubar el TSA a 35 °C por 24 horas.
- Retener el cultivo en TSA para pruebas bioquímicas y tinción al Gram.

4.4.5.2 Pruebas bioquímicas para identificación de *Escherichia coli*_{(11), (26)}

4.4.5.2.1 Reacción de Indol (Ver Anexo N° 10)

- Sobre 1 mL de medio de caldo triptófano, inocular con las colonias del microorganismo patógeno de prueba
- Incubar el cultivo anterior, a 37±1°C, durante 24 horas. Luego de la incubación, añadir 5 gotas de reactivo de Erlich por la pared interior del tubo.

4.4.5.2.2 Voges Proskauer (Ver Anexo N° 10)

- Inocular el caldo con las colonias del microorganismo patógeno de prueba.
- Incubar el cultivo anterior a 37±1°C, durante 24 horas.
- Luego de finalizado el tiempo de incubación, adicionar al tubo de ensayo 3 gotas de Alfa-naftol + 2 gotas de hidróxido de potasio.
- Agitar cuidadosamente el tubo.

- Dejar reposar el tubo durante 10 a 15 minutos. El desarrollo de un color rojo luego de 15 minutos indica la presencia de diacetilo y la prueba es positiva.

4.4.5.2.3 Rojo de metilo (Ver Anexo N° 10)

- Inocular el caldo rojo de metilo con las colonias del microorganismo patógeno.
- Incubar el cultivo anterior a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Agregar 2 gotas del reactivo rojo de metilo.
- La prueba es positiva si se desarrolla un color rojo en el tubo. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir un viraje del indicador debido a que el microorganismo fermento la glucosa.

4.4.5.2.4 Prueba de movilidad (Ver Anexo N° 10)

- Inocular la colonia del microorganismo patógeno de prueba por punzada por el agar MIO (Movilidad-Indol-Ornitina).
- Incubar el cultivo anterior a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Luego de la incubación observar la movilidad de la bacteria en el medio de cultivo inclusive más allá de la punzada de siembra.

4.4.5.2.5 Prueba en agar Triple Sugar Iron (TSI) (Ver Anexo N° 10)

- Inocular los tubos de TSI con asa de punta, introduciendo la punta entre 3 y 5 mm del fondo del tubo, luego de retirar el alambre del fondo, estriar sobre la superficie.
- Incubar el cultivo anterior a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas
- Observar el crecimiento en el medio de cultivo y la coloración, además, si hay formación de gas SH_2 .

4.4.5.2.6 Prueba en agar citrato (Ver anexo N° 10)

- Inocular por estría el microorganismo patógeno de prueba sobre el agar inclinado de citrato.
- Incubar el cultivo anterior a 37 ± 1 °C durante 24 a 48 horas.
- La prueba es positiva cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría acompañado o no, de un viraje del indicador color azul.

4.4.5.3 Aislamiento macroscópica e identificación de *Staphylococcus aureus*

(24), (11)

Para la identificación macroscópica se utilizó el medio selectivo Baird Parker y se llevó una cepa de *Staphylococcus aureus* caracterizada por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de El Salvador como referencia.

Procedimiento (Ver Anexo N° 11)

- Pipetear 0.3 mL, 0.3 mL, y 0.4 mL de la primera dilución de la muestra (10^{-1}) y colocarlas en 3 placas conteniendo agar Baird Parker (esparciendo con rastrillo).
- Incubar las placas a 35-37°C de 24 a 48 horas.
- Realizar la verificación de la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, observar el desarrollo de colonias sospechosas de aspecto negro, brillante, o gris oscuro, con formación de halo alrededor de la colonia.

4.4.5.3.1 Prueba Coagulasa (11), (15)

Para la identificación macroscópica se utilizó el medio selectivo Baird Parker y se llevó la cepa *Staphylococcus aureus*, caracterizada por el Laboratorio de

Microbiología, de la Facultad de Química y farmacia, de la Universidad de El Salvador como referencia. (Ver Anexo N° 12)

- Tomar de 5 a 10 colonias sospechosas en agar Baird Parker y transferirlas a un tubo conteniendo 0.2 a 0.3 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y agitar.
- De esta suspensión, inocular un tubo conteniendo agar inclinado TSA con bisel.
- Incubar el TSA y el BHI a 35 °C por 24 horas
- Retener el cultivo en TSA para pruebas adicionales o por si fuera necesario repetir la prueba de coagulasa.
- Añadir 0.5 mL de plasma de conejo al cultivo de BHI y mezclar.
- Incubar a 35 °C y examinar cada 6 horas para observar la formación de coagulo.
- Solo si se observa un coagulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo es inclinado o invertido, se considera positiva la prueba para *Staphylococcus aureus*.

4.4.5.4 Identificación microscópica de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ⁽²⁴⁾

4.4.5.5 Tinción Gram (Ver Anexo N° 13)

Procedimiento

- Colocar una pequeña gota de solución salina en el centro de un portaobjetos limpio.
- Flamear el asa de siembra y dejar enfriar. Tomar en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferir a la gota de solución salina. Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.

- Teñir con cristal violeta agregando suficiente colorante y dejar que actúe durante 1 minuto. Lavar suavemente con agua.
- Aplicar el mordiente, yodo de Gram, y dejar actuar durante 1 minuto. Lavar suavemente con agua.
- Decolorar aplicando alcohol etílico al 95%. Lavar suavemente con agua.
- Aplicar safranina para la tinción de contraste, dejando actuar por 1 minuto. Lavar suavemente con agua.
- Dejar secar la preparación y examinar en el microscopio.
- Este procedimiento se realizó para ambas bacterias. Observar colonias rosadas en forma de bacilos cortos para *Escherichia coli* y colonias moradas en forma de racimos para *Staphylococcus aureus*.

4.4.6 Preparación de la suspensión estandarizada de las cepas salvajes ⁽²⁵⁾

Procedimiento (Ver Anexo N° 14)

- Preparar el estándar Mc Farland de 0.5%, midiendo 0.05 ml de una solución de BaCl₂ al 1% + 9.95 mL de una solución de H₂SO₄ al 1%. Este estándar tiene una densidad celular aproximada de 1.5x10⁸ Unidades Formadoras de Colonias por cada mililitro (UFC/mL).
- Agitar vigorosamente con un vórtex.
- Comprobar la densidad del estándar Mc Farland 0.5%, mediante lecturas de absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV. La absorbancia del estándar a una longitud de onda de 625 nm debe estar entre 0.08 y 0.10.
- Preparar tubos conteniendo 10 mL de solución salina estéril.
- Del cultivo de *Escherichia coli* mantenido en la placa de agar TSA transferir cierto número de colonias a un tubo de ensayo utilizando un asa bacteriológica.
- Repetir el procedimiento anterior hasta obtener lecturas de absorbancia entre 0.08 y 0.10 a una longitud de onda de 625 nm equivalente al estándar de Mc Farland 0.5%.

- Realizar diluciones seriadas
- Verificar la densidad celular real contenida en cada dilución mediante el método de vertido en placa utilizando agar TSA.

Este procedimiento se aplicó para la estandarización de ambas cepas.

4.4.7 Preparación del antibiótico de referencia ^{(10), (30)}

Se prepararon soluciones de Penicilina a 2 U, 1 U y 0.5 U.

Procedimiento (Ver Anexo N° 15)

- Disolver con 5mL de agua estéril el polvo de Benzatina Bencilpenicilina que equivale a 1'200,000 U de Penicilina.
- Transferir con un micropipeteador 50 µL de esta solución a un balón volumétrico de 25.0mL y llevar a volumen con Buffer Fosfato 1 (B1), obteniendo una concentración de 480 U/mL.
- Homogenizar la solución agitando por 1 min.
- Transferir con un micropipeteador 500 µL de esta solución a un balón volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con B1, obteniendo una concentración de 24 U/mL.
- Homogenizar la solución agitando por 1 min.
- Transferir con un micropipeteador 840 µL de esta solución a un balón volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con B1, obteniendo una concentración de 2.016 U/mL.
- Homogenizar la solución agitando por 1 min.
- Transferir con un pipeteador 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con B1, obteniendo una concentración de 1.008 U/mL.
- Homogenizar la solución agitando por 1 min.

- Transferir con un pipeteador 5 mL de esta solución a un balón volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con B1, obteniendo una concentración de 0.504 U/mL.

4.4.8 Determinación de la actividad antimicrobiana ^{(21), (25)}

Se utilizó el método de Kirby Bauer Modificado, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton, sobre el cual se colocan cilindros en forma vertical llenos de la sustancia en estudio de concentración conocida. Las placas se incuban por 16 - 18 horas a 35 – 37 °C. Durante la incubación, la sustancia en estudio se difunde radialmente desde el cilindro a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del cilindro. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos.

4.4.8.1 Preparación de las concentraciones de extractos. ⁽²²⁾

Se pesó en una balanza analítica 0.25 g de extracto seco de *Ocimum campechianum* y 0.50 g de extracto seco de *Fernaldia pandurata*, se preparó una solución madre de 10 mg/mL de concentración para cada extracto, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener las siguientes concentraciones: 6.4 mg/mL, 3.2 mg/mL, 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL y 0.1 mg/mL.

Se describe la cascada de dilución a seguir, utilizando agua destilada estéril como solvente.

Procedimiento (Ver Anexo N° 16)

- Pesar por separado 0.25 g de extracto de *Ocimum campechianum* y 0.50 g de extracto de *Fernaldia pandurata* en vasos de precipitados de 25 mL.
- Disolver los extractos vegetales con aproximadamente 15.0 mL de agua destilada estéril.
- Filtrar las soluciones utilizando gasa estéril.
- Recibir los filtrados en vasos de precipitados limpios y secos.
- Transferir la solución de Albahaca resultante a un balón volumétrico de 25.0 mL, la solución resultante de Loroco a un balón volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen, obteniendo una concentración de 10 mg/mL.
- Homogenizar las soluciones agitando por 2 min.
- Tomar 6.4 mL de la solución anterior utilizando una pipeta volumétrica estéril y trasladar a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 6.4 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 3.2 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 1.6 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 0.8 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen y homogenizar; obteniendo una concentración de 0.4 mg/mL.
- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen homogenizar; obteniendo una concentración de 0.2 mg/mL.

- De la dilución anterior, tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 mL y transferir a un balón volumétrico de 10.0 mL. Llevar a volumen homogenizar; obteniendo una concentración de 0.1 mg/mL.

4.4.8.2 Método de Kirby Bauer Modificado ⁽²¹⁾

Se prepararon placas con agar Müller-Hinton y se inocularon con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en forma separada:

- Por el método de extendido, se utilizaron hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL, inocular uniformemente sobre la superficie del medio Agar Müller-Hinton.
- Dejar secar el medio con la suspensión de microorganismos durante 10 minutos a temperatura ambiente en condiciones estériles.
- El proceso de inoculación se ejecutó utilizando dos cilindros de acero inoxidable por placa, los cuales se identificaron como “A-1” para aquellos que contenían las diluciones preparadas a partir del extracto de *Ocimum campechianum* y como “L-1” para aquellos que contenían las diluciones preparadas a partir del extracto de *Fernaldia pandurata*; para evaluar la actividad antibacteriana de ambas especies vegetales.

Procedimiento (Ver Anexo N° 17)

- Colocar sobre la superficie del medio inoculado con *Escherichia coli* dos cilindros de acero inoxidable. Identificar la placa como “A-1”.
- Colocar 200 μ L de extracto con una micropipeta en el cilindro de acero inoxidable con la dilución cuya concentración corresponde a 6.4 mg/mL de *Ocimum campechianum*. Nota: repetir el proceso anterior para cada una de las concentraciones preparadas.
- Dejar reposar por una hora.
- Incubar a 37 °C por 24 horas.

- Medir los diámetros de inhibición con un pie de rey.

Se realizó el mismo procedimiento utilizando el medio inoculado con la suspensión de *Staphylococcus aureus*. Además, se repitió todo el proceso con las concentraciones de *Fernaldia pandurata* preparadas. Se prepararon cuatro placas más, una como blanco: conteniendo en los cilindros únicamente agua destilada estéril y tres como control positivo conteniendo soluciones de Penicilina a concentraciones de 2, 1, 0.5 U, todas en presencia del microorganismo inoculado.

4.4.9 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ⁽²¹⁾

Para esta prueba se parte de la concentración obtenida del ensayo de Kirby Bauer en donde los extractos de *Ocimum campechianum* y *Fernaldia pandurata*, presenten mayor inhibición bacteriana, por lo que este procedimiento no fue realizado debido a que los extractos evaluados no presentaron actividad antibacteriana. ⁽²⁵⁾

4.4.9.1 Método de Macrodilución en caldo Müller-Hinton ⁽²¹⁾

El método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima, por lo que se prepara un juego de tubos con 1 mL de caldo Müller-Hinton. (Ver Anexo N° 18)

Para efectuar las pruebas se preparan diluciones por duplicado directamente en los tubos:

- Colocar 2.0 ml del extracto vegetal cuya concentración resulta con más carácter antimicrobiano determinado en el ensayo de Kirby Bauer, en el primer tubo de la serie de diluciones. Identificar como “tubo 1”.
- En cada uno de los tubos restantes añadir 1 ml de caldo Müller-Hinton.
- Con una pipeta estéril, transferir 1.0 ml del “tubo 1” al segundo e identificar como “tubo 2”.
- Después de mezclar el contenido del “tubo 2”, transferir 1.0 ml con una pipeta estéril diferente (utilizar una pipeta diferente en todas las transferencias sucesivas) al tercer tubo. Continuar el proceso hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1.0 ml que se descarta. En total se evalúan 10 diluciones sin incluir tubo control.
- El último tubo no contiene solución de extracto, solo caldo Müller-Hinton y sirve como control de crecimiento. Identificar como tubo “C”.
- Las concentraciones finales del extracto vegetal en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en el caldo.

Este proceso de inoculación se desarrolla para ambos microorganismos por separado y de manera individual para cada concentración de extracto. La CIM corresponde a la mínima concentración de extracto en donde no se observa desarrollo de crecimiento (turbidez) y se expresa en mg/mL.

La CIM no fue determinada debido a que los extractos de *Ocimum campechianum* y *Fernaldia pandurata*, no presentaron la mínima actividad antibacteriana requerida para la ejecución del método, ya que no se observaron halos de inhibición en el ensayo de Kirby Bauer.

4.4.10 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) ⁽²¹⁾

La determinación se desarrolla de la siguiente manera: (Ver Anexo N° 19)

- Partiendo del tubo que presente la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), resembrar utilizando el método de vertido en placa, añadiendo 0.1 mL del tubo inoculado y vertiendo 20.0 mL de agar Müeller-Hinton a 40°C.
- Realizar este proceso por duplicado.
- Repetir el paso anterior con todos aquellos tubos en donde la concentración de extracto es mayor que la CIM determinada.
- Incubar las placas durante 20 horas a 37 °C.
- Realizar las lecturas y reportar la concentración en la cual hubo una reducción del 99.9% del inculo.

Ya que no se logró establecer la Concentración Inhibitoria Mínima, la Concentración Bactericida Mínima (CBM) no fue determinada, debido a que ninguno de los extractos, ni *Ocimum campechianum*, ni *Fernaldia pandurata* mostró actividad antibacteriana significativa.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Porcentaje de humedad del material vegetal ⁽⁹⁾

La determinación del porcentaje de humedad del material vegetal se realizó mediante método AOAC 934.91 (Association of Official Analytical Chemists). Este método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta masa constante en estufa. (Ver anexo N° 4)

Porcentaje de humedad de Albahaca.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Donde:

m1: masa de la cápsula vacía (g)

m2: masa de la cápsula con la muestra antes del secado (g)

m3: masa de la cápsula más la muestra desecada (g)

$$\text{Porcentaje de humedad Albahaca} = \frac{25.8438 - 25.3778}{25.8438 - 20.9138} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de humedad Albahaca} = \frac{0.466}{4.93} \times 100 = \mathbf{9.45}$$

Porcentaje de humedad de Loroco.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Donde:

m1: masa de la cápsula vacía (g)

m2: masa de la cápsula con la muestra antes del secado (g)

m3: masa de la cápsula más la muestra desecada (g)

$$\text{Porcentaje de humedad Loroco} = \frac{26.6004 - 25.9204}{26.6004 - 21.5379} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de humedad Loroco} = \frac{0.68}{5.0625} \times 100 = \mathbf{13.43}$$

El porcentaje de humedad deseado para la preparación de extractos con material vegetal seco debe ser inferior al 10%, este porcentaje representa la cantidad de agua libre que permite una buena conservación del material vegetal para evitar procesos enzimáticos y así permitir la expresión de los metabolitos. *Ocimum campechianum* (Albahaca) presentó un porcentaje de humedad óptimo de 9.45. Debido a las condiciones climáticas y a que las flores de *Fernaldia pandurata* (Loroco) poseen mayor cantidad de agua, se obtuvo un porcentaje de humedad de 13.43 para esta especie. Sin embargo, se considera que los porcentajes de humedad obtenidos fueron satisfactorios para la preparación de los extractos.

5.2 Rendimiento obtenido de la preparación de extractos

Se obtuvo el porcentaje de rendimiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto seco en gramos}}{\text{Peso material vegetal fresco en gramos}} \times 100$$

El proceso de evaporación del etanol fue lento, debido a que no se utilizó calor, para no exponer a alguna alteración los extractos; y así asegurar que los metabolitos no se degradaran. El extracto de Albahaca presentó apariencia y consistencia resinosa, en cambio el extracto de Loroco presentó consistencia más líquida, debido, posiblemente a la interacción del solvente de extracción (etanol) y del contenido (en apariencia aceite) de la materia vegetal. El porcentaje

de rendimiento de cada extracto se refleja en la tabla N° 1.

Tabla N°1 Porcentaje de rendimiento de los extractos de *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco).

Tipo de extracto	Especie vegetal	Parte utilizada de la planta	Peso de material vegetal fresco (g)	Volumen de solvente utilizado (mL)	Peso del extracto seco (g)	Rendimiento (%)
Etanólico seco	<i>Ocimum campechianum</i>	Hoja	47.7	1000	5.783	12.12
	<i>Fernaldia pandurata</i>	Flor	10.0	10	0.25	2.5

La tabla N°1 refleja que el porcentaje de rendimiento obtenido de las hojas de *Ocimum campechianum* y flores de *Fernaldia pandurata*, es distinto, esto puede ser debido a que se utilizaron diferentes partes de cada planta, y, a que el contenido y naturaleza de metabolitos en cada especie vegetal es diferente.

5.3 Cepas de referencia

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* caracterizadas y donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

5.4 Aislamiento e identificación macroscópica de *Escherichia coli* a partir de diferentes muestras de quesos

5.4.1 Determinación de coliformes totales

Se preparó una serie de 9 tubos de caldo LMX a 3 diluciones para queso fresco,

queso duro y quesillo, se verificó fluorescencia en lámpara UV a las 24 horas de incubación. De la dilución 10^{-3} de queso duro se tomó una asada y se inoculó en agar EMB por duplicado, posteriormente se añadió una gota del reactivo de Kovacs a todos los tubos, se observó formación de un anillo violeta que indica prueba positiva para *Escherichia coli* en todos los tubos. Ver figura N° 3.

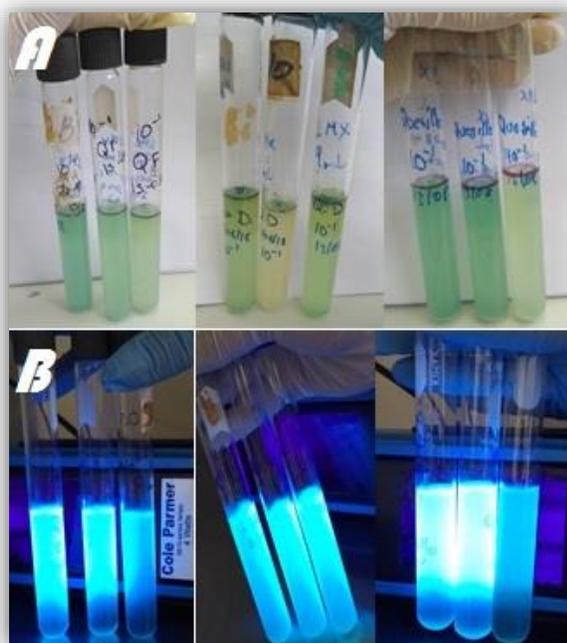


Figura N° 3. A) Tubos con caldo LMX y reactivo de Kovacs con formación deanillo violeta. B) Tubos bajo luz UV, fluorescencia.

5.4.2 Determinación e identificación macroscópica de *Escherichia coli*

Se verificó la morfología macroscópica de las colonias obtenidas en agar EMB de las muestras de queso comparándolas con la cepa de *Escherichia coli* de referencia. Debido a que se obtuvo colonias mixtas a partir de las muestras de queso, se estrió nuevamente una asada de la dilución 10^{-3} en agar Mac Conkey lo que permitió obtener colonias aisladas, de color rosa, medianas, circulares, convexas, bordes redondeados, lactosa positiva. Ver figura N° 4.

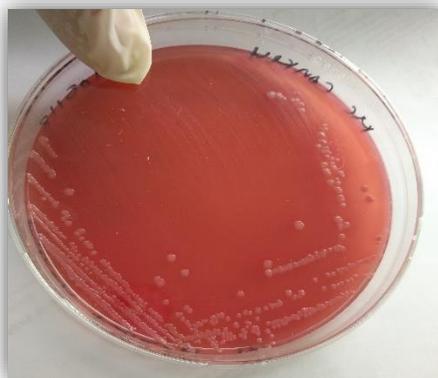


Figura N° 4. Morfología características en agar Mac Conkey de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestra de queso.

5.4.3 Resultados de pruebas bioquímicas

Los resultados obtenidos para *Escherichia coli* de referencia y *Escherichia coli* salvaje aislada a partir de las muestras de diferentes tipos de quesos se muestran en la tabla N° 2.

Tabla N° 2 Resultados de pruebas bioquímicas.

Prueba bioquímica	<i>Escherichia coli</i> salvaje.		<i>Escherichia coli</i> referencia.	
	Resultado esperado	Resultado obtenido	Resultado esperado	Resultado obtenido
Reacción de Indol	(+)	(+)	(+)	(+)
Rojo de Metilo	(+)	(+)	(+)	(+)
Voges-Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)
Agar Citrato	(-)	(-)	(-)	(-)
Movilidad	(+)	(+)	(+)	(+)
TSI	A/A con presencia de gas	A/A con presencia de gas	A/A con presencia de gas	A/A con presencia de gas

(+): resultado positivo; (-): resultado negativo; (A/A): reacción ácido sobre ácido o fermentador de lactosa. (Ver anexo N° 10).

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para la cepa de referencia y la cepa salvaje, se concluye que ambas cepas coinciden con las especificaciones para la bacteria *Escherichia coli*.

5.4.4 Identificación microscópica de *Escherichia coli*

Al realizar la tinción Gram, se observaron colonias rosadas en forma de bacilos cortos. Ver figura N° 5.

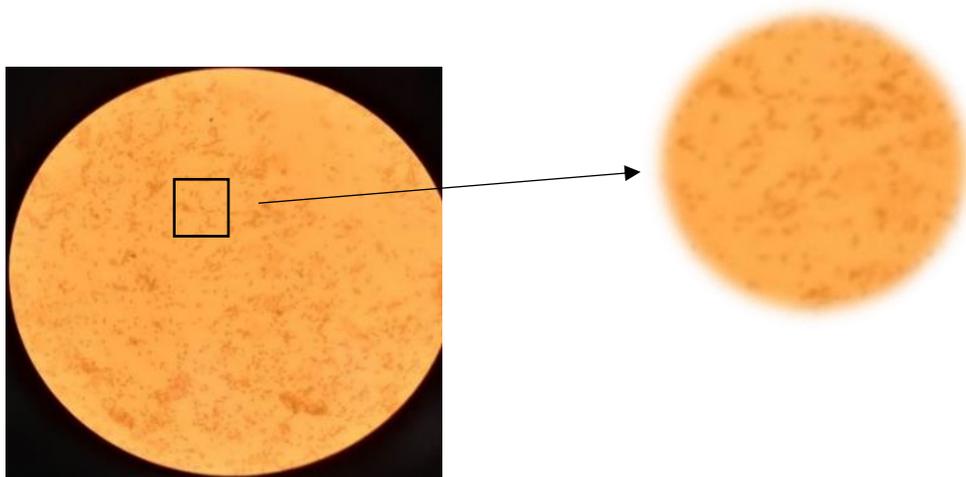


Figura N° 5 Tinción Gram de *Escherichia coli*.

Con base en los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se verificó que la bacteria aislada a partir de las muestras de quesos corresponde a *Escherichia coli* lo cual es un indicador de que las muestras no han sido manipuladas apropiadamente ya que se encuentran contaminadas con el indicador de materia fecal.

5.5 Aislamiento e identificación macroscópica de *Staphylococcus aureus*

Se utilizó el medio selectivo Baird Parker del cual se obtuvo colonias de color negro con formación de halo. Ver figura N° 6.



Figura N° 6 Morfología característica de cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de queso.

5.5.1 Prueba Coagulasa

Se observó un coágulo firme y completo, lo cual confirma prueba positiva para *Staphylococcus aureus*. Ver figura N° 7.



Figura N° 7. Prueba coagulasa

5.5.2 Identificación microscópica de *Staphylococcus aureus*

Se realizó tinción Gram, se observaron colonias moradas en forma de racimos características de la bacteria. Ver figura N° 8.

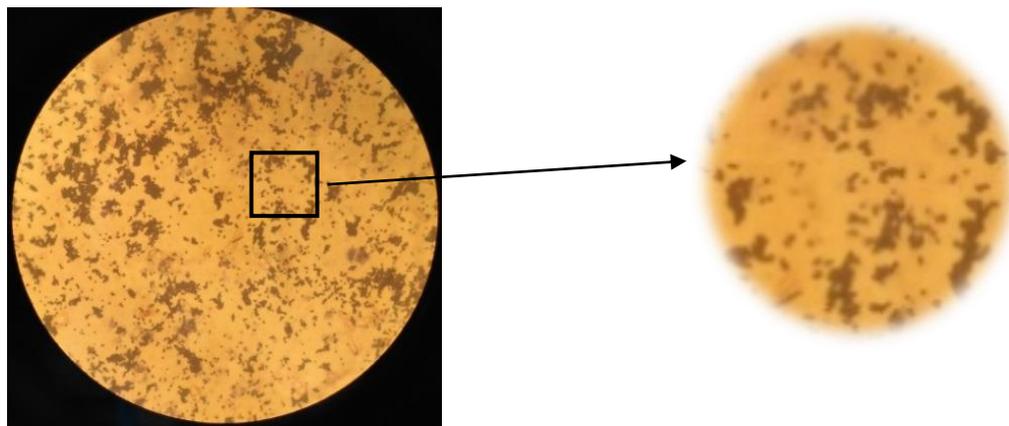


Figura N° 8 Tinción Gram de *Staphylococcus aureus*.

Con base en los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se verificó que la cepa aislada a partir de las muestras de quesos corresponde a *Staphylococcus aureus* lo cual indica que no se han seguido Buenas Prácticas de Manipulación de Alimentos lo cual significa un riesgo sanitario para las personas que los ingieren ya que estas pueden causar diferentes malestares como diarrea, náuseas, vómitos severos fiebre y dolor abdominal.

Debido a que todas las muestras de los diferentes tipos de queso presentaron abundante crecimiento microbiano, del cual se aislaron dos microorganismos patógenos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, cuya ausencia es exigida por el RTCA 67.04.50:17, para garantizar la inocuidad de los alimentos, se concluye que los quesos no son apropiados para el consumo, porque representan un riesgo para la salud humana.

5.6 Verificación del método de estandarización de cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ⁽²²⁾

Para realizar el antibiograma se estandarizaron las cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la metodología siguiente: se tomó

como referencia el estándar de Mc Farland 0.5%. Se realizaron diluciones seriadas a las cepas salvajes en solución salina estéril.

Las absorbancia obtenida a 625 nm de *Escherichia coli* fue 0.092 y 0.084 para *Staphylococcus aureus*. Posteriormente se realizó el conteo mediante vertido en placa en agar TSA, obteniendo 3.1×10^8 UFC/mL y 7.2×10^8 UFC/mL de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

Los resultados de los recuentos se muestran en la tabla N° 3. (Ver anexo N° 14)

Tabla N° 3. Verificación del método de estandarización.

Cepa	Medio de dilución	Dilución	Resultados (UFC/mL)		
			Recuento		Promedio
			1	2	
<i>Escherichia coli</i>	Solución salina estéril	10 ⁻²	2.7X10 ¹³	3.2X10 ¹³	3.0X10 ¹³
		10 ⁻⁴	1.9X10 ¹¹	2.8X10 ¹¹	2.4X10 ¹¹
		10 ⁻⁵	5.8X10 ¹⁰	4.6X10 ¹⁰	5.2X10 ¹⁰
		10 ⁻⁶	2.7X10 ⁹	3.9X10 ⁹	3.3X10 ⁹
		10 ⁻⁷	3.6X10 ⁸	2.6X10 ⁸	3.1X10 ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i>	Solución salina estéril	10 ⁻²	3.7X10 ¹¹	2.9X10 ¹¹	3.3X10 ¹¹
		10 ⁻³	4.9X10 ¹⁰	4.6X10 ¹⁰	4.8X10 ¹⁰
		10 ⁻⁴	5.5X10 ⁹	5.1X10 ⁹	5.3X10 ⁹
		10 ⁻⁵	2.1X10 ⁸	1.5X10 ⁸	1.8X10 ⁸
		10 ⁻⁶	7.8X10 ⁸	6.5X10 ⁸	7.2X10 ⁸

5.7 Prueba de Antibiograma por el método de Kirby Bauer Modificado (Ver Anexo N° 17)

Inicialmente se trabajaron los extractos con concentraciones más bajas, debido a que en la investigación de extractos naturales con propiedades antibacterianas, se considera de mayor interés para la comunidad científica a aquellos que presentan actividad antibacteriana a concentraciones inferiores a 100 µg/mL, por

lo que partiendo de allí, se redujeron las concentraciones haciendo 6 diluciones seriadas según el método de Kirby Bauer (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL y 1.562 µg/mL), utilizando Gentamicina como antibiótico de referencia a concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.02 µg/mL.

Sin embargo, a estas concentraciones no se observaron halos de inhibición en el ensayo, lo que indica que a esas concentraciones, los extractos de *Ocimum campechianum* y *Fernaldia pandurata* y la Gentamicina, no presentan actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de los diferentes tipos de quesos.

Para evidenciar mejor el comportamiento de los extractos a distintas concentraciones se realizó un segundo ensayo elevando las concentraciones a 6.4 mg/mL, 3.2 mg/mL, 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL 0.4 mg/mL 0.2 mg/mL y 0.1 mg/mL, y con un antibiótico diferente, Penicilina a concentraciones de 2 U, 1 U y 0.05 U, ya que se observó que ambas bacterias presentan resistencia a la Gentamicina. (Ver Anexo N° 15 y N° 16)

El ensayo realizado se detalla a continuación: se inoculó con hisopo estéril suspensiones estandarizadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 3.1×10^8 UFC/mL y 7.2×10^8 UFC/mL respectivamente, en placas conteniendo agar Müller-Hinton. Posteriormente en cada placa se colocaron dos cilindros de acero inoxidable para cada concentración de extracto, Penicilina y el blanco utilizado (agua estéril), a los cuales se les añadió 200 µL de cada una de estas soluciones.

Los criterios para la interpretación del antibiograma se muestran en la tabla N° 4. (Ver Anexo N° 17)

Tabla N° 4. Criterios para interpretación del antibiograma. (22)

Criterio	Dictamen
Halos de inhibición mayores a 20 mm	Sensible
Halos de inhibición entre 12 y 20 mm	Intermedio
Halos de inhibición menores a 12 mm	Resistente

Como control negativo y positivo del ensayo se utilizaron cilindros que contenían agua estéril y Penicilina respectivamente.

Tabla N° 5. Halos de inhibición de control negativo: agua estéril y positivo: Bencilpenicilina.

Sustancia	Halo de inhibición promedio (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Agua estéril	Sin halo	Sin halo
Penicilina 2.0 U	1.20	Sin halo
Penicilina 1.0 U	1.20	Sin halo
Penicilina 0.5 U	0.85	Sin halo

Los datos de la tabla N° 5 indican que el diluyente no afecta a los resultados obtenidos ya que no inhibe el crecimiento de las bacterias, también muestra que ambas bacterias presentan resistencia al agente antibacteriano de referencia, esto evidencia el grave problema que supone la resistencia bacteriana y el creciente interés de la comunidad científica en el estudio de nuevos agentes antibacterianos.

A continuación se presentan los resultados del extracto de *Ocimum campechianum* sobre *Escherichia coli*.

Tabla N° 6. Halos de inhibición de *Ocimum campechianum* sobre *Escherichia coli*

Concentración (mg/mL)	Halo (mm)		Promedio	Dictamen
	1	2		
Blanco	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
6.4	1.00	1.20	1.10	Resistente
3.2	0.80	0.80	0.80	Resistente
1.6	1.00	0.90	0.95	Resistente
0.8	1.10	1.20	1.15	Resistente
0.4	1.10	1.10	1.10	Resistente
0.2	1.20	1.20	1.20	Resistente
0.1	1.00	1.10	1.05	Resistente

Los datos de la tabla N° 6 muestran que *Escherichia coli* presenta resistencia ante *Ocimum campechianum* a concentraciones iguales o inferiores a 6.4 mg/mL ya que se observaron halos de inhibición inferiores a 12 mm, esto indica que el extracto estudiado no es capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* a la mayor concentración evaluada.

Tabla N° 7. Halos de inhibición de *Ocimum campechianum* sobre *Staphylococcus aureus*

Concentración (mg/mL)	Halo (mm)		Promedio	Dictamen
	1	2		
Blanco	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
6.4	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
3.2	1.1	1.2	1.15	Resistente
1.6	1.1	1.1	1.10	Resistente
0.8	1.0	1.0	1.0	Resistente
0.4	1.2	1.1	1.15	Resistente
0.2	1.1	1.1	1.10	Resistente
0.1	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente

Los datos de la tabla N° 7 muestran que *Staphylococcus aureus* presenta resistencia ante *Ocimum campechianum* a concentraciones iguales o inferiores

a 6.4 mg/mL ya que se observaron halos de inhibición inferiores a 12 mm, esto indica que dicha planta no es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria a la concentración más alta ensayada.

Los resultados de inhibición del extracto de *Ocimum campechianum* sobre ambas bacterias, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, aisladas de los diferentes tipos de queso, indican que incluso a concentraciones superiores a 0.1 mg/mL, que es la concentración deseada para la evaluación de actividad antibacteriana en extractos vegetales, éste no posee una actividad antibacteriana significativa contra las especies Gram negativa y positiva estudiadas, por lo que no puede ser utilizada como una alternativa para disminuir la carga microbiana de los alimentos.

Tabla N° 8. Halos de inhibición de *Fernaldia pandurata* sobre *Escherichia coli*.

Concentración (mg/mL)	Halo (mm)		Promedio	Dictamen
	1	2		
Blanco	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
6.4	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
3.2	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
1.6	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
0.8	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
0.4	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
0.2	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
0.1	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente

Los datos de la tabla N° 8 muestran que *Escherichia coli* presenta resistencia ante *Fernaldia pandurata* a concentraciones iguales o inferiores a 6.4 mg/mL ya que se observaron halos de inhibición inferiores a 12 mm, esto indica que el extracto de la planta en estudio no es eficaz para la inhibición de la bacteria Gram negativa ensayada.

Tabla N° 9. Halos de inhibición de *Fernaldia pandurata* sobre *Staphylococcus aureus*.

Concentración (mg/mL)	Halo (mm)		Promedio	Dictamen
	R1	R2		
Blanco	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
6.4	1.0	0.9	0.95	Resistente
3.2	1.1	1.0	1.05	Resistente
1.6	1.2	1.2	1.20	Resistente
0.8	1.0	1.1	1.05	Resistente
0.4	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
0.2	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente
0.1	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Resistente

Los datos de la tabla N° 9 muestran que *Staphylococcus aureus* presenta resistencia ante *Fernaldia pandurata* a concentraciones iguales o inferiores a 6.4 mg/mL ya que se observaron halos de inhibición inferiores a 12 mm.

Los resultados de inhibición del extracto de *Fernaldia pandurata* sobre ambas bacterias, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, aisladas de los diferentes tipos de queso, indican que incluso a concentraciones superiores a 0.1 mg/mL, que es la concentración deseada para la evaluación de actividad antibacteriana en extractos vegetales, éste no posee una actividad antibacteriana significativa contra las especies Gram negativa y positiva estudiadas, por lo que no puede ser utilizada como una alternativa para disminuir la carga microbiana de los alimentos.

5.8 Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Método de Macrodilución en Caldo Müller-Hinton

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de Kirby Bauer Modificado, no fue posible determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), debido a que los extractos de *Ocimum campechianum* y *Fernaldia pandurata* no

presentaron actividad antibacteriana significativa, ya que en todas las concentraciones ensayadas, 6.4 mg/mL, 3.2 mg/mL, 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL 0.4 mg/mL 0.2 mg/mL y 0.1 mg/mL para ambos extractos no se observó formación de halo superior a 12 mm sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de los diferentes tipos de queso.

5.9 Determinación de Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Debido a que la Concentración Inhibitoria Mínima, es el punto de partida para establecer la Concentración Bactericida Mínima, esta última no pudo ser determinada.

Por lo tanto, al no obtener datos cuantitativos, de CIM y CBM no se pudo hacer el análisis de varianza multifactorial, ejecutando el software Statgraphics Centurion.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Se prepararon extractos etanólicos por maceración ultrasónica, debido que este método de extracción es utilizado internacionalmente para la elaboración de extractos de especies vegetales, y así obtener los metabolitos de forma más rápida y eficiente.
2. De todas las muestras de los diferentes tipos de queso se aislaron dos microorganismos cuya ausencia es exigida por el RTCA 67.04.50:17, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se concluye que los quesos están contaminados con dichas bacterias.
3. Se verificó que las cepas de referencia y las cepas aisladas de los diferentes tipos de queso, correspondían a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante su morfología macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas.
4. Los resultados obtenidos del ensayo inicial del método de Kirby Bauer Modificado muestran que el extracto de *Ocimum campechianum* (Albahaca), no posee actividad antibacteriana, sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas, ya que se observaron halos de inhibición menores a 12 mm, a las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.562 µg/mL, se obtuvieron resultados similares con Gentamicina, se concluye que las bacterias son resistentes al extracto y al antibiótico de referencia seleccionado.
5. Los resultados obtenidos del ensayo inicial del método de Kirby Bauer Modificado muestran que el extracto de *Fernaldia pandurata* (Loroco), no posee actividad antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas, ya que se observaron halos de inhibición menores a 12 mm, a las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.562 µg/mL, se obtuvieron resultados similares con Gentamicina, se concluye

que las bacterias son resistentes al extracto y al antibiótico de referencia seleccionado.

6. Los resultados obtenidos del segundo ensayo del método Kirby Bauer Modificado realizado muestran, que el extracto de *Ocimum campechianum* (Albahaca), a las concentraciones de 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/mL y el antibiótico de referencia, Penicilina, no poseen actividad antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, debido a que se obtuvieron halos de inhibición menores a 12 mm, lo que indica resistencia de las bacterias en todas las concentraciones.
7. De acuerdo a los resultados del segundo ensayo realizado se observó que el extracto de *Fernaldia pandurata* (Loroco), a las concentraciones de 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/mL y el antibiótico de referencia, Penicilina, no poseen actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* debido a que se obtuvieron halos de inhibición menores a 12 mm, lo que indica resistencia de las bacterias en todas las concentraciones.
8. Basados en los resultados obtenidos en el método de Kirby Bauer Modificado, no se pudo establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ni Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos, *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco), sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de los diferentes tipos de quesos, debido a que los extractos estudiados no presentaron actividad antibacteriana.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Caracterizar la composición química de los extractos de las especies vegetales *Ocimum campechianum* (Albahaca) y *Fernaldia pandurata* (Loroco) para su estudio en investigaciones posteriores, ya que estas son especies vegetales nativas que han sido poco estudiadas a la fecha.
2. Que se realicen estudios de sensibilidad utilizando el método de Kirby Bauer a otras especies vegetales nativas y comestibles del país para verificar si poseen actividad antibacteriana y pueden ser utilizadas como preservantes alimenticios.
3. Mediante charlas informativas y afiches, dar a conocer a la población que elabora y comercializa productos lácteos sin pasteurizar, las Buenas Prácticas de Manipulación de Alimentos, ya que todas las muestras ensayadas evidenciaron una elevada carga microbiana, y así reducir el riesgo de Enfermedades de Transmisión Alimentarias (ETA's).
4. Que se promueva el uso racional de los antibióticos a través de recursos institucionales digitales y escritos, ya que se observó resistencia bacteriana incluso ante el medicamento de referencia (Penicilina), tanto de la cepa control como de las cepas salvajes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alegría, B. (2014). Perfil Del Cultivo Y Negocios Del Loroco (*Fernaldia pandurata*). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado el 2018, de <http://simag.mag.gob.sv/uploads/pdf/Contribuciones2014626103443.pdf>
2. Alós, J. I., & Rodríguez Baño, J. (2010). ¿Qué antibióticos debemos informar en el antibiograma y cómo? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 737-741.
3. Análisis Químico De Plantas Aromáticas Y Medicinales. (s.f.). Recuperado el 05 de Junio de 2018, de <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
4. Can-Sulu, C. A. (2015). *Ocimum campechianum* (Lamiaceae): su uso en la medicina tradicional. *Herbario CICY*, 31-34.
5. Carovic´-Stanko, K., Orlic´, S., Politeo, O., Strikic´, F., Kolak, I., Milos, M., & Satovic, Z. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry*, 196-201.
6. Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., & Jiménez, S. (2010). Actividad Bactericida Del Extracto Etanólico Y Del Aceite Esencial De Hojas De *Rosmarinus Officinalis* L. Sobre Algunas Bacterias De Interés Alimentario. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 149-154.
7. Cervantes García, E., García González, R., & Salazar Schettino , P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 28-40.

8. Chemists, A. O. (1980). *Official Methods of Analysis* (13th Edition ed.). Washington, D.C. . Recuperado el 2018.
9. Chízmar Fernández, C., Chang Vargas, G., Lobo Cabezas, S., Lara, L. R., Cerén López, J. G., Quesada Hernández, A., . . . Correa Arroyo, M. (2009). *Plantas comestibles de Centroamérica* (1a ed.). Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBio.
10. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América,. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América USP30. Formulario Nacional NF25* (Vol. 1). Washington D.C.
11. Feng, P., Weagant, S., Grant, M., Burkhardt, W., Bennett, R., & Lancette, G. (2001). *Bacteriological Analytical Manual*. Obtenido de https://www.eberbachlabtools.com/Assets/FDA_Bacteriological_Analysis.pdf.
12. Gentamicina. (s.f.). Recuperado el 05 de Junio de 2018, de Gentamicina: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Gentamicina%20iny.htm.
13. Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)*, 1, 8-26.
14. Hurtado, M. P., de la Parte, M. A., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica*. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2).
15. MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3 ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A.
16. Martínez Ortiz, H. A., & Zavaleta Márquez, C. Y. (2004). *Determinación De La Calidad De Leches Crudas Y Quesillos Elaborados Artesanalmente En*

Plantas Productoras De Lácteos. Área Metropolitana De San Salvador. San Salvador, El Salvador. Recuperado el 2018, de <http://ri.ues.edu.sv/5615/1/10128428.pdf>

17. Miller, A. B., Cates, R. G., Lawrence, M., Fuentes Soria, J. A., Espinoza, L. V., Martínez, J. V., & Arbizú, D. A. (21 de Octubre de 2014). The Antibacterial And Antifungal Activity Of Essential Oils Extracted From Guatemalan medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, págs. 548-554.
18. Morton, J., Álvarez, E., & Quiñonez, C. (1990). Loroco, *Fernaldia pandurata* (Apocynaceae): A Popular Edible Flower of Central America. *Economic Botany*, 301-310.
19. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s.f.). Recuperado el 30 de Abril de 2018, de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/tipos-y-caracteristicas/es/>
20. Poncelet. (2004). Recuperado el 05 de mayo de 2018, de Poncelet: <http://www.poncelet.es/enciclopedia-del-queso/elaboracion.html>
21. Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías Para Evaluar In Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal. *Scientia et Technica*, 263-268.
22. Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal Plants And Antimicrobial Activity. *Journal Of Ethnopharmacology*, 80-84.
23. Rivas Saravia, K. B., Roque Arévalo, S. J., & Tovar Martínez, D. V. (Agosto De 2008). Determinación De La Calidad Microbiológica Del Requesón Que Se Comercializa En Los Principales Supermercados De La Zona Metropolitana De San Salvador. Determinación De La Calidad Microbiológica Del Requesón Que Se Comercializa En Los Principales Supermercados De

La Zona Metropolitana De San Salvador. San Salvador, El Salvador.
Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/3104/1/16100329.pdf>

24. Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. d., Fernández Chavarría, F., & García Hidalgo, J. D. (s.f.). Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. Obtenido de https://books.google.com.sv/books?redir_esc=y&hl=es&id=vwB0fgirgN0C&q=tincion+gram#v=snippet&q=tincion%20gram&f=false
25. Rojas, J., García, A., & López, A. (marzo de 2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(2), 28-32.
26. Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., ... Bruni, R. (05 de 05 de 2004). Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils. *Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), págs. 3486-3491.
27. Samol Juárez, V. G., & Santizo Paz, B. C. (Mayo de 2011). Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. *esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra Campylobacter jejuni*. Guatemala.
28. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (R. Pinzón, Ed.) Santafé de Bogotá, Colombia. Obtenido de <https://books.google.com.sv/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA41&lpg=PA41&dq=maceraci%C3%B3n,+percolaci%C3%B3n,+extracci%C3%B3n+con+solvente&source=bl&ots=iUpuDYMzZl&sig=JJO1NuWGwDEriUZ>

le8v1XhMg5VM&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjO2tqagv7aAhVnkuAKHXDa
AVIQ6AEwDHoFCAAQmwE#

29. Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (2005). Microbiología (2 ed.). España: REVERTÉ, S. A.
30. United States Pharmacopeial Convention. (2013). Farmacopea de los Estados Unidos de America: USP 36: Fórmulario Nacional: NF31. Estado Unidos: Rockville.
31. Zweig, G. (Ed.). (1963). Principles, Methods, and General Applications: Analytical Methods for Pesticides, Plants Growth, Regulators, and Food additives. (Vol. 1). New York, United States of America: Academic Press, Inc. Obtenido de <https://books.google.com/sv/books?id=oyPLBAAAQBAJ&pg=PA443&dq=Preparation+of+extracts+from+plants&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjb99GAmb7bAhWR71MKHdBQAg4Q6AEISzAF#v=onepage&q=Preparation%20of%20extracts%20from%20plants&f=false>.

ANEXOS

ANEXO N° 1.



Asociación Jardín Botánico La Laguna

Antiguo Cuscatlán, 6 de junio de 2018

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.
Docente Asesora
Facultad de Química y Farmacia
Universidad de El Salvador

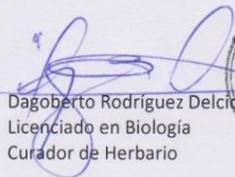
Reciba un afectuoso saludo, esperando muchos éxitos, en las cotidianas actividades personales y de trabajo.

Aprovecho la oportunidad, para hacer de su conocimiento que Luz Adriana Martínez Valencia y Leticia Iveth Orellana Hernández, visitaron las instalaciones del Herbario LAGU, de nuestra Institución, con muestras de loroco y albahaca, solicitando identificación taxonómica, de dichas plantas; respaldándose con una carta, que especifica que dichas especies serán utilizadas en una investigación científica de pregrado, por las estudiantes.

Comentarle que se verificaron las especies nativas y se especifican científicamente en el siguiente cuadro.

#	Nombre común	Nombre científico	Familia
1	loroco	<i>Fernaldia pandurata</i> (A. DC.) Woodson	Apocynaceae
2	albahaca	<i>Ocimum campechianum</i> Mill.	Lamiaceae

Atte.


Dagoberto Rodríguez Delcid
Licenciado en Biología
Curador de Herbario



Urbanización Industrial Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán La Libertad, Tel. (503) 2243 - 7970 / 2243 - 7968
Email: jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv Sitio Web: www.jardinbotanico.org.sv

Figura N° 9. Identificación taxonómica del material vegetal.

ANEXO N° 2.

Tabla N° 10. Material, equipo y reactivos.

Material	Equipo	Reactivos
2- Mortero	Estufa	Plasma de conejo
2- Pistilo	Balanza semianalítica	Agua Peptonada Buferada
2- Capsulas de porcelana	Balanza analítica	Agua destilada estéril
Láminas	Cámara de extracción de gases	Caldo LMX
Laminillas	Rotaevaporador	Caldo Mueller-Hinton
120- Cilindros de acero inoxidable	Desecador	Agar Mueller-Hinton
Placas de Petri	Ultrasonicador	Agar EMB
Asas en punta	Lámpara Ultravioleta	Agar Mac Conkey
Asas redondas	Incubadora	Agar TSA
	Espectrofotómetro UV	Caldo Triptófano
	Baño de María	Caldo Rojo de Metilo Voges
	Cabina de Flujo Laminar	Proskauer
	Refrigeradora	Alfa Naftol
	Hot Plate	Rojo de Metilo
	Vortex	Hidróxido de Potasio
	Stomacher	Reactivo de Erlich
	Autoclave	Agar MIO
		Agar TSI
		Agar Citrato
		Agar Baird Parker
		Caldo BHI
		Cristal Violeta
		Lugol
		Alcohol 95%
		Safranina
		Solución de BaCl ₂ al 1%
		Solución de H ₂ SO ₄ al 1%
		Hidróxido de Sodio
		Fosfato Monobásico de Potasio

ANEXO N° 3.

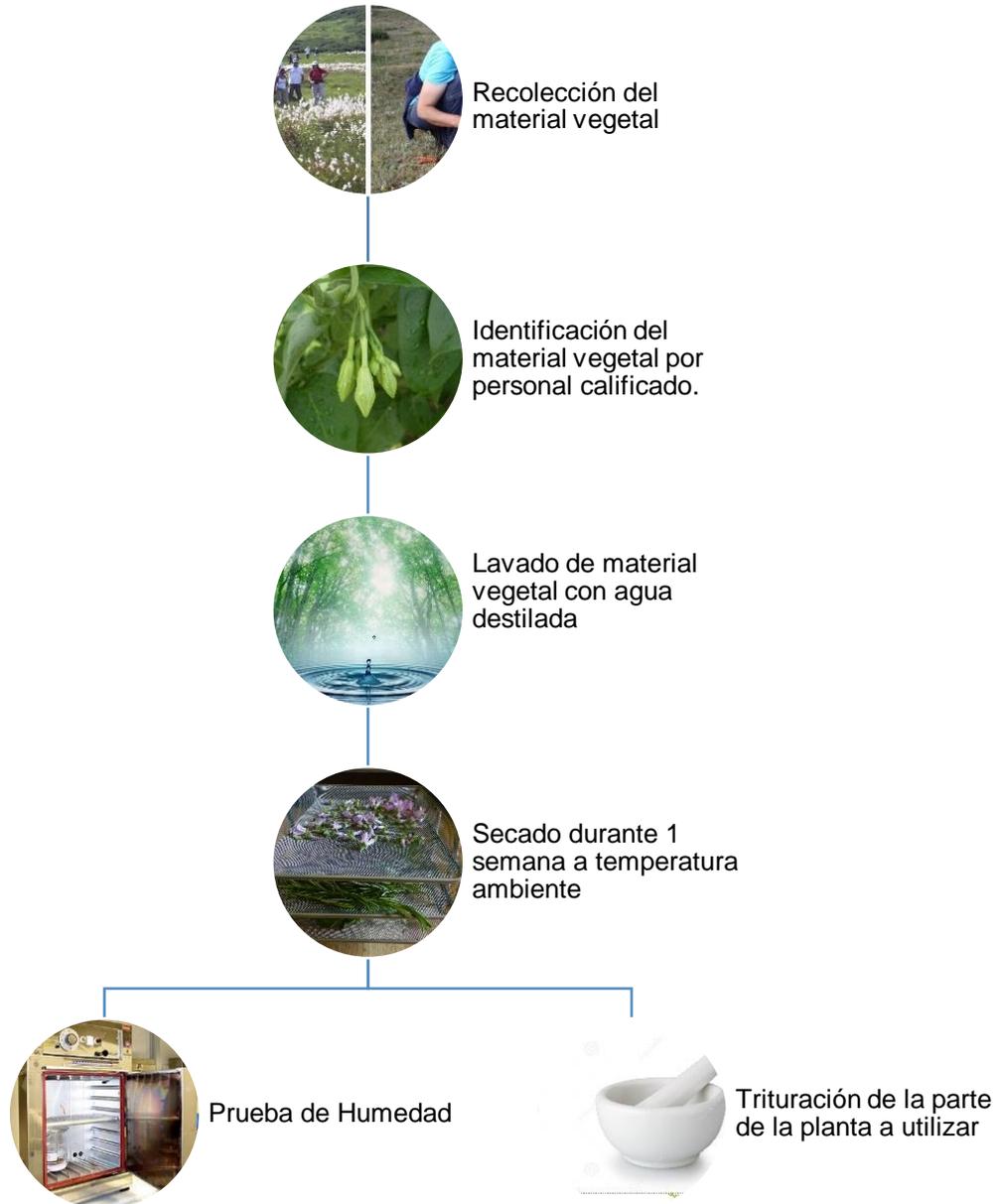


Figura N° 10. Esquema de procesamiento de material vegetal. (8)

ANEXO N° 4.



Figura N° 11. Procedimiento para determinar el porcentaje de humedad del material vegetal. (8)

ANEXO N° 5.

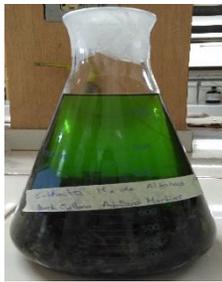
Esquema de preparación de extractos etanólicos.



50 g hojas de Albahaca



50 g flores de Loroco



Añadir 600mL de alcohol 95% v/v
y cubrir con papel parafilm



Ultrasonicar durante 60 minutos
a 30°C. Reposar a temperatura
ambiente durante una semana.



Filtrar por gravedad con gasa estéril.



Figura N° 12. Esquema de preparación de extractos etanólicos. 6), (31)

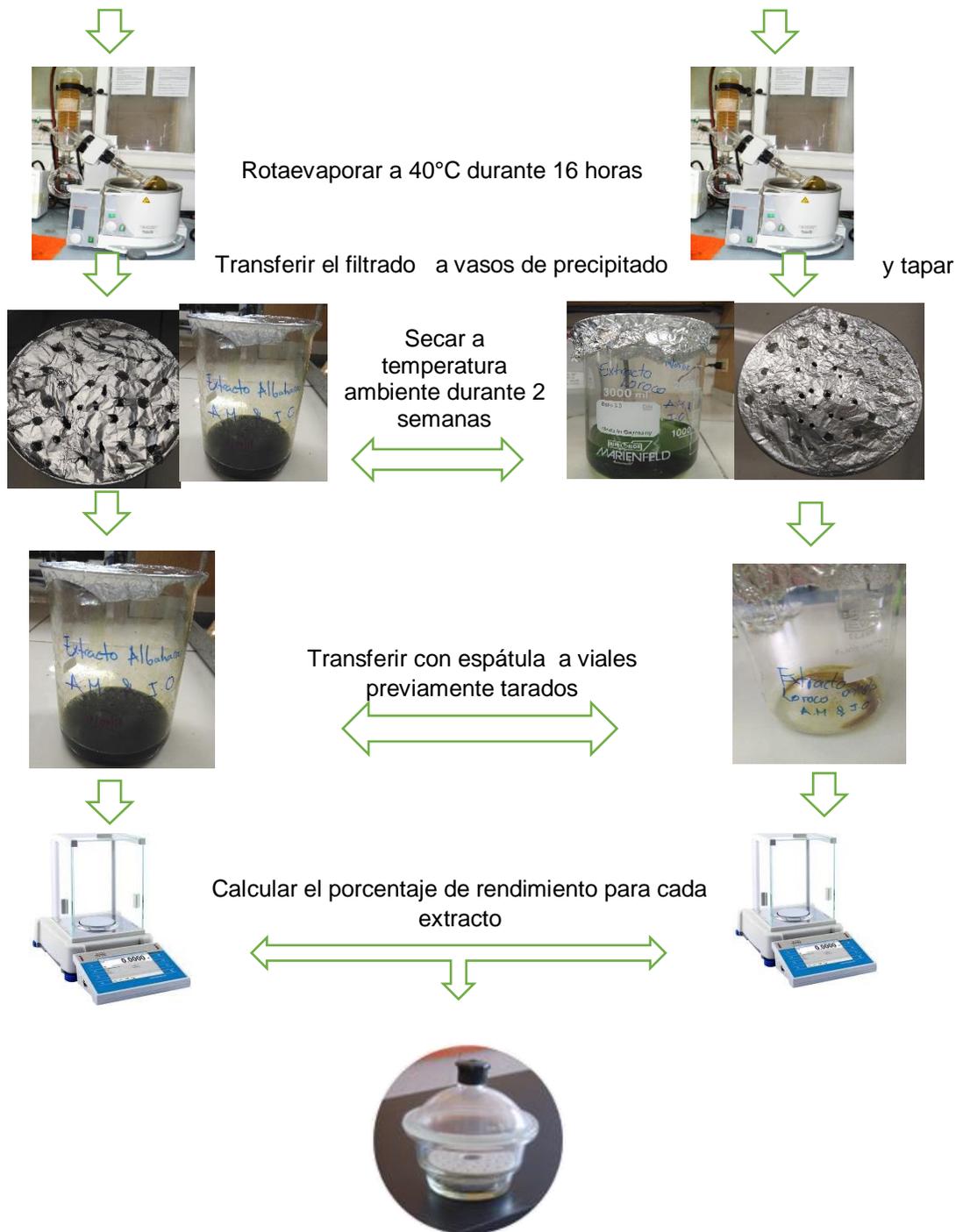


Figura N° 12. Continuación. (6), (31)

ANEXO N° 6.



Tomar 1 lb de cada tipo de queso en el Mercado Central de San Salvador.



Transportar



Almacenar en refrigeración en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Figura N° 13. Esquema de toma y transporte de muestras de queso hasta lugar de trabajo.

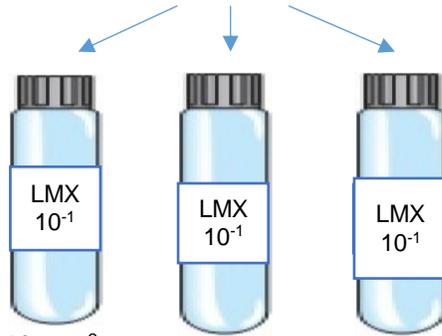
ANEXO N° 7.



Figura N° 14. Esquema de proceso de preparación de muestra de cada tipo de queso para aislamiento de cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (16). (23)

ANEXO N° 8.

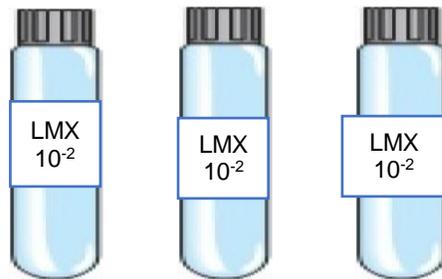
Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-1} y transferirla a un tubo que contiene 9 mL de caldo LMX.



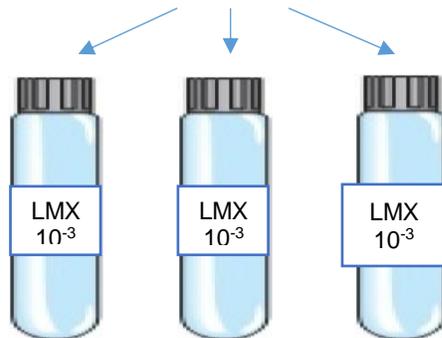
Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-2} y

transferirla a un tubo que

contiene 9 mL de caldo LMX.



Pipetear 1 mL de la dilución 10^{-3} y transferirla a un tubo que contiene 9 mL de caldo LMX.



Incubar los tubos de 24 a 48 horas a 35

Observar viraje de color (azul verdoso indica prueba positiva).

Figura N° 15. Esquema para Prueba de Coliformes Totales. ⁽¹¹⁾

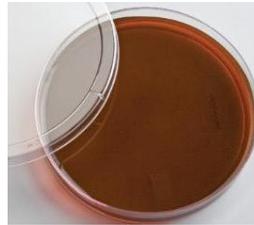
ANEXO N° 9.

Esquema de aislamiento e identificación macroscópica de *Escherichia coli*.

De los tubos con caldo LMX, que den positiva la prueba para coliformes totales, observar la posible presencia de fluorescencia por medio de una lámpara de luz ultravioleta.



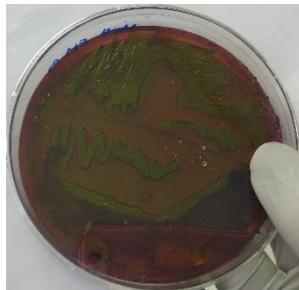
Estriar en agar EMB e incubar a 37°C por 24 horas



Añadir a cada tubo de LMX positivo 2 gotas del reactivo de Kovacs. Formación de anillo color rojo indica prueba positiva para *Escherichia coli*



Realizar la verificación de la morfología macroscópica de las colonias obtenidas, observando colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado indican prueba positiva para *Escherichia coli*.



Seleccionar una colonia aislada resembrar en agar Mac Conkey



Figura N°16. Esquema de aislamiento e identificación macroscópica de *Escherichia coli*. (11)

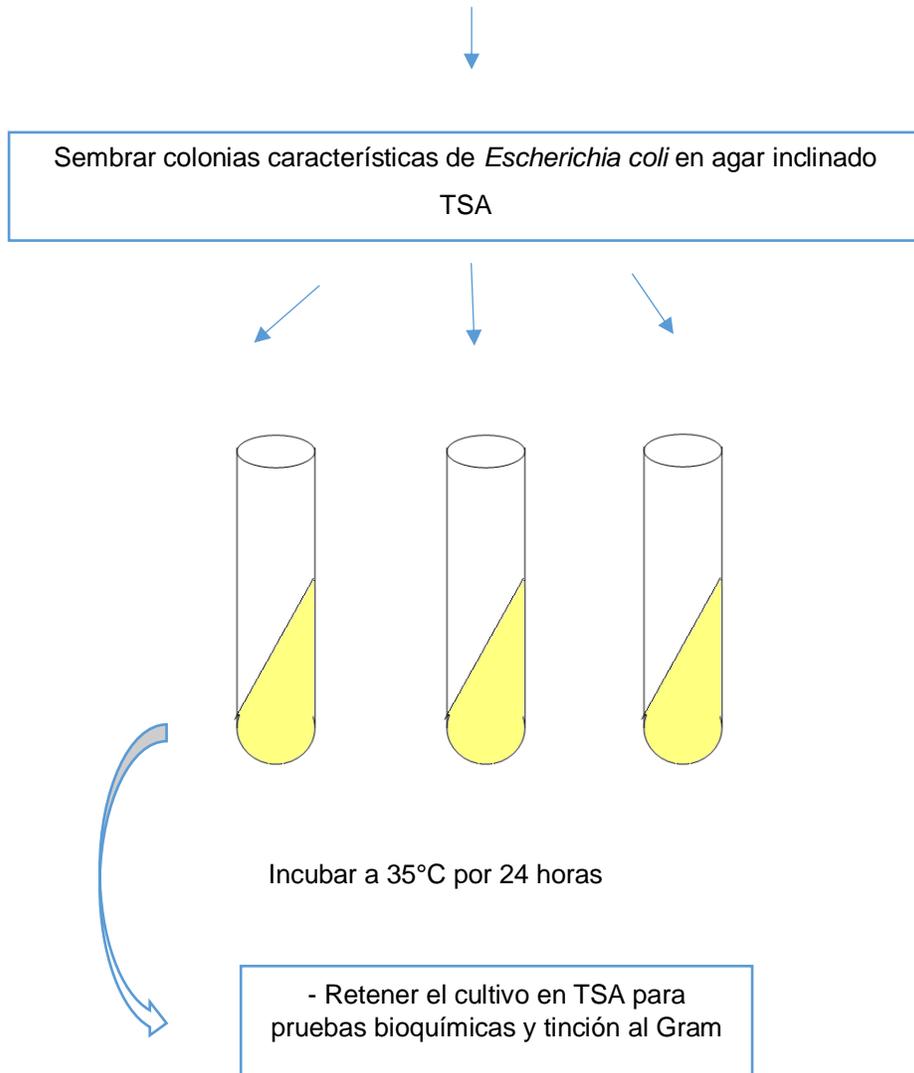


Figura N° 16. Continuación.

ANEXO N° 10.
Pruebas Bioquímicas para *Escherichia coli*.

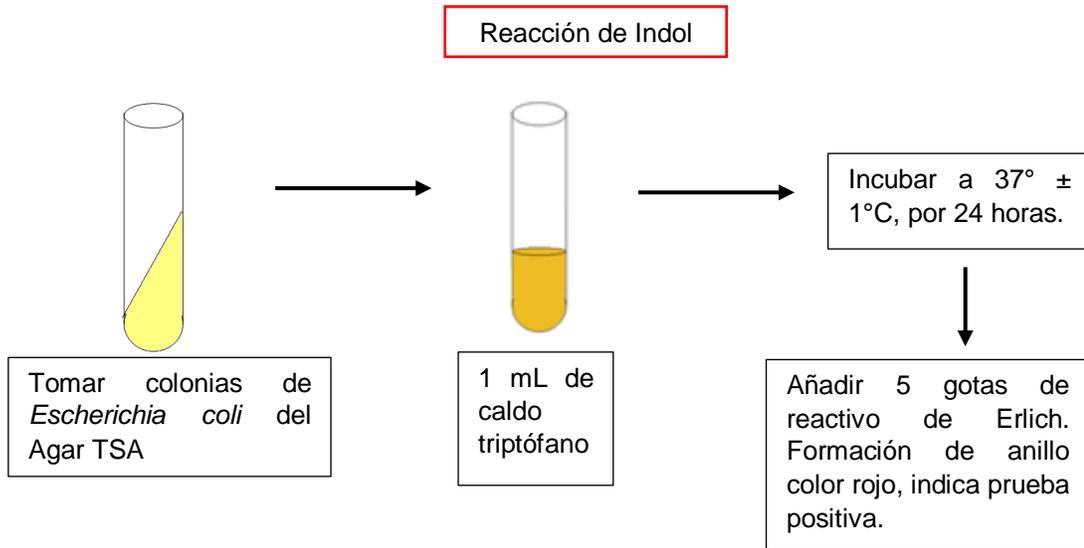


Figura N° 17. Reacción de Indol. (11)

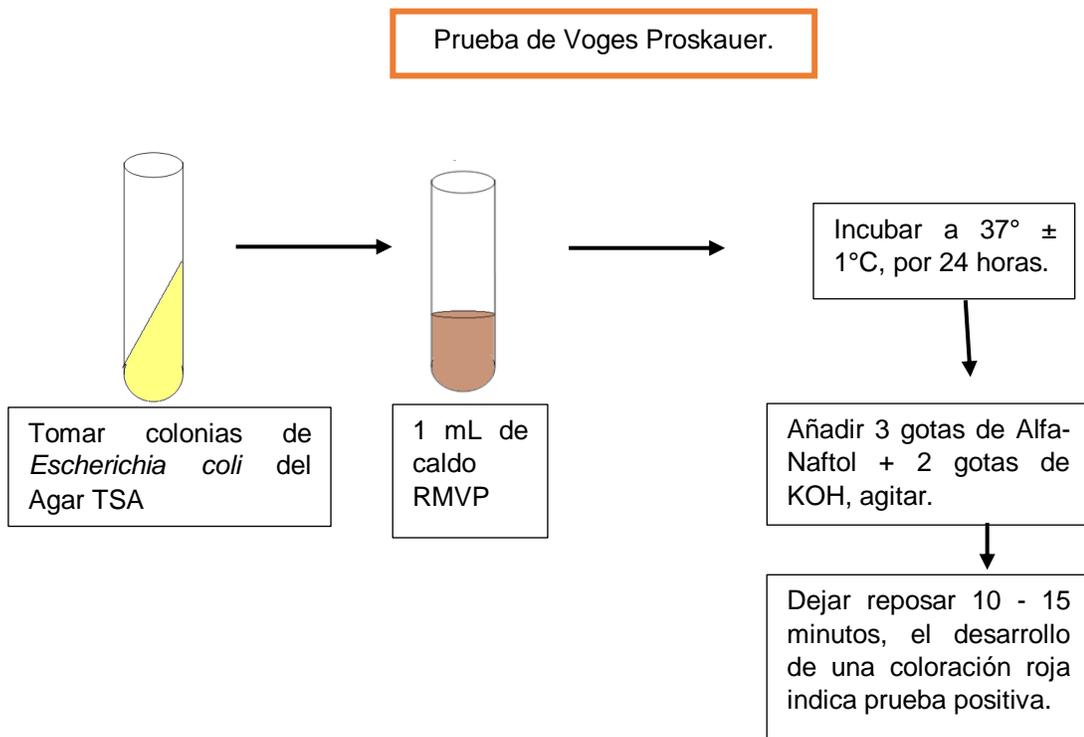


Figura N° 18. Prueba de Voges Proskauer. (11)

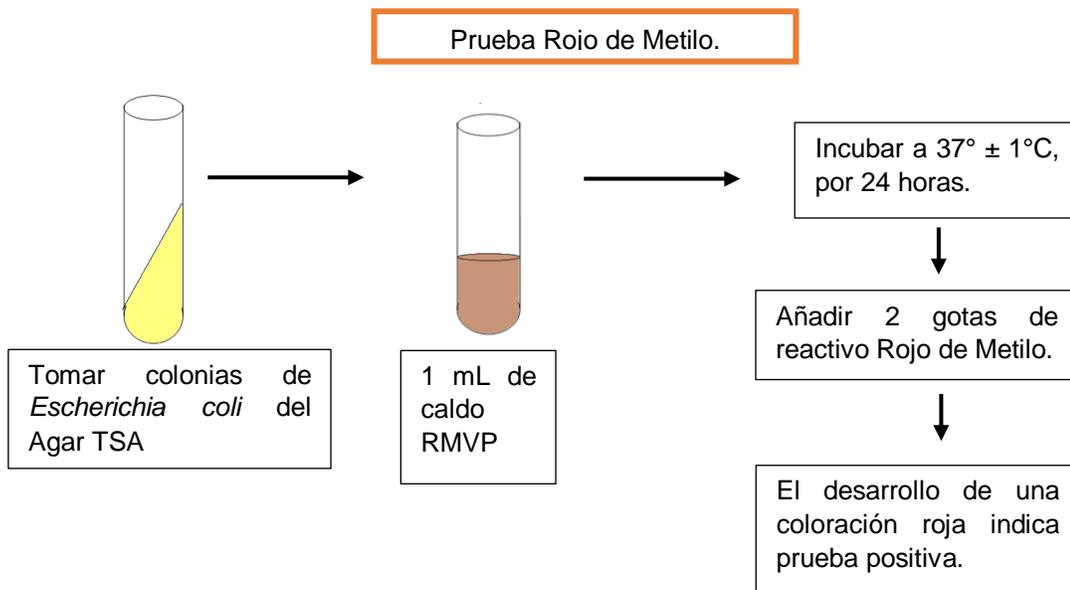


Figura N° 19. Prueba Rojo de Metilo. (11)

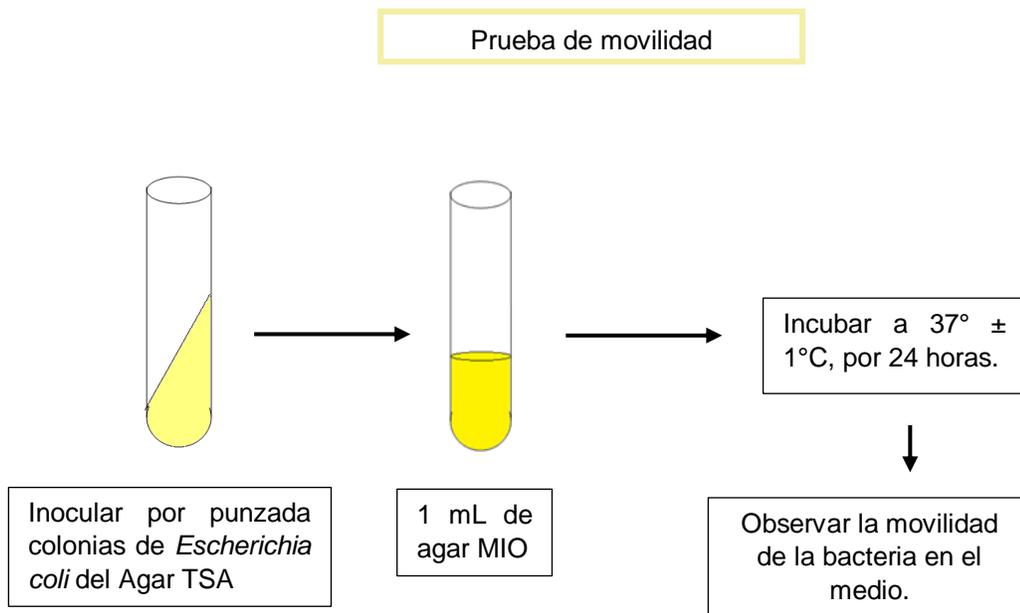


Figura N° 20. Prueba de movilidad. (11)

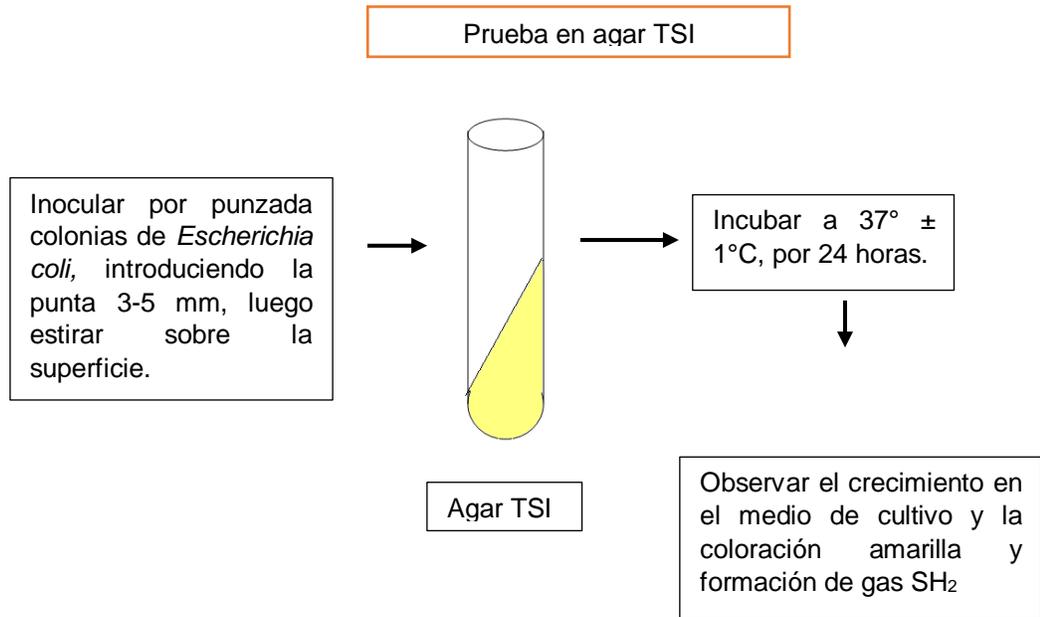


Figura N° 21 Prueba en agar TSI. ⁽¹¹⁾

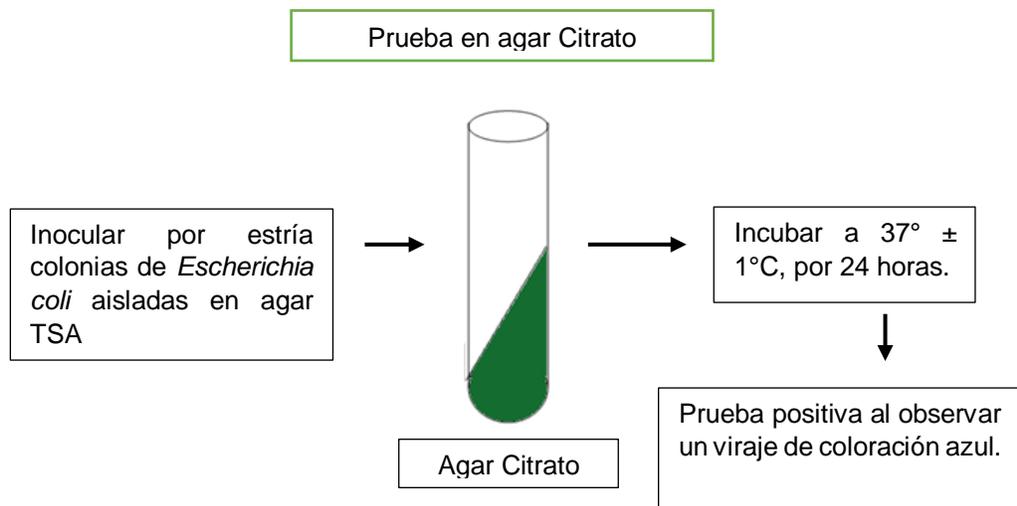
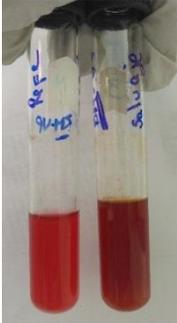
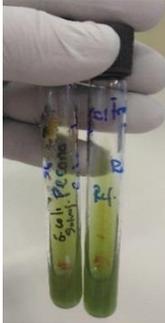


Figura N° 22. Prueba en agar Citrato. ⁽¹¹⁾

Tabla N° 11. Resultados de Pruebas Bioquímicas para *Escherichia coli*.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Indol: Positivo.		Movilidad: Positivo.	
Voges Proskauer: Negativo.		TSI: A/A (+)	
Rojo de Metilo: Positivo.		Citrato: Negativo.	

ANEXO N°11.

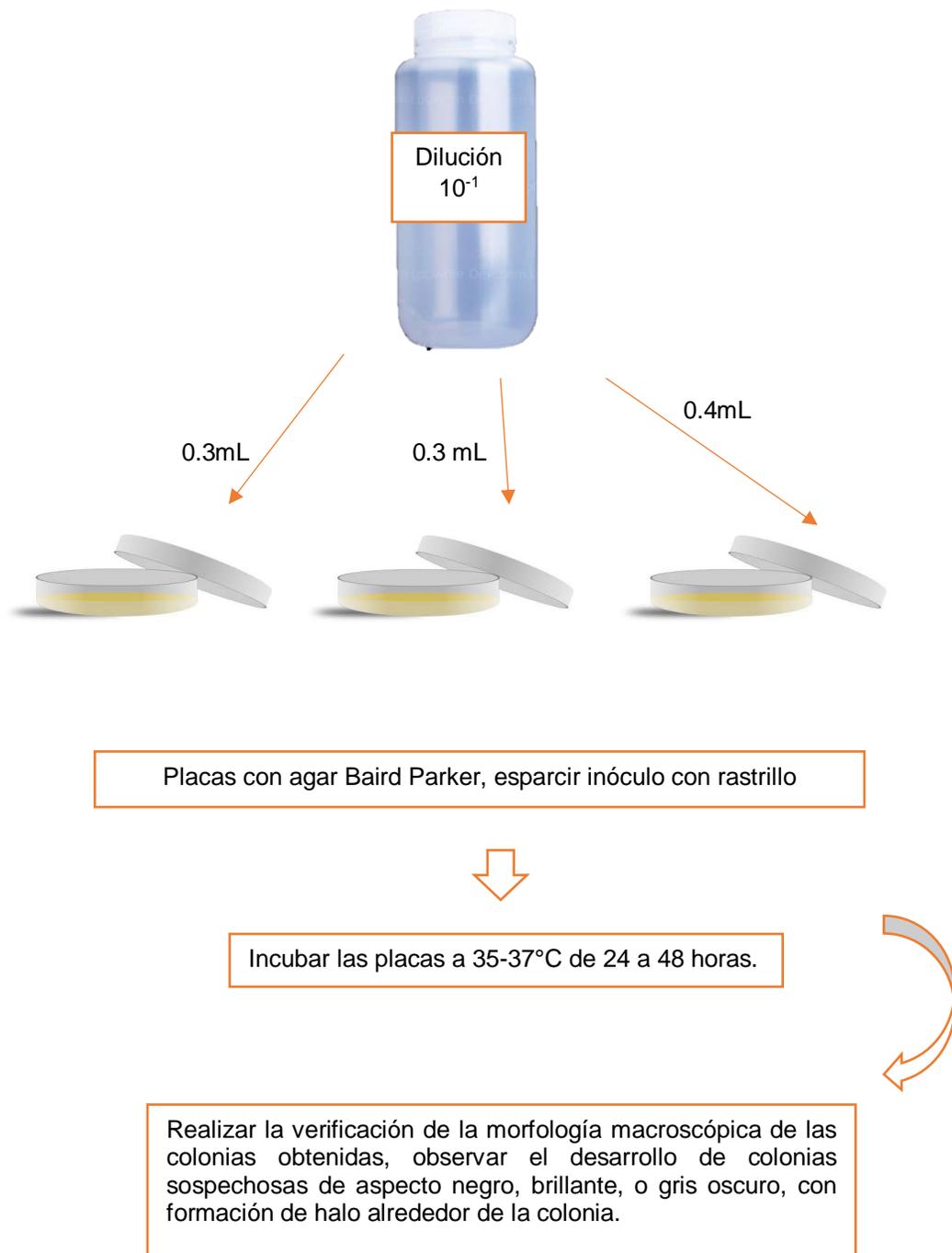
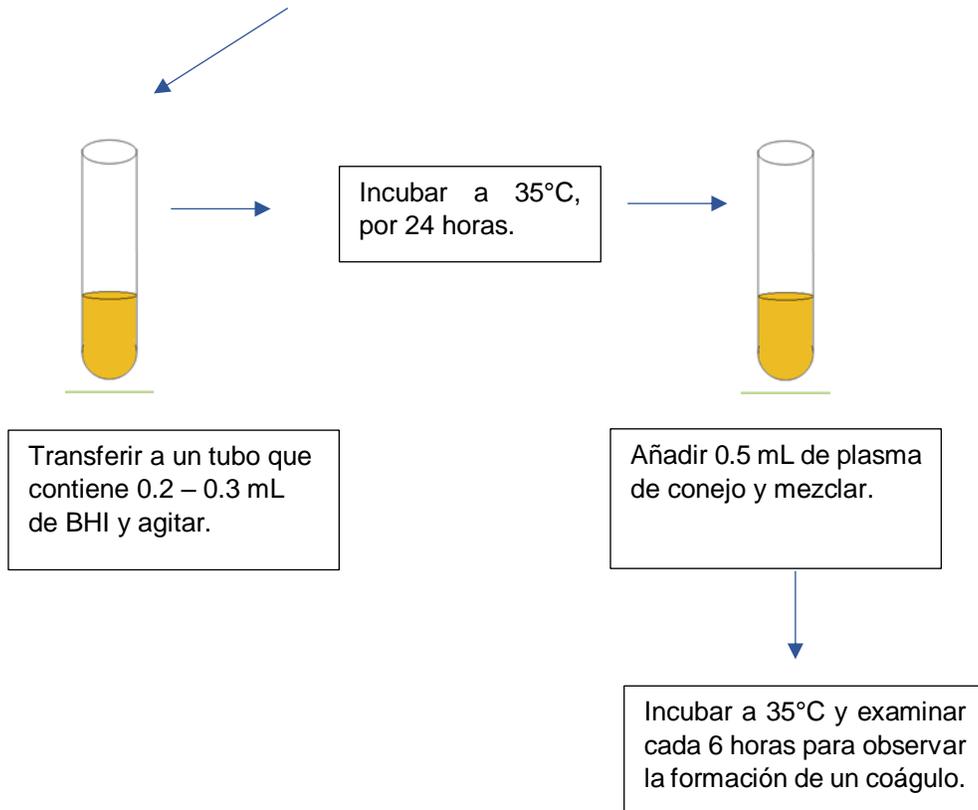


Figura N° 23. Esquema de aislamiento e identificación macroscópica de *Staphylococcus aureus*. ⁽¹¹⁾

ANEXO N° 12.



Tomar 5 – 10 colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* del agar Baird Parker.



Sólo si se observa un coágulo firme y completo, que permanece en su lugar, cuando el tubo se invierte, se considera prueba positiva para *Staphylococcus aureus*.

Figura N° 24. Prueba Coagulasa. (11)

ANEXO N°13.

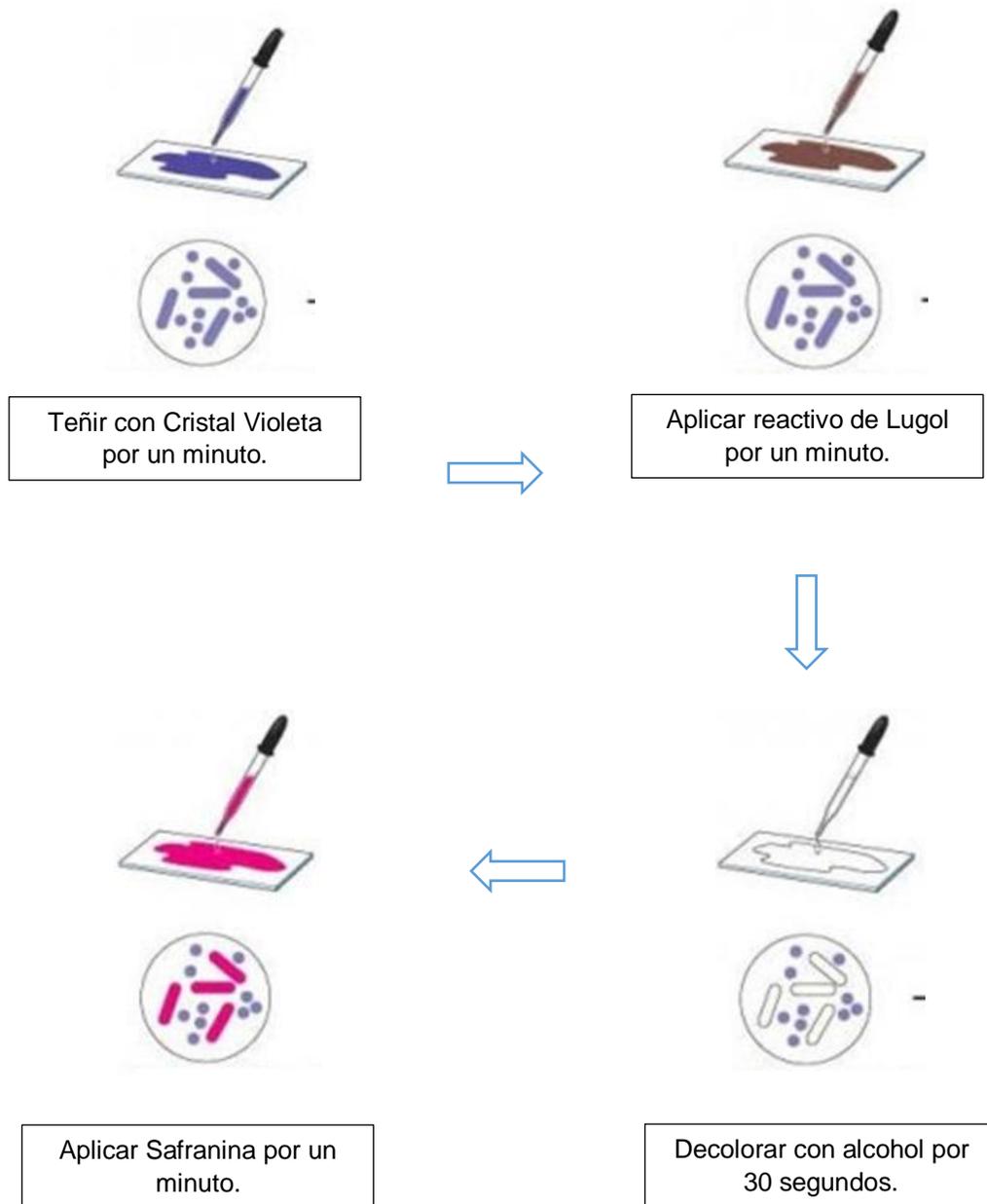


Figura N° 25. Tinción Gram. (24)

ANEXO N° 14.

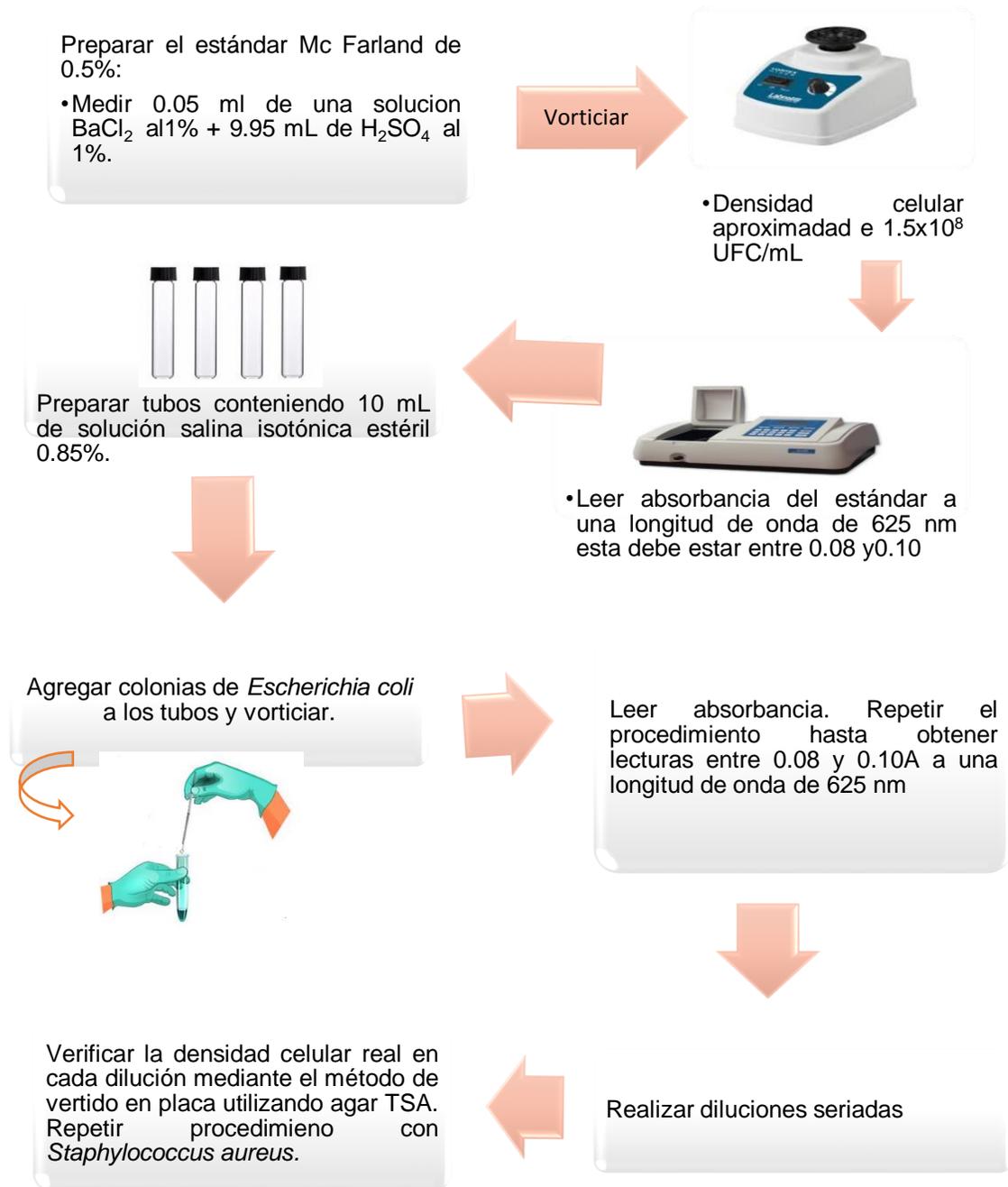


Figura N° 26. Esquema de estandarización de cepas salvajes. (25)

ANEXO N° 15.

Preparación de antibióticos de referencia.

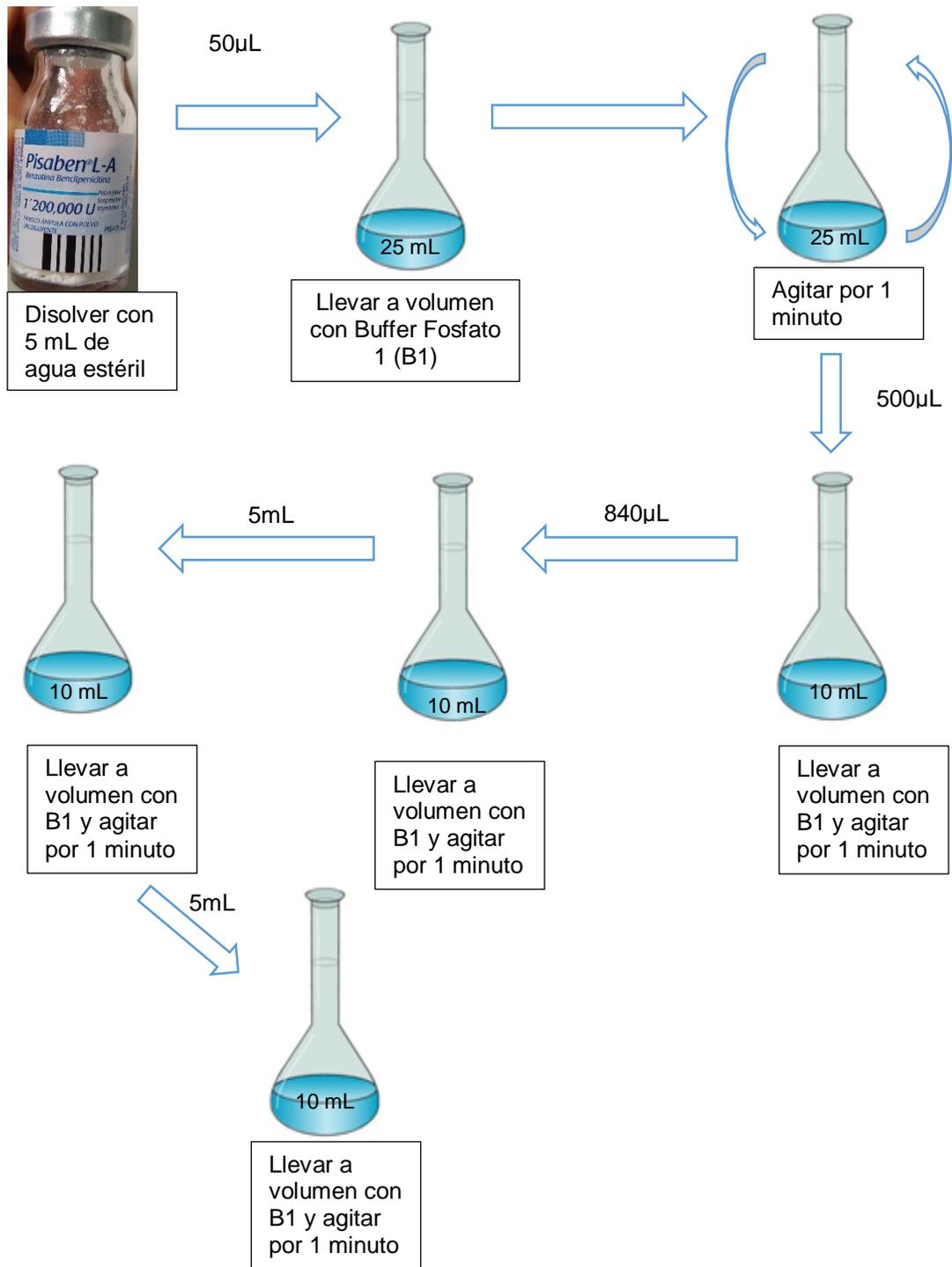


Figura N° 27. Esquema de preparación del antibiótico de referencia, Bencilpenicilina. (10)

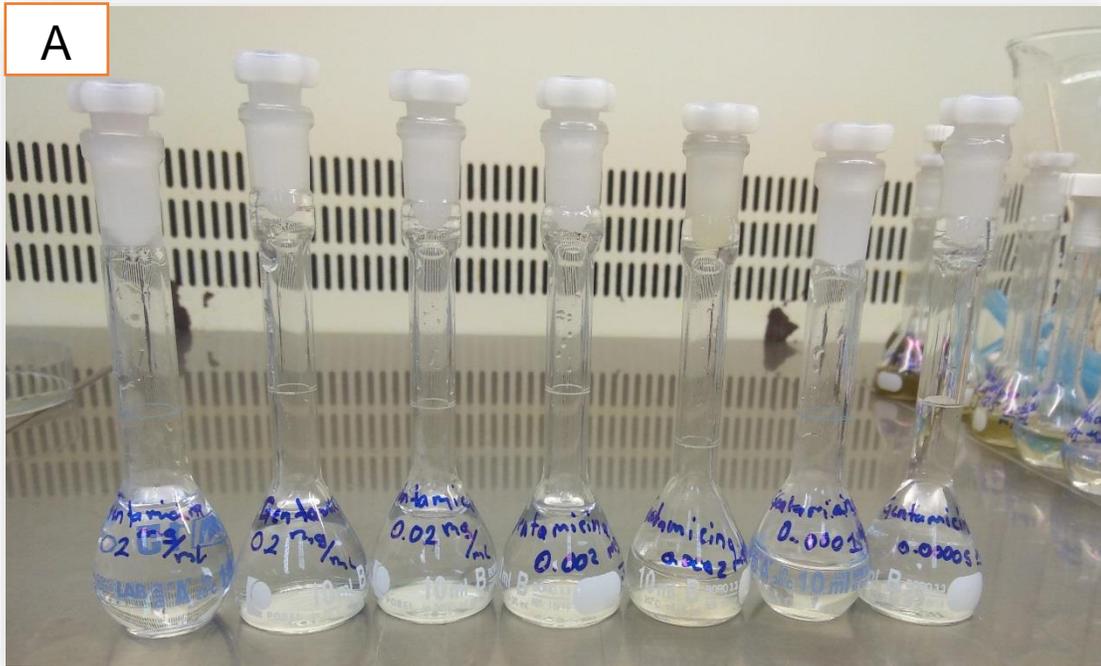


Figura N° 28. Dilución de antibiótico de referencia. A) Gentamicina. B) Bencilpenicilina.

ANEXO N° 16.

Preparación de concentraciones de extractos.

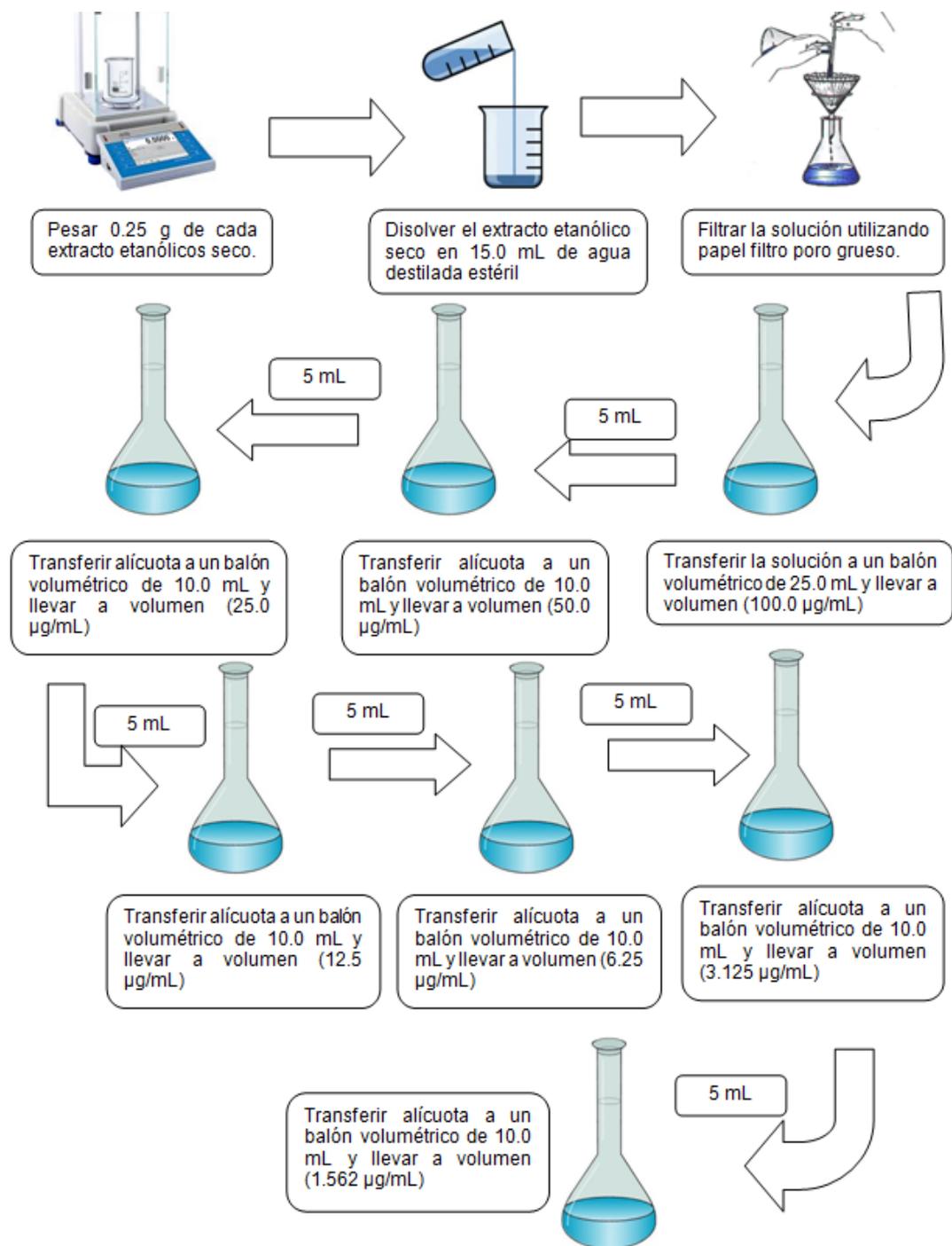


Figura N° 29. Esquema de preparación de concentraciones de extracto, ensayo inicial.. (22)

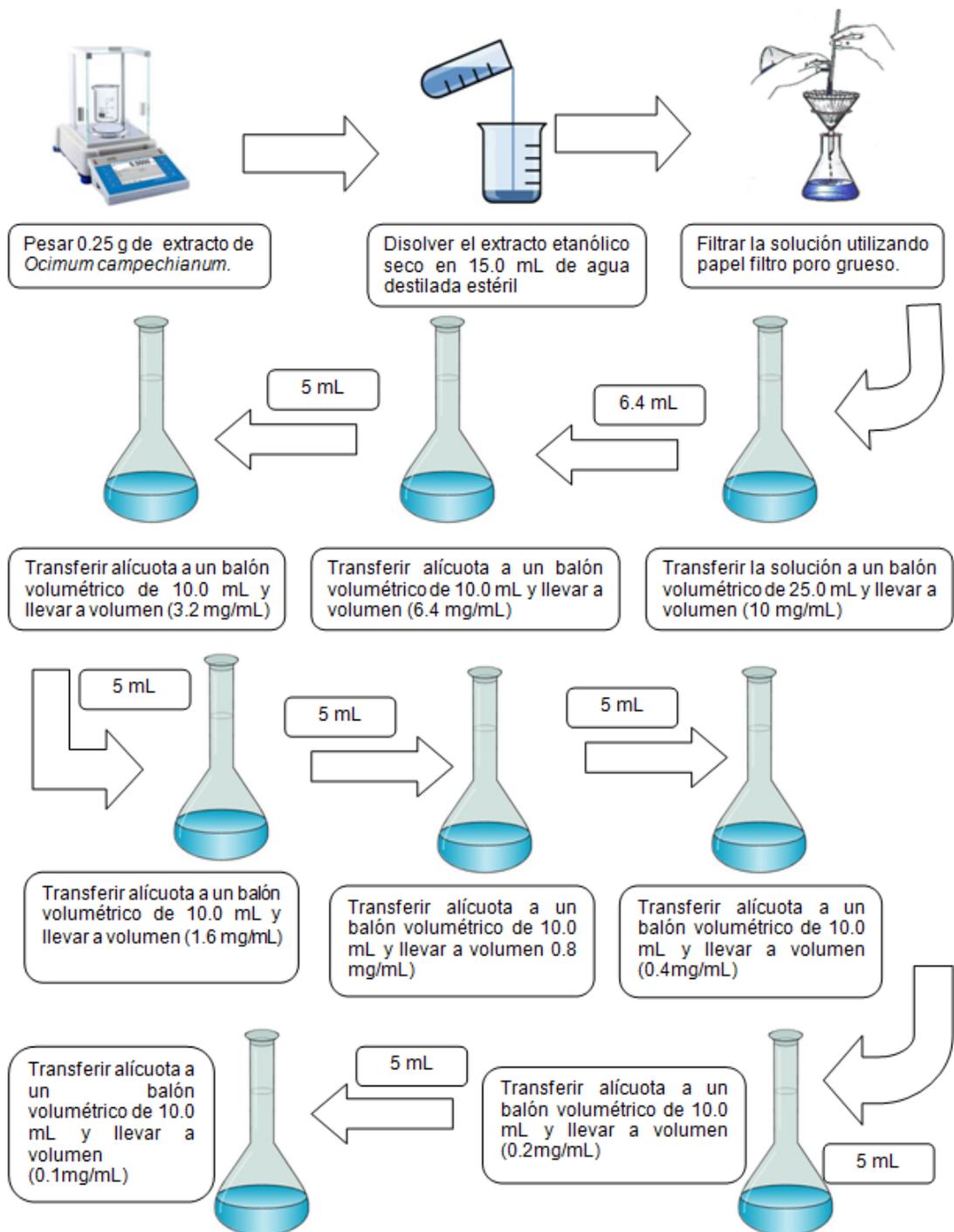


Figura N° 30. Esquema de preparación de concentraciones de extracto, segundo ensayo. (22)

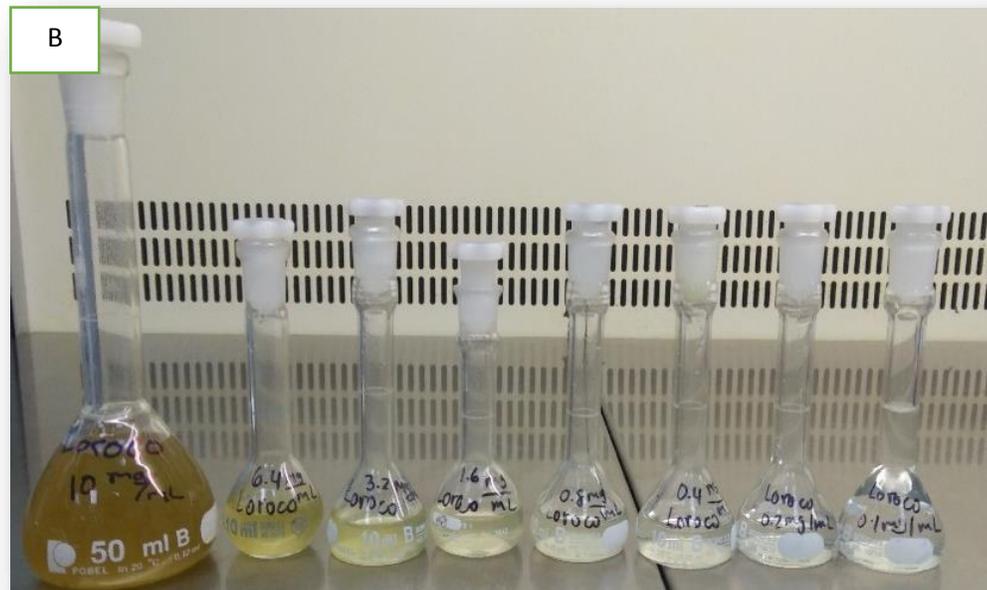
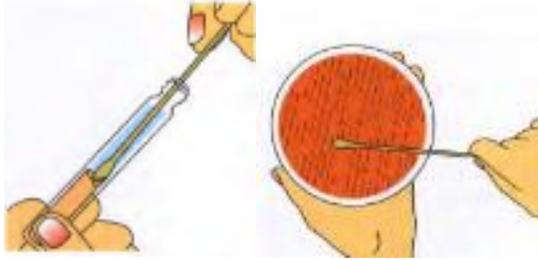


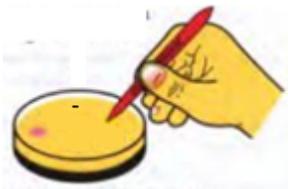
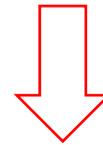
Figura N° 31. Concentraciones de extracto ensayadas. A) Cascada de dilución extracto de Albahaca. B) Cascada de dilución extracto de Loroco.

ANEXO N° 17.

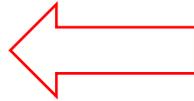
Método Kirby Bauer Modificado.



Inocular las placas con una suspensión de microorganismos equivalentes a 1×10^7 UFC/mL con el método del extendido con hisopo estéril, en la superficie del agar.



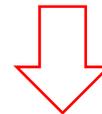
Dejar secar el medio durante 10 minutos en condiciones estériles.



Colocar sobre la superficie del medio inoculado, dos cilindros de acero inoxidable.



Colocar en cada cilindro de acero inoxidable, 200 μ L de extracto con una micropipeta.



Incubar a 37°C por 24 horas. Medir los diámetros de inhibición con un pie de rey.

Este procedimiento se realiza para cada concentración de extracto, se utiliza como control positivo las soluciones de Penicilina y como Blanco agua estéril.

Figura N° 32. Esquema de método Kirby Bauer Modificado. (21)

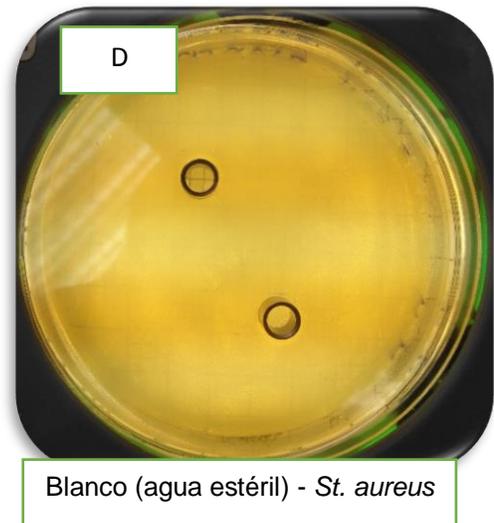
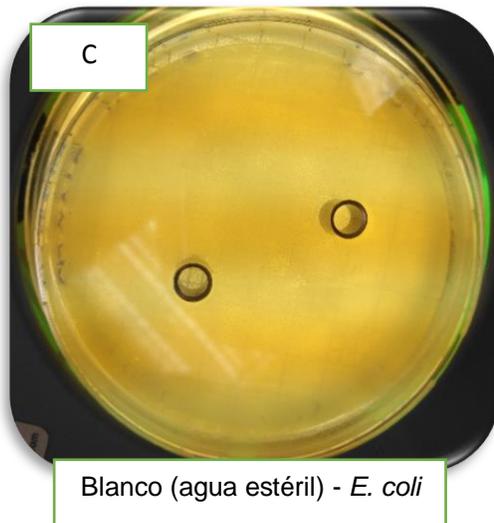
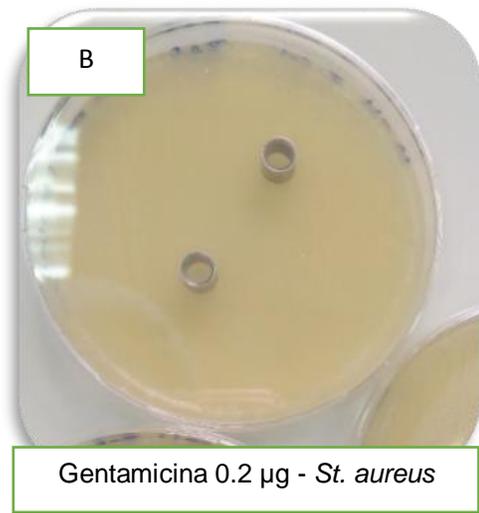
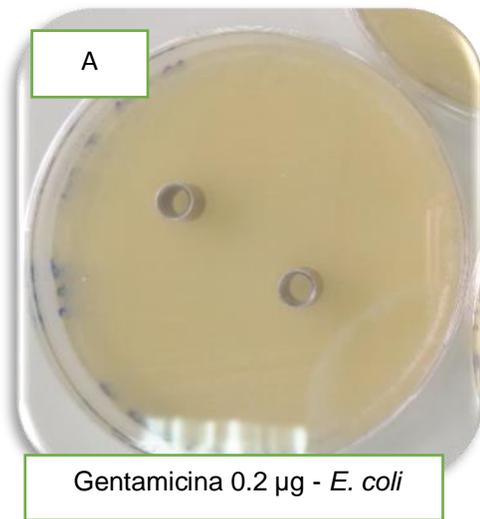


Figura N° 33. A) Control positivo Gentamicina - *E. coli*, B) Control positivo Gentamicina - *St. aureus*, C) Control negativo, agua estéril - *E. coli*, D) Control negativo, agua estéril - *St. aureus*. (21)

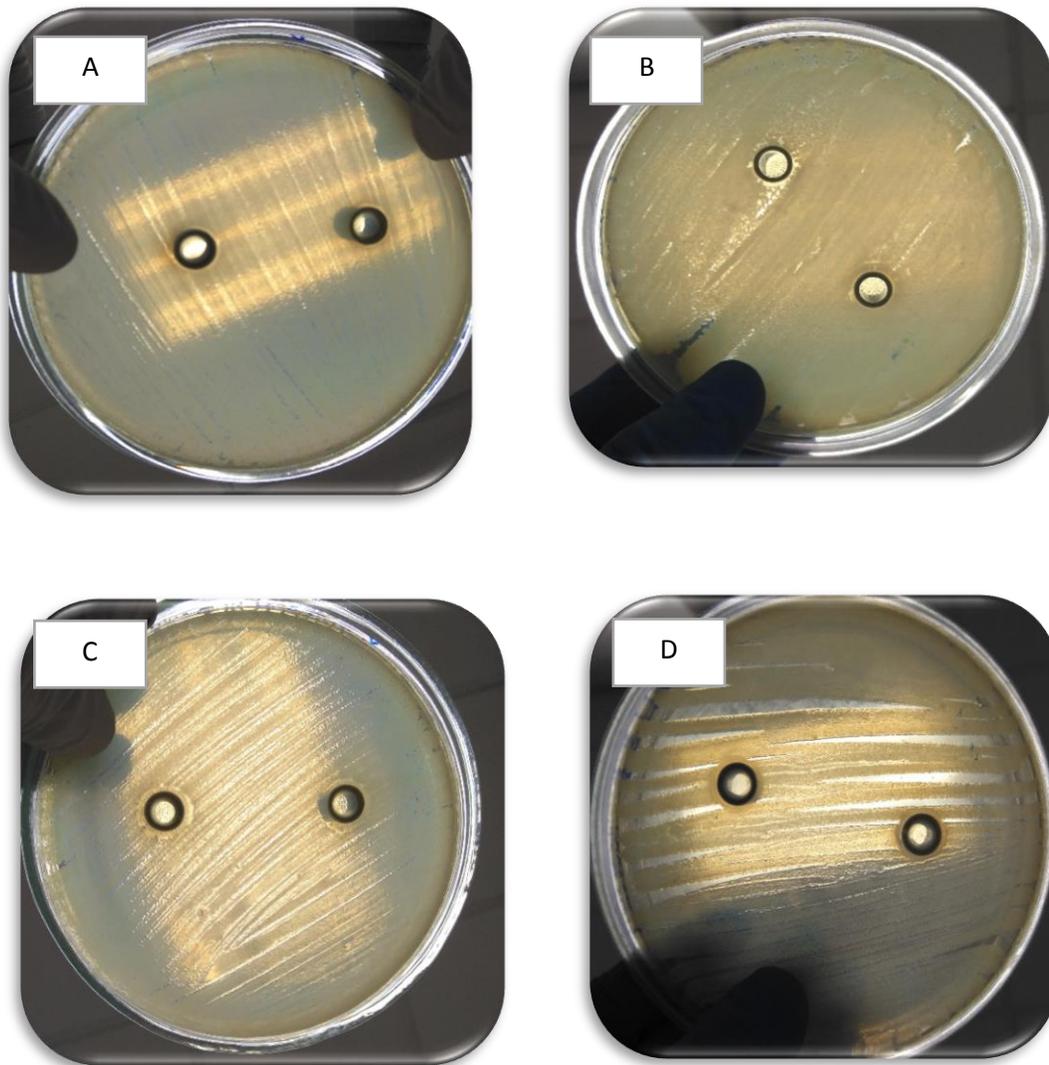


Figura N° 34. Resultados de Kirby Bauer Modificado extracto de Albahaca - bacterias. A) Extracto de Albahaca 1.562 $\mu\text{g/mL}$ – *E. coli*, B) Extracto de Albahaca 100 $\mu\text{g/mL}$ – *E. coli*, C) Extracto de Albahaca 1.562 $\mu\text{g/mL}$ – *St. aureus*, D) Extracto de Albahaca 100 $\mu\text{g/mL}$ – *St. aureus*. (21)

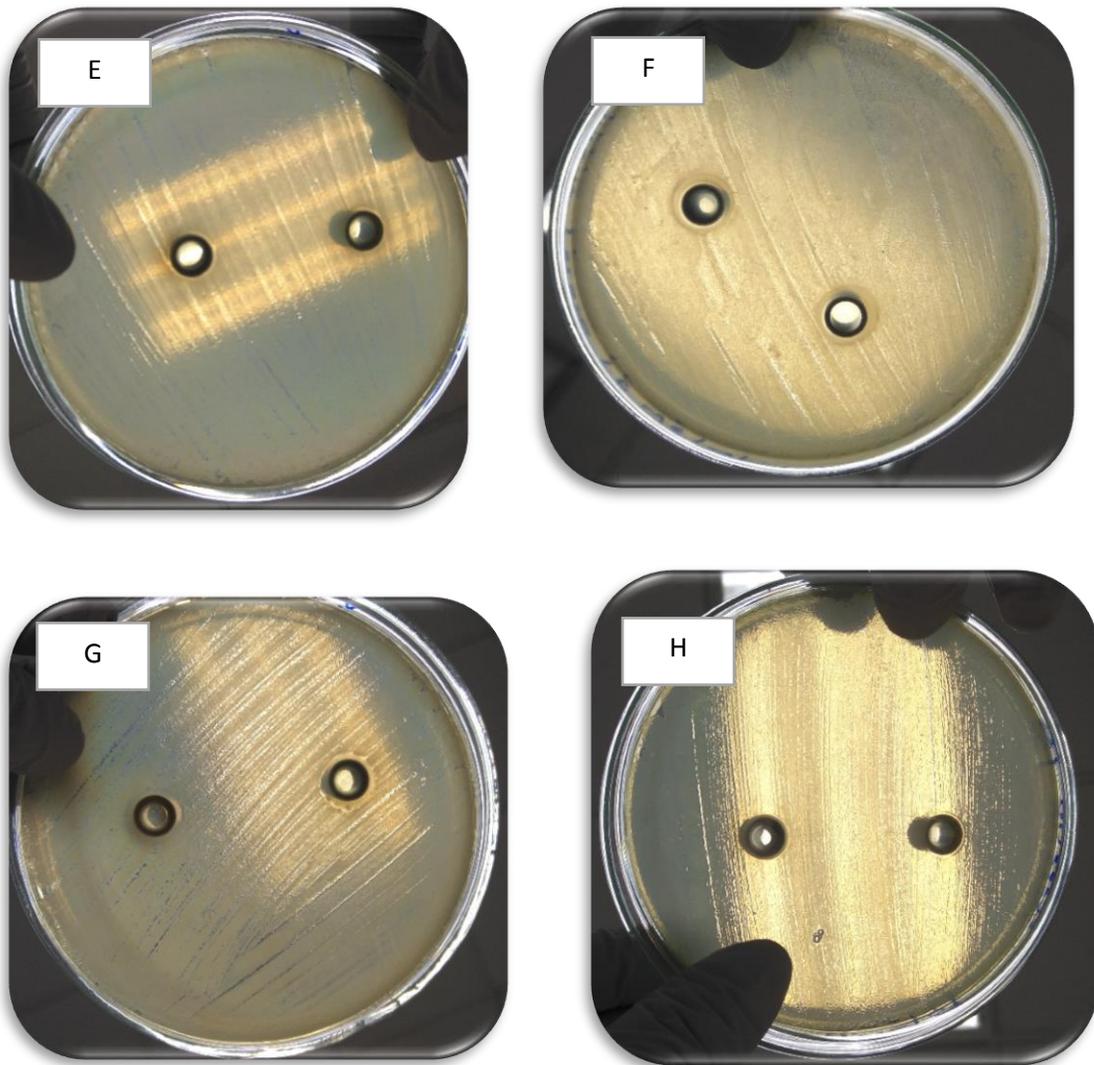
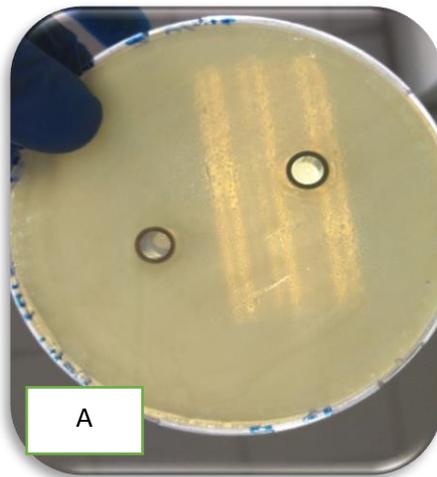
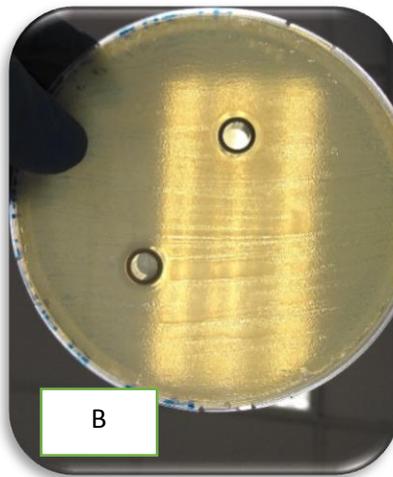


Figura N° 35. Resultados de Kirby Bauer Modificado extracto de Loroco - bacterias. E) Extracto de Loroco 1.562 $\mu\text{g/mL}$ - *E. coli*, F) Extracto de Loroco 100 $\mu\text{g/mL}$ - *E. coli*, G) Extracto de Loroco 1.562 $\mu\text{g/mL}$ - *St. aureus*, H) Extracto de Loroco 100 $\mu\text{g/mL}$ - *St. aureus*. (21)



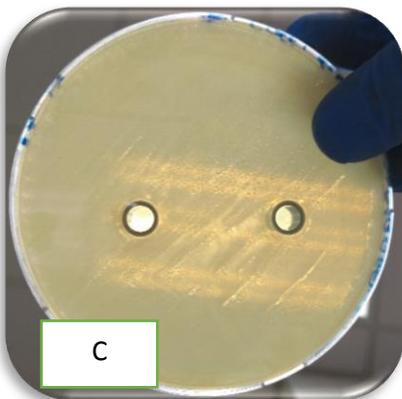
A

Penicilina 2U - *E. coli*



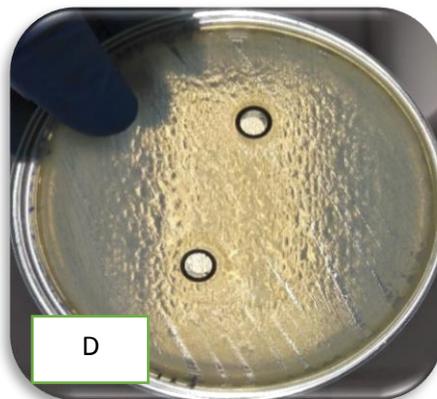
B

Penicilina 2U - *St. aureus*



C

Blanco (agua estéril) - *E. coli*



D

Blanco (agua estéril) - *St. aureus*

Figura N° 36. A) Control positivo Penicilina - *E. coli*, B) Control positivo Penicilina - *St. aureus*, C) Control negativo, agua estéril - *E. coli*, D) Control negativo, agua estéril - *St. aureus*. (21)

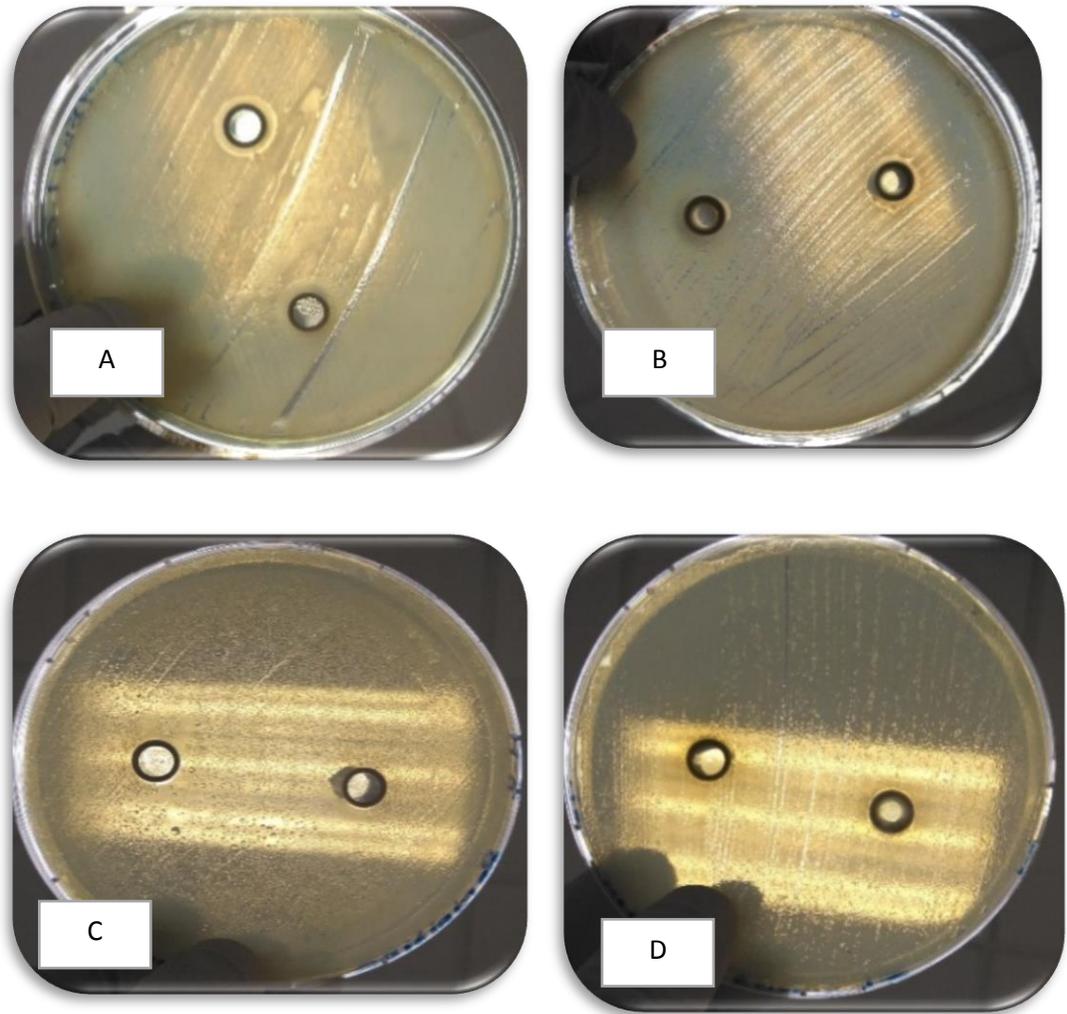


Figura N° 37. Resultados de Kirby Bauer Modificado extracto de Albahaca - bacterias. A) Extracto de Albahaca 0.1mg/mL – *E. coli*, B) Extracto de Albahaca 6.4mg/mL – *E. coli*, C) Extracto de Albahaca 0.1mg/mL – *St. aureus*, D) Extracto de Albahaca 6.4mg/mL – *St. aureus*. (21)

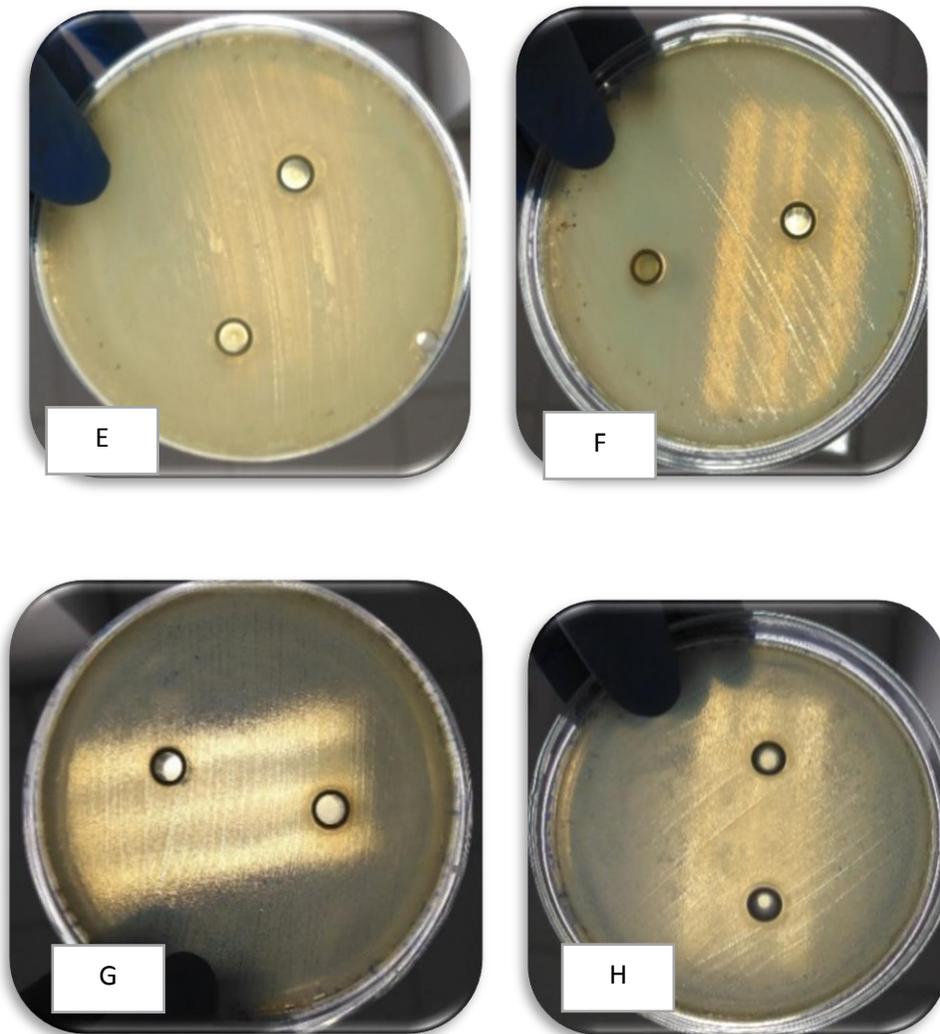


Figura N° 38. Resultados de Kirby Bauer Modificado extracto de Loroco - bacterias. E) Extracto de Loroco 0.1mg/mL – *E. coli*, F) Extracto de Loroco 6.4mg/mL – *E. coli*, G) Extracto de Loroco 0.1mg/mL – *St. aureus*, H) Extracto de Loroco 6.4mg/mL – *St. aureus*. (21)

ANEXO N° 18.

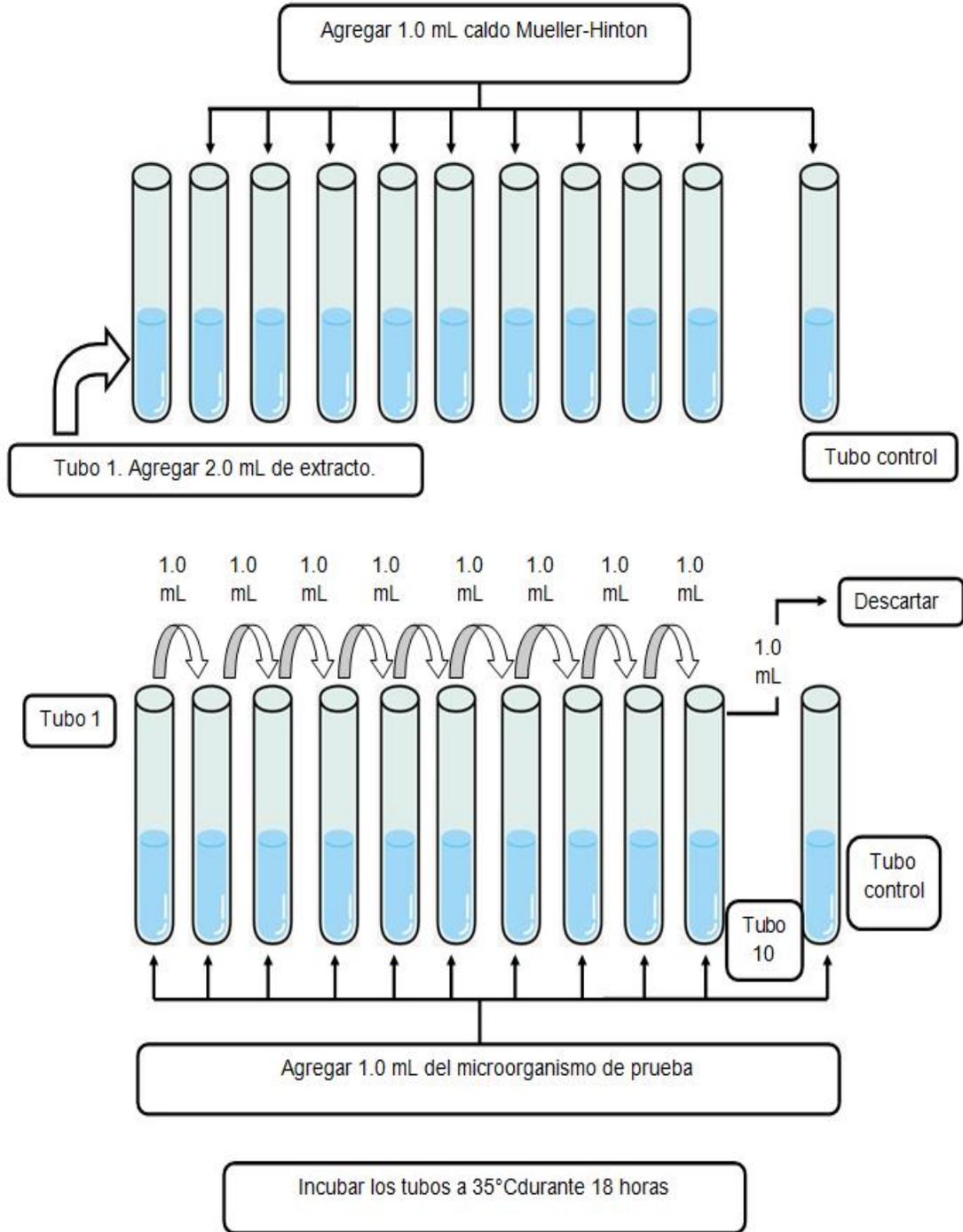
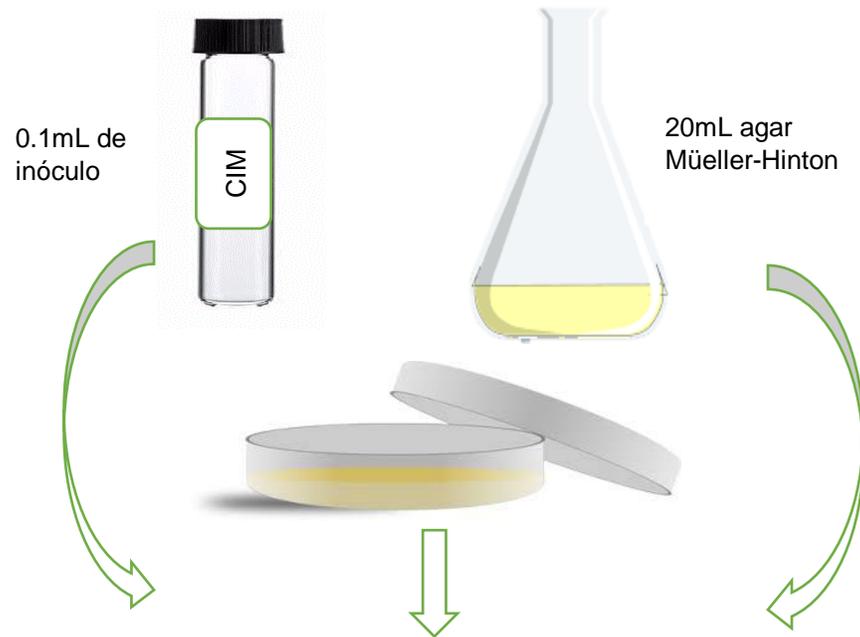


Figura N° 39. Esquema de Método de Macrodilución en caldo Müller-Hinton. (21)

ANEXO N° 19.



Repetir el paso anterior con todos aquellos tubos en donde la concentración de extracto es mayor que la CIM determinada.



Figura N° 40. Esquema de Concentración Bactericida Mínima. (21)