

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL
EXTRACTO DE *Equisetum giganteum* L. (COLA DE CABALLO) SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*,
AREQUIPA-2015.**

Presentado por la Bachiller
MEDINA BERNAL, MILAGROS

Para optar el título profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: Dra. Jenny López Valencia

AREQUIPA - PERÚ

2016



DEDICATORIA

*A DIOS POR HABERME DADO A MIS PADRES, VIDA Y SALUD PARA PERMITIRME
EL HABER LLEGADO HASTA ESTE MOMENTO TAN IMPORTANTE DE MI
FORMACION PROFESIONAL.*

AGRADECIMIENTOS

*AGRADEZCO A LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA*

*AGRADEZCO A TODOS MIS MAESTROS QUE PARTICIPARON EN MI FORMACION
ACADEMICA*

*AGRADEZCO A TODAS LAS PERSONAS QUE ME AYUDARON DIRECTA E
INDIRECTAMENTE EN LA REALIZACION DE ESTE PROYECTO*

GRACIAS

ÍNDICE

| | Págs. |
|--|--------------|
| RESUMEN | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| OBJETIVOS | 16 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO | 18 |
| 1. <i>Equisetum giganteum</i> L. (COLA DE CABALLO) | 18 |
| 1.1 Descripción botánica | 18 |
| 1.2 Etiología | 19 |
| 1.3 Taxonomía | 19 |
| 1.4 Hábitat y distribución geográfica | 20 |
| 1.5 Antecedentes terapéuticos | 20 |
| 1.6 Composición química | 21 |
| 1.7 Posología | 21 |
| 1.8 Referencias toxicológicas | 21 |
| 2. EXTRACTOS VEGETALES | 22 |
| 2.1 Métodos de Extracción | 22 |
| 2.2 Método de extracción por percolación | 23 |
| 2.3 Selección del solvente | 24 |
| 3. USO DE AGENTES PATÓGENOS | 24 |
| 3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 |
| 3.1.1 Patología | 24 |
| 3.1.2 Tratamiento | 25 |
| 3.2 <i>Escherichia coli</i> | 25 |
| 3.2.1 Patología | 25 |
| 3.2.2 Tratamiento | 25 |
| 3.3 <i>Cándida albicans</i> | 25 |
| 3.3.1 Patología | 26 |
| 3.3.2 Tratamiento | 26 |

| | | |
|--|---|----|
| 4. | MÉTODOS DE DILUCIÓN | 26 |
| 4.1 | Macro-dilución en caldo..... | 26 |
| 4.1.1 | Concentración inhibitoria mínima (CIM)..... | 27 |
| 4.1.2 | Concentración bactericida mínima (CBM)..... | 27 |
| CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS | | 28 |
| 1 | MATERIAL BIOLÓGICO Y AMBIENTE UTILIZADO | 28 |
| 2 | MATERIALES Y REACTIVOS..... | 29 |
| 2.1 | Equipos de Laboratorio | 29 |
| 2.2 | Reactivos | 29 |
| 2.3 | Material de Vidrio | 30 |
| 2.4 | Medios de Cultivo | 30 |
| 2.5 | Otros | 31 |
| 3 | MÉTODOS..... | 32 |
| 3.1 | RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL, <i>Equicetum giganteum L. (COLA DE CABALLO)</i> | 32 |
| 3.2 | EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO DE PERCOLACIÓN | 32 |
| 3.3 | DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN..... | 34 |
| 3.4 | MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF) | 34 |
| 3.5 | DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE REFERENCIA (Rf) | 35 |
| 3.6 | PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CLINICAS EN ESTUDIO | 36 |
| 3.6.1 | Identificación de <i>Stapylococcus aureus</i> | 37 |
| 3.6.2 | Identificación de <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| 3.6.3 | Identificación de <i>Candida albicans</i> | 38 |
| 3.6.5 | Tinción de Gram | 38 |
| 4 | DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HIDRO-ETANOLICO DE <i>Equicetum giganteum L. (COLA DE CABALLO)</i> | 40 |
| 4.1 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA | 40 |
| 4.1.1 | Método de dilución en tubo | 40 |
| 4.1.2 | Preparación de la solución Madre del extracto Hidroetanolico de <i>Equicetum gigateum L.</i> | 40 |

| | | |
|---|--|----|
| 4.1.3 | Preparación del Inoculo | 40 |
| 4.1.3 | Preparación de diluciones | 41 |
| 4.2 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA | 41 |
| 4.2.1 | Método de Macro dilución en Placa | 41 |
| CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 42 |
| 1 | CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE <i>Esquicetum gigateum L.</i> | 42 |
| 2 | ANÁLISIS FISICOQUÍMICO ANÁLISIS PROXIMAL..... | 43 |
| 3 | OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE <i>Equicetum giganteum L.</i> (COLA DE CABALLO) | 43 |
| 4 | SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)..... | 47 |
| 4.1 | IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS | 47 |
| 4.2 | IDENTIFICACIÓN DE TANINOS..... | 48 |
| 4.3 | IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES | 49 |
| 4.4 | IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES | 50 |
| 5 | RESULTADOS DE CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA..... | 51 |
| 6 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA..... | 51 |
| 7 | DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA..... | 64 |
| CONCLUSIONES..... | | 76 |
| BIBLIOGRAFIA | | 77 |
| ANEXOS | | 83 |
| ANEXO N° 1 | FOTOGRAFÍAS | 84 |
| ANEXO N° 2 | PLACAS | 87 |
| ANEXO N° 3 | CONSTANCIA..... | 90 |
| ANEXO N° 4 | INFORME DE ENSAYO..... | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

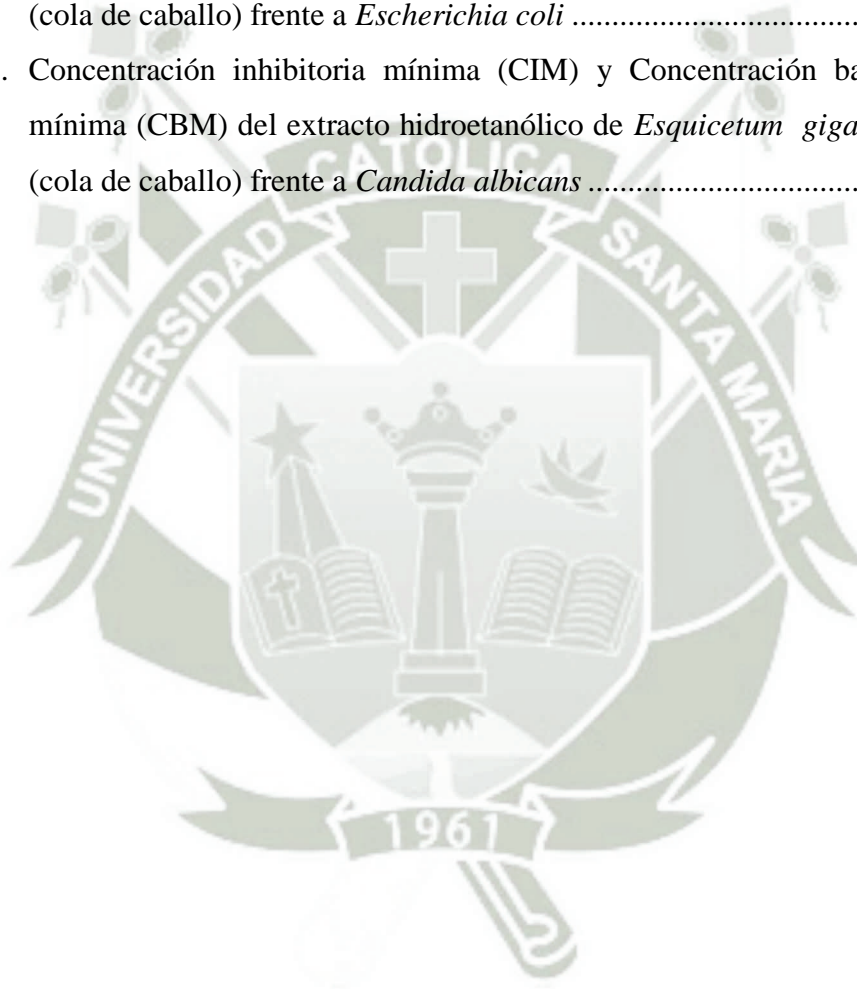
| | Págs. |
|---|--------------|
| Figura 1. <i>Esquisetum giganteum</i> L. (Cola de caballo)..... | 19 |
| Figura 2. Métodos de extracción..... | 23 |
| Figura 3. Sistema de percolación | 23 |
| Figura 4. Muestras de <i>Equicetum giganteum</i> L. (Cola de caballo) | 32 |
| Figura 5. Sistemas de percolación usando solvente hidroetanólico, hexano y acetato de etilo..... | 33 |
| Figura 6. Rotavapor..... | 34 |
| Figura 7. Conservación de cepas clínicas..... | 36 |
| Figura 8. Extracto hidroetanólico de <i>Esquicetum gigateum</i> L..... | 42 |
| Figura 9. Promedios de los rendimientos (%) de los extractos de <i>Equicetun giganteum</i> L. (Cola de caballo) para cada tipo de solvente..... | 46 |
| Figura 10. CCF para terpenos | 47 |
| Figura 11. CCF para taninos | 48 |
| Figura 12. CCF para flavonoides | 49 |
| Figura 13. CCF para alcaloides..... | 50 |
| Figura 14. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hidroetanólico de <i>Esquicetun giganteum</i> L. (cola de caballo) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> | 55 |
| Figura 15. Determinación de la concentración inhibitoria minima (CIM) del extracto hidroetanólico de <i>Esquicetun giganteum</i> L. (cola de caballo) frente a <i>Escherichia coli</i> | 59 |
| Figura 16. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hidroetanólico de <i>Esquicetum giganteum</i> L. (cola de caballo) frente a <i>Cándida albicans</i> | 63 |
| Figura 17. Determinación de la Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de <i>Esquicetum giganteun</i> L. (cola de caballo) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> | 67 |
| Figura 18. Determinación de la Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de <i>Esquicetum giganteum</i> L. (cola de caballo), frente a <i>Escherichia coli</i> | 70 |

Figura 19. Determinación de la Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de *Esquicetun giganteum* L (cola de caballo) frente a *Candida albicans* 73

Figura 20. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de *Esquicetun giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Staphylococcus aureus* 74

Figura 21. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de *Equicetum giagnteum* L (cola de caballo) frente a *Escherichia coli* 74

Figura 22. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de *Esquicetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Candida albicans* 75



ÍNDICE DE TABLAS

| | Págs. |
|---|--------------|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de Cola de caballo..... | 20 |
| Tabla 2. Composición fisicoquímica proximal..... | 43 |
| Tabla 3. Rendimiento de los extractos de <i>Equisetum giganteum</i> L. (Cola de caballo) | 44 |
| Tabla 4. Análisis estadístico descriptivo de los rendimientos (%) de los extractos de <i>Equisetum giganteum</i> L. (cola de caballo) para cada tipo de solvente..... | 45 |
| Tabla 5. Análisis de varianza de los rendimientos (%) de los extractos de <i>Equisetum giganteum</i> L. (Cola de caballo) para cada tipo de solvente..... | 45 |
| Tabla 6. Información de agrupación Tukey..... | 46 |
| Tabla 7. Comparaciones múltiples para los rendimientos (%) de los extractos de <i>Equisetum giganteum</i> L. (cola de caballo) para cada tipo de solvente según método de LSD Fisher..... | 46 |
| Tabla 8. Resultados de Confirmación de Identificación Bioquímica..... | 51 |
| Tabla 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado..... | 52 |
| Tabla 10. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab | 53 |
| Tabla 11. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames..... | 54 |
| Tabla 12. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Escherichia coli</i> aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado | 56 |
| Tabla 13. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Escherichia coli</i> aislado de pacientes del Laboratorio SuizaLab. | 57 |
| Tabla 14. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Escherichia coli</i> aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames. | 58 |
| Tabla 15. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Cándida albicans</i> aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado..... | 60 |
| Tabla 16. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Cándida albicans</i> aislado de pacientes del Laboratorio Suiza..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Tabla 17. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para <i>Cándida albicans</i> aislado de pacientes del Laboratorio Llerena | 62 |
| Tabla 18. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de | 64 |
| Tabla 19. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab | 65 |
| Tabla 20. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames. | 66 |
| Tabla 21. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Escherichia coli</i> aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado. | 67 |
| Tabla 22. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Escherichia coli</i> | 68 |
| Tabla 23. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Escherichia coli</i> aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames. | 69 |
| Tabla 24. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Candida albicans</i> aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado | 70 |
| Tabla 25. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Candida albicans</i> aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab..... | 71 |
| Tabla 26. Concentración bactericida mínima (CBM) para <i>Cándida albicans</i> aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames. | 72 |



RESUMEN

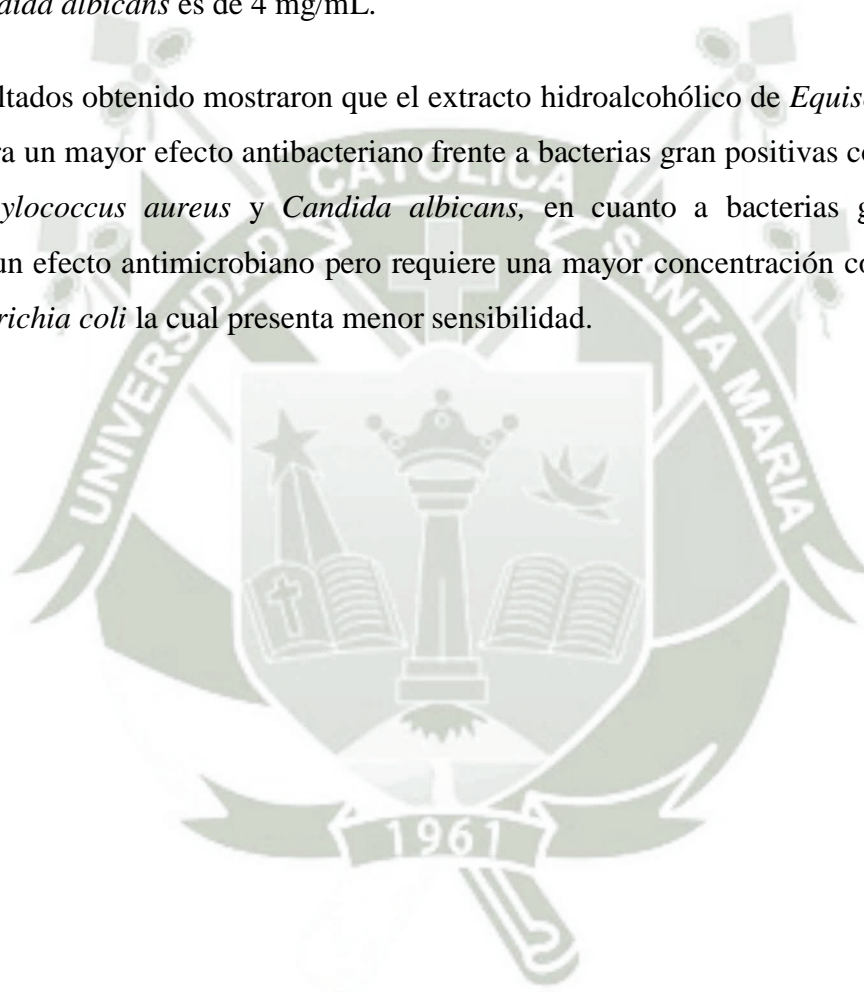
El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal la determinación del efecto antimicrobiano in vitro de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo), sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* se realizó en la Universidad Católica de Santa María.

Se procedió a realizar las extracciones, las cuales se realizaron por el método de percolación, se trabajó con tres componentes solubles, hexano (disolvente no polar), acetato de etilo, (disolvente polar aprótico) y un solvente hidroalcohólico (disolvente protico), la identificación de componentes secundarios del extracto hidroalcohólico se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF), para las pruebas antimicrobianas, el procedimiento fue determinado in vitro, las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) por el método de dilución en tubo; las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) por el método de siembra en agar, sobre los siguientes microorganismos Gram positivos, Gram negativo y levaduras ya referidos. Se utilizó 12 cepas de cada especie de distinta procedencia, Hospital Honorio Delgado, Laboratorio Suiza Lab. y Laboratorio Llerena Ames, las cuales han sido debidamente identificadas bioquímicamente.

Se obtuvo el extracto hidroalcohólico con un mayor porcentaje de rendimiento, presentando un resultado de 46.8 %, en cuanto a la identificación de componentes secundarios, se identificó la presencia de alcaloides, terpenos, flavonoides y taninos.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) obtenida para *Staphylococcus aureus*, es de 3.5 mg/mL, para *Escherichia coli* es de 15 mg/mL y para *Candida albicans* es de 3 mg/mL. Así mismo la concentración bactericida mínima (CBM) obtenida para *Staphylococcus aureus* obtenida, es de 4.5 mg/mL, para *Escherichia coli* es de 25 mg/mL y para *Candida albicans* es de 4 mg/mL.

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. muestra un mayor efecto antibacteriano frente a bacterias gram positivas como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, en cuanto a bacterias gram negativas muestra un efecto antimicrobiano pero requiere una mayor concentración como es el caso de *Escherichia coli* la cual presenta menor sensibilidad.



ABSTRACT

The present research had as a main objective the determination of the antimicrobial effect in vitro of *Equisetum giganteum* L. (horsetail), on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* that was held at the Catholic University of Santa María. It was proceeded to make the extractions, which were performed by the method of percolation, it was worked with three soluble components, hexane (nonpolar solvent), ethyl acetate (polar aprotic solvent) and a hydro-alcoholic solvent (solvent protic), the identification of Secondary Components of the hydroalcoholic extract was performed by thin layer chromatography (TLC), for antimicrobial tests, the procedure was determined in vitro the minimum inhibitory Concentrations (MIC) by the dilution method tube; Minimum Bactericidal Concentrations (CBM) by the agar plating method, on the following Gram Positive, Gram negative and yeast referred. It was used 12 strains of each species from different sources, Honorio Delgado Hospital, Suiza Lab Laboratory, and Ames Laboratory Llerena, which properly have been identified biochemically.

It was obtained the hydroalcoholic extract with an higher percentage yield, presenting a result of 46.8%, about the identification of secondary components, it was identified the presence of alkaloids, terpenoids, flavonoids and tannins.

The Minimum Inhibitory Concentrations (CIM) obtained for *Staphylococcus aureus* is 3.5 mg / ml, *Escherichia coli* is 15 mg / ml and *Candida albicans* is 3 mg / ml. Also minimum bactericidal Concentration (MBC) obtained for *Staphylococcus aureus* is 4.5 mg / ml, *Escherichia coli* is 25 mg / ml and *Candida albicans* is 4 mg / ml.

The results obtained showed that the hydroalcoholic extract of *Equisetum giganteum* L. Sample shown a higher antibacterial effect against Gram positive bacterias like *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*, about Gram negative bacterias it shown an

antimicrobial effect but requires a higher concentration like is the case with *Escherichia coli* which presents less sensitive.



INTRODUCCIÓN

En estos últimos tiempos las plantas han constituido un valioso recurso en los sistema de salud en nuestra sociedad, sobre todo en el Perú, por su gran diversidad de flora, siendo este el factor que brinda una fuente inagotable de información sobre los diferentes usos que se les dan a múltiples especies vegetales con fines curativos tomando un papel muy importante en el área terapéutica debido a que el estudio de las plantas medicinales se está intensificando con la finalidad de descubrir y crear nuevos antibióticos también quimioterapicos y terapias alternativas. ⁽¹⁾

El objetivo de múltiples investigaciones científicas, fueron demostrar experimentalmente algunos efectos terapéuticos atribuidos a estas plantas, como las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antimicóticas; teniendo una alternativa viable para combatir las infecciones que afectan al organismo humano, provocadas por microorganismos patógenos como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, etc.

Una de las alternativas y quizás la de mayor interés a nivel mundial en nuestros días es la que nos brinda *Equisetum giganteum* L. (Cola de Caballo), al ser una de las plantas silvestres más utilizada como planta medicinal desde la antigüedad. Los componentes de esta especie vegetal demuestran ejercer un efecto diurético, sin provocar pérdida significativa de electrolitos ^(2,3)

Además, Inhibe la osteoclastogénesis (destrucción del hueso) y favorece la ostegénesis (formación del hueso), por lo que es útil para potenciar la regeneración del hueso y en el tratamiento de la osteoporosis, así también se sabe que modula la función de las células inmunocompetentes, ejerciendo efecto antiinflamatorio y analgésico, por otro lado reduce la glucosa en sangre, por lo que es útil como antidiabético. ⁽⁴⁾

El presente trabajo de investigación pretende demostrar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo), empleando el método de extracción por percolación, para poder alcanzar un mayor porcentaje de rendimiento y extractos libres de solventes con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tuvo como fin alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo General

Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de, *Equisetum giganteum l.* (Cola de caballo) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Objetivos Específicos

1. Obtención del extracto de mayor porcentaje de rendimiento utilizando diferentes solventes.
2. Caracterizar por cromatografía de capa fina para obtener metabolitos secundarios del extracto obtenido del *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo).
3. Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*
4. Determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*



HIPÓTESIS

Debido a que existe referencia sobre el uso en medicina tradicional de especies vegetales como *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo) ya que se le atribuye actividad antimicrobiana es probable que el extracto hidroalcohólico de esta especie tenga un efecto antimicrobiano sobre, *Staphylococcus aureus*, *Escherichica coli*, *Candida albicans*



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *Equisetum giganteum* L. (COLA DE CABALLO)

El género *Equisetum*, perteneciente a la familia *Equisetaceae*, está constituido en la actualidad por 15 especies conocidas vulgarmente como “colas de caballo”, que son plantas vasculares, pertenecientes a la división Equisetophyta, que se reproducen sexualmente por medio de esporas⁽⁵⁾

1.1 Descripción botánica

Equisetum giganteum L. es una planta palustre, rizomatosa. Su tallo aéreo puede medir hasta 5 m. de altura, erecto verde oscuro, cilíndrico, fistuloso, nudoso, áspero, con estrías longitudinales en alto relieve por la presencia de sílice. Ramas verticiladas, divaricadas, articuladas en segmentos que nacen por debajo del collar o vaina dejando visible en parte la ocreola, de epidermis rugosa. Hojas pequeñas y escumiformes, agrupadas en verticilos sobre los nudos, soldadas por sus bases, se encuentran formando un collar o vaina que rodea

completamente al tallo, inmediatamente por encima de los nudos; cada hoja tiene un único nervio que forma una costilla central y presenta estomas en su epidermis interior. Normalmente las hojas son verdes cuando jóvenes, pero se van decolorando y blanqueando con la edad, por lo que la función fotosintetizadora corre a cargo del tallo. Órganos reproductores formando una espiga fructífera, estrobiliforme, cilíndrica, apiculada, sésil en el extremo de las ramas, con un involucro de escamas en su base, de 5-20 mm de largo por 3-6 mm de diámetro (ver Figura 1).⁽⁶⁾



Figura 1. *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo).

1.2 Etimología

El nombre genérico *Equisetum* procede del latín *equus* que significa "caballo" y *seta* que significa "cerda" o "pelo", el nombre latino se adoptó del griego que en castellano se traduce como "cola de caballo".⁽⁷⁾

1.3 Taxonomía

En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica correspondiente a *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo).⁽¹⁹⁾

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Cola de caballo

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| Nombre Científico | <i>Equisetum giganteum L.</i> |
| Reino | Plantae |
| Phylum | Pteridophyta |
| Clase | Equisetopsida |
| Orden | Equisetales |
| Familia | Equisetaceae |
| Género | Equisetum |
| Epíteto Específico | Giganteum |
| Autor Epíteto Específico | L. |

1.4 Hábitat y distribución geográfica

Es una planta que crece en lugares húmedos, lechos de río, a lo largo de canales, en fosos, etc. Principalmente en lugares despejados, por otro lado también se ha encontrado que a veces invade en forma intensa los bosques artificiales de álamos, que son frecuentes en Chile central, en sitios húmedos, Cuba, Jamaica y Haití, sur de México, América Central hasta Chile, Perú-Arequipa y Argentina. ^(7,8)

1.5 Antecedentes terapéuticos

Respecto de sus propiedades medicinales, tradicionalmente es empleada como diurético, mediante el uso por vía oral de extractos acuosos. Otras aplicaciones aprovechan sus múltiples efectos como astringente; cicatrizante, y en el tratamiento de diversos procesos dermatológicos, además es empleada como antidiarreico, tratamiento de enfermedades hepáticas, enfermedades del estómago, hemorragias internas e infecciones del tracto respiratorio. ⁽⁹⁾

1.6 Composición química

Contiene ácidos (aconítico, cafeico, ferúlico, hidroxibenzoico, silícico, oxálico, málico, gálico, cumárico), glucósidos saponínicos (equisetonina), flavonoides (galutolina, dihidroquercetina, equisetrina, naringenina), alcaloides (nicotina, palustrina), β - sitosterol, taninos,(cianidina y perlagonidina), sales minerales (sílice, potasio).^(11,12)

1.7 Posología

Se puede usar la droga pulverizada o en infusiones, extracto fluido y tinturas. También se recomienda asegurar un correcto aporte de agua para evitar deshidrataciones.

Se sabe que se puede hacer una decocción al 5% para ser usado como diurético siendo la dosis 50-200 mL/día y como hemostático hasta 500 mL/día. En tintura de 30 g de tallos macerados en 500 mL de alcohol de 90 °, a razón de 1 cucharada por día en la mañana.

Como extracto fluido se prescribe en una dosis de 1 a 4 mL tres veces al día, en polvo cuando se desea obtener un efecto remineralizante se recomienda utilizar el polvo seco de la planta en dosis 1 a 2 g/día antes de cada comida principal. Para su uso externo como loción capilar se emplea la infusión al 5-10 %.⁽¹³⁾

1.8 Referencias toxicológicas

Hasta el momento no existe evidencia científica que demuestre que el consumo de la planta Cola de caballo en dosis adecuadas, produzca efectos tóxicos en las personas. Sin embargo, no se recomienda el consumo de cualquier preparado con base en esta planta, durante el embarazo y la lactancia. La cola de caballo posee dentro de su composición una gran cantidad de sustancias que pueden desencadenar algún efecto tóxico, por lo que no se recomienda en absoluto, abusar de esta especie, para obtener beneficios medicinales. Dentro de la composición de la planta de cola de caballo se encuentran alcaloides, como la nicotina, que en acumulación excesiva en el organismo, podría ocasionar malestares en general, dolor de cabeza, desordenes nerviosos, disfagia, cefalea, tenesmo y pérdida de apetito.⁽¹³⁾

2. EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos son preparados concentrados obtenidos por el tratamiento de productos vegetales con solventes adecuados, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta seca o fresca ⁽¹⁸⁾

El extracto vegetal puede ser líquido, semisólido o en polvo y se puede obtener por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos, a partir de una fuente vegetal y puede ser utilizado en cualquier campo de la tecnología ⁽¹³⁾

Cuando la materia vegetal seca o fresca se pone en contacto con el solvente empieza un proceso opuesto al del secado, es decir, se reconstituye el estado original de la célula. El proceso extractivo empieza cuando el solvente penetra en la célula, logrando sacar el aire contenido en el citoplasma, de esta manera se consigue el aislamiento de metabolitos secundarios. ⁽¹⁶⁾

2.1 Métodos de Extracción

Los métodos de extracción permiten obtener los productos en formas farmacéuticas adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que se recomiende.

Los procesos de extracción consisten en la separación de las sustancias biológicamente activas de los materiales inertes o inactivos de una planta, a partir de la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado; donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (el extracto) y el residuo (el bagazo). ⁽¹⁸⁾

En la extracción continua con disolventes o también conocida como dinámica el disolvente utilizado para la extracción se hace pasar por la droga, arrastrando a los principios activos de un paso. Este proceso permite extraer casi por completo los compuestos químicos presentes en la droga. En la Figura 2 se puede observar algunos métodos de extracción ^(13,16)

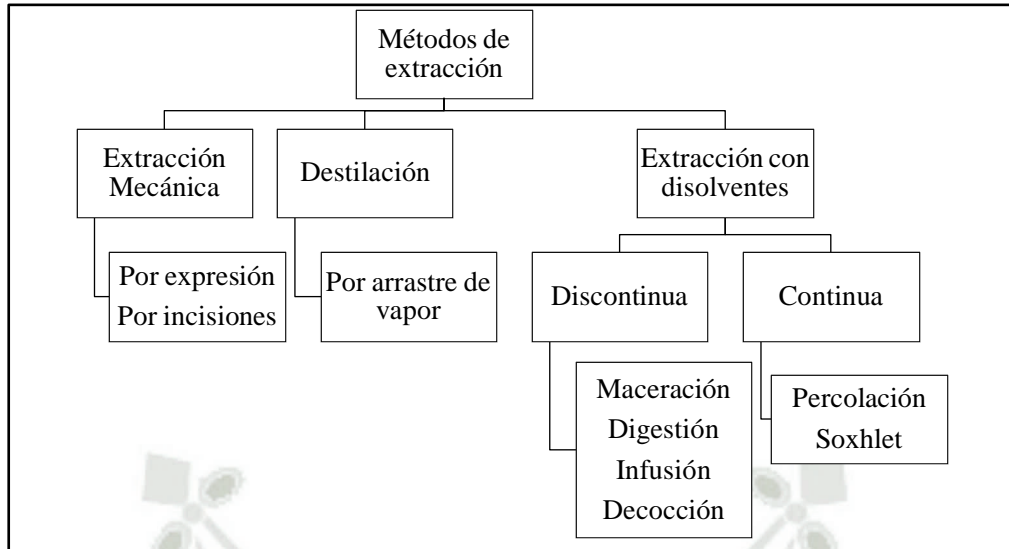


Figura 2. Métodos de extracción

2.2 Método de extracción por percolación

La droga se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte inferior. Constantemente se adiciona disolvente puro por la parte superior de la columna, de tal manera que se compensa la cantidad de disolvente que sale por la parte inferior. En la Figura 3 se puede observar un modelo de sistema de percolación⁽¹⁷⁾

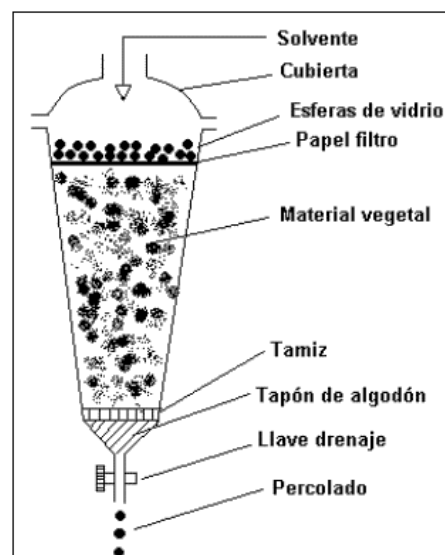


Figura 3. Sistema de percolación

2.3 Selección del solvente

Es de gran importancia la elección del solvente, se recomienda un solvente con un mejor balance de diversas características deseables, alto límite de saturación, una buena selectividad con respecto al soluto por extraer, que tenga una gran capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en cuanto a las condiciones del proceso, baja viscosidad, facilidad y recuperación de la corriente de extracto y bajo costo.^(18,20)

3. USO DE AGENTES PATÓGENOS

Las sustancias naturales se han utilizado desde épocas antiguas, como sustancias aromáticas y como preservantes. Sin embargo, estas cubren un amplio espectro de actividades tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos y biocidas contra una amplia gama de organismos como: bacterias, hongos, virus, protozoos e insectos.⁽²⁴⁾

3.1 *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos en racimos irregulares, inmóviles no formadores de esporas, sin cápsula, catalasa positiva y aerobios facultativos, poseen alta tolerancia al NaCl. Los antígenos constituyen la proteína A específico.

S. aureus produce enzimas extracelulares como la coagulasa, estafilocinasa, nucleasa, lipasa y hialuronidasa. Por otro lado las colonias de *Staphylococcus aureus* son redondas de 1-4 mm, de diámetro lisas, elevadas y resplandecientes de color gris o amarillo dorado intenso.⁽²²⁾

3.1.1 Patología

Staphylococcus aureus causa infecciones piógenas en lactantes y niños, en la piel puede producir celulitis, furúnculos, pústulas, impétigo e infecciones postoperatorias. Si la lesión es severa las bacterias pasan las barreras locales de la lesión llegando a los ganglios linfáticos y al torrente sanguíneo en donde se multiplica causando necrosis.

Produce intoxicación alimenticia: náuseas, vómitos, diarrea y a menudo shock. Se asocia con enteritis, osteomielitis, pioartritis, bacteremia y endocarditis.

3.1.2 Tratamiento

Con derivados semisintéticos de penicilina, el tratamiento quimioterapéutico con administración simultánea de dos o más medicamentos. En las infecciones estafilocócicas supurativas, el tratamiento adecuado es el drenaje.^(21,22)

3.2 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, produce endotoxinas, fermenta la lactosa y glucosa, positivos al indol, no tienen cápsula, presentan movilidad por la presencia de flagelos. Las cepas lisas forman colonias incoloras, convexas y brillantes, pero al ser subcultivadas se convierten en cepas rugosas que forman colonias granuladas y opacas.

3.2.1 Patología

La encontramos en el intestino grueso, causan enfermedad intestinal primaria así como infección extra intestinal. Es un microorganismo que puede desplazarse del conducto intestinal al tracto urinario y a los riñones por vía hematológica o linfática presentando con mayor frecuencia procesos patológicos en el tracto urinario.

3.2.2 Tratamiento

Para el tratamiento de diarrea se usa el manejo del equilibrio líquido y electrolítico. La diarrea infantil se controla con antibióticos como sulfamidas, ampicilina, cefalosporina, tetraciclinas, carbencelinas, colistina, gentamicina, kanamicina y aminoglucósidos; para infecciones urinarias, se utiliza nitrofurantoina, ácido nalidíxico y sus derivados.^(23,24)

3.3 *Cándida albicans*

Cándida albicans, Son levaduras que pueden producir pseudohifas e hifas verdaderas, colonias elevadas de coloración cremosa y opaca, de 1 a 2 mm de diámetro aproximadamente. Las levaduras macroscópicas son elipsoides o esféricas con brotes de 3-6 μm de tamaño; en medios sin carbohidrato fermentable *Candida albicans* crece como

levadura por gemación mientras que en medios sin carbohidrato fermentable y en condiciones semi anaerobias la levadura se alarga formando un pseudo micelio. ⁽²⁹⁾

3.3.1 Patología

Causa infecciones en la piel, mucosas y uñas. La candidiasis de la mucosa presenta lesiones únicas y una pseudo membrana blanquecina que puede cubrir la lengua, paladar blando y mucosa oral. La candidiasis cutánea ataca los pliegues inter triginosos de la piel, la región vulvo vaginal y los genitales. ⁽³¹⁾

3.3.2 Tratamiento

El ácido propiónico saturado como también sus sales de sodio y zinc se usa para tratar micosis de la ingle y uñas. El tratamiento más indicado para la infección por *C. albicans* es la nistatina y la anfotericina B, antibióticos poliénicos e imidazoles, ketoconazol, fluconazole por vía oral y miconazol por vía intravenosa. ⁽²⁷⁾

4. MÉTODOS DE DILUCIÓN

4.1 Macro-dilución en caldo

Las primeras determinaciones se realizaron empleando una cantidad considerable de tubos con caldo de cultivo, a los cuales se le colocaban diluciones crecientes de antibióticos con el mismo fundamento que el descrito para el método de dilución en agar.

Este procedimiento se denominó macro dilución en caldo. Se realizan con el fin de determinar la CMI. Para ello se preparan una serie de tubos (dilución en caldo) inoculados con un determinado volumen del medio de cultivo que contiene concentraciones progresivas y crecientes del antimicrobiano a ensayar; sobre ellos se adiciona el inóculo bacteriano. Tras un período de incubación establecido, se considera el tubo de la serie donde no existe crecimiento; la concentración del antimicrobiano en ese lugar corresponde la CMI. ⁽²⁶⁾

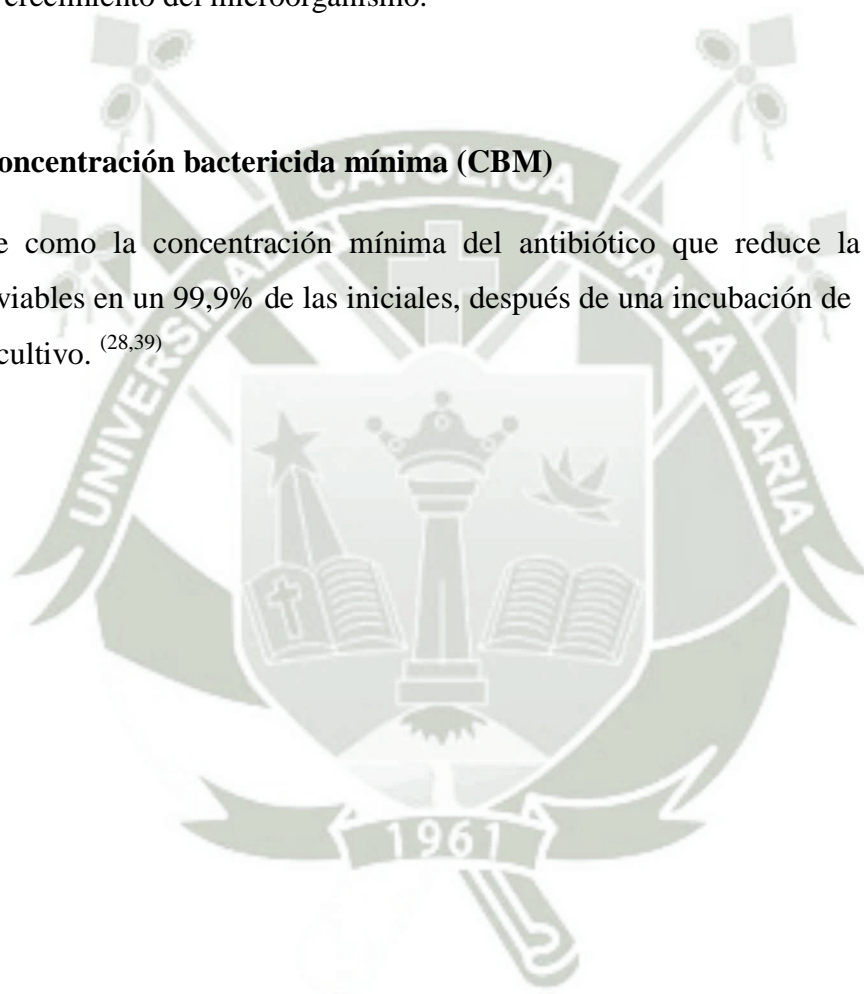
4.1.1 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Es posiblemente la técnica más adecuada para el estudio de la sensibilidad. Se define como la concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano visible en un periodo de 16-24 horas, de un inóculo estándar del microorganismo con una serie de diluciones del antibiótico en un caldo de agar.⁽³⁷⁾

De esta forma se conocerá la concentración del antibiótico que se debe conseguir para inhibir el crecimiento del microorganismo.

4.1.2 Concentración bactericida mínima (CBM)

Se define como la concentración mínima del antibiótico que reduce la población de colonias viables en un 99,9% de las iniciales, después de una incubación de 16-24 horas en caldo de cultivo.^(28,39)





CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1 TIPO DE ESTUDIO

Según el nivel de conocimiento científico, es un tipo de estudio experimental, prospectivo, In vitro.

2 MATERIAL BIOLÓGICO Y AMBIENTE UTILIZADO

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se obtuvieron materiales biológicos como; cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans* procedentes del Hospital Honorio Delgado, laboratorio Suizalab y Laboratorios Llerena Ames, las cuales se trabajaron a diferentes concentraciones, así como, extractos de *Equisetum giganteum L.* (Cola de caballo). Por otro lado los ensayos fueron realizados en los laboratorios H-103 y H-402 de la Universidad Católica de Santa María.

3 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1 Equipos de Laboratorio

- Autoclave (P Selecta).
- Balanza analítica (DAKOTA).
- Baño María (Cimatec).
- Cocina eléctrica
- Estufa (J P Selecta).
- Lámpara de luz ultravioleta (CAMAG-CA004)
- Refrigerador (BOSCH-KDN43).
- Mechero Bunsen.

3.2 Reactivos

- Ácido acético JT Baker, P.A
- Acetato de Etilo Merck, P.A
- Ácido Fórmico JT Baker
- Ácido sulfúrico concentrado Merck, QP
- Lauril Sulfato de sodio Merck
- Etanol JT Baker, P.A
- Hexano JT Baker, P.A
- Metanol JT Baker, P.A
- Reactivo de Dragendorft A y B
- Reactivo de Liebermann Burchard
- Reactivo de Cloruro de Aluminio
- Reactivo de Cloruro Ferrico
- Tolueno
- Vainillina

3.3 Material de Vidrio

- Baguetas.
- Balón
- Cubetas cromatografías
- Capilares
- Frascos de color ámbar
- Matraz Erlenmeyer .
- Laminas portaobjetos
- Luna de reloj
- Pipetas Pasteur
- Pipetas
- Probetas
- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado

3.4 Medios de Cultivo

- Agar Mac Conkey
- Agar Mueller Hilton (Merck).
- Agar Manitol Salado
- Agar Citrato de Simons
- Agar Saboraud
- Agar lisina Hierro (LIA)
- Agar triple azúcar Hierro (TSI)
- Caldo Peptona.
- Caldo MRVP

3.5 Otros

- Algodón
- Asa de kolle
- Barbijo
- Espátula
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes quirúrgicos
- Papel filtro
- Papel kraft
- Pinzas
- Papel aluminio



4 MÉTODOS

4.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL, *Equisetum giganteum* L. (COLA DE CABALLO)

La especie en estudio *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo) fue recolectada en los meses de Enero a Abril, en el valle de Vítor en la ciudad de Arequipa (ver Figura 4).

El proceso de recolección fue realizado manualmente en el valle de Vítor, acondicionando las muestras en bolsas de papel adecuadas para ser trasladadas a la Universidad Católica de Santa María.



Figura 4. Muestras de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo)

Una vez recolectadas y lavadas se procede a fraccionar en partes pequeñas para lograr un mejor secado para una posterior extracción. La desecación se realizó en la estufa a una temperatura de 40 °C por 18 horas.

4.2 EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO DE PERCOLACIÓN

El proceso de extracción únicamente separa a las sustancias, o porciones solubles, de tejidos vegetales o animales respecto de los componentes insolubles, estos principios activos pueden ser disueltos por afinidad en un líquido o una mezcla de líquidos conocidos como solventes o líquidos extractores.

Procedimiento

Se pesaron 30 g de ramas de *Equisetum giganteum* L, luego se llevaron a tres sistemas de percolación ámbar, con la parte superior cubierta de papel filtro y perlas de vidrio. Luego se agregaron 300 ml de solvente hidroalcohólico, hexano y acetato de etilo a cada sistema. Pasado un tiempo de contacto adecuado se procede a recolectar los extractos a un flujo de 20 gotas por minutos aproximadamente usando un equipo de venoclisis, ver Figura 5.



Figura 5. Sistemas de percolación usando solvente hidroalcohólico, hexano y acetato de etilo.

4.3 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN

El porcentaje de rendimiento de extracción (% RE) o el porcentaje de sólidos solubles, se fundamenta en determinar la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto obtenido.

Para determinar el rendimiento los extractos fueron llevados a un rotavapor (ver Figura 6) con la finalidad de obtener un extracto semiseco, posteriormente los extractos fueron transferidos a balones de fondo plano previamente tarados, en el caso del extracto con hexano y acetato de etilo se llevaron a Baño María hasta sequedad total. Finalmente se pesaron los balones y se determinó el porcentaje de rendimiento.



Figura 6. Rotavapor

Para calcular el porcentaje de rendimiento se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% RE = \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso planta seca}} \times 100$$

4.4 MÉTODO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

Una vez obtenida la determinación de porcentaje de rendimiento de los tres extractos, se procede a seleccionar el de mayor rendimiento para continuar con los ensayos de identificación por cromatografía en capa fina (CCF).

Para la identificación general de los componentes de la muestra se colocó un volumen adecuado de fase móvil en cubas cromatográficas, se esperaron un tiempo de 30 minutos para garantizar la saturación del medio. Por otro lado se procedió a realizar el sembrado del extracto en las placas de sílica gel (fase estacionaria) y fueron puestas en contacto con la fase móvil hasta que su ascenso este aproximadamente a un centímetro del extremo superior de las placas. Una vez secas se procedió a llevar las placas a luz UV y a identificación con reveladores químicos.

4.4.1 Identificación de terpenos:

Para la identificación de terpenos se utilizó una fase móvil de tolueno de acetato de etilo (90:10) y se usó el relevador Liebermann-Burchard además se observaron a 254 nm.

4.4.2 Identificación de taninos

Para la identificación de taninos se utilizó una fase móvil de metanol: agua (90:10), y se usó como revelador cloruro férrico al 5% en etanol.

4.4.3 Identificación de flavonoides

Para la identificación de Flavonoides se utilizó como fase móvil acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:24), y como revelador cloruro de aluminio al 5% para luego identificar los flavonoides a una longitud de onda de 254 nm.

4.4.4 Identificación de alcaloides

Para la identificación de Alcaloides se utilizó una Fase móvil de ácido acético: metanol: agua (70:10: 20) como revelador al reactivo de Dragendorf.

4.5 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE REFERENCIA (R_f)

Es un número que permite identificar sustancias considerando las distancias recorridas en un cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene un R_f único y específico.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

4.6 PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CLÍNICAS EN ESTUDIO

Las cepas aisladas en estudio *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Candida albicans*, en la cantidad de 4 unidades fueron obtenidas de distinta procedencia, Hospital General, Laboratorio Suiza Lab y Laboratorio Llerena ames.

Para conservar las cepas clínicas se realiza la conservación y replicación de cepas utilizando diferentes medios de cultivo como:

- Agar Mac conkey para la replicación de *Escherichia coli*,
- Agar selectivo manitol salado para *Staphylococcus aureus*.
- Agar Nutritivo para *Candida albicans*.

Estos medios de cultivo (ver Figura 7) tienen la finalidad de mantener la viabilidad de las bacterias, conservando sus características fisiológica, morfológicas.



Figura 7. Conservación de cepas clínicas.

Los procedimientos de cultivo y replicación deben ser considerados de acuerdo con la naturaleza de cada muestra, de los microorganismos que se investigan y de la flora saprofita o patógena que se puede encontrar. El uso de medios de cultivo adecuados debe brindar como resultado, el rápido crecimiento de microorganismo viable que, directamente o mediante posteriores resiembra, formaran colonias aisladas disponibles para su estudio.

4.6.1 Identificación de *Staphylococcus aureus*

Para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* se utilizó el medio de cultivo selectivo para *Staphylococcus* manitol salado, al final se observa un crecimiento de color amarillo característico de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente se procede a realizar una tinción Gram donde se observa colonias Gram positivas en racimos. (Pares o cadenas). Por otro lado se realizó la prueba de la catalasa permitió diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativos).⁽²¹⁾

Pruebas de diferenciación bioquímica:

- **Prueba de la coagulasa en porta objeto:** el fibrinógeno presente en el plasma al entrar en contacto con la enzima coagulasa del *Staphylococcus aureus* provoca su aglutinación. Dando así coagulasa positiva.
- **Prueba de la coagulasa en tubo:** La enzima coagulasa que presenta la bacteria al entrar en contacto con el plasma va a activar los factores de coagulación produciéndose así un coagulo visible en el medio. Dando coagulasa positiva.
- **Fermentación del manitol:** El consumo de manitol por *Staphylococcus aureus* hace virar el color del indicador presente del medio a amarillo lo que se interpreta como manitol positivo.
- **Prueba de la catalasa:** Al entrar en contacto el H₂O₂ con la enzima catalasa va descomponer al mismo, ocasionando la aparición de burbujas de gas que la reacción es positiva.

4.6.2 Identificación de *Escherichia coli*

La Identificación se realizó mediante pruebas microbiológicas de identificación específicas para *Escherichia coli*; el medio Mac Conkey fue seleccionado para conservación y selectividad de esta bacteria.

- **Triple azúcar hierro (TSI):** Al haber el consumo de los tres azúcares presentes en este medio va ocasionar el viraje del indicador rojo neutro a una coloración amarilla (pico y fondo) (A/A) con o sin producción de CO₂.

- **Agar Lisina Hierro (LIA):** *Escherichia coli* va a presento una coloración morada del medio (K/K) por lo que indica la descarboxilacion de la lisina (positiva).
- **Prueba de Indol:** La formación de un anillo de color grosella después de haber agregado el reactivo de kovacs nos dará una prueba de Indol positiva para *Escherichia coli* lo que quiere decir que dicha bacteria posee la enzima triptófano.
- **Rojo de Metilo–Voges Proskawer:** La prueba de rojo de metilo es positiva ya que se desarrolló un color rojo estable esto indica que el microorganismo fermento la glucosa por la vía de los ácidos mixtos.
- que la prueba de **Voges Proskawer** es negativa ya que se observa una coloración amarilla lo cual nos indica que no hay presencia de Acetilo.
- **Citrato de Simmons:** se observa una coloración verde lo que indica que no hay consumo o utilización de citrato como fuente de carbono por lo tanto la prueba es negativa.

4.6.3 Identificación de *Candida albicans*

La identificación para hongos como *Candida albicans*, se realizó mediante pruebas microbiológicas de identificación específicas.

- **Prueba de tubo germinativo:**
La prueba del tubo germinal, conocida también como prueba de filamentación en suero o filamentación precoz, Sólo *Candida albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *Candida tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *Candida albicans* del resto de las especies de Cándida, aunque no está exenta de falsos negativos.

4.6.5 Tinción de Gram

La Tinción diferencial requiere el uso de más de un reactivo químico, la cual se aplica en secuencia a un frotis fijado por calor, El primer reactivo es llamado colorante primario la función que cumple es impartir color a todas las células, Con el objetivo de establecer un contraste de color, el segundo reactivo es un agente decolorante, él tiene la finalidad de

decolorar la célula completa o solo parte de ella. El tercer reactivo, llamado también el colorante de contraste, le da a las células decoloradas un color que contrasta con el del colorante primario. El colorante de contraste no puede ser absorbido por células que no han perdido el colorante primario. Donde podemos diferenciar bacterias gran positivas de gran negativas, es esencial para la diferenciación y clasificación de microorganismos, su finalidad de la reacción de tinción está basada en la diferencia que se da en la composición química de la pared celular bacteriana de tal forma que las bacterias Gram positivas presentan una coloración azul-morado, y las bacterias Gram negativas nos da la presencia de una coloración rosa o rojo grosella.

Procedimiento

- Colocar una gota de suero fisiológico y una colonia de bacteria, sobre una lámina portaobjetos, haciendo un movimiento de disgregue sobre la lámina portaobjeto.
- Se deja secar a temperatura ambiente o pasando por llama suavemente con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Colocar la lámina portaobjeto sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta por un minuto. Luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño
- Cubrir el preparado con Iodo de Gram, durante un minuto, en seguida lavar con agua de caño
- Bañar la superficie de la lámina portaobjeto con el decolorante acetona-alcohol (10 segundos).
- Cubrir la superficie con safranina durante un minuto, lavar con agua de cano.
- Secar al aire libre, se lleva al microscopio con aceite de inmersión y cubreobjetos, observa al microscopio e interpretar. ⁽³⁹⁾

5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HIDRO-ETANOLICO DE *Equisetum giganteum* L. (COLA DE CABALLO)

5.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA

Prueba de sensibilidad antimicrobiana

5.1.1 Método de dilución en tubo

La prueba por dilución en tubo se basa en exponer a las cepas de interés en estudio a diferentes concentraciones de antimicrobianos en un medio líquido (caldo de cultivo). Cada agente antimicrobiano se prueba a diferentes rangos de concentraciones, el rango de concentraciones es probada para cada antimicrobiano. ⁽³⁷⁾

De tal forma que se identifica el tubo que ya no presenta turbidez, con el cual se puede determinar la concentración mínima (CIM) de la sustancia en estudio. Para concretar un resultado más concreto es necesario una la correcta visualización del crecimiento microbiano por lo que se procede a sembrar en placa. (CBM).

Se realizó una esterilización a todo el material que sea vaya a utilizar, material de vidrio, caldos de cultivo etc., para la esterilización se empleara la autoclave, equipo que se basa en el vapor a presión a 120C, 160 C por 30 min, ya que es un método muy eficaz, económico y seguro. ⁽⁵⁴⁾

5.1.2 Preparación de la solución Madre del extracto Hidroetanolico de *Equitum gigateum* L.

Se preparó una solución del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) obtenido por el método de extracción por percolación a una concentración de 10 mg/mL y de 100 mg/mL a esta soluciones le denominamos solución madre.

5.1.3 Preparación del Inoculo

Se preparó el inóculo donde se utiliza el mismo procedimiento para cada microorganismo en estudio, tomándose de 3 a 4 colonias de las placas, se inoculan en 5ml de caldo peptonado hasta que se asemeje a la turbidez del tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland (Anexo N°). Este enturbiamiento corresponde aproximadamente a 5×10^8 unidades

formadoras de colonia (UFC) por mililitro. Luego se procede a realizar una dilución 1/100 del inóculo para obtener una solución 10^6 UFC/mL

5.1.3 Preparación de diluciones

Se preparó las diluciones una vez que tenemos el extracto elegido de acuerdo a su porcentaje de rendimiento, elegimos el extracto hidroalcohólico. Las bacterias en estudio procedentes de diferentes lugares y con una cantidad de 12 bacterias de cada especie:

- *Staphylococcus aureus*, a una concentración 10mg/mL.
- *Escherichia coli*, a una concentración 100 mg/mL.
- *Cándida albicans*. A una concentración 10mg/mL.

Se agregó el inóculo en un volumen igual (1000 μ l) para cada uno de los tubo previamente codificados. Se añadió en cada tubo la cantidad determinada de solución madre del extracto de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo). Para luego agregar caldo peptonado para estandarizar los volúmenes de cada tubo, luego se procedió a incubar por 24 horas a 37 ° C para observar el crecimiento bacteriano. Una vez finalizado se observa la turbidez y ausencia de turbidez para la determinación del punto de quiebre. Éste procedimiento se repitió para cada uno de los microorganismos en estudio.

5.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA

5.2.1 Método de Macro dilución en Placa

La concentración bactericida mínima se trabaja después de obtener los resultados de la concentración inhibitoria mínima. Se procedió a realizar la siembra en placas a partir de los tubos sin turbidez, en los cuales se ha inhibido el crecimiento, luego se sembró en placas Petri con el agar nutritivo esterilizado a 37 ° C por 24 h. Luego se observó el crecimiento bacteriano. ^(28,54)

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se expondrán los resultados obtenidos en el cual se determinó el efecto antimicrobiano de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans*.

1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE *Equisetum giganteum* L.

En la Figura 8 se observa el extracto hidroalcohólico correspondiente a *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo) siendo sus características organolépticas color verde oscuro, olor suigeneris, sabor característico y aspecto denso.



Figura 8. Extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L.

2 ANÁLISIS FISCOQUÍMICO PROXIMAL

Tabla 2. Composición fisicoquímica proximal

| PARÁMETROS | PORCENTAJE (%) |
|------------------|----------------|
| Cenizas totales | 24.79 |
| Grasas totales | 8.80 |
| Humedad residual | 15.68 |
| Proteínas | 5.71 |

En la Tabla 2 se puede observar el análisis fisicoquímico de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo), realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, en el laboratorio de control de calidad.

3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE *Equisetum giganteum* L. (COLA DE CABALLO)

Una vez recolectada la muestra de *Equisetum giganteum* L., se obtuvieron extractos usando como solventes hexano, acetato de etilo e hidroalcohólico. Estas extracciones se llevaron a cabo por el método de percolación, tal y como se señaló en el capítulo anterior (ver Figura 5).

Una vez obtenidos los extractos estos fueron llevados a desecación a baño maría hasta la completa evaporación del solvente, obteniendo así el extracto seco correspondiente de cada uno de los solventes. En la tabla 3 se observa los porcentajes de rendimiento para cada extracto usando la siguiente fórmula.

Tabla 3. Rendimiento de los extractos de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo)

| SOLVENTE | EXTRACTOS | VEGETAL (g) | EXTRACTO SECO (g) | RENDIMIENTO (%) |
|-----------------------------|-----------|----------------|-------------------------|--------------------|
| HEXANO | Muestra 1 | 30 | 3.7319 | 12.44 |
| | Muestra 2 | 30 | 3.3574 | 11.19 |
| | Muestra 3 | 30 | 3.7361 | 12.45 |
| ACETATO DE ETILO | Muestra 1 | 30 | 5.914 | 19.71 |
| | Muestra 2 | 30 | 5.3512 | 17.84 |
| | Muestra 3 | 30 | 5.9158 | 19.72 |
| HIDROETANÓLICO | Muestra 1 | 30 | 14.0389 | 46.80 |
| | Muestra 2 | 30 | 14.0394 | 46.80 |
| | Muestra 3 | 30 | 14.0422 | 46.80 |

En la Tabla 3 se presenta el análisis estadístico descriptivo de los porcentajes de rendimientos de los 3 extractos de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo. Se puede observar que para los tres solventes empleados se realizaron tres repeticiones, en el caso de hexano se obtuvo un promedio de (12.03 ± 1.8) %, una desviación estándar de 0.7246 y un coeficiente de variación de 6.02 %, para el caso del acetato de etilo se obtuvo un promedio de (19.09 ± 2.69) %, una desviación estándar de 1.0825 y un coeficiente de variación de 5.67 % y para el caso hidroalcohólico se obtuvo un promedio de 46.8 %.

Así mismo el valor de sesgo estandarizado, para los tres solventes, se encuentra entre el rango aceptable de -2 y +2, lo cual indicaría que se tratan de datos que siguen una distribución normal por lo cual se procedió a realizar las pruebas estadísticas convencionales.

Tabla 4. Análisis estadístico descriptivo de los rendimientos (%) de los extractos de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) para cada tipo de solvente.

| | HEXANO | ACETATO DE ETILO | HIDROALCOHÓLICO |
|----------------------------|-------------|------------------|-----------------|
| Recuento | 3 | 3 | 3 |
| Promedio | 12.03+/-1.8 | 19.09+/-2.69 | 46.8+/-0.00 |
| Varianza | 0.5250 | 1.1719 | 0.0000 |
| Desviación Estándar | 0.7246 | 1.0825 | 0.0000 |
| CV (%) | 6.02% | 5.67% | 0.00% |
| Mínimo | 11.19 | 17.84 | 46.8 |
| Máximo | 12.45 | 19.72 | 46.8 |
| Rango | 1.26 | 1.88 | 0 |
| Sesgo Estandarizado | -1.2245 | -1.2246 | 1.7321 |

Para la selección del solvente a emplear en los métodos posteriores, se realizó el análisis estadístico de comparación ANOVA (Tabla 5). La probabilidad fue menor a 0.05 ($p < 0.05$) por lo cual se concluye que hay diferencia entre los porcentajes de rendimiento obtenidos en el tratamiento con los tres solventes.

Tabla 5. Análisis de varianza de los rendimientos (%) de los extractos de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo) para cada tipo de solvente.

| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----|---------------|----------------------|
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Proba bilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 2026.92 | 2 | 1013.46 | 179 | 4.67E-09 | 5.14 |
| Dentro de los grupos | 3.39 | 6 | 0.57 | | | |
| Total | 2030.31 | 8 | | | | |

Una vez obtenido los resultados por el análisis de varianza se procedió a realizar una prueba confirmatoria (Tukey) donde se confirma la diferencia entre grupos (ver Tabla 6).

Tabla 6. Información de agrupación Tukey

| | N | Mean | Grouping |
|-------------------------|---|--------|----------|
| Hidroalcohólico | 3 | 46.800 | X |
| Acetato de etilo | 3 | 19.090 | X |
| Hexano | 3 | 12.027 | X |

Fuente: Minitab

En la Figura 9 se puede observar la gráfica de caja y bigotes la cual muestra los promedios para cada tipo de solvente, así se ve para hexano un valor de (12.03 ± 1.8) % para acetato de etilo (19.09 ± 2.69) % y para el extracto con solvente hidroalcohólico (46.8 ± 0.00) %, con ello se puede concluir que el extracto hidroalcohólico presentó un mayor rendimiento respecto a los otros solventes empleados.

Tabla 7. Comparaciones múltiples para los rendimientos (%) de los extractos de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) para cada tipo de solvente según método de LSD Fisher

| Solvente | Promedio |
|------------------------|------------------|
| Hexano | 12.03 ± 1.80 |
| Acetato de etilo | 19.09 ± 2.69 |
| Hidroalcohólico | 46.80 ± 0.00 |

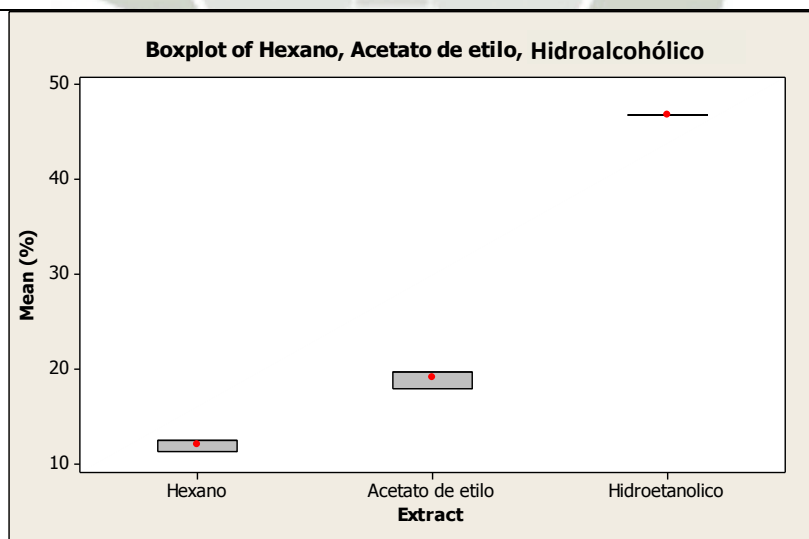


Figura 9. Promedios de los rendimientos (%) de los extractos de *Equicetun giganteum* L. (Cola de caballo) para cada tipo de solvente.

4 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).

Una vez obtenidos los extractos se realizó un análisis por cromatografía de capa fina, obteniéndose los siguientes resultados:

4.1 IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS

Para la identificación de terpenos se utilizó una fase móvil de tolueno: acetato de etilo (90:10) y como revelador a Liebermann-Burchard. La placa cromatografía (Figura 10) se puede observar en la Figura 10 en la cual se observa colores característicos siendo sus Rf de 0.25; 0.4; 0.438; 0.475 y 0.5 que pertenecen a la presencia de terpenos, bajo la luz UV a 254 nm presenta fluorescencia violeta - azulada con un resultado Rf igual a 0.5.



Figura 10. CCF para terpenos

Según Avila M. (2013), presenta el estudio de la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae), colectada en el páramo del nevado del Tolima, la cual cuenta con estudios químicos y farmacológicos, al igual que muchas otras especies de este ecosistema donde se realizaron análisis fitoquímicos a las porciones de mayor bioactividad obtenidas durante todo el proceso. Se observa que la acción

antibacteriana se incrementa al aumentar la simplicidad química del extracto y que terpenos y flavonoides están relacionados con la acción antibacteriana. Se trata del primer reporte, hasta la fecha conocido, de actividad antibacteriana *in vitro* para *D. tolimense*.⁽²⁵⁾

4.2 IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

Para la identificación de taninos se utilizó una fase móvil metanol: agua (90:10) y como revelador cloruro férrico al 5% en etanol. En la placa cromatografía (Figura 11) en la cual se observa colores característicos que pertenecen a la presencia de taninos (color verde a marrón), encontrándose manchas a Rf de 0.3902; 0.6219; 0.6463; 0.6707 y 0.6951.



Figura 11. CCF para taninos

Según estudios registrados la combinación de ensayos colorimétricos y técnicas cromatográficas permite obtener suficiente información sobre el perfil de polifenoles de *E. giganteum*. Como resultado, se determinó la presencia de cianidina y pelargonidina, provenientes de los taninos condensados procianidina y propelargonidina, respectivamente las identidades de éstos compuestos fueron asignadas teniendo en cuenta sus comportamientos cromatográficos (valores de Rf) frente a testigos puros y por comparación con bibliografía específica. También se realizaron los estudios de espectroscopía UV-visible, que permitieron obtener los espectros característicos para cianidina y pelargonidina. Siendo glucosidos fenólicos los cuales tienen efectos antimicrobianos, antisépticos urinarios.⁽⁴⁸⁾

4.3 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la identificación de flavonoides se utilizó una fase móvil acetato de etilo: acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:24) y como revelador cloruro de aluminio al 5 % en etanol. En la placa cromatografía (Figura 12) en la cual se observa colores característicos que pertenecen a la presencia de flavonoides ya que bajo la luz UV a 364 presenta fluorescencia verde - amarillenta y azulada siendo los valores de R_f de 0.25; 0.375; 0.5; 0.625 y 0.675.



Figura 12. CCF para Flavonoides

Según Stoliar (2007), estudios realizados en cuanto a la identificación de metabolitos secundarios mediante métodos de análisis cromatográficos, cromatografía en capa delgada (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto metanólico de *Equisetum giganteum*, demostraron resultado la identificación de tres flavonoides isoquercitrina, vitexina e isovitexina y dos compuestos derivados del fenilpropano: ácido clorogénico, ácido caféico. ⁽¹¹⁾

4.4 IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

Para la identificación de alcaloides se utilizó una fase móvil ácido acético: metanol: agua (70:10: 20) y como revelador al reactivo de Dragendorft. En la placa cromatografía (Figura 13) en la cual se observa colores característicos que pertenecen a la presencia de alcaloides (naranja), bajo la luz UV a 364 presenta fluorescencia naranja –amarillo con resultados Rf de 0.5263 y 0.56.

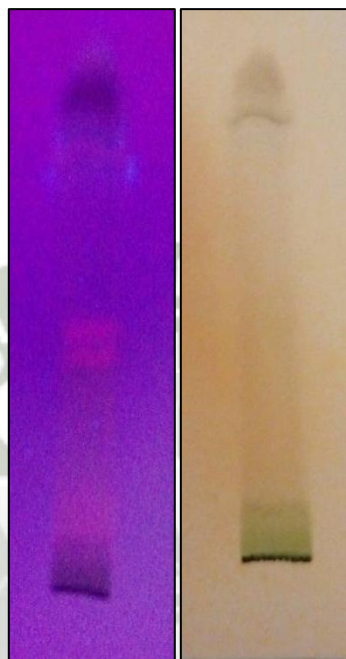


Figura 13. CCF para Alcaloides

Cesar M (2009) En cuanto a la actividad antimicrobiana la presencia de flavonoides y alcaloides, les confiere la actividad antibacteriana y actividad fúngica en el caso de los alcaloides.

La mayor resolución de inhibición se debe al extracto hidroalcohólico al flavonoide y alcaloide, con similar poder de inhibición contra bacterias gram positivas y gram negativas, la acción antimicrobiana se debería a que los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipita las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos.

La acción antibacteriana y antifúngica de los alcaloides se podría deber a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida⁽³⁴⁾

5 RESULTADOS DE CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Tabla 8. Resultados de Confirmación de Identificación Bioquímica

| <i>Staphylococcus aureus</i> | |
|---|--|
| Coloración Gram | Cocos Gram positivos en forma de racimos |
| Prueba de catalasa | Positivo |
| Prueba de coagulasa | Positivo |
| Manitol salado | Fermentación |
| <i>Escherichia Coli</i> | |
| Coloración Gram | Bacilos Gram Negativo |
| Agar Mac Monkey | Colonias rojas, Fermentadoras de la Lactosa |
| Triple Azúcar Hierro (TSI) | A/A+- |
| Agar Lisina Hierro (LIA) | K/K- |
| Caldo Peptonado (INDOL) | Positivo |
| Prueba de Rojo de Metilo-Voges Proskauer | RM(+) VP(-) |
| Agar Citrato De Simmons | Negativo |
| <i>Candida albicans</i> | |
| Tinción de Gram | Levaduras y pseudohifas Gram positivos |
| Examen directo | Presencias de levaduras y pseudohifas |
| Agar Sabouraud | Crecimiento de colonias lisas, ligeramente beige |
| Prueba del Tubo Germinativo | Presencia de tubos germinativos |

Fuente: Elaboración propia

En el presente cuadro, obtenidas las bacterias patógenas de distintas procedencias para obtener un resultado más concreto se procedió a identificar las cepas a través de diferentes pruebas microbiológicas y bioquímicas específicas para cada especie, como podemos observar en la tabla No 18 resultados de las pruebas realizadas frente a cada especie.

6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Determinado el Porcentaje de Rendimiento y el RF para cada uno de los extractos se procedió a la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima mediante método en tubos empleando en ellos el extracto hidroalcohólico previamente seleccionado por su porcentaje de rendimiento y su identificación de compuestos. La evaluación fue realizada sobre tres diferentes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida Albicans* para cada uno de ellos se obtuvieron los resultados mostrados a continuación.

Tabla 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para *Staphylococcus aureus* aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3.5 | 4 | 4.5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |

Donde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 9 se puede observar que para las bacterias 1,3 y 4 el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 5 y el 6 correspondiente a la concentración de 2,5 y 3 mg/ml respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3 mg/ml, para la bacteria 2 el punto de corte se encuentra entre los tubos 6 y 7 dando como concentración inhibitoria mínima 3,5 mg/ml para la bacteria en ensayo.

Tabla 10. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Staphylococcus aureus* aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |

Donde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 10 se puede observar que para las bacterias 2 y 3, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 5 y el 6 correspondiente a la concentración de 2,5 y 3 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3 mg/mL, para la bacteria 1 y 4 el punto de corte se encuentra entre los tubos 6 y 7 dando como concentración inhibitoria mínima 3,5 mg/mL para la bacteria en ensayo.

Tabla 11. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Staphylococcus aureus* aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames.

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |

Donde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 11 se puede observar que para las bacterias 1, 2 y 3, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 5 y el 6 correspondiente a la concentración de 2,5 y 3 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3 mg/mL, para la bacteria 4 el punto de corte se encuentra entre los tubos 6 y 7 dando como concentración inhibitoria mínima 3,5 mg/mL para la bacteria en ensayo.

Por otro lado en la Figura 14 se puede observar el grafico resumen de CIM relacionando el lugar de obtención.

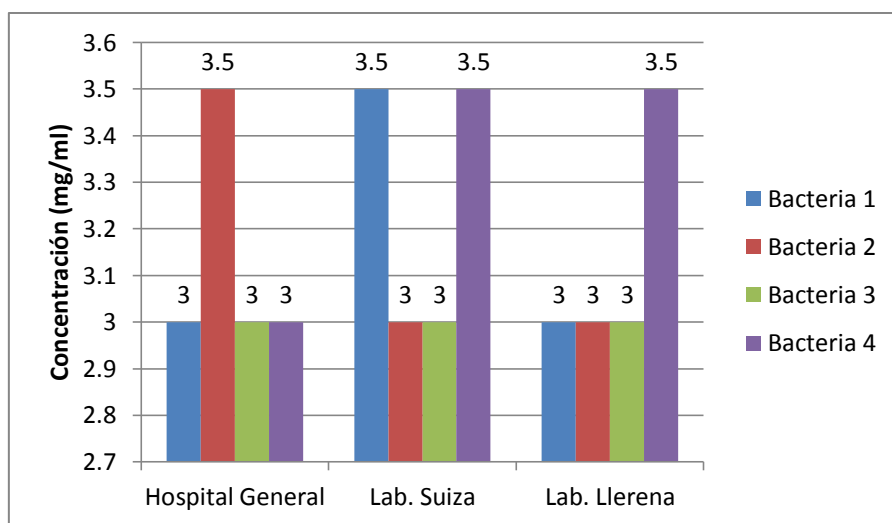


Figura 14. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hidroalcohólico de *Esquisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Staphylococcus aureus*.

Según Campos S, (2006) en su investigación para determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero), frente a *Staphylococcus aureus* el cual se realizó por el método de dilución en tubo, dando como resultado que los extractos alcohólicos de las especie estudiada presentaron una CMI de 8mg/ml siendo sus componentes principales los Flavonoides y Taninos (Cespedes J, 2004). Sin embargo en el presente proyecto se encontró que el extracto hidroetanólico de equicetum giganteum L. (cola de caballo) presento una CIM menor a 5 mg/mL presentaban lo cual indica que podría deberse a la presencia de sus componentes presentes como flavonides, taninos, acidos fenólicos, terpenos⁽³⁰⁾

Otro proyecto evaluado Según Gil quien determino la actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas entre ellas Estaphylococcus aureus. Dicha cepa clínica se expuso a distintas concentraciones de tintura de propóleos durante 24 horas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) utilizando el método de macro-dilución en tubos. Obteniéndose como resultado una CMI de 5mg/mL y CMB de 6mg/mL, demostrando que la tintura de propóleos tiene efecto bacteriostático y bactericida in vitro en las cepas estudiadas. Por otro lado en el presente proyecto se encontró una CMI de

3.5mg/mL y CMB de 4.5 mL aproximadamente para una especie similar a la estudiada por Gil lográndose mejores resultados con *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo).⁽³⁶⁾

Tabla 12. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Escherichia coli* aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Sol 100 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo(mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

Donde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 12 se puede observar que para las bacterias 2, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 1 y el 2 correspondiente a la concentración de 5 y 10 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 10 mg/mL, para la bacteria 1, 3y 4 el punto de corte se encuentra entre los tubos 1, 3 y 4 dando como concentración inhibitoria mínima 15 mg/ml para la bacteria en ensayo.

Tabla 13. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Escherichia coli* aislado de pacientes del Laboratorio SuizaLab.

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 100 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Donde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 13 se puede observar que para las bacterias 1, 2 y 3, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 2 y el 3 correspondiente a la concentración de 10 y 15 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 15 mg/ml, para la bacteria 4 el punto de corte se encuentra entre los tubos 1 y 2 dando como concentración inhibitoria mínima 10 mg/mL para la bacteria en ensayo.

Tabla 14. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Escherichia coli* aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames.

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Sol 100 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Donde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 14 se puede observar que para las bacterias 1 y 2, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 2 y el 3 correspondiente a la concentración de 10 y 15 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 15 mg/mL, para la bacteria 3 y 4 el punto de corte se encuentra entre los tubos 1 y 2 dando como concentración inhibitoria mínima 10 mg/mL para la bacteria en ensayo.

Así mismo en la Figura 15 se puede observar un gráfico resumen de la CIM para *Escherichia coli*.

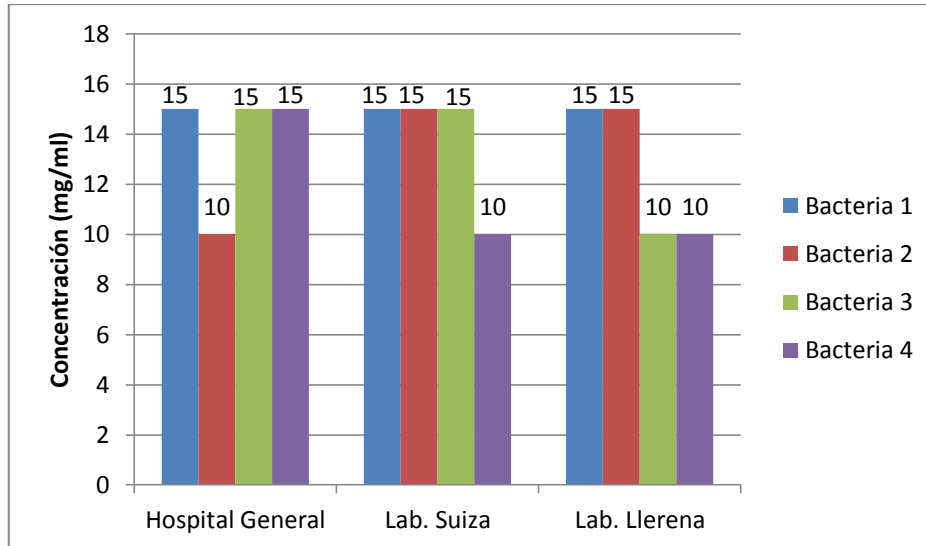


Figura 15. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hidroalcohólico de *Esquisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Escherichia coli*

Según Centurión H.(2013), en su investigación, buscó alternativas para la prevención y tratamiento de infecciones de origen alimentario, usando extractos crudos de dos palmas (*Astrocaryum mexicanum* Liebm. ex Mart. Y *Chamaedorea cataractarum* Mart) contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó mediante el método de dilución en caldo y la concentración mínima bactericida (CMB) por sembrando las diluciones sin turbidez para observar la presencia de colonias bacterianas encontrándose que los extractos etanólicos de las especies estudiadas no presentaron una CMI ni CMB a la mayor concentración probada (200mg/mL) Sin embargo en el presente proyecto se encontró que el extracto hidroalcohólico de cola de caballo a concentraciones menores a 100 mg/mL presentaban CMI y CMB⁽³³⁾

Tabla 15. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Cándida albicans* aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado.

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

Dónde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 15 se puede observar que para las levaduras 1, 2 y 4, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 4y el 5 correspondiente a la concentración de 2 y 2,5 mg/ml respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2,5 mg/ml, para la bacteria 3 el punto de corte se encuentra entre los tubos 5 y 6 dando como concentración inhibitoria mínima 3 mg/ml para la bacteria en ensayo.

Tabla 16. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Cándida albicans* aislado de pacientes del Laboratorio Suiza

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

Dónde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 16 se puede observar que para las levaduras 1y 3, el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 5 y el 6 correspondiente a la concentración de 2,5 y 3 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 3 mg/mL, para la bacteria 2 y 4 el punto de corte se encuentra entre los tubos 4 y 5 dando como concentración inhibitoria mínima 2,5 mg/mL para la bacteria en ensayo.

Tabla 17. CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *Cándida albicans* aislado de pacientes del Laboratorio Llerena

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

Dónde: +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 17 se puede observar que para las levaduras 2,3 y 4 , el punto de corte del tubo con crecimiento y el de no crecimiento está entre el tubo número 4 y el 5 correspondiente a la concentración de 2 y 2,5 mg/mL respectivamente, siendo para ellos la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2,5 mg/mL, para la bacteria 1 el punto de corte se encuentra entre los tubos 5 y 6 dando como concentración inhibitoria mínima 2,5 mg/mL para la bacteria en ensayo.

Así mismo en la Figura 15 se puede observar una grafico resumen de la CIM para *Candida albicans*.

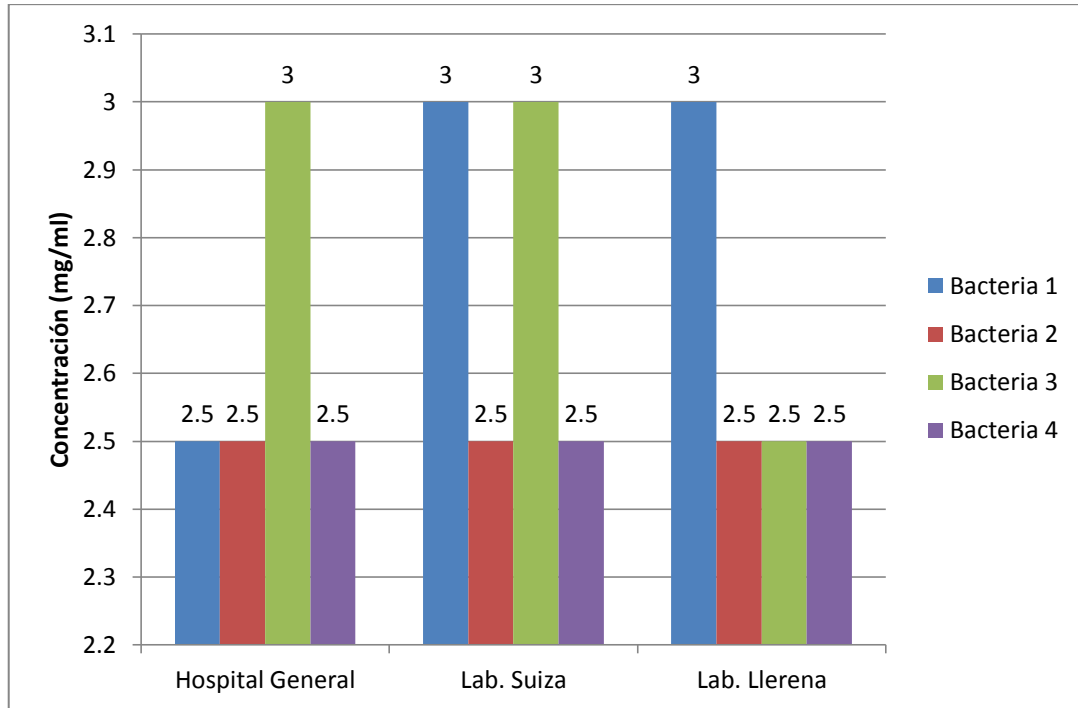


Figura 16. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Candida albicans*.

Según Arenas Y. (2013) *Candida albicans* fue muy sensible a los extractos etanolicos de *Copaifera paupera* (copaiba) indicando como resultados una CIM de 3500 ug/mL muy similar a la del presente proyecto debido a que en ambas investigaciones contienen la presencia de Terpenos y flavonoides los cuales en su composición realizan un buen efecto antifungico⁽²³⁾

7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA

Determinada CIM para cada uno de los extractos se procedió a la determinación de la Concentración Bactericida Mínima, mediante método de siembra en placas.

La evaluación fue realizada sobre tres diferentes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans* para cada uno de ellos se obtuvieron los resultados mostrados a continuación.

Tabla 18. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Staphylococcus aureus* aislado de Pacientes del Hospital Honorio Delgado

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | D | D | D | D | + | + | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 18 se puede observar que para las bacterias 1, 3 y 4, la CBM corresponde a una concentración de 4 mg/mL y para la batería 2 la CBM corresponde a una concentración de 4,5 mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

Tabla 19. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Staphylococcus aureus* aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab

| Características \ Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶ (mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | D | D | D | D | + | + | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | D | D | D | D | + | + | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 19 se puede observar que para las bacterias 1 y 4, la CBM corresponde a una concentración de 4,5 mg/mL y para la batería 2 y 3 la CBM corresponde a una concentración de 4mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

Tabla 20. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Staphylococcus aureus* aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames.

| Características | Tubos | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | D | D | D | + | + | + | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | D | D | D | D | + | + | - | - |

Donde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 20 se puede observar que para las bacterias 1 y 2 la CBM corresponde a una concentración de 4 mg/mL y para la batería 3 y 4 la CBM corresponde a una concentración de 4,5 mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

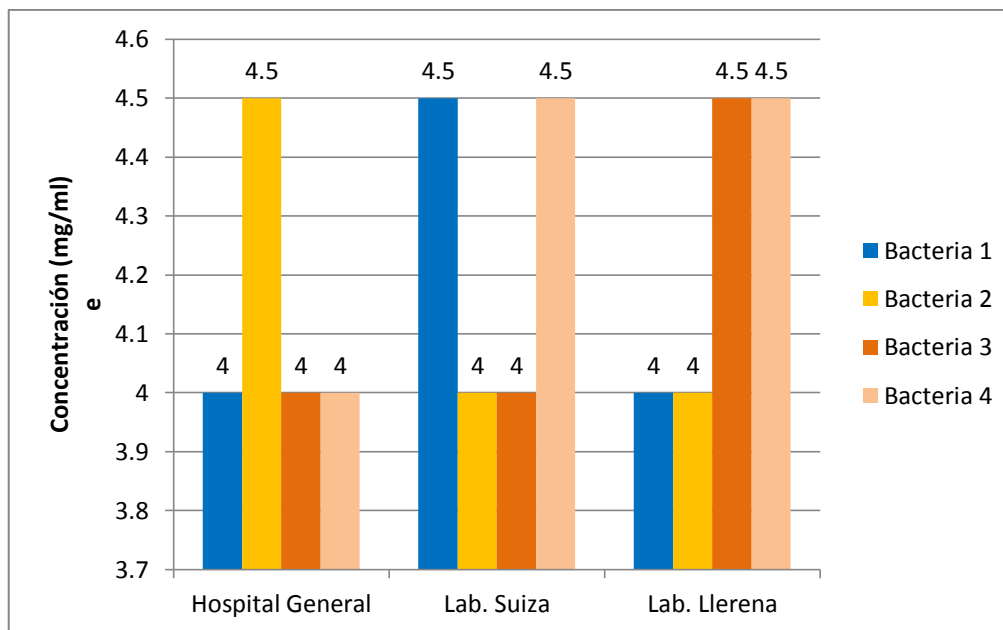


Figura 17. Determinación de la Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla 21. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Escherichia coli* aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado.

| Características | Tubos | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Sol 100 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶ (mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla N° 21 se puede observar que para las bacterias 1, 3 y 4, la CBM corresponde a una concentración de 25 mg/ml y para la batería 2 la CBM corresponde a una concentración de 20mg/ml debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

**Tabla 22. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Escherichia coli*
Aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab.**

| Tubos Características | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 100 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | + | + | - | - | - | - | - | - | - |

Donde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

En la Tabla 22 se puede observar que para las bacterias 1, 2 y 3, la CBM corresponde a una concentración de 25 mg/mL y para la batería 4 la CBM corresponde a una concentración de 20 mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

Tabla 23. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Escherichia coli* aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames.

| Características \ Tubos | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sol 100 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | + | + | - | - | - | - | - | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano.

En la Tabla 23 se puede observar que para las bacterias 1,2 y 3 la CBM corresponde a una concentración de 25 mg/ml y para la batería 4 la CBM corresponde a una concentración de 20 mg/ml debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

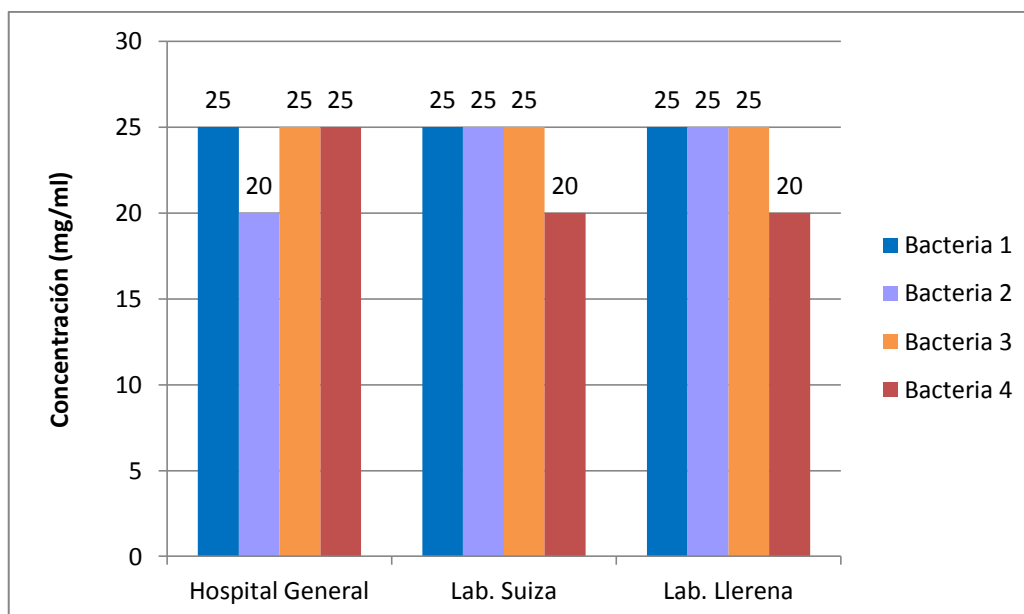


Figura 18. Determinación de la Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo), frente a *Escherichia coli*

Tabla 24. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Candida albicans* aislado de pacientes del Hospital Honorio Delgado

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | D | D | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | D | D | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | D | D | + | + | + | - | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano.

En la Tabla 24 se puede observar que para las levaduras 1 y 2, la CBM corresponde a una concentración de 3,5 mg/mL y para la batería 3 y 4 la CBM corresponde a una concentración de 4 mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

Tabla 25. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Candida albicans* aislado de pacientes del Laboratorio Suiza Lab

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3.5 | 4 | 4.5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | D | D | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | D | D | + | + | + | - | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 25 se puede observar que para las levaduras 1, 3 y 4, la CBM corresponde a una concentración de 4 mg/mL y para la batería 2 la CBM corresponde a una concentración de 3,5 mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

Tabla 26. Concentración bactericida mínima (CBM) para *Cándida albicans* aislado de pacientes del Laboratorio Llerena Ames.

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Características | | | | | | | | | | |
| Sol 10 (mg/mL) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
| Caldo (mL) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0 |
| Inóculo 10⁶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final (mL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Concentración Final (mg/mL) | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3.5 | 4 | 4.5 | 5 |
| Incubar a 37° C por 24 horas | | | | | | | | | | |
| Observación de turbidez | | | | | | | | | | |
| Bacteria 1 | D | D | D | D | D | + | + | - | - | - |
| Bacteria 2 | D | D | D | D | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 3 | D | D | D | D | + | + | - | - | - | - |
| Bacteria 4 | D | D | D | D | + | + | - | - | - | - |

Dónde: D: Tubo Descartado, +: Tubo con crecimiento Bacteriano, -: Tubo sin crecimiento Bacteriano.

En la Tabla N° 26 se puede observar que para las levaduras 2, 3 y 4, la CBM corresponde a una concentración de 3,5 mg/mL y para la batería 1 la CBM corresponde a una concentración de 4 mg/mL debido a que no hubo crecimiento de la bacteria en ensayo.

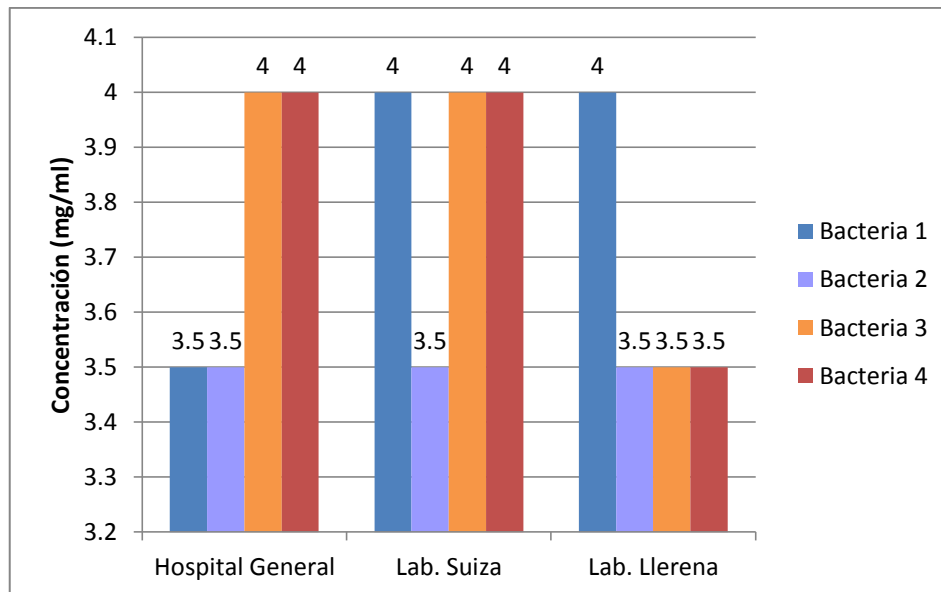


Figura 19. Determinación de la Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L (cola de caballo) frente a *Candida albicans*

Por lo tanto los resultados obtenidos fueron confirmados mediante la siembra en placas, observándose que el crecimiento positivo de cada bacteria presenta un color específico tomando como resultado el crecimiento o el no crecimiento de cada Placa según su especie.⁽⁴¹⁾ Los resultados que podemos observar para la CBM son similares de acuerdo a su procedencia esto puede deberse a que son cepas de la misma especie y la pequeña variación que se da en algunos resultados podrían ser debido a que son cepas clínicas de distintos pacientes.

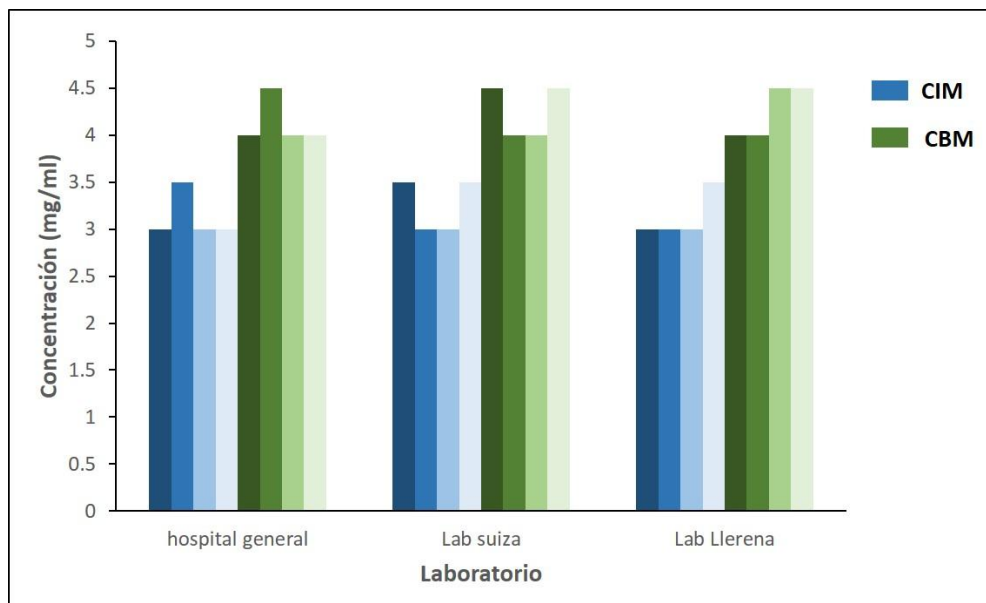


Figura 20. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Staphylococcus aureus*

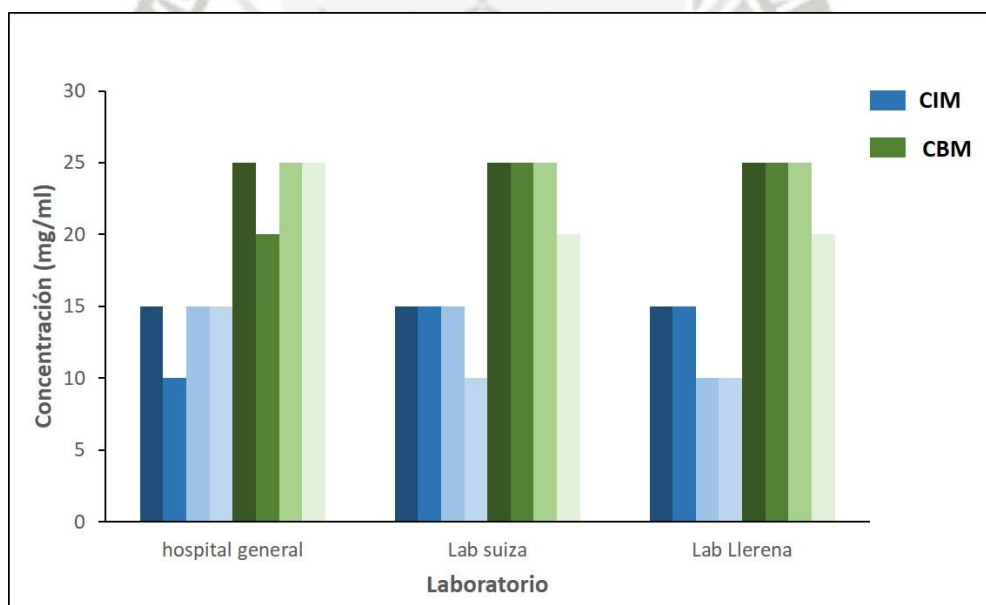


Figura 21. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroetanólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Escherichia coli*

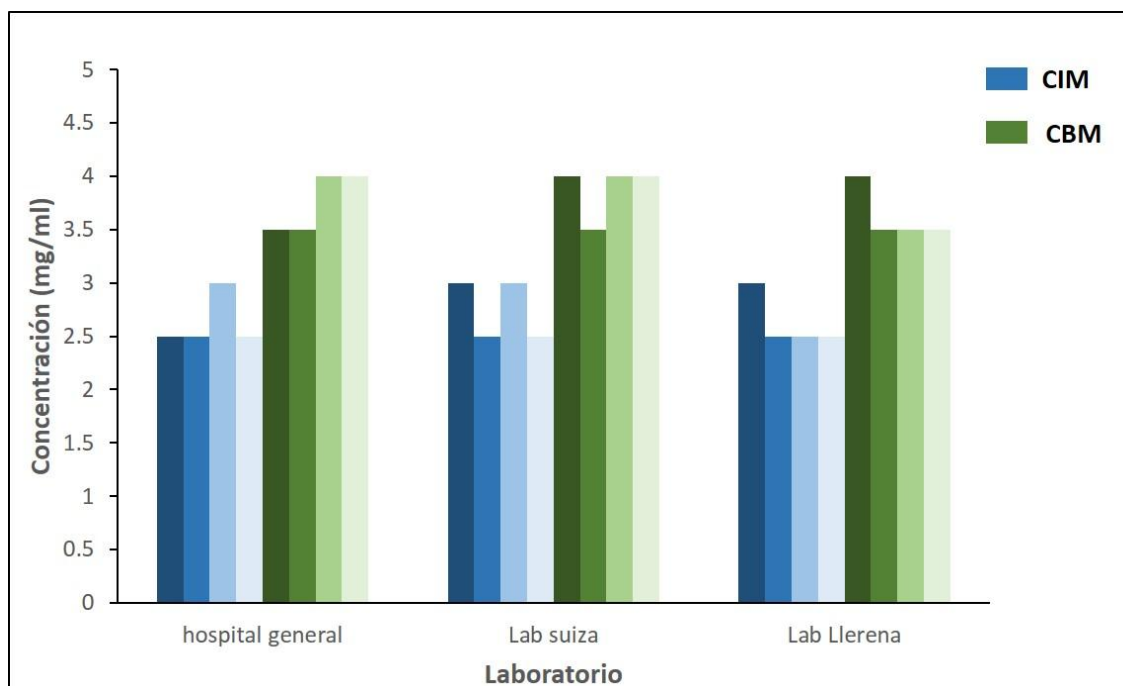


Figura 22. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a *Candida albicans*

Según Campos S (2006), la mayor resistencia de las bacterias Gram positivas en relación a las Gram negativas puede deberse a que presentan una capsula que las protege contra agentes antibacterianos la cual varía según las especies, y por la pared celular formada por 40 capas de mureina y presencia de ácido teicoico a diferencia de las bacterias Gram negativas que no presentan ácido teicoico en su estructura y tiene una red de mureina de una sola capa en su pared celular. ⁽³⁰⁾

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

PRIMERO Se obtuvo los extractos hidroalcohólico, extracto con acetato de etilo, y hexánico, por el método de extracción por percolación, hallando una diferencia significativa en el rendimiento de cada extracto siendo el de mayor rendimiento el extracto obtenido con el solvente hidroalcohólico 46.80 % y el de menor rendimiento fue el extracto con el solvente hexánico con un rendimiento 12.03%.

SEGUNDO Mediante la identificación de Metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina (CCF) que se realizó al extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) se aprecia la identificación de Terpenos, Taninos, Flavonoides y Alcaloides.

TERCERO.- De acuerdo a las pruebas de sensibilidad según los resultados de la CIM y extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L., si tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y *Candida albicans*,

CUARTO .- Se obtuvo una CBM donde muestra un mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, mientras que frente *Escherichia coli*, fue más resistente al poder inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L.

QUINTO.- Se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L., muestra un mayor efecto antibacteriano frente a bacterias gran positivas como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, en cuanto a bacterias gran negativas muestra un efecto antimicrobiano pero requiere una mayor concentración como es el caso de *Escherichia coli* la cual presenta menor sensibilidad.

SUGERENCIAS

- El extracto hidroalcohólico obtenido de *Equisetum giganteum* L puede constituirse en una buena fuente de principios activos que contribuyan al descubriendo de antimicrobianos de origen natural, los cuales puedes ser útiles como base para la síntesis de moléculas útiles a nivel farmacéutico.
- Se recomienda identificar, separar las moléculas presentes en el extracto *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) responsable de la actividad antimicrobiana reportada en el presente trabajo, con el fin de generar alternativas para la obtención de nuevos antibacterianos a partir de una fuente original.
- Se recomienda realizar pruebas in vivo para valorar la efectividad, toxicidad, y dosis terapéuticas, que pueden proporcionar los componentes activos de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) .en el caso del uso terapéutico de la población.
- Investigar el desarrollo de formas farmacéuticas para el tratamiento antibacteriano de *Equisetum giganteum* L (cola de caballo)

BIBLIOGRAFÍA

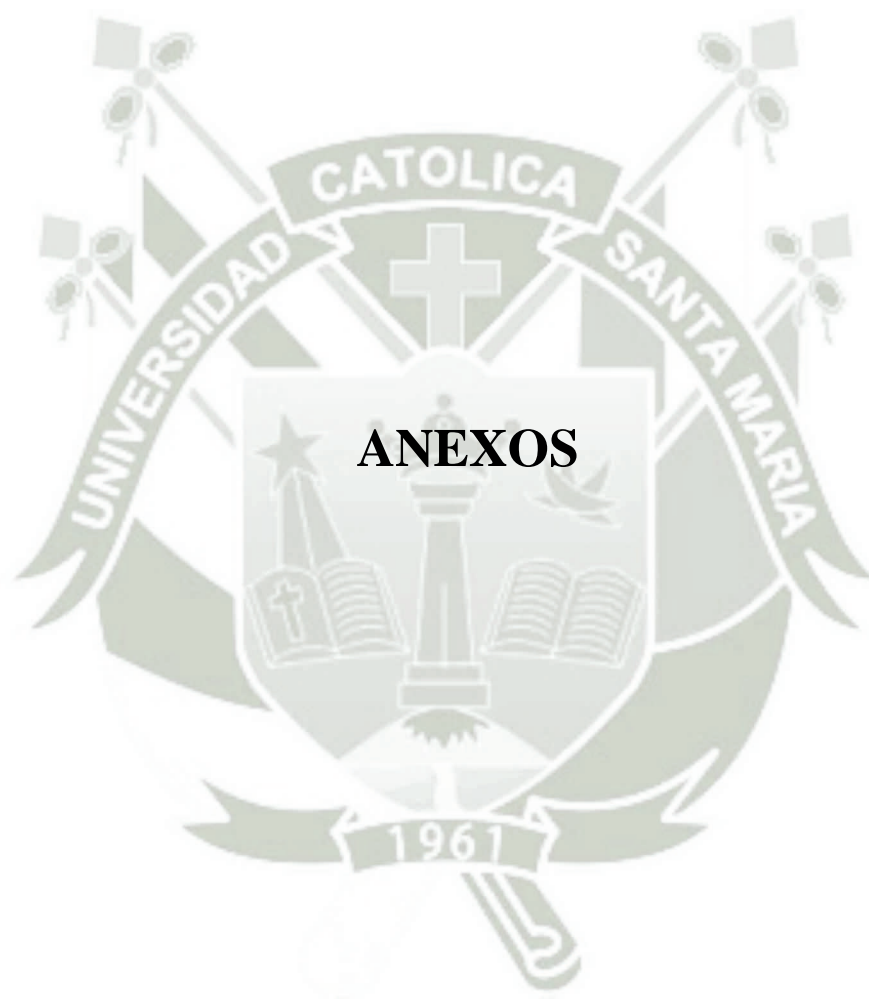
1. Franco J. Sulca L. Diversidad florística medicinal altoandina y propuesta de aprovechamiento de especies endémicas como recurso terapéutico del departamento de Tacna. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias. Tacna: Candarave; 2003.
2. Holman,R. y Robbins,W. Botánica General. Editorial Hispano Americana; México DF, México ; 1994
3. Schaffner J.H. Miscellaneous notes on Equisetum. American Fern Journal. 1993.
4. Danielski L, Michielin E, Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. J Food Eng 2007.
5. Husppyn, C.E., Oberbauer, S.F., Delatorre-Herrera, J, Oreste, V. Salinity tolerance ecophysiology of the giant horsetail, *Equisetum giganteum*, in northern Chile. Paper presented at the Botanical Society of America annual meeting, California State University, Chico, California. August; 2006.
6. Holman,R. y Robbins,W. Botánica General. Editorial Hispano Americana; México DF, México ; 1994
7. Hauke, R.L. A taxonomic monograph of the genus *Equisetum* Hippochaete. Nova Hedwigia; 1963.
8. Camino, L, Cerros, Plantas y Lagunas poderosas. La medicina al Norte Del Perú. CIPCNCEBEMO; 1992.
9. Francescato L.M, Bassani V. L. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. Talanta; 2013.
10. Johnson, M. A, Hydathodes in the genus *Equisetum*. Botanical Gazette. 2006
11. Stoliar. C, Parámetros botánicos y cromatográficos para la monografía farmacopea de cola de caballo, *Equisetum giganteum* L. Departamento de Investigaciones; 2007.
12. Perera W. H, Gonzales L. y Payo A. L, Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea Carolinensis*. Revista cubana de farmacia. 2006.

13. Danielski L, Michielin E, Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. J Food Eng 2007.
14. Niklas K.J, The Evolutionary Biology of Plants. The University of Chicago Press, Chicago; 2004.
15. Anesini C, Perez C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology; 2002.
16. Mena G. María G, Obtención y aprovechamiento de extractos y vegetales de la flora salvadoreña. 2ª. Edición Editorial Universitaria; 1994.
17. Stoliar. C, Parámetros botánicos y cromatográficos para la monografía farmacopea de cola de caballo, *Equisetum giganteum* L. Departamento de Investigaciones; 2007.
18. Lullman, H. Mohr, K. Hein, L, Farmaconogsia - Texto y Atlas. 6a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.
19. Mostacero J. Castillo F. Ramírez, R, Plantas medicinales del Perú. Taxonomía, Disponible en Internet: < <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf> Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Trujillo. Fondo Editorial. Perú; 2011.
20. Montoya Núñez J, Ortega M, y Cabrera J, Aspecto reglamentarios sobre procedimientos fitoterápico Farmacognosia”, Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; 2001.
21. Alarcón P, Diagnóstico microbiológico del género *Staphylococcus*. Instituto de Salud Pública. Disponible en Internet: http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones_microbiologia_cli_2011/9_sr_Alarcon.pdf. Chile: 2011. 18p.
22. Lancette G. Bennet W, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcal enterotoxins*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington; 2001.
23. Arenas Y, Determinacion del efecto antimicrobiano in vitro de la *Resina de Capoifera (copaiba)* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichica Coli*, *Pseudomona aerruginosa*, *Candida albicans*. Arequipa; 2013.

24. Aricapa, D, Actividad antimicrobiano de plantas sobre microorganismos cariogénicos. (Tesis de Bacteriólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá; 2009.
25. Avila B, Actividad antimicrobiana de *Diplostephium tolimense* Cuatrecasas (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Departamento de Biología. Universidad del Tolima. Barrió Sta. Elena, Ibagué; 2013
26. Bustamante Z, Funes F. Zamora J. Panozo, A. Villaroel, P. Identificación Microbiológica, molecular; serológica, Y Determinación de la susceptibilidad a la Penicilina y Eritromicina en la Ciudad de Cochabamba; 2009.
27. Florez, M, Larrea, H. Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in Vitro de *Croton lechleri* “Sangre de grado”. Instituto de Investigación, Laboratorio de Microbiología. Universidad San Martín de Porres. Lima, Perú; 2005.
28. Ferraro, M.J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Fifth Edition; 2002.
29. Caceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J Ethnopharmacol*; 2001
30. Campos S, Efecto antimicrobiano in vitro del Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis*, (romero). Frente a Bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans*. Arequipa-Perú. 2006
31. Casaroto A, R., Lara V. S. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*; 2010.
32. Castro C, Diagnóstico de la Infección Fúngica por levaduras del género *Candida dubliniensis*. *SEIMC*.1-10; 2004.
33. Centurion H. Evaluación de la actividad antibacteriana de los Extractos Hexanico de las inflorescencias de palmas comestibles de la Sierra de Tabaco, Mexico. *Polibotanica*; 2013.
34. Cesar M. Trabajo de investigación, Flavonoides y alcaloides de Lupinos Ballianus C.P., SMITH. Actividad Antibacteriana y Antifungica, Instituto de química orgánica aplicada a la Farmacia y Bioquímica; 2009.

35. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, USA: Pennsylvania; 2007.
36. Gil M. Perelli. Actividad antifúngica y bactericida de la tintura de propóleos sobre levaduras y bacterias enteropatógenas. Salus; 2012.
Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382.
37. Jawhertz E, Microbiología Médica 15ava Edición Editorial Manual Moderno S.A. México; 1995
38. Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food; 2001.
39. Garcia, P., Microbiología Clínica Práctica. 2a ed. Andalucía: Cádiz. 1994.
40. Gonzales J. Efecto in vitro del Aceite esencial del *Senecio graveolens* Wedell sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* B-hemolítico del grupo A y *Klebsiella pneumoniae*. Perú Tesis para optar el título de Química Farmacéutica; 2007.
41. Guerci A, Laboratorio, Métodos y Análisis Clínicos 4ta Edición Editorial El Ateneo. Argentina; 2009
42. Hammer K.A, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol; 2005.
43. Hauke RL, Equisetaceae. In: Flora of North America Editorial Committee (Editors), Flora of North America North of Mexico, 2. Oxford University Press, New York, 1993.
44. Florez, M, Larrea, H. Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in Vitro de *Croton lechleri* "Sangre de grado". Instituto de Investigación, Laboratorio de Microbiología. Universidad San Martín de Porres. Lima, Perú; 2005.
45. Koneman E, Atlas de Diagnostico Microbiológico 5ta Edición Editorial Medico Panamericana Argentina; 1999.
46. Manrique E, Mosquera O. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeletia murilloi* Cuatr. Y *Espeletopsis*

- guacharaca. Carrera Bacteriológica. Facultad de Ciencias Bñasicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá; 1997.
47. Navarro M. Servicio de Recopilación y Documentación de Medicina tradicional natural, Ancestral de Candarave, utilización de plantas curativas y rituales curativos. Perú: Tacna; 2012.
 48. Original Article 325 Polifenoles y actividad antioxidante en Equisetum giganteum L. (Equisetaceae), Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática; 2011.
 49. Ostle, B, Estadística Aplicada. Editorial Limusa; México D.F., México.1991.
 50. Perera W. H, Gonzales L. y Payo A. L, Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de Pluchea Carolinensis. Revista cubana de farmacia. 2006.
 51. Raven, P.H., R. F. Eveth S.E.. Biology of Plants. 2 editions. W.H. Freeman and Company, Worth publishers; 2006
 52. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, 8.Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants J Ethnopharmacol; 2003.
 53. Tortora F, .Introducción a la Microbiología. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana; 2007.
 54. Grau S, Alvarez F, Campany D. Bayon J, *Antimicrobianos*. España: 2002. 159 p. Disponible en Internet: <<http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap1315.pdf>>



ANEXO N° 1

FOTOGRAFIAS

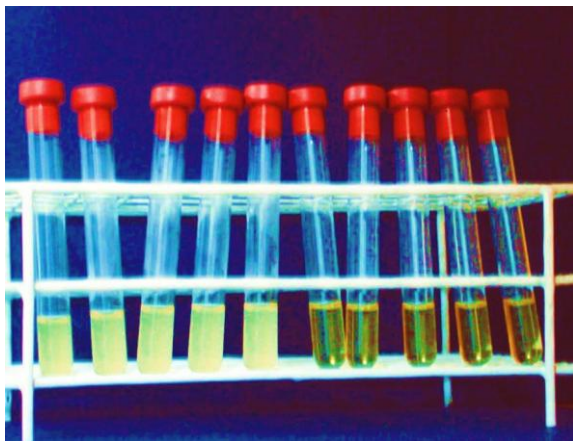


Foto 1 Bacteria de tubos para hallar la CMI
Frente a *Staphylococcus aureus*
Procedente de del Hospital Honorio
Delgado

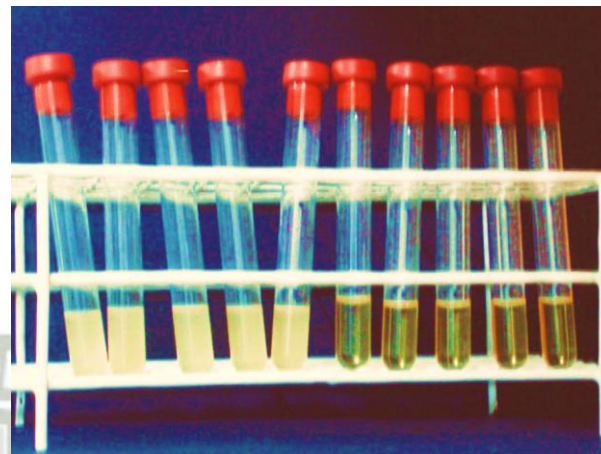


Foto 2 Bacteria de tubos para hallar la CMI
Frente a *Staphylococcus aureus*
Procedente de del Laboratorio Suiza Lab

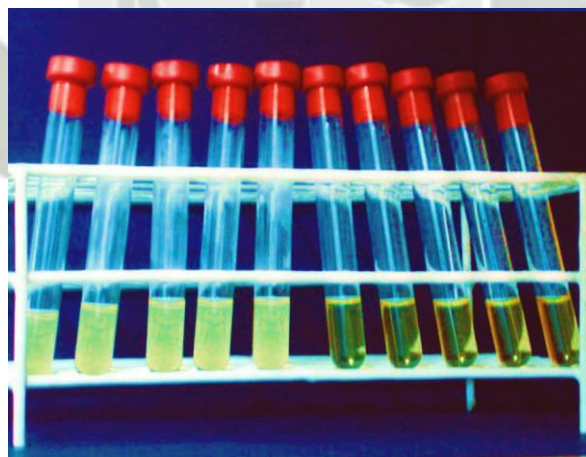


Foto 3 Bacteria de tubos para hallar la CMI
Frente a *Staphylococcus aureus*
Procedente de del Laboratorio Llerena A.

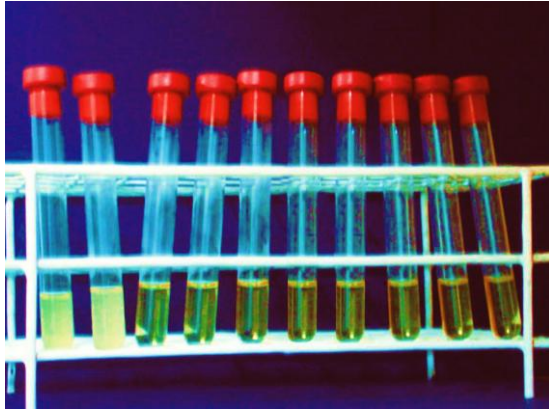


Foto 4 Bacteria de tubos para hallar la CMI Frente a *Escherichia coli*
Procedente de del Hospital Honorio Delgado

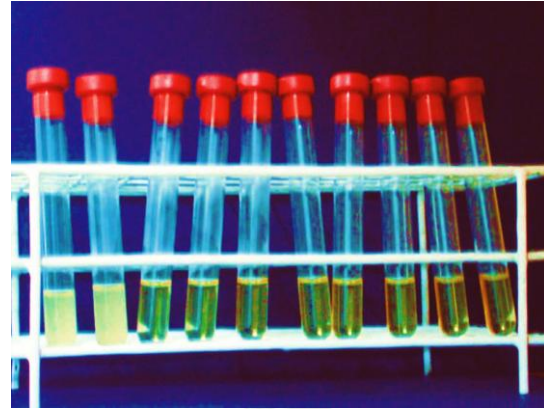


Foto 5 Bacteria de tubos para hallar la CMI Frente a *Escherichia coli*
Procedente de Laboratorio Suiza Lab.

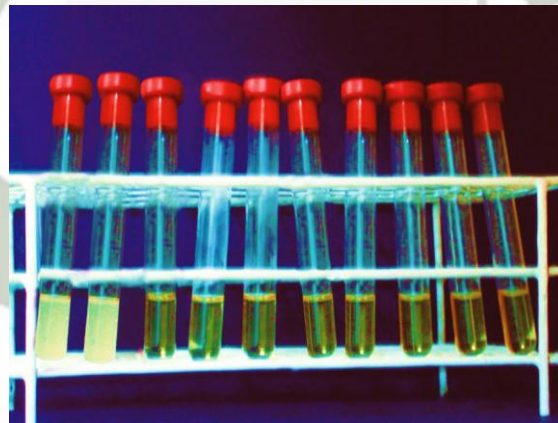


Foto 6 Bacteria de tubos para hallar la CMI Frente a *Escherichia coli*
Procedente de laboratorio Llerena A.

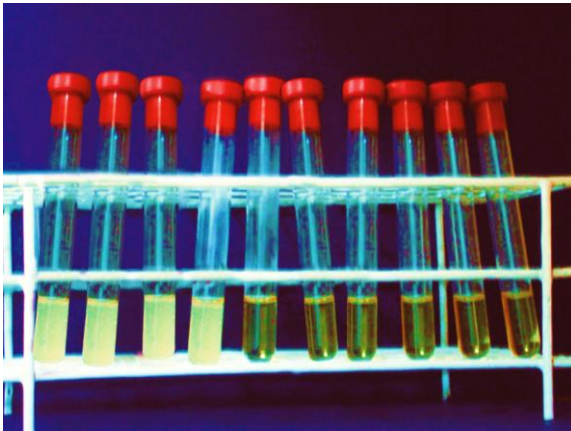


Foto 7 Bacteria de tubos para hallar la CMI
Frente a *Candida albicans*
Procedente de del Hospital Honorio
Delgado

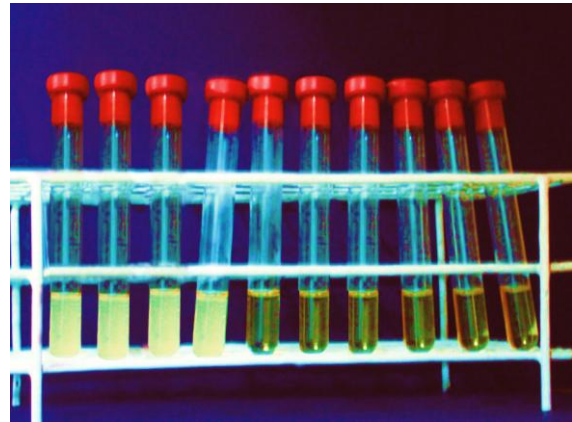


Foto 8 Bacteria de tubos para hallar la CMI
Frente a *Candida albicans*
Procedente del laboratorio Suiza Lab

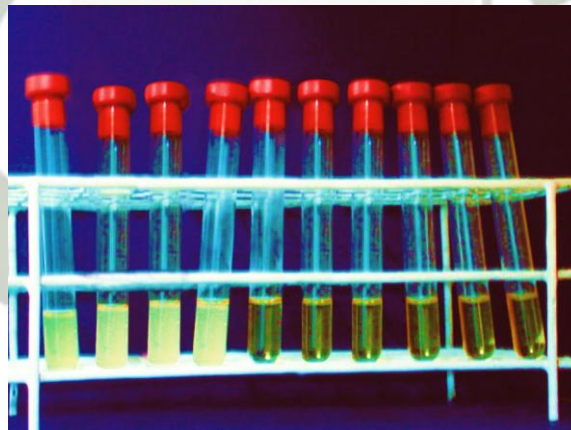
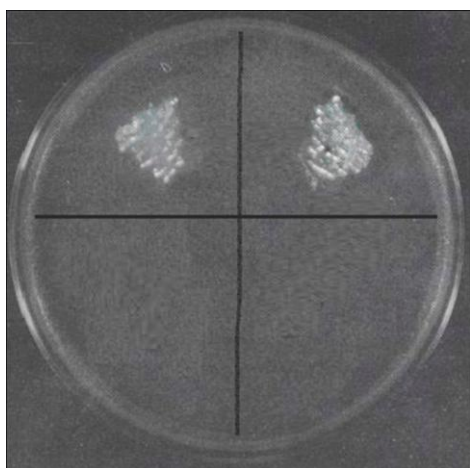


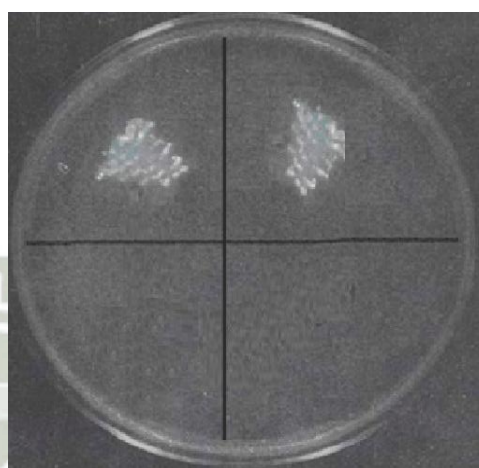
Foto 9 Bacteria de tubos para hallar la CMI
Frente a *Candida albicans*
Procedente del laboratorio Llerena A.

ANEXO N° 2

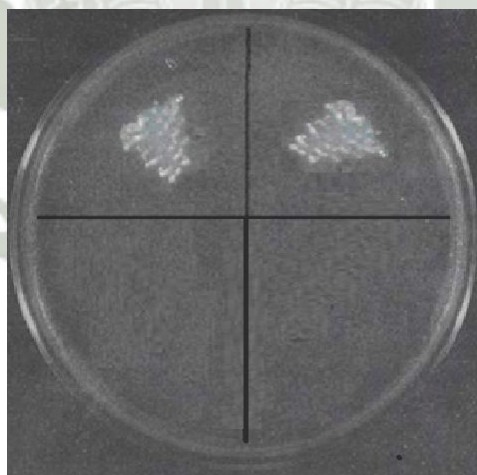
PLACAS



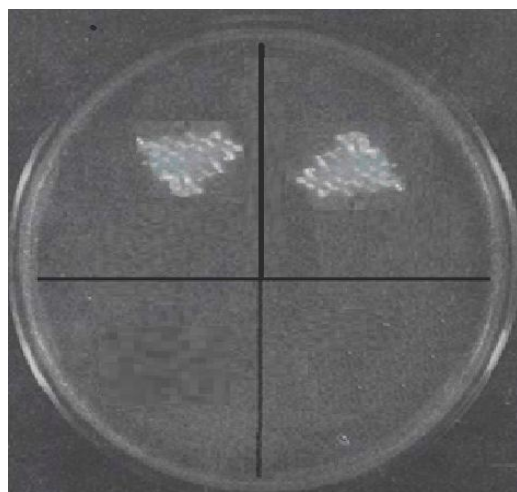
Placa N 1 para hallar CBM frente a *Staphylococcus aureus* Procedente de del Hospital Honorio Delgado



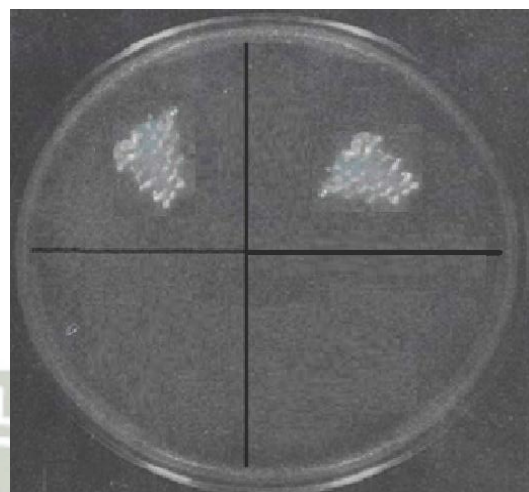
Placa N 2 para hallar CBM frente a *Staphylococcus aureus* procedente de Laboraotrio Suiza Lab



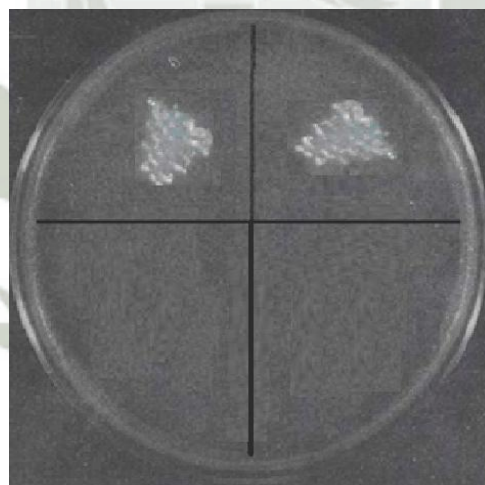
Placa N 3 para hallar CBM frente a *Staphylococcus aureus* procedente de Laboratorio Llerena A.
Concentración Bactericida mínima



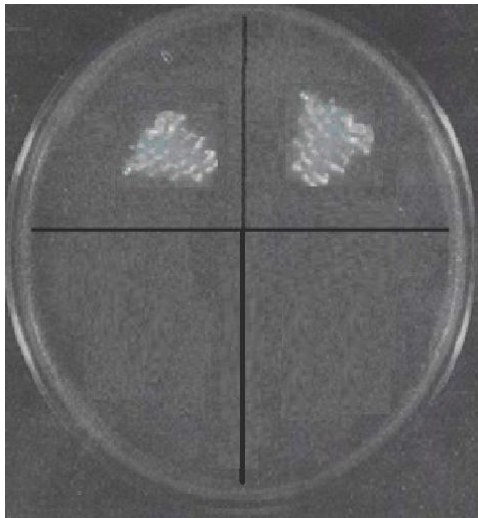
Placa N 4 para hallar CBM frente a
Escherichia coli procedente de Procedente
de del Hospital Honorio Delgado



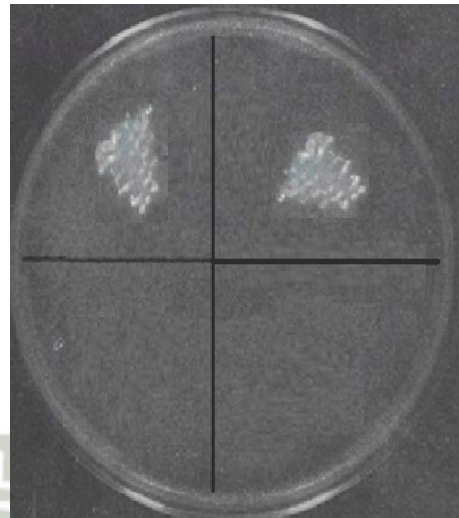
Placa N 5 para hallar CBM frente a
Escherichia coli procedente de Laboraotrio
Suiza Lab



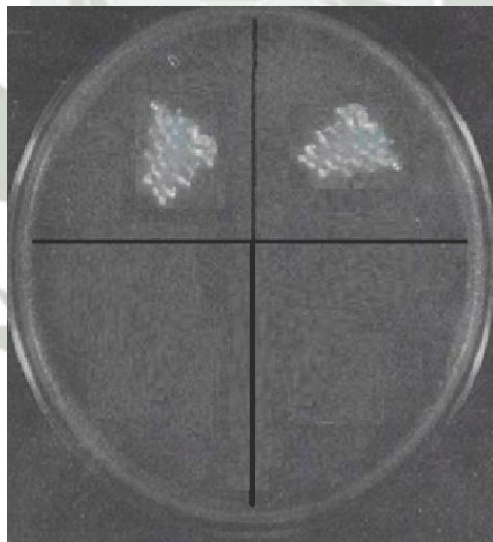
Placa N 6 para hallar CBM frente a
Escherichia coli procedente de Laboratorio
Llerena A



Placa N 7 para hallar CBM frente a *Candida albicans* procedente de
Procedente de del Hospital Honorio
Delgado



Placa N 8 para hallar CBM frente a *Candida albicans* procedente de
laboratorio Suiza Lab



Placa N 9 para hallar CBM frente a *Candida albicans* procedente de
laboraotrio Llerena Ames.

ANEXO N° 3

CONSTANCIA



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



CONSTANCIA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas traídas al laboratorio por Milagros Medina Bernal con DNI 43284915, para la ejecución de su trabajo de investigación: "Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de *Equisetum* sp "Cola de caballo" sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* y *Candida albicans* , de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María. La muestra traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, procedente del Valle de Vitor de la región Arequipa y corresponde a la especie, *Equisetum giganteum* L.

CLASIFICACION TAXONOMICA

Reino: **Plantae**
División: Equisetophyta
Clase: Equisetopsida
Orden: Equisetales
Familia: Equisetaceae
Genero: Equisetum
Especie: *Equisetum giganteum* L.

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

Arequipa 16 de Abril del 2015


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

ANEXO N° 4

INFORME DE ENSAYO



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

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



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA31E16.002211

| | |
|------------------------------------|--|
| Nombre del Cliente | : MILAGROS MEDINA BERNAL |
| Dirección del Cliente | : COOP JOSE CARLOS MARIATEGUI MZ E LOTE 39 HUARANGUILLO |
| RUC | : NO CORRESPONDE |
| Condición del Muestreo | : POR EL CLIENTE |
| Descripción | : COLA DE CABALLO (<i>Equicetum arvense</i>) |
| Tamaño de muestra | : 500 g |
| Fecha de Recepción | : 31/05/2016 |
| Fecha de Inicio del Ensayo | : 31/05/2016 |
| Fecha de Emisión de Informe | : 09/06/2016 |
| Página | : 1 de 1 |

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

| ANÁLISIS | RESULTADO |
|--|-----------|
| DETERMINACION DE HUMEDAD (%) Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Vol. II. Method 925.45D. USA. p. 1010 - 1011. | 15,68 |
| DETERMINACIÓN DE GRASA (%) Adaptado del Método gravimétrico NTP 209.263.2001 | 8,80 |
| DETERMINACIÓN DE CENIZA (%) Método gravimétrico adaptado de NTP 209.265.2001 | 24,79 |
| DETERMINACIÓN DE PROTEINAS (%) Método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984. | 5,71 |

OBSERVACIONES:

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

Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA 00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD LECC

