



UNIVERSIDAD DE GRANMA

FACULTAD DE INGENIERÍA

CENTRO DE ESTUDIO DE QUÍMICA APLICADA

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

TRABAJO DE DIPLOMA

TÍTULO:

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS
HOJAS DE *Kalanchoe pinnata* (SIEMPREVIVA)**

AUTORA: GLADYS MERCEDES CALVOPÍÑA HERRERA

TUTOR: Lic. ROBINSON HERMOSILLA.

Lic. RODISNEL PERDOMO.

Lic. YOSVEL VIERA.

BAYAMO, M. N.

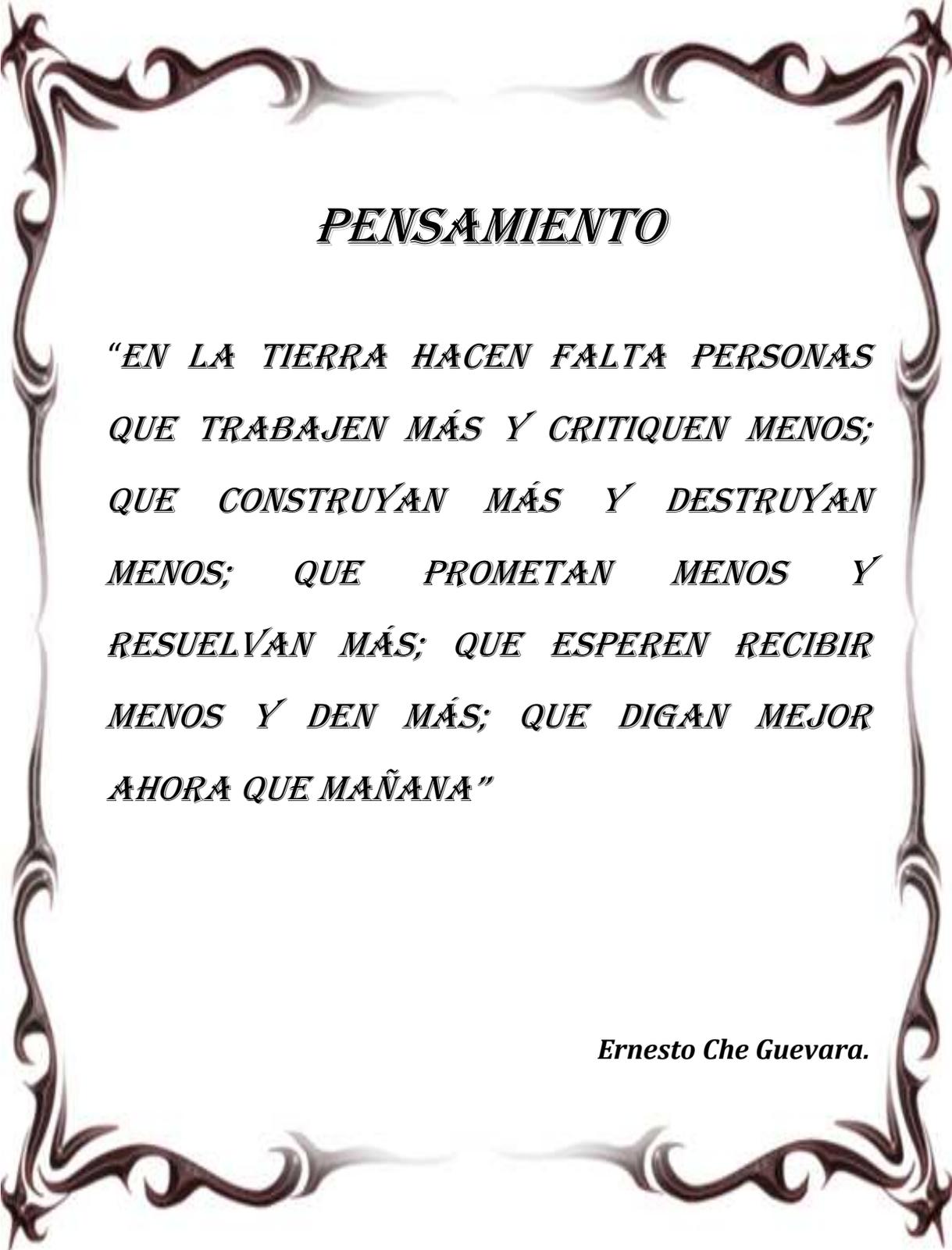
2010

Años del 52 aniversario del triunfo de la Revolución

LATACUNGA - ECUADOR

2010 *Por la vinculación de la Universidad con el Pueblo.*





PENSAMIENTO

*“EN LA TIERRA HACEN FALTA PERSONAS
QUE TRABAJEN MÁS Y CRITIQUEN MENOS;
QUE CONSTRUYAN MÁS Y DESTRUYAN
MENOS; QUE PROMETAN MENOS Y
RESUELVAN MÁS; QUE ESPEREN RECIBIR
MENOS Y DEN MÁS; QUE DIGAN MEJOR
AHORA QUE MAÑANA”*

Ernesto Che Guevara.

AGRADECIMIENTO

La confección de este epígrafe no es puro formalismo, tampoco constituye un recuento de quienes hicieron posible la realización de este trabajo, es el reconocimiento hacia aquellos que de una u otra manera me brindaron su apoyo desinteresado a tal punto que dejaron en mí una perdurable huella de amor y respeto. A ellos mi más sinceros agradecimientos.

-Primeramente a Dios por darme el don de la vida.

-A mis padres, mi más eterno agradecimiento, pues con su ejemplo, amor y abnegación guiaron mis pasos contribuyendo a mi formación.

-A mis hermanos, cuñada y novio por su confianza y apoyo incondicional.

- Agradezco a mis abuelitos por todo su apoyo y ánimos brindados.

-Agradezco a todos los miembros del Centro de Estudios de Química Aplicada y Biotecnología Vegetal, en especial a Robinson Hermosilla, Rodisnel Perdomo y Yosvel Viera, por su apoyo y conocimientos impartidos.

-Al convenio de la Universidad Técnica de Cotopaxi y la Universidad de Granma, quienes hicieron posible la realización de este trabajo.

*-A la dirección de la **FACULTAD DE INGENIERIA**, por su apoyo grato durante la realización del trabajo investigativo.*

A todos les doy las gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado de manera satisfactoria a:

-Mis padres Luis Calvopiña y Laura Herrera, quienes han sido mi inspiración y el pilar fundamental en este largo caminar que ha llegado a un final exitoso.

-A mis queridos hermanos, Geovanny, Lourdes y Juan Carlos Calvopiña Herrera, a mi cuñada Jeaneth Quimbita por el apoyo brindado en los momentos más difíciles de mi vida.

- A mis sobrinitos, los angelitos más hermosos, que con sus ocurrencias le dan a mi vida momentos de mucha alegría.

- A mis abuelitos Segundo, Amelia, María, a mis tíos y primos, por su apoyo y confianza, depositada en mí.

-A mis compañeros de viaje por todo el apoyo, confianza y ayuda brindada durante la realización del trabajo investigativo.

-A una persona muy especial en mi vida, quien se encuentra junto a mi, brindándome todo su amor, apoyo y confianza, Jhony Jácome.

RESUMEN

El trabajo estuvo encaminado a la evaluación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Kalanchoe pinnata* (Siempreviva), que es de uso popular. Una vez recolectadas y secadas las muestras se realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente, éter, alcohol y agua para lograr el máximo agotamiento de la droga. Luego se obtuvo la tintura al 20% por maceración según Norma Ramal de Salud Pública (NRS-312) y el extracto seco se obtuvo a partir de las tinturas por roto evaporación. A una porción de los diferentes extractos, de las tinturas y los extractos secos se le realizó estudio fitoquímico para conocer los componentes presentes en dicha planta.

Al extracto seco y la tintura al 20 % se les realizó las pruebas *in vitro* de evaluación de la actividad antibacteriana empleando el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Las cepas utilizadas en el ensayo forman parte de una batería mínima de cepas necesarias para este tipo de estudios y se relacionan a continuación: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se comprobó la alta diversidad de compuestos químicos presentes en la tintura al 20 % de hojas de Siempreviva, tales como: alcaloides, coumarinas, saponinas, quinonas, esteroides, antocianidinas y aminoácidos libres. Sin embargo en el extracto seco no se detectaron triterpenos ni quinonas. El extracto seco y la tintura al 20 % mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y su eficiencia fue evaluada por comparación con antibióticos modelos actualmente en uso para el sistema de salud.

SAMMARY

The work was aimed at assessing antibacterial activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* (Evergreen), which is in popular use. Once harvested and dried samples, consecutive extractions with solvents of increasing polarity, ether, alcohol and water to maximize the depletion of the drug. After the dye was obtained by macerating 20% according to standard Public Health Branch (NRS-312) and dry matter was obtained from tinctures by evaporating broken. A portion of the different extracts, tinctures and dry extracts phytochemical study was performed to understand the components present in the plant. The dry and dye 20% underwent testing in vitro evaluation of antibacterial activity using the agar diffusion method for disk superficial spreading (Bauer-Kirby). The strains used in the test part of a minimum set of strains needed for such studies and are listed below: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

We confirmed the high diversity of chemical compounds in the tincture 20% leaves of evergreens, such as alkaloids, coumarins, saponins, quinones, steroids, and anthocyanins and free amino acids. But in dry or not triterpenes quinones. The dry extract and tincture 20% showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and its efficiency was evaluated by comparison with antibiotics models currently in use for the health system.

Índice

	Pág.
1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	4
2.1. Generalidades	4
2.1.1. <i>Descripción botánica</i>	4
2.1.2. <i>HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN</i>	5
2.1.3. <i>Parte empleada</i>	5
2.1.4. <i>Usos y aplicaciones</i>	5
2.2. Tamizaje fitoquímico de plantas medicinales	6
2.2.1. <i>Metabolitos secundarios y sus funciones</i>	7
2.3. Bacterias	9
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.3.2. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	13
2.3.3. <i>Escherichia coli</i>	15
3. Materiales y métodos	18
3.1. <i>Preparación de formulaciones</i>	18
3.1.1. <i>Extractos (etéreo, alcohólico, acuoso)</i>	18
3.1.2. <i>Tintura al 20%</i>	19
3.1.3. <i>Extracto Seco</i>	19
3.2. Especificaciones de Calidad	20

3.3.	Metodología del Tamizaje Fitoquímico	22
3.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Siempreviva.	27
4.	Resultados y discusión	31
4.1.	TAMIZAJE FITOQUÍMICO de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso, seco y tintura 20 % de Siempreviva.	31
4.2.	Comparación del tamizaje fitoquímico de la tintura 20 % y el extracto seco.	32
4.3.	Control de la calidad realizado a la tintura 20 %.	33
4.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Siempreviva.	34
5.	Conclusiones	41
6.	Recomendaciones	42
7.	Bibliografía	43
8.	Anexos	49

CAPITULO I

1. Introducción.

Desde tiempos remotos el hombre se ha valido de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades más elementales. En Cuba cuatro culturas constituyen las influencias principales de la medicina natural y tradicional, estas son: la aborígen, la europea, la africana, y la asiática. Su influjo desigual ocurrió en un proceso de transculturación, en el que de forma simultánea se emplearon plantas típicas de la medicina tradicional de cada una de ellas.

El uso de las plantas fue un recurso esencial para paliar, en parte, las más elementales necesidades de alimentación, eliminar enfermedades y para sus creencias religiosas. Estos conocimientos han llegado a través de los años a la población cubana, por medio de la transmisión oral. (1)

Las plantas medicinales son especies vegetales cuya aplicación depende de la corrección de una patología presente en el organismo humano. La milenaria experiencia sobre su uso, enseña que la efectividad no depende exclusivamente del producto; es decir, no solo de sus principios activos según la química, sino también, de su preparación y posibles combinaciones. (2)

La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, decocción, elixir, infusión, jarabe, pomada, tintura, ungüento, etc. (3)

Se conocen unas 260.000 especies de plantas en la actualidad, de las que el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas en los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas.

En las regiones ecuatoriales, la proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora. (4)

A pesar del tiempo transcurrido y los adelantos en la esfera de la Química y el desarrollo alcanzado en la industria farmacéutica el hombre continúa por diversas razones, valiéndose de los beneficios que le proporcionan las plantas del entorno

en el que se encuentran, independiente de su ubicación geográfica, de su grado de desarrollo cultural y económico. (1)

La medicina herbaria, es una de las formas más antigua del cuidado médico ya que ha sido utilizada por todas las culturas a lo largo de la historia. Esta se renueva en la actualidad, dado al rechazo que están teniendo los productos sintéticos medicinales por las reacciones adversas que provocan en los pacientes, lo cual unido a la contaminación ambiental que genera su fabricación, hace que los científicos y personal médico acudan a los productos naturales obtenidos a partir de plantas medicinales para enfrentar los retos que demanda el combate de las enfermedades principales que atacan a la población en los diferentes países.(5, 6)

El conocimiento y aplicación de los procedimientos y técnicas de promoción de salud, prevención de enfermedades, diagnóstico, curación y rehabilitación que comprende la Medicina Tradicional y Natural en busca de más vida y sobre todo de más calidad de vida, tiene una gran importancia para los pueblos subdesarrollados, por cuanto es posible generalizar el uso de medicamentos y otros recursos de fácil adquisición, independientemente del grado de desarrollo alcanzado en la producción industrial de estos en cada pueblo. (6)

En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, sin embargo la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades para agrupar las de efectos similares, conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, separar estos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, sintetizarlos, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.(7)

Conocer el contenido de metabolitos secundarios de las plantas y en especial de la Siempreviva, permite contar con una fuente natural renovable de estos compuestos con gran valor económico por sus variadas acciones farmacológicas y aplicaciones industriales. (8)

1.1. Problema:

La alta incidencia de enfermedades producidas por microorganismos bacterianos como; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, es un inconveniente grave de salud en diferentes sectores, debido a la baja disponibilidad de medicamentos industriales para el tratamiento de las mismas.

1.2. Hipótesis:

- Las enfermedades producidas por bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* que afectan grandemente a nuestra población pueden ser combatidas con formulaciones producidas a partir de las hojas de la Siempreviva.

1.3. Objetivo General:

- Evaluar la actividad antibacteriana de las hojas de **Siempreviva**, frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* *Escherichia coli*.

1.4. Objetivos Específicos:

- Obtener extractos (etéreo, etanólico, acuoso), tintura al 20% y extracto seco de las hojas de **Siempreviva**.
- Realizar estudios fitoquímicos al extracto y tintura para conocer los metabolitos secundarios que posee las hojas de dicha planta.
- Realizar el control de calidad de las tinturas al 20%.
- Evaluar la acción biológica de los distintos extractos obtenidos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*.

CAPITULO II

2. Revisión bibliográfica:

2.1. Generalidades

2.1.1. Antecedentes Históricos

Los primeros estudios de la flora cubana fueron, obviamente, producto de los españoles, siendo el médico **Francisco Hernández** (1517-1586), enviado por Felipe II a Nueva España, quien ya describió algunas plantas en su breve estancia en La Habana en 1571. Los estudios de Hernández cayeron casi en el olvido durante dos siglos, período de debilidad y decadencia española, con la pérdida de territorios en Hispanoamérica a manos de ingleses, franceses y holandeses. ⁽⁹⁾

SIEMPREVIVAS: Este nombre se aplica principalmente a varias especies cuyas hojas y flores se conservan por largo tiempo sin marchitarse ni secarse. La más conocida de ellas es la planta *Bryophyllum pinnata* (siempreviva) se reporta en FITOMED efectos no probados, pues aunque las especies cubanas no han sido estudiadas, la población refiere de ellas posibles efectos curativos sobre lesiones de la piel.

Sinonimia: La *Bryophyllum pinnata* (Lam) Kurz o *Kalanchoe pinnata*, planta conocida como Siempreviva o comúnmente llamada también inmortal, flor de aire, hoja de aire, hoja de bruja y prodigiosa, es una especie de planta fanerógama perteneciente a la familia *Crassulaceae*, nativa de Madagascar. ^(5,10)

Nombre Científico	<i>Kalanchoe pinnata</i>
Nombre Común	<i>Siempreviva.</i>
Familia	<i>Crassulaceae</i>
Género	<i>Kalanchoe</i>
Especie	<i>Pinnata</i>

Fenología	<i>Planta perenne.</i> <i>Florece en invierno.</i>
------------------	---

2.1.2. Descripción Botánica

Es una planta carnosa, erguida, lampiña, de hasta 1,5 m de altura y poco ramificada. Hojas decusadas, simples o pinnado-compuestas, foliolos oblongos, ovalados o elípticos, fuertemente crenados, de hasta 15 cm. de largo y 7 cm. de ancho; peciolo de hasta 4 cm. de largo. Flores agrupadas en panículas terminales de hasta 50 cm. de largo; corola campanulada, rojiza, 4-lóbulos; estambres en 2 series de 4. Semillas numerosas y poco ramificadas. (5)

2.1.3. Hábitad y Distribución

Hábitad/Cultivo: Cultivo extendido a regiones tropicales de todo el mundo. Subespontánea cerca de poblaciones, en márgenes de ríos y junto a matorrales secos. (11)

Distribución: La Siempreviva se ha naturalizado como planta ornamental en las regiones templadas de Asia, Australia, Nueva Zelanda, Indias Occidentales, Macaronesia, Mascareñas, Galápagos, Melanesia, Polinesia, y Hawaii. En muchos de estos como Hawaii, es considerada como una especie invasiva. (3)

Origen Probablemente nativa de África tropical. Actualmente se ha extendido, por la vía del cultivo, a regiones tropicales de todo el mundo.

Localización Ampliamente cultivada como ornamental. Con frecuencia se expone en mercados de hierbas. (5)

2.1.4. Usos y Aplicaciones

Parte empleada: Hojas

Esta especie contiene bufadienolida, un glucósido cardíaco, estas sustancias pueden producir envenenamiento cardíaco en particular en animales de apacentamiento. En Trinidad y Tobago se utiliza para el tratamiento tradicional de la hipertensión. (5, 10)

La población le atribuye a esta planta efecto cicatrizante, antifúngico,

antiinflamatoria, antibacteriana, vasoconstrictora, diurética, antiséptico urinario y de acción sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, sus efectos terapéuticos no han sido probados. En México también la población refiere que la planta tiene diversos usos medicinales por lo que le llaman sanalotodo.

Otras propiedades atribuidas (Aún no probadas).

Se utiliza en el tratamiento de la gingivitis, estomatitis aftosa, otalgia, odontosis, antiséptico urinario, antiespasmódico, sedante, pectoral, y antipiléptica.

Principios activos: Fenoles, 2 flavonoides, ácidos acético, málico, cítrico, isocítrico, láctico, fumárico, oxálico y succínico. La planta presenta un alto contenido de calcio y cloro.

Contiene además B-citosterol, mucilago, briofilina, polisacáridos, taninos, vitamina P, aluminio, hierro, magnesio, manganeso, cobre y silicio. ⁽¹¹⁾

2.2. Tamizaje fitoquímico de plantas medicinales.

Para desarrollar el tamizaje fitoquímico se reportan en la literatura variados esquemas de trabajo que comprenden a su vez el uso de diferentes solventes de extracción. ⁽⁸⁾ Es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente ya que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir de forma determinante, los siguientes parámetros: ⁽¹²⁾

1. La época de recolección.
2. El estado vegetativo de la planta.
3. Las variaciones ocurridas por una deficiente recolección, secado y/o conservación.
4. La concentración de los metabolitos.
5. La solubilidad en el solvente empleado.
6. Las interferencias de otros metabolitos.

El esquema que se propone utiliza la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente, con la finalidad de lograr el mayor agotamiento de la droga, ensayándose en cada extracto los metabolitos que de acuerdo a su solubilidad pueden ser extraídos en estos solventes. (12)

Puede partirse de una muestra entre 10 a 20 gramos de droga fresca o seca y emplear un volumen de solvente equivalente a 10 veces el peso de la droga.

La extracción puede realizarse por maceración de la droga pulverizada o bien triturada, por un tiempo no menor de 48 horas; o por extracción continúa en caliente o por reflujo en un tiempo de 2 a 4 horas. En este último caso pueden producirse alteraciones de algunos metabolitos por la influencia de la temperatura.

2.2.1. Metabolitos secundarios y sus funciones

Los metabolitos secundarios son sustancias dotadas de actividad farmacológica, que no se sintetizan bajo cualquier circunstancia, ni tampoco tienen una función metabólica fundamental en la célula que le da origen. (1, 13) Sin embargo, son indispensables en el organismo como un todo, además se acumulan generalmente en pequeñas proporciones en las plantas, a veces en células especializadas, ello es lo que hace difícil y costosa su extracción. Estos compuestos no están generalmente desempeñando papeles de importancia en el proceso fotosintético, la respiración, transporte de solutos, traslocación, diferenciación y asimilación de nutrientes, como muchos metabolitos primarios. (14, 15)

Principales principios activos

- Alcaloides
- Glúcidos
- Heterósidos
- Proteínas
- Lípidos
- Taninos
- Flavonoides
- Antocianinas

- Coumarinas
- Quinonas (naftoquinonas)

Aplicaciones generales de algunas de las familias de constituyentes naturales más importantes de las plantas. (1)

Alcaloides: se emplean en el tratamiento de la hipertensión, la arritmia cardiaca y constituyen materias primas para la fabricación de medicamentos.

Esteroles: Se aplican fundamentalmente en la medicina. Forman parte de hormonas animales y vitaminas.

Triterpenos: Poseen acciones farmacológicas destacadas Tienen actividad antihelmíntica, antiséptica, digestivos, expectorantes y diuréticos, por lo que se emplean en la medicina, además tienen importantes aplicaciones en la industria. Constituyen los llamados aceites esenciales, útiles en perfumería, farmacia y en la preparación de determinados alimentos.

Glicósidos cardiotónicos: Se aplican en la medicina pues estimulan la función cardíaca, son los llamados venenos del corazón.

Saponinas: En la práctica comúnmente se les da un uso medicinal e industrial. Son precursores de hormonas esteroidales y corticosteroides. Por su actividad tensoactiva son útiles como emulgentes y hemolizantes.

Fenoles simples: Se emplean en la medicina por poseer actividad antifúngica. y tienen además uso industrial como desinfectante y aromatizante.

Flavonoides: Producen la fragilidad capilar, protegen frente a estados tóxicos, antiinflamatorios, antialérgica, pueden ser además hepatoprotectoras, antiespasmódicas, diuréticos, antibacterianos y antivirales. Son empleados en la industria como colorantes.

Taninos (taninos condensados): Se les han atribuido propiedades cercanas a los flavonoides disminuyendo la fragilidad y permeabilidad capilar, propiedades astringentes, antisépticas, antibacteriana y antifungica. A demás son empleados en la industria útiles en la fabricación de tintas y otros colorantes, para curtir pieles.

Cumarinas: Se emplean en la medicina acción anticoagulante en el tratamiento de psoriasis y el vitiligo y en la industria como aromatizante.

glicósidos flavonoides: Principalmente la rutina, antocianinas y quercitinas se le atribuyen efectos sobre la irrigación sanguínea de los bronquios, provocando broncodilatación, lo cual mejora obviamente los cuadros clínicos de bronco constricción en los pacientes asmáticos.

Quinonas específicamente las naftoquinonas: Se caracterizan por su acción antibacterianas y antifúngicas y las antraquinonas por su acción laxante. (1)

2.3. Bacterias evaluadas

Bacteria (del griego, *bakteria*, 'bastón'), nombre que reciben los organismos unicelulares y microscópicos, que carecen de núcleo diferenciado y se reproducen por división celular sencilla (fisión binaria). Las bacterias son muy pequeñas, entre 1 y 10 micrómetros (μm) de longitud.

Probablemente, las bacterias fueron los primeros seres vivos que habitaron la Tierra y, sin embargo, debido a su diminuto tamaño no hemos sabido que existían hasta que se inventó el microscopio. Fueron descritas por primera vez a finales del siglo XVII por un holandés, **Antoni van Leeuwenhoek**, que las observó con la ayuda de un microscopio muy sencillo construido por él mismo.

En el siglo XIX el científico francés **Louis Pasteur** demostró que algunas bacterias podían producir enfermedades. Pasteur observó que el calor podía destruirlas. El uso de temperaturas muy elevadas para matar las bacterias de los instrumentos que se utilizan en los quirófanos se llama esterilización. Las bacterias pueden contaminar los alimentos y producir intoxicaciones. A ellas se deben enfermedades tan conocidas como la tuberculosis, la peste, la sífilis, el tétanos, el cólera y muchas formas de neumonía. La mayoría de las enfermedades producidas por bacterias se curan con antibióticos. (3, 16)

2.3.1. Staphylococcus Aureus

Caracteres micromorfológicos

El género *Staphylococcus* se incluye en la familia *Micrococcaceae*. En cultivos líquidos se encuentran cocos aislados, en pares, tétradas, cadenas cortas y principalmente en forma de racimos. La forma de coco tiende a ser de tamaño mucho más uniforme que los tipos morfológico de bacterias, tienen un diámetro aproximado de 1 μm , típicamente son casi perfectos en su forma esférica. Los cocos jóvenes son positivos a la tinción de Gram; al envejecer muchas células se vuelven Gram-negativas. Se caracterizan por ser inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos, que crecen con facilidad en los medios de laboratorio; son metabólicamente activos; fermentan carbohidratos; son catalasa positiva y producen pigmentos que van desde el blanco al amarillo intenso, muchas células son hemolíticas. Los estafilococos desarrollan, con rapidez, resistencia a muchos agentes antimicrobianos por lo que resulta difícil su tratamiento. (12, 17, 18)

Caracteres macromorfológicos (17, 19, 20)

Los estafilococos proliferan fácilmente en los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerófilas a temperatura de 37 °C. Las colonias desarrolladas en medios sólidos (agar- sangre de carnero) en un período de 18-24 horas tienen un diámetro de 1-3 mm. En incubación prolongada durante 5 días, las mismas, son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. *Staphylococcus aureus* suele formar colonias de color gris a amarillo dorado intenso, se caracterizan por fermentar con lentitud muchos carbohidratos y elaboran ácido láctico pero no gas.

Diagnóstico bacteriológico (12, 21)

Las muestras deben ser sembradas en placas de agar sangre, agar infusión cerebro- corazón, agar-soya-tripticosa o P-agar durante 18-24 horas a temperatura entre 34-37 °C. Se obtienen colonias circulares, lisas, elevadas y resplandecientes con un diámetro de 1-3 mm. Forman pigmentos a temperatura ambiente (20-25°C), de color amarillo dorado en *S. aureus*.

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se realizan son:

Prueba de catalasa: Se coloca una gota de solución de peróxido de hidrogeno sobre un porta objetos y sobre esa solución se vierte una pequeña cantidad de bacterias en crecimiento. La formación de burbujas (liberación de oxígeno) indica una prueba positiva.

Prueba de la coagulasa: el plasma citrato de humano (o animal) se mezcla con un volumen igual de caldo de cultivo o colonias en crecimientos sobre agar y se incuba a 37 °C. Se incluye como control un tubo de plasma mezclado con caldo estéril. Si se forma con coágulos de 1-4 horas la prueba es positiva. Los estafilococos coagulasa positivo se consideran patogénicos para los humanos, no obstante los estafilococos positivos de los perros (*S. intermedius*) muy pocas veces causan enfermedades en humanos.

Los estafilococos son capaces de crecer en presencia de cloruro de sodio al 7.5 %, que inhibe muchas bacterias y se han usado medios selectivos que contienen sal junto con manitol, y a veces rojo de fenol como indicador ácido- básico, para aislar estafilococos de muestras muy contaminadas con otras bacterias.

Epidemiología (12, 17)

S. aureus es el principal patógeno humano perteneciente al género *Staphylococcus*. Es una bacteria de amplia distribución capaz de colonizar e infectar tanto al individuo sano como al inmunodeprimido. Suele encontrarse en cualquier superficie cutánea y mucosa. Sus infecciones se adquieren indistintamente en la comunidad y en el hospital.²⁷ *S. aureus* produce varias enzimas y toxinas responsables de la patogenia y del cuadro clínico; son causa de absceso, forúnculos, infecciones piógenas diversas, sepsias mortales, síndrome de choque tóxico, meningitis, neumonía, pioartrosis, osteomielitis y ocasionan envenenamiento alimentario por la producción de enterotoxina tonsilitis, endocarditis, queratitis ulcerativa entre otras.^{25, 26} Como agente secundario interviene en la viruela, difteria, angina séptica, escarlatina, tuberculosis y neumonía.

La lesión típica ocasionada por *S. aureus* es el furúnculo o absceso, interviene en la mayor parte de los procesos de supurados de heridas en el hombre y los

animales. Puede localizarse en cualquiera de los tejidos corporales, por lo que es el germen que con más frecuencia produce piemia.

Tratamiento (17, 20)

Infecciones locales

Drenaje, retirada del cuerpo extraño, antibióticos

Infecciones localizadas acompañadas de rash

Reposición hidroelectrolítica, soporte del estado general, antibióticos

Infecciones sistémicas

Bacteriemia: cloxacilina 2g/4h/IV^d un mínimo de quince días

Endocarditis derecha: cloxacilina 2g/4h/IV durante quince días

Endocarditis izquierda: cloxacilina 2g/4h/IV de cuatro a seis semanas

Neumonía: cloxacilina quince días

Osteomielitis y artritis aguda: cloxacilina IV de tres a cuatro semanas

Osteomielitis crónica: ciprofloxacina u ofloxacina más rifampicina por vía oral de tres a seis meses

a: si hay afectación del estado general y/o riesgo de diseminación.

b: antibióticos de administración oral con actividad antiestafilocócica: amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de primera generación, quinolonas fluoradas.

c: si se demuestra infección localizada;

d: como alternativas se puede utilizar las cefazolina. En caso de alergia a los betalactámicos o de SAMRA (*S. aureus* resistente a la meticilina y aminoglucósidos): vancomicina o teicoplanina;

e: a los quince días del tratamiento, si no existen complicaciones locales se puede parar al tratamiento¹³. Si el tratamiento debe realizarse con glucopéptidos éste debe prolongarse por espacio de cuatro semanas;

f: en los casos de sepsis grave es aconsejable asociar gentamicina de trae a cinco días;

g: otras alternativas según antibiograma: cotrimoxazol o clindamicina;IV: por vía intravenosa

2.3.2. *Pseudomona aeruginosa*

Género: *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonaceae* integrada por una gran variedad de especies que habitan el suelo y las aguas estancadas, algunas forman parte de la microbiota del intestino de varias especies de animales y del hombre. (17)

Las infecciones por *P. aeruginosa* son procesos patógenos caracterizados por síndrome anémico depresivo, fiebre y enteritis que puede llegar a ser hemorragia. (23)

Son de vida libre, se encuentran en los materiales orgánicos en descomposición y tienen un importante papel en la degradación de dicho material, ciertas especies son patógenas para el hombre.

Caracteres micromorfológicos

Son bacilos Gram negativos, aerobios obligados, no esporulados y son bacilos no fermentadores (BNF). Algunos poseen microcápsulas y pigmentos solubles en agua. Poseen de 1-3 flagelos polares. Son bacilos rectos o curvos (bastoncillos) que pueden aparecer aislados, en pares o en cadenas, con un diámetro de 0.6- 2 μm . (17)

Caracteres macromorfológicos

P. aeruginosa es un aerobio obligado, que crece con facilidad en los medios de cultivo bacteriológicos tales como, agar cetrimida, agar sangre, agar Mc Conkey, agar SS. (17, 23) Se desarrollan a temperatura entre 10-42⁰C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 ⁰C. Los cultivos pueden mostrar varios tipos de colonias (2 mm de diámetro): lisas, rugosas, mucoides, redondas, alargadas, y generalmente emiten olor dulzón. Algunas cepas producen hemólisis. Las mismas producen pigmentos de fenazina en agar nutritivo y pueden ser azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorrubina) y negro (piomelanina). Existe aproximadamente un 10 % de *P. aeruginosa* que son apigmentadas. El crecimiento a 42 ⁰C con formación de velo en medio líquido, ayuda a distinguirlas de otras especies. (17, 24)

Epidemiología

Tiene como hábitat el agua, produce enfermedades por propiedades invasivas y toxigénicas, ya que pueden producir una exotoxina termolábil. Es muy resistente a los antibióticos. Presentan una gran susceptibilidad a las infecciones por este microorganismo los lactantes y prematuros y pacientes quemados. (23)

P. aeruginosa es el patógeno más importante dentro del género *Pseudomonas*, teniendo en cuenta la cantidad y tipos de infecciones (invasivas y toxígenas) que produce, así como la morbilidad y mortalidad que ocasionan. Esta bacteria provoca infección de las heridas y quemaduras, en las cuales origina un pus de color azul verdoso, ocasiona meningitis cuando se infiltra por punción lumbar e infección de vías urinarias cuando se infiltra por catéter, instrumentos o en soluciones de lavado de las vías urinarias. (17)

Es un patógeno oportunista que se presenta cuando los mecanismos de defensa del hospedero están alterados, suprimidos o comprometidos, siendo necesario la presencia de factores predisponentes para que ocurra la infección; entre ellos se encuentran las enfermedades malignas, las quemaduras, la diabetes. (17, 19)

Tratamiento

Es necesario emplear fármacos de forma combinada, pues pueden desarrollar resistencia cuando se usan de forma única. Deben utilizarse penicilinas activas contra *P. aeruginosa* como: ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, combinadas con un aminoglucósido: gentamicina, tobramicina, amikacina.

Otros medicamentos eficaces contra *P. aeruginosa* son: aztreonam, imipenem, quinolonas (ciprofloxacina) y cefalosporinas (ceftazidima y cefoperazona). (17)

2.3.3. Escherichia coli

Género: *Escherichia*

E. coli es el principal representante de la microbiota normal del hombre y los animales, sin embargo, existen cepas productoras de diarreas que pueden dar lugar a cuadros leves, evolucionar hasta la diarrea persistente u originar

complicaciones que pueden llegar hasta la muerte del paciente. De acuerdo a los patrones clínicos, las características epidemiológicas y patogénicas, diferenciación serológica y diferentes formas de interactuar con la mucosa intestinal, la especie *E. coli* se divide en seis clases productoras de diarreas: (22, 25)

- *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)
- *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)
- *E. coli* enteroagregativa (ECEA)
- *E. coli* difusamente adherente (ECDA)

Caracteres micromorfológicos (25)

Como miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa y la lactosa, carecen de indol-fenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hayan ampliamente distribuidos por la naturaleza; muchas de sus especies tienen como hábitat el intestino del hombre. (12) Pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos. En ocasiones, en cultivos jóvenes, se presentan en forma de cocos bacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0.5-2 µm de ancho y de 2-4 µm de ancho. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno son anaeróbicas facultativas.

Caracteres macromorfológico

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de subespecies es de 37 °C aunque *E. coli* tolera temperaturas hasta de 42 °C.

Los requerimientos de nutrientes en los que crecen estos microorganismos no son extremadamente exigentes. Así, pueden crecer bien desde un agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo. No obstante, en el diagnóstico de laboratorio se realiza el aislamiento a partir de heces fecales recién emitidas en los primeros 6 días de la enfermedad. El aislamiento se hace en agar

Mc Konkey con lactosa con sorbitol donde se observan las colonias blancas por la no utilización de este sustrato. (26)

Epidemiología

Las especies que se encuentran en ella son de las que más frecuentemente se identifican en los laboratorios de microbiología clínica como causa de infecciones tanto comunitarias como nosocomiales.

Las infecciones más frecuentes debidas a *E. coli* son la urinarias. Así mismo, puede originar infecciones de las vías biliares, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal y gastroenteritis, entre otras menos importantes. Aunque *E. coli* es un comensal normal del tubo digestivo puede causar infecciones en determinadas circunstancias, como son la emigración desde el intestino al tracto urinario, produciendo infección urinaria baja y eventualmente bacteriemia o infecciones focales por vía hematológica. Aunque la puerta de entrada más común es la urinaria, ello no significa que sea la única que permite el acceso de este germen a la circulación. En presencia de hepatopatía crónica se producen una serie de anastomosis portosistémicas que permiten el acceso de *E. coli* a la circulación general sin pasar por el filtro hepático, lo que puede originar una bacteriemia y facilita el desarrollo de peritonitis espontánea del cirrótico. También esta bacteria puede alcanzar el pulmón desde la faringe, especialmente en pacientes hospitalizados con enfermedades graves, ya que en estos pacientes *E. coli* forma parte de la flora orofaríngea. (27)

Tratamiento. (12, 17, 29)

Las gastroenteritis por *E. coli* no precisan casi nunca de tratamiento con antibióticos y en general sólo es necesaria una adecuada hidratación. En las infecciones urinarias bajas no complicadas pueden usarse diferentes antibióticos por vía oral (cefalosporinas de primera o segunda generación, amoxicilina-ácido clavulánico, cotrimoxazol, quinolonas) durante cinco a siete días. Por el contrario, en las infecciones urinarias complicadas y pielonefritis, especialmente si cursan con bacteriemia, es preciso utilizar antibióticos parenterales. La gran mayoría de

las cepas de *E. coli* son actualmente resistentes a la ampicilina, por lo que es necesario el uso de aminoglucósidos o cefalosporinas de segunda o tercera generación en esta situación. La resistencia cada vez mayor a quinolonas puede dificultar en el futuro empleo de estos fármacos.

CAPITULO III

3. Materiales y Métodos

Se seleccionó la planta **Siempreviva**, con reportes de acción cicatrizante, antifúngica, antiinflamatoria, antibacteriana, vasoconstrictora, diurética, antiséptico urinario y de acción sobre el sistema nervioso central, pero sin efectos terapéuticos comprobados experimentalmente. Esta selección se realizó tomando como criterio la revisión bibliográfica, los reportes populares y la disponibilidad de las mismas. (30, 33)

La planta seleccionada fue recolectada en el Organopónico de Veguitas Municipio de Yara, Provincia Granma a las 10 am y fue identificada por el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencia Agrícola de la Universidad de Granma, según la Norma Ramal de Salud Pública 311 (1998).

Las partes de la planta utilizadas en los ensayos in vitro fueron las hojas.

El material fue trisado y secado a la sombra a temperatura ambiente y extendida en bandejas perforadas volteándose diariamente durante 7 días, luego se sometió a temperatura de 60 °C durante una hora en estufa marca WSU400 con circulación de aire. Terminado este proceso de secado se procedió a la pulverización de la droga hasta obtener un polvo grueso (2 mm) que se empleó en la elaboración de los extractos, tinturas y extractos fluidos. La droga cruda se obtuvo mediante la trituración de las hojas secas.

Como paso lógico de la ruta crítica para la investigación científica de los productos naturales, se realizó el análisis de la composición fitoquímica de los extractos de las partes de la planta en experimentación.

3.1. Preparación de Formulaciones

3.1.1. Extractos (Etéreo, Etanólico y acuoso).

Para la obtención de los extractos, se pesan 10g de muestra en balanza analítica marca SARTORIUS y se le realizan extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, alcohol y agua) con la finalidad de lograr un mayor agotamiento del material vegetal seco.

3.1.2. Tinturas al 20 %.

Las tinturas fueron obtenidos una vez recolectado el material vegetal, secado apropiadamente y tamizado a 0.5 mm de diámetro, utilizando como menstruo Alcohol al 70 %. Se utilizaron 100 g de la droga cruda para obtener 500 ml de tintura al 20 %. La extracción de las tinturas se realizó por maceración de la droga pulverizada, por un tiempo de 7 días, según Norma Ramal de Salud Pública 311 (1998); la Norma Cubana de Salud Pública 313 (1998) Programa de Medicina Tradicional y Natural (1999).

Después de realizada la extracción y lograda la homogeneidad y transparencia total de cada producto, se colocó en frasco ámbar para evitar la descomposición de la sustancia activa por acción de la luz, ya que muchas sustancias activas extraídas de plantas son fotosensibles. Se deja reposar por tres días en refrigeración y luego son sometidos al análisis de calidad, mediante la aplicación de los métodos de ensayos para la determinación de los requisitos de los extractos fluidos y tinturas: determinación del PH, del índice de refracción, de la densidad relativa y de los sólidos totales.

La determinación de calidad de la tintura al 20 % de Siempreviva se realizó basado en la Norma Ramal de Salud Pública 312 (1998).

3.1.3. Extracto secos.

El extracto seco de Siempreviva fue obtenido a partir de la tintura al 20 %. La muestra se lleva a un balón de 500 ml y luego a un roto evaporador marca KIKA de producción Alemana donde se elimina el solvente a 50 °C hasta obtener una masa consistente.

3.2. Especificaciones de Calidad. (40)

Determinación de pH: Se determina según se establece en la NC 90-13-13. Se determina según se establece en la NC 90-13-13' con pHmetro HANNA 211, Portugal (41)

Determinación del índice de refracción. (42) con refractómetro ABBE WYA-2S, China

Procedimiento: Sobre el prisma de medición de un refractómetro Abbé se coloca una gota de agua, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos; se espera 10 minutos y se ajusta el instrumento al índice de refracción correspondiente al agua a una temperatura de 25 °C, con una tolerancia de $\pm 0,2$ °C. Se limpian los prismas cuidadosamente empleando un algodón humedecido con solución de alcohol y éter etílico 50 % v/v.

Con la varilla de vidrio se coloca en el prisma fijo, sin tocarlo, una o dos gotas de la muestra de ensayos. Se cierra el doble prisma y se esperan unos minutos antes de efectuar la lectura, hasta que la temperatura sea estable.

Si la muestra de ensayos es de color claro o transparente, se utiliza luz transmitida, o sea, se coloca una gota de la muestra de ensayos sobre el prisma de medición, se cierra el termo prisma y se enfoca la luz a través del prisma de iluminación.

Si la muestra de ensayos es de color oscuro u opaco, se utiliza luz reflejada, o sea, se coloca una gota de la muestra de ensayos sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la abertura de entrada del prisma de medición.

Expresión de los resultados.

Método para los cálculos: Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no pueden diferir en más de 0,002 n_D .

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia, se emplea la fórmula siguiente:

$$n_D^{25} = n_D^t + 0,000\ 44 (t - 25)$$

donde:

n_D^{25} índice de refracción a 25 °C

n_D^t valor leído en la escala del aparato a la temperatura t

t valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0,000 44 factor de corrección por grado centígrado

Aproximación de los resultados e informe: El ensayo se realiza por triplicado. Los valores se aproximan hasta la milésima y se informa el valor del índice de refracción.

Determinación de sólidos totales

Procedimiento: De la muestra de ensayos previamente homogeneizada se transfieren 5 ml a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se coloca en un baño de agua y se evapora hasta que el residuo esté aparentemente seco; posteriormente se pasa a una estufa a una temperatura de 105 ± 2 °C durante 3 h.

Se retira la cápsula de la estufa, se coloca en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa. Se repite el proceso anterior, pero empleando sólo 60 min de secado, las veces necesarias, hasta obtener masa constante.

Expresión de los resultados

Método para los cálculos: Los sólidos totales S_t se calculan mediante la fórmula siguiente

$$S_t = (P_r - P / V)100$$

donde:

P_r masa de la cápsula más el residuo (g)
 P masa de la cápsula vacía (g)
 V volumen de la porción de ensayos (mL)
100 factor matemático

Aproximación de los resultados e informe: El ensayo se realiza por duplicado. Los valores se aproximan hasta la décima. Se informa la cantidad de sólidos totales g/100 ml.

3.3. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó en el laboratorio de productos naturales de la Universidad de Granma. Bayamo. Cuba, por la metodología reportada por Payo, Sandoval y Peña. (8, 34, 35) Se emplearon pruebas o técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios.

A cada uno de los extractos y tinturas obtenidas se les realizan los ensayos reflejados a continuación.

Extracto etéreo.

Se concentran a sequedad cada una de las fracciones y se llevan a cabo los siguientes ensayos.

- ✓ Ensayo de Mayer (alcaloides)
- ✓ Ensayo de Baljet (coumarinas)
- ✓ Ensayo de Sudan III (ácidos grasos)

Extracto etanólico.

- ✓ Ensayo de Resina
- ✓ Ensayo de Liebermann-Burchard (triterpenos y/o esteroides)
- ✓ *Ensayo de espuma (saponinas)*
- ✓ *Ensayo de Ninhidrina (aminoácidos libres)*
- ✓ *Ensayo de Mayer y Wagner (alcaloides)*
- ✓ *Ensayo de Baljet (coumarinas)*
- ✓ *Ensayo de Fehling (Carbohidrato reductores)*
- ✓ *Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)*
- ✓ *Ensayo de Borntrager (quinonas)*
- ✓ *Ensayo de Shinoda, (flavonoides)*
- ✓ *Ensayo de antocianidinas*

Extracto acuoso.

- ✓ *Ensayo de espuma (saponinas)*
- ✓ *Ensayo de Shinoda, (flavonoides)*
- ✓ *Ensayo de Fehling (Carbohidrato reductores)*
- ✓ *Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)*
- ✓ *Ensayo de Mayer y Wagner (alcaloides)*
- ✓ *Ensayo de Borntrager (quinonas)*
- ✓ *Ensayo de mucílagos*

Breve descripción de los ensayos que se realizan.

Ensayo de Sudán III, permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente.

Ensayo de Mayer y el de Wagner, permiten identificar alcaloides, para ello si la alícuota está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de HCl 1%. Si el extracto es acuoso a la alícuota se le añade una gota de HCl concentrado, se calienta suavemente y se

deja enfriar hasta acidez. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias. (34)

Ensayo de Baljet, permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos láctonicos pueden dar también positivo este ensayo. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en etanol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1ml). En estas condiciones se adiciona 1ml del reactivo, considerándose la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración (+) y un precipitado (++)

Para la identificación de quinonas se emplea el **ensayo de Borntrager**. Para ello debe de evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de NaOH, KOH o NH₄OH al 5% en agua, se agita mezclando las fases. Sí la fase acuosa alcalina (superior) se colorea, el ensayo se considera positivo (+), coloración rosado (++) , coloración rojo (+++).

La presencia de triterpenos y/o esteroides, se puede realizar a través del **ensayo de Liebermann - Burchard**, debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe de evaporarse el solvente y el residuo redisolverse en 1ml de cloroformo, se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por las paredes del tubo se dejan correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio de color.

1-rosado-azul muy rápido

2-Verde intenso, visible aunque rápido

3-Verde oscuro- negro al final de la reacción

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. Esta reacción también se emplea para diferenciar las estructuras esteroidales de las triterpénicas, las primeras producen coloraciones que van desde azul a azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

Observación: Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción, ya que con el ácido sulfúrico puede reaccionar de forma violenta.

La presencia de aminoácidos libres o de aminas en general se realiza a través del **ensayo de Ninhidrina**. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2ml de la solución de ninhidrina al 2%. La mezcla se calienta durante 10 min en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.

Ensayo de Shinoda. Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en etanol, se diluye con 1ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálica. Después de la reacción se esperan 5 min., se añade 1ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que las mismas se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

Ensayo de antocianidinas Permite identificar en los extractos la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calientan 2ml del extracto en etanol durante 10 min, con 1ml de ácido clorhídrico concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1ml de agua y 2ml de alcohol amílico. Se agita y se espera a que las dos fases se separen. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativo de un ensayo positivo.

La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae, denota la presencia de **mucílagos**. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo

Ensayo de espuma permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas. De modo que si la alícuota se encuentra en etanol, se diluye en 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 min. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de 2 min.

Para reconocer la presencia de azúcares reductores se emplea el **ensayo de Fehling**. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 ml de agua. Se adicionan 2 ml del reactivo (recién preparado) y se calienta en baño de agua de 5-10 min. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo

Ensayo de resina. Para detectar la presencia de resinas, adicione a 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

Ensayo de Cloruro Férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. Si el extracto de la planta se realiza con etanol el ensayo

determina tanto fenoles como taninos; a una alícuota del extracto etanólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos; a una alícuota del mismo se le añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de la solución reactiva. Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- ✓ Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general.
- ✓ Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- ✓ Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

3.4. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Siempreviva

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Siempreviva se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*) con algunas modificaciones. Este método fue publicado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) y la *Organización Mundial de la Salud* (**WHO**, del inglés, *World Health Organization*) y adoptada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (**CLSI**, antes NCCLS) como norma de aceptación general. ⁽⁴²⁾

Principio

El disco impregnado en antibiótico (o extracto vegetal) hace contacto con la superficie del agar. El agua es absorbida por el papel de filtro y el antibiótico difunde hacia el medio circundante. La velocidad de difusión del antibiótico (o extracto vegetal) fuera del disco es mayor que la de su difusión hacia el medio, de modo que la concentración del antibiótico inmediatamente adyacente al disco puede exceder la del mismo disco. Sin embargo, a medida que aumenta la distancia al disco, ocurre una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico hasta que se llega a un punto en el que el desarrollo bacteriano de la

superficie del agar ya no es inhibido. El resultado es una zona de inhibición del desarrollo microbiano con bordes bien definidos denominado *halo de inhibición*.

Procedimiento

Microorganismos evaluados

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana son de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection (ATCC)* y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudios y se relacionan a continuación: *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC).

Preparación de los discos de antibióticos empleados:

Se emplearon discos de antibióticos comerciales (Sensi-Disc™, Francia) de amplio espectro para cepas bacterianas. En este sentido se emplearon discos de Amicacin (**AK**) de 30 µg y Kanamycin (**K**) de 30 µg.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Siempreviva se resuspendieron 0.6 g de los extractos secos en 1 ml de dimetilsulfóxido (**DMSO**) para una concentración final de 600 µg/ml. A partir de esta solución *stock* se preparó una solución de 50 µg/ml. Para la obtención de la tintura se siguió el protocolo que se explica en el acápite ++++ del capítulo III. Materiales y métodos. Se aplicaron 8 µl en discos de papel de filtro (pb, SA, Brasil) de 6 mm de diámetro para una concentración final de 400 µg/disco de extracto seco y para la tintura no se sabía la concentración en el momento de la aplicación. Una vez cargados los discos con cada una de las soluciones se dejaron secar a 50°C por 15 min antes de dispensarlos en las placas inoculadas. Dado a la viscosidad del DMSO y sus características físico-químicas no se logró la evaporación del solvente.

Como control negativo se emplearon discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 8 µl de etanol al 70 % y DMSO para la tintura y el extracto seco de Siempreviva, respectivamente, que fueron los solventes empleados en la

preparación de las soluciones a evaluar. El etanol al 70 % sufrió los mismos procedimientos que la tintura a evaluar.

Preparación de los inóculos

Se tomaron de tres a cinco colonias semejantes y se trasladaron con un asa de inoculación a 4-5 ml de caldo nutriente (Biocen, Cuba). Los cultivos en caldo se incubaron en agitación a 100 rpm en una zaranda (MLW, Alemania) y $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2-6 h. La turbidez de los mismos se ajustó equivalentemente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml.

Inoculación de las placas de agar y dispensación de los discos de antibióticos

Se tomó un hisopo estéril y se llevó a la suspensión, se eliminó el exceso de líquido presionando y rotando el hisopo sobre las paredes del tubo por encima del nivel del líquido. Se estrió la superficie del medio agar Mueller-Hinton, contenido en placas petri (Anumbra, China) de 90 mm de diámetro, en tres direcciones con 60° de diferencia entre ellas para obtener una siembra uniforme en césped. Se dejó secar la placa de 3-5 min. Posteriormente se depositaron los discos de antibióticos en la placa petri, inoculada con la suspensión bacteriana, empleando una pinza (Bochem Stainless, Inglad) estéril. Los discos se colocaron a una distancia no menor de 10 mm del borde de la placa y una separación entre ellos no menor de 30 mm para evitar la superposición de los halos de inhibición. Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por un período de 16-18 h en una incubadora (Sartorius, China).

Evaluación de los resultados

La zona de inhibición es el área que rodea al disco donde el crecimiento ha sido completamente inhibido. Los resultados se expresaron como el diámetro del halo de inhibición del crecimiento, medido en mm, con una regla milimetrada (Wenquan, China).

Análisis estadístico

Se empleó un ANOVA de clasificación simple en la comparación de varias muestras por el test de Fisher, en los casos en que hubo diferencias estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$ se realizó un test de rangos múltiples para determinar las medias que diferían. El método utilizado para discernir entre las medias fue el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

CAPITULO IV

4. Resultados y Discusión (43,44,45)

4.1. Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso, seco y tintura 20 % de Siempreviva.

Las propiedades farmacológicas de los extractos naturales obtenidos de plantas medicinales dependen de la composición de metabolitos secundarios y de la concentración de los mismos. Como resultado de la determinación de la composición fitoquímica de los extractos empleados.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del **extracto etéreo, etanólico y acuoso:**

Ensayo	ETÉREO	ETANÓLICO	ACUOSO
Saponinas (Espuma)	*	+	-
Flavonoides (Shinoda)	*	+	-
Aminoácidos libres (Nihidrina)	*	+	*
Quinonas (Borntrager)	*	+++	*
Triterpenos y/o Esteroides (Liebermann-Burchard)	*	+	*
Coumarinas (Balject)	+	+	*
Fenoles y/o Taninos (Cloruro férrico)	*	+	*
Resinas	*	-	*
Antocianidinas	*	+	*
Carbohidratos reductores (Fehling)	*	+	-
Mucilagos	*	-	+
Alcaloides (Mayer)	-	+++	-
Ácidos grasos (Sudan III)	+	*	*

Leyenda: - => Ausencia + => Presencia ++ y +++ => Abundante * => No realizado

En la tabla 1, se muestra los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los

extractos; etéreo, alcohólico y acuoso donde se muestra la alta variabilidad de compuestos presentes en las hojas de Siempreviva.

Se observa la presencia de una alta cantidad de quinonas y alcaloides que podrían ser los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana de esta planta.

Además en el extracto alcohólico es donde están disueltos la mayor cantidad de metabolitos secundarios.

4.2. Comparación del tamizaje fitoquímico de la tintura 20 % y el extracto seco.

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico de las tinturas al 20% y extractos secos.

ENSAYO	TINTURA	EXTRACTO SECO
Resinas	-	-
Triterpenos y/o Esteroides (Liebermann-Burchard)	+	-
Saponinas (Espuma)	+	+
Aminoácidos libres (Nihidrina)	+	+
Alcaloides (Mayer y Wagner)	+++	+
Coumarinas (Baljet)	+	+
Carbohidratos reductores (Fehling)	+	+
Fenoles y/o Taninos (Cloruro férrico)	+	+
Quinonas (Borntrager)	+++	-
Flavonoides (Shinoda)	-	+
Antocianidinas	+	+

Leyenda: - => Ausencia + => Presencia ++ y +++ => Abundante

La tabla 2 muestra el resultado del tamizaje fitoquímico realizados a las tintura al 20% y a los extractos secos, se puede notar que son ricos en metabolitos secundarios, destacándose un alto contenido de alcaloides

determinados por el método de Mayer y los demás metabolitos se encuentran en menor proporción.

Se ha detectado además que no hay presencia de resina. Un aspecto importante es que la composición de metabolitos se mantiene casi igual en la tintura y el extracto seco obtenidas a partir de esta, a excepción de las quinonas determinados por el método de Borntrager, que se encuentran en la tintura y no en el extracto seco, esto puede ser debido a la descomposición del mismo por la temperatura. Por tanto las propiedades farmacológicas se mantienen, ya que es conocida la dependencia que existe entre composición química y propiedades.

4.3. Control de la calidad realizado a la tintura 20 %.

Tabla 3 Control de calidad de las tinturas.

Índice de refracción	1,2995
pH	4,02
Sólidos totales	0,2100

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la determinación de calidad de la tintura al 20% de las hojas de **Siempreviva**. La cual fue tomada como materia prima para la obtención de los extractos secos, estos resultados están en los rangos de calidad que establecen las normas NR313 esto garantiza el empleo óptimo de la misma, el valor de los sólidos totales es de 0,2100 lo que indica una concentración adecuada de principios activos. El pH se estabilizó por debajo de 7, lo que indica que son soluciones ligeramente ácidas, hecho éste que unido al medio alcohólico permite su estabilización y conservación.

4.4. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Siempreviva

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Siempreviva (*Kalanchoe pinnata*) se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Este método fue adoptado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS)* como norma de aceptación general. ⁽⁴²⁾

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana son de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection (ATCC)* e incluyen *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC).

En este ensayo se emplearon discos de antibióticos comerciales como controles positivos y discos de papel de filtro (6 mm de diámetro) conteniendo el solvente, empleado en la preparación de las soluciones de los extractos secos y la tintura al 20 % de hojas de Siempreviva (DMSO y etanol al 70 %, respectivamente), como control negativo. En discos de papel de filtro (6 mm de diámetro) se depositaron 8 µl de extracto seco y tintura de Siempreviva. Los resultados se evaluaron por la medición en milímetros (mm) del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano que aparece alrededor del disco. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener las réplicas necesarias para el análisis estadístico.

En la figura 1 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos de hojas de Siempreviva frente a 3 cepas bacterianas. En esta figura se evidencia que los controles positivos presentan halos de inhibición entre 18-23 mm de diámetro para todas las cepas bacterianas evaluadas excepto para Kanamycin frente a *P. aeruginosa* donde, aunque se observó un halo de inhibición, este se encontraba invadido por colonias bacterianas, cuyo resultado se reporta como negativo. Según la tabla de clasificación de la susceptibilidad de los microorganismos, publicada por el CLSI ⁽⁴²⁾ (Anexo II), las tres cepas bacterianas son susceptibles (**S**) a Amikacin al igual que *Escherichia coli* (ATCC 113-3), y *Staphylococcus aureus* (ATCC) para

Kanamycin, mientras *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) es resistente a este antibiótico.

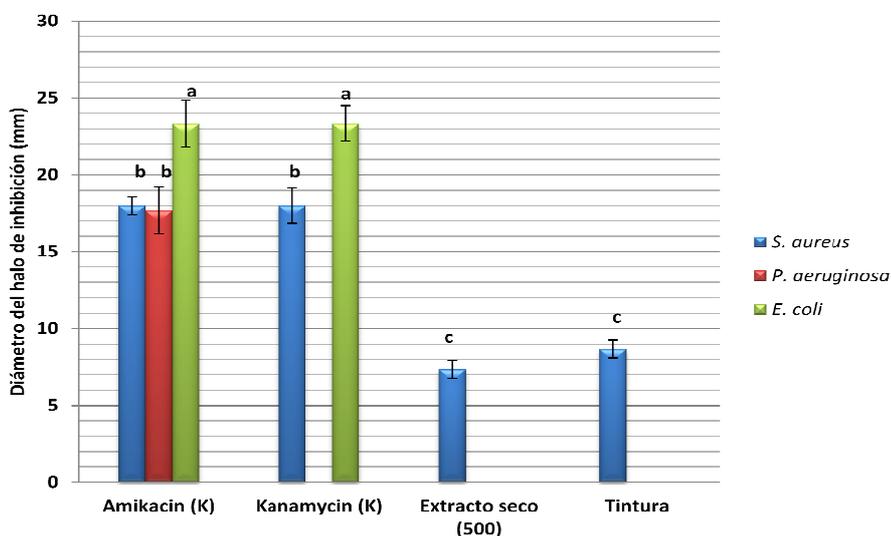


Figura 1. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos y tintura al 20 % de hojas de Siempreviva (*Kalanchoe pinnata*), mediante el método de difusión superficial en disco (Bauer-Kirby) frente a tres cepas bacterianas de interés clínico. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

Se evidencia además, que el extracto seco a 400 $\mu\text{g}/\text{disco}$ y la tintura al 20 % de hojas de Siempreviva tienen actividad antibacteriana sólo frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC), con halos de inhibición de 7 y 9 mm de diámetro, respectivamente. Estos resultados, conjuntamente con la ausencia de halo de inhibición alrededor del disco conteniendo DMSO y etanol al 70 % (controles negativos), nos sugieren que las hojas de la Siempreviva presenta metabolitos secundarios con actividad antiestafilocócica.

La diferencia en los halos de inhibición del extracto seco y la tintura al 20 % se explicaría por el hecho de que la tintura al 20 % presenta una concentración 4 veces mayor que los del extracto seco. Se pudo constatar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición del extracto seco (400 $\mu\text{g}/\text{disco}$) y la tintura al 20 % (m/m). Estos resultados sugieren que a

mayores concentraciones de extracto seco de hojas de Siempreviva no se obtendrán mejores resultados frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC) y probablemente tampoco frente al resto de las cepas bacterianas evaluadas.

En el caso del *Staphylococcus aureus* (ATCC) estos resultados pudieran explicarse teniendo en cuenta que los sistemas biológicos presentan una concentración de saturación de la actividad, basado en que el mecanismo de acción de los principios activos pudiera estar mediado por reconocimiento molecular y no por acción inespecífica.

Estos resultados también pudieran estar influidos por la sensibilidad y principio del método empleado ya que, a medida que aumenta la distancia al disco, ocurre una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico hasta que se llega a un punto en el que el desarrollo bacteriano de la superficie del agar ya no es inhibido (Llop *et al*, 2001). En este sentido, es de esperar que al aumentar la concentración del principio activo sea mayor el diámetro de inhibición correspondiente. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el caso de la tintura al 20 % se hace evaporar el solvente (Etanol al 70 % (v/v)) y la solubilidad en agua de los principios activos pueda no ser la mejor, por lo que pudiera estar afectando los procesos de difusión y por tanto enmascarando los resultados. En el caso del extracto seco de hojas de Siempreviva la solución se preparó en DMSO que, aunque es un solvente de elección para la solubilización de sustancias orgánicas, no se volatiliza y es muy viscosa, por tanto, es posible que también se vieran afectados los procesos de difusión aunque de manera diferente. Por lo antes expuesto, es probable que empleando otro método de evaluación de la actividad antibacteriana como los basados en diluciones seriadas en caldo, mediante los cuales se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (**MIC**, del inglés, *Minimal Inhibitory Concentration*) y Concentración Mínima Bactericida (**MBC**, del inglés, *Minimal Bactericidal Concentration*), se obtengan resultados diferentes.

Aunque la clasificación de la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) frente a los extractos secos evaluados y tintura al 20 % es de resistente (R), según la tabla de clasificación de la susceptibilidad de los microorganismos, publicada por el CLSI

(Anexo I), a diferencia de los antibióticos comerciales evaluados ante los cuales esta cepa es completamente susceptible, los resultados obtenidos no son desalentadores por cuanto hay que tener en cuenta la posible diferencia de concentraciones de los principios activos entre los discos de antibióticos comerciales y los que contienen los extractos secos y tintura al 20 % de hojas de Siempreviva. En este sentido, los discos comerciales contienen el principio activo con altos niveles de pureza en tanto para los discos de papel de filtro que contienen los extractos vegetales las concentraciones empleadas se refieren a la masa de sustancias solubles en etanol, entre las que se encuentran varias familias de compuestos químicos. Para ejemplificar lo antes expuesto, en la tintura al 20 % se identificaron saponinas, triterpenos y/o esteroides, coumarinas, fenoles y/o taninos, antocianidinas, aminoácidos libres, carbohidratos reductores, alcaloides y quinonas; y en el extracto seco de hojas de Siempreviva se identificaron en este trabajo saponinas, flavonoides, coumarinas, fenoles y/o taninos, antocianidinas, aminoácidos libres, carbohidratos reductores y alcaloides. Por ello se debe trabajar en el aislamiento y purificación de los principios activos para probar su verdadero potencial antibacteriano.

Los metabolitos secundarios de las plantas, tales como saponinas, flavonoides, taninos, glucósidos cianogénicos, fenoles, terpenoides y quinonas entre otros, son responsables de la actividad antibacteriana de los extractos vegetales (43, 44, 45, 46, 47). En este sentido, la mayoría de las familias químicas identificadas en el tamizaje fitoquímico de los extractos secos y tintura al 20 % de hojas de Siempreviva pudieran contener ejemplares con posible actividad antibacteriana. No obstante, es de destacar que los compuestos químicos pertenecientes a la familia de las quinonas y los alcaloides son los más abundantes en la tintura al 20% mientras en el extracto seco la abundancia de los alcaloides disminuye y la de las quinonas se pierde. Estos resultados sugieren que es probable que estas familias químicas sean las responsables de la actividad antibacteriana observada por cuanto no hay diferencias estadísticamente significativas entre estos extractos vegetales.

En un estudio realizado por Kaur y Arora (2009) (43) con tres especies vegetales (*Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* y *Trachyspermum ammi*) determinaron

y aislaron los componentes fitoquímicos de estas plantas y realizaron la evaluación de la actividad antibacteriana de ellos frente a *Staphylococcus aureus* y otras cepas de interés clínico. Estos autores demostraron que las saponinas, fenoles y/o taninos, glucósidos cardiotónicos y alcaloides eran responsables en alguna medida de las propiedades antibacterianas de los extractos de las plantas evaluadas y no así los flavonoides. También demostraron que frente a *Staphylococcus aureus* sólo las saponinas fueron efectivas. En este sentido es probable que en nuestra investigación se diera un fenómeno similar aunque se sabe que las familias químicas están representadas por compuestos disímiles en familias botánicas diferentes e incluso en especies diferentes de un mismo género. Los resultados de la actividad antiestafilocócica de los extractos secos de hojas de Siempreviva son similares a los obtenidos por Bhandari *et al* (2000) (43) frente a *Staphylococcus aureus* quienes emplearon discos con 1 mg/disco de extracto seco de *Berberis asiatica*.

En la actualidad no existe una organización o institución que legisle o estandarice las concentraciones de extractos secos vegetales u otro formulado fitofarmacéutico a emplear en la evaluación de la actividad antibacteriana de las plantas medicinales por el método de difusión superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Es por ello que en la literatura aparecen valores de diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano que difieren mucho entre ellos, sin embargo, hay que tener muy presente las concentraciones empleadas para ellos. En este sentido, los estudios realizados por Mothana *et al* (2009) (43) con 26 especies de plantas pertenecientes a 17 familias botánicas diferentes, en los cuales se realizaron extracciones con metanol, los resultados arrojaron que 23 de estas plantas mostraron actividad antiestafilocócica con halos de inhibición entre 8-31 mm de diámetro, pero para los ensayos emplearon 8 veces mayor la mínima concentración efectiva en nuestros estudios.

Así mismo, en un amplio estudio realizado por Duraipandiyan *et al* (2006), (43) en la India, con 18 especies de plantas medicinales de ese país frente a 9 cepas bacterianas se muestran resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo. Los resultados obtenidos por estos autores revelaron que para 3 de estas plantas

no se encontraron principios activos solubles en metanol con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, para la mínima concentración (1.5 mg/disco) que emplearon los autores en los ensayos, que es 3 veces mayor que la mínima concentración efectiva en nuestra investigación, solo 3 de las 18 plantas evaluadas mostraron actividad antiestafilocócica y con halos de inhibición muy similares a los obtenidos en nuestros estudios. Por lo antes expuesto, podemos destacar que nuestros resultados son muy promisorios por cuanto a concentraciones tan bajas como 0.5 mg/disco se obtienen halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* semejantes a los obtenidos para estas tres plantas mencionadas anteriormente.

Por lo antes discutido, podemos sugerir que sería más rentable el empleo de formulaciones farmacéuticas preparadas a partir de las hojas de Siempreviva que las preparadas a partir de cualquiera de las 16 plantas antes tratadas con resultados inferiores a los obtenidos para *Kalanchoe pinnata*.

El hecho de que los extractos secos y tintura al 20 % de hojas de Siempreviva sólo mostraran actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC) y no frente a las bacterias Gram-negativas, podría explicarse por la diferencia estructural de la pared celular de estas bacterias. En este sentido, la pared celular de las bacterias Gram-positiva es menos compleja y carece de la propiedad de tamiz natural para grandes moléculas por presentar poros no selectivos, lo cual debe permitir una penetración más fácil de los principios activos a través de ella. (43, 44) Otra posible explicación podría estar dirigida a que los principios activos tengan un mecanismo de acción específico frente a las bacterias Gram-positivas como lo tiene, por ejemplo, la penicilina, que afecta solamente a las bacterias Gram-positivas; o por mecanismos de acumulación en la membrana. (43) No obstante, es preciso realizar evaluaciones de la actividad antibacteriana frente a otras cepas bacterianas para poder llegar a una conclusión más fundamentada.

CAPITULO V

5. Conclusiones

- Se obtuvieron extractos (etéreo, etanólico, acuoso), tintura al 20% y extracto seco, determinándose la composición fitoquímica preliminar y se comprobó que en este predomina alcaloides, coumarinas, quinonas, flavonoides, fenoles, saponinas, aminoácidos libres, antocianidinas, carbohidratos reductores, ácidos grasos.
- Se determinaron las especificaciones de la calidad de tinturas al 20%, las cuales se encuentran dentro de los rangos establecidos, dentro de las normas NR313.
- Se demostró que la composición del extracto seco es similar a la de la tintura al 20% con excepción de alcaloides, quinonas, y flavonoides.
- Se demostró mediante ensayos biológicos que el extracto seco y la tintura al 20 % tienen acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

CAPITULO VI

6. Recomendaciones.

- Determinar la MIC y la MBC de los extractos de Siempreviva para la cepa de *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar las formulaciones farmacéuticas de las hojas de Siempreviva en pacientes afectados con enfermedades producidas por *Staphylococcus aureus*.
- Realizar estudios de toxicidad a los extractos de la planta estudiada.
- Ampliar los estudios *in vitro* a otros microorganismos no empleados en dicho estudio, especialmente bacterias (G+).

- Aislar y purificar el o los principios activos responsables de la actividad antibacteriana.
- Realizar los estudios de actividad antifúngica de las hojas de Siempreviva.
- Realizar estudios *in vivo* para corroborar las observaciones *in vitro*.

CAPITULO VII

7. Bibliografía

1. Tabloides de Plantas Medicinales "Universidad para Todos" Pág. 31 Editorial Abril.P13-16
2. Manual de plantas medicinales <http://www.monografias.com/trabajos34/medicina-natural/medicina-natural.shtml#fabric> Consultado el 13/05/10.
3. Microsoft ® Encarta ® 2009. © 1993-2008 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
4. Artículo en línea Sitio: http://www.wikipedia.org/wiki/medicina_natural/, consultado 17/may/2010.
5. Roig, JT, Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana. 1988, 839.
6. Granda M, Fuentes V, Acosta L, Cabrera I. 1988, Sustancias biológicamente activas en: Plantas medicinales I. La Habana: CIDA; V,4 -7.
7. Plantas medicinales del Perú - ANÁLISIS FITOQUIMICO Y METABOLITOS SECUNDARIOS www.maca-peruana.com/analisis.htm Consultado el 08/06/10
8. PEÑA, R.A (2002) Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional. Monografía. Bayamo
9. <http://www.arrakis.es/~jmanuel/Plantascubanas.pdf> Consultado el 20/05/10
10. http://es.wikipedia.org/wiki/Kalanchoe_pinnata#Propiedades Consultado el 05/06/10
11. http://www.linneo.net/plut/B/bryophyllum_pinnata/bryophyllum_pinnata.htm Consultado el 05/06/10
12. Miranda, M y A. Cuellar (2001).Farmacognosia y química de los productos naturales. Editorial Félix Varela. Ciudad de La Habana. Ministerio de Educación Superior.

13. http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas

Consultado el 26/06/10

14. DISCOVERY DSALUD >>> PLANTAS MEDICINALES

www.dsalud.com/fitoterapia_numero17.htm Consultado el 18/06/10

15. Abad, G Cuba, F (2004) "Monografía de metabolismo secundario"

16. <http://es.wikipedia.org/wiki/Bacterias-conceptos> Consultado el 27/05/10

17. Llop A. H. y otros(2001), Microbiología y Parasitología Médicas, La Habana: Editorial Ciencias Médicas.

18. J.A. Capdevila Morell, B. Almirante Gragera, C. Pigrau Serrallach y A. Pahissa Berga. Infecciones por estafilococo. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Vall d'Hebrón. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. Medicine 1998.

19. Burrows, W. (1974). Tratado de microbiología Ed. Nueva editorial interamericana. México.

20. Jawetz, E; JL.Melnick.(2000). Microbiología Médicas. Ed. El manual moderno S.A. México.

21. Brock, TD; MT, Madigan. Microbiología. Ed. Prentice Hall Hispanoamérica. México, 1993.

22. Boyd, R ; Bryan, H. Microbiología Médicas. Ed. Librería El Ateneo. Buenos Aires, 1981.

23. Sánchez, A. Enfermedades de las aves. Ediciones ENPES. La Habana. 1990.

24. Dorn, P. Manual de patología aviar. Ed. Acribia. España. 1983

25. Merchant, I; Packer, R.A. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acribia. Zaragoza. 1980.

26. Nicolet, J. Compendio de Bacteriología Medica Veterinaria. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. 1986.

27. Boado, Encarnación, E. Laurent; C. Herrera; Dalia Quintero; A. Cánovas.

28. Sánchez, P.A Y María del Carmen Lamazares. Patología Aviar. Ministerio de educación superior. 1990.

29. Madeus, Virginia; Isis Acosta; Tamara Ramejo; V.M. Espinoza; C. Herrera; Raquel hernat y Graciela Díaz. Caracterización de los procesos respiratorios mediante el diagnóstico serológico y cuadro clínico lesional. Informe técnico. Instituto de Investigaciones Avícola. La Habana. 1995
30. Robineau, L. (1995) Hacia una Farmacopea Caribeña. Sto. Domingo, endacaribe/ UNAH. 278.
31. Scull R., M. Miranda y R. E. Infante (1998) Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Estudio etnobotánico I. Rev. Cubana Farm v: ene-abr. Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la Habana.
32. Norma Ramal de Salud Pública 311(1998). Medicamentos de origen vegetal extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. La Habana.
33. Payo, A. (2001) Tamizaje Fitoquímico del *Croteun L.* Revista Cubana de Farmacia v.35 n.3 Ciudad de la Habana sep-dic.
34. Sandoval, D. y O. Suárez (1990) Estudio Fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. V: 24(2)288-96.
35. Olazabal, E. (2000) Investigación de nuevos antiparasitarios de uso veterinario y humano. Tesis de doctorado. UCLV.
36. Vercruysse J., P. Holdsworth., T. Letonja, D. Barth. G. Conder., K. Hamamoto, K.OKANO (2001) J. of Veterinary Parasitology 96 pp171–193 International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines.
37. Norma Cubana Salud Pública 313(1998). Métodos de ensayos a partir de drogas crudas. Salud Pública.
38. Vidal, A. (2001) Guía de Manejo del ave semirrustica. Ministerio de la Agricultura. Unidad de Empresas Combinado Avícola Nacional. Instituto de Investigaciones Avícolas.
39. NC 92-02 Control de la calidad. Muestreo de líquidos.
40. NC 90-13-13 Aseguramiento metrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH.

41. NC 90-13-11 Aseguramiento metrológico. Refractómetros. Reglas generales para efectuar determinaciones refractométricas.
42. **Clinical and Laboratory Standards Institute (2007)**. M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne Pa.
43. Guerra Ordóñez M. Guacamaya francesa. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro*. Informe de Investigación. CIDEM, La Habana; Mayo 1995.
44. Ortega E. y otros. Estudio de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extracto de *Cassia alata* frente a cepas de interés en dermatología. Matanzas, Colón; 1994
45. Wuthi-udomlert M. y otros. Antifungal activities of *Senna alata* extracts using different methods of extraction. ISHS, Acta Horticulturae 597: International Conference on Medicinal and Aromatic Plants).
46. Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne Pa.
47. Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne
48. Nweze EL, Okafor JI and Njoku O (2004). Antimicrobial activities of methanolic extracts of *Trema guineensis* (Schumm and Thorn) and *Morinda Lucida* Benth used in Nigeria herbal medicinal practice. *Journal of Biological Research and Biotechnology* 2 (1): 36-39.
49. Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
50. Mothana RA, Lindequist U, Gruenert R and Bednarski (2009). Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9: 7.
51. Camarada L, Dayton T, Di Stefano V, Pitonzo R, Schillaci D (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of some oleogum resin essential oils from *Boswellia* spp. (Burseraceae). *Ann Chim* 97 (9): 837-844.

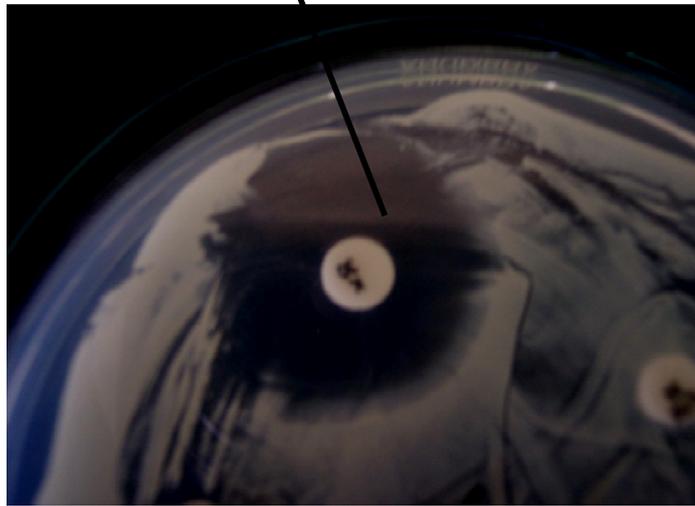
52. Madureira AM, Ascenso JR, Valdeira L, Duarte A, Frade JP, Freitas G, Ferreira MJ (2003). Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. *Nat Prod Res* 17 (5): 375-380.
53. Kaur GJ and Arora DS (2009). Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9: 30.
54. Bhandari DK, Nath G, Ray AB and Tewari PV (2000). Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark. *Pharmaceutical Biology* 38:4:254-57.
55. Mothana RA, Lindequist U, Gruenert R and Bednarski (2009). Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9: 7.
56. Duraipandiyar V, Ayyanar M and Ignacimuthu S (2006). Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6: 35.
57. Hawkey BM (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ* 317: 657-660.
58. Gould D and Booker C (2000). Applied Microbiology for Nurses. Aardvark Editorial, Mcndham, Suffolk, pp: 75-94.
59. Adwan K and Abu-Hasan (1998). Gentamycin resistant in clinical strains of Enterobacteriaceae associated with reduced Gentamycin uptake. *Folia Microbiol* 43: 438-40.

ANEXO I.

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos y tintura al 20 % de hojas de Siempreviva (*Kalanchoe pinnata*), mediante el método de difusión superficial en disco (Bauer-Kirby) frente a *Staphylococcus aureus*.

Halo de inhibición de los controles positivos

Kanamycin



Amikacin



Halos de inhibición de extracto seco y tintura al 20%



Anexo 2

Tabla de interpretación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Inter-mediate ^a	Susceptible ^b	E. coli	S. aureus	P. aeruginosa	H. influenzae	H. influenzae	N. gonorrhoeae	S. pneumoniae
						ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 49247 ^c	ATCC 49766 ^c	ATCC 49226 ^d	ATCC 49619 ^e
Amdinocillin ^f <i>Enterobacteriaceae</i>	AMD-10	10 µg	≤15	—	≥16	23 – 29	—	—	—	—	—	—
Amikacin <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci</i>	AN-30	30 µg	≤14	15 – 16	≥17	19 – 26	20 – 26	18 – 26	—	—	—	—
Amoxicillin/Clavulanic Acid ^{g,h,i} <i>Enterobacteriaceae</i>	AmC-30	20/10 µg	≤13	14 – 17	≥18	18 – 24 ^{g,ii}	28 – 36	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus</i> spp. ^j			≤19	—	≥20	—	—	—	15 – 23 ^c	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤19	—	≥20	—	—	—	—	—	—	—
Ampicillin ^{h,j} <i>Enterobacteriaceae^l and V. cholerae^m</i>	AM-10	10 µg	≤13	14 – 16	≥17	16 – 22	27 – 35	—	—	—	—	—
<i>Staphylococci</i> ^{l,ii}			≤28	—	≥29	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o,ii}			≤16	—	≥17	—	—	—	—	—	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i> ^f			≤19	—	≥20	—	—	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k,p}			≤18	19 – 21	≥22	—	—	—	13 – 21 ^c	—	—	—
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{e,i,aaa,ccc}			—	—	≥24 ⁱⁱ	—	—	—	—	—	—	30 – 36 ^e
Ampicillin/Sulbactam ^{g,h,i} <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter^q and staphylococci^j</i>	SAM-20	10/10 µg	≤11	12 – 14 ⁱⁱ	≥15 ⁱⁱ	19 – 24 ^{g,ii}	29 – 37	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤19	—	≥20	—	—	—	14 – 22 ^c	—	—	—
Azithromycin <i>Staphylococcus</i> spp. ^r	AZM-15	15 µg	≤13	14 – 17	≥18	—	21 – 26	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥12	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,r,s}			≤13	14 – 17	≥18	—	—	—	13 – 21 ^c	—	—	19 – 25 ^e
Azlocillin <i>P. aeruginosa</i>	AZ-75	75 µg	≤17	—	≥18	—	—	24 – 30	—	—	—	—
Aztreonam <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa & Acinetobacter</i>	ATM-30	30 µg	≤15	16 – 21	≥22	28 – 36	—	23 – 29	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥26	—	—	—	30 – 38 ^c	—	—	—
Bacitracin ^f	B-10	10 U	≤8	9 – 12	≥13	—	12 – 22	—	—	—	—	—
Carbenicillin <i>Enterobacteriaceae and Acinetobacter</i>	CB-100	100 µg	≤19 ⁱⁱ	20 – 22 ⁱⁱ	≥23	23 – 29	—	18 – 24	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>			≤13	14 – 16	≥17	—	—	—	—	—	—	—
Cefador ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae^u and staphylococci^j</i>	CEC-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	23 – 27	27 – 31	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤16	17 – 19	≥20	—	—	—	—	25 – 31 ^c	—	—
Cefamandole <i>Enterobacteriaceae and staphylococci^j</i>	MA-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	26 – 32	26 – 34	—	—	—	—	—
Cefazolin <i>Enterobacteriaceae^u and staphylococci^j</i>	CZ-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	21 – 27 ⁱⁱ	29 – 35	—	—	—	—	—
Cefdinir ^h <i>Enterobacteriaceae^{kk} and methicillin-susceptible staphylococci^j</i>	CDR-5	5 µg	≤16	17 – 19	≥20	24 – 28	25 – 32	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥20	—	—	—	—	24 – 31 ^c	—	—
Cefepime ^{h,i} <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci^j</i>	FEP-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	31 – 37 ⁱⁱ	23 – 29	24 – 30	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥26	—	—	—	25 – 31 ^c	—	—	—
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥31	—	—	—	—	—	—	37 – 46 ^{d,ii}
Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,ccc}			≤21 ⁱⁱ	22 – 23 ⁱⁱ	≥24 ⁱⁱ	—	—	—	—	—	—	28 – 35 ^e
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}			—	—	≥24 ⁱⁱ	—	—	—	—	—	—	—
Cefixime ^h <i>Enterobacteriaceae^v</i>	CFM-5	5 µg	≤15	16 – 18	≥19	23 – 27	—	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥21	—	—	—	25 – 33 ^c	—	—	—
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥31	—	—	—	—	—	—	37 – 45 ^d
Cefmetazole <i>Enterobacteriaceae and staphylococci^j</i>	CMZ-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16	26 – 32	25 – 34	—	—	—	—	—
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤27	28 – 32 ^w	≥33	—	—	—	—	—	—	31 – 36 ^d
Cefonicid <i>Enterobacteriaceae and staphylococci^j</i>	CID-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	25 – 29	22 – 28	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤16	17 – 19	≥20	—	—	—	—	30 – 38 ^c	—	—
Cefoperazone <i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci^j</i>	CFP-75	75 µg	≤15	16 – 20	≥21	28 – 34	24 – 33	23 – 29	—	—	—	—

Cefotaxime ^h <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{L,X} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^J	CTX-30	30 µg	≤14	15 – 22 ^{II}	≥23 ^{II}	29 – 35	25 – 31	18 – 22	31 – 39 ^C	—	38 – 48 ^d	31 – 39 ^e
<i>Haemophilus</i> spp. ^C			—	—	≥26							
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥31							
Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,I,CCC}			≤25	26 – 27	≥28							
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{aaa,CCC}			—	—	≥24 ^{II}							
Cefotaxime/Clavulanic Acid ^t	CTX/CLA	30/10 µg										
Cefotetan <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^J	CTT-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16	28 – 34	17 – 23	—			30 – 36 ^d	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤19	20 – 25 ^W	≥26							
Cefoxitin <i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci ^{J,aa}	FOX-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	23 – 29	23 – 29	—			33 – 41 ^d	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤23	24 – 27 ^W	≥28							
Cefpodoxime ^{h,I} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{t,U,V} and staphylococci ^J	CPD-10	10 µg	≤17	18 – 20	≥21	23 – 28	19 – 25	—				
<i>Haemophilus</i> spp. ^C			—	—	≥21				25 – 31 ^C	—		
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥29						35 – 43 ^d	
Cefprozil ^{h,I} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{U,Y} and staphylococci ^J	CPR-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	21 – 27	27 – 33	—				
<i>Haemophilus</i> spp. ^{C,K}			≤14	15 – 17	≥18				—	20 – 27 ^C		
Ceftazidime <i>Enterobacteriaceae</i> , ^t <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^J	CAZ-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	25 – 32	16 – 20	22 – 29				
<i>Haemophilus</i> spp. ^C			—	—	≥26				27 – 35 ^C	—		
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥31						35 – 43 ^d	
Ceftazidime/Clavulanic Acid ^t	CAZ/CLA	30/10 µg										
Ceftibuten ^{h,I} <i>Enterobacteriaceae</i> ^{z,II}	CTB-30	30 µg	≤17	18 – 20	≥21	27 – 35	—	—				
<i>Haemophilus</i> spp. ^C			—	—	≥28				29 – 36 ^{C,II}	—		
Ceftizoxime ^{h,I} <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{t,X} <i>P. aeruginosa</i> , ^{II} <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^J	ZOX-30	30 µg	≤14	15 – 19	≥20	30 – 36	27 – 35	12 – 17				
<i>Haemophilus</i> spp. ^C			—	—	≥26				29 – 39 ^C	—		
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥38						42 – 51 ^d	
Ceftriaxone ^h <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{t,X} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^J	CRO-30	30 µg	≤13	14 – 20 ^{II}	≥21 ^{II}	29 – 35	22 – 28	17 – 23				
<i>Haemophilus</i> spp. ^C			—	—	≥26				31 – 39 ^C	—		
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			—	—	≥35						39 – 51 ^d	
Viridans Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,I,CCC}			≤24	25 – 26	≥27							30 – 35 ^e
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{aaa,CCC}			—	—	≥24 ^{II}							
Cefuroxime (sodium) ^{h,I} CXM-30 <i>Enterobacteriaceae</i> ^U and staphylococci ^J (parenteral)		30 µg	≤14	15 – 17	≥18	20 – 26	27 – 35	—				
<i>Haemophilus</i> spp. ^{C,K}			≤16	17 – 19	≥20				—	28 – 36 ^C		
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤25	26 – 30 ^W	≥31						33 – 41 ^d	
Cephalothin <i>Enterobacteriaceae</i> ^U and staphylococci ^J	CF-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	15 – 21	29 – 37	—				

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27853	H. influenzae ATCC 49247 ^c	H. influenzae ATCC 49766 ^c	N. gonorrhoeae ATCC 49226 ^d	S. pneumoniae ATCC 49619 ^e
Chloramphenicol <i>Enterobacteriaceae</i> , ^f <i>P. aeruginosa</i> , ^f <i>Acinetobacter</i> , ^f staphylococci, ^f enterococci ^{r,yy} and <i>V. cholerae</i> bb, ^f <i>Haemophilus</i> spp. ^{C,f} <i>S. pneumoniae</i> ^{e,f} Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,f}	C-30	30 µg	≤12	13 – 17	≥18	21 – 27	19 – 26	—	31 – 40 ^C	—		23 – 27 ^e
Cinoxacin <i>Enterobacteriaceae</i>	CIN-100	100 µg	≤14	15 – 18	≥19	26 – 32	—	—				
Ciprofloxacin <i>Enterobacteriaceae</i> , ^{ddd} <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and enterococci <i>Haemophilus</i> spp. ^C <i>N. gonorrhoeae</i> ^d	CIP-5	5 µg	≤15	16 – 20	≥21	30 – 40	22 – 30	25 – 33	34 – 42 ^C	—	48 – 58 ^d	
Clarithromycin <i>Staphylococcus</i> spp. ^f <i>Haemophilus</i> spp. ^C <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,C,S}	CLR-15	15 µg	≤13	14 – 17	≥18	—	26 – 32	—	11 – 17 ^C	—		25 – 31 ^e
Clindamycin ^f <i>Staphylococcus</i> spp. ^{II} <i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e	CC-2	2 µg	≤14	15 – 20	≥21	—	24 – 30	—				19 – 25 ^e
Colistin ^{aa,dd}	CL-10	10 µg	≤8	9 – 10	≥11	11 – 15	—	—				

Lomefloxacin	LOM-10	10 µg				27 – 33	23 – 29	22 – 28			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤18	19 – 21	≥22						
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥22				33 – 41 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤26	27 – 37	≥38						45 – 54 ^d
Loracarbef ^{h,i}	LOR-30	30 µg				23 – 29	23 – 31	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{u,kk} and staphylococci ^j			≤14	15 – 17	≥18						
<i>Haemophilus</i> spp. ^{c,k}			≤15	16 – 18	≥19				—	26 – 32 ^c	
Meropenem ^{h,i}	MEM-10	10 µg				28 – 34	29 – 37 ⁱⁱ	27 – 33			
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤13	14 – 15	≥16						
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥20				20 – 28 ^c	—	
Mezlocillin ⁱⁱ	MZ-75	75 µg				23 – 29	—	19 – 25			
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i>			≤17	18 – 20	≥21						
<i>P. aeruginosa</i>			≤15	—	≥16						
Minocycline ^{ee}	MI-30	30 µg				19 – 25	25 – 30	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤14	15 – 18	≥19						
Moxalactam	MOX-30	30 µg				28 – 35	18 – 24	17 – 25			
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤14	15 – 22	≥23						
Moxifloxacin	MXF-5	5 µg				28 – 35	28 – 35	— ^{aa}			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{f,ddd} and <i>Staphylococcus</i> spp. ^{aa}			≤15	16 – 18	≥19						
<i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c			—	—	≥18				31 – 39 ^c	—	
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤14	15 – 17	≥18						25 – 31 ^e
Nafclillin	NF-1	1 µg				—	16 – 22	—			
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{j,nn}			≤10	11 – 12	≥13						
Nalidixic Acid	NA-30	30 µg				22 – 28	—	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^z			≤13	14 – 18	≥19						
Neomycin ^f	N-30	30 µg				17 – 23	18 – 26	—			
Netilmicin	NET-30	30 µg				22 – 30	22 – 31	17 – 23			
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 14	≥15						
Nitrofurantoin	F/M-300	300 µg				20 – 25	18 – 22	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> , staphylococci and enterococci			≤14	15 – 16	≥17						
Norfloxacin ⁱⁱ	NOR-10	10 µg				28 – 35	17 – 28	22 – 29			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and enterococci			≤12	13 – 16	≥17						
Novobiocin ^f	NB-30	30 µg				—	22 – 31	—			
(Mueller Hinton agar with sheep blood for veterinary use)			≤14	15 – 16	≥17						
Doxycycline ^{ee}	D-30	30 µg				18 – 24	23 – 29	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤12	13 – 15	≥16						
Enoxacin	ENX-10	10 µg				28 – 36	22 – 28	22 – 28			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and staphylococci ^{ff}			≤14	15 – 17	≥18						
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤31	32 – 35	≥36						43 – 51 ^d
Ertapenem ^{h,i}	ETP-10	10 µg				29 – 36	24 – 31	13 – 21			28 – 35
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Staphylococcus</i> spp. ^j			≤15	16 – 18	≥19						
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥19				20 – 28	27 – 33	
Erythromycin	E-15	15 µg				—	22 – 30	—			
<i>Staphylococcus</i> spp. ^f and enterococci ^{yy}			≤13	14 – 22 ⁱⁱ	≥23 ⁱⁱ						
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^{e,rs}			≤15	16 – 20	≥21						25 – 30 ^e
Fosfomicin ^z	FOS-200	200 µg				22 – 30 ⁱⁱ	25 – 33	—			
<i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i> only			≤12	13 – 15	≥16						
Gatifloxacin	GAT-5	5 µg				30 – 37	27 – 33	20 – 28 ^{mm}			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} and <i>Staphylococcus</i> spp. ^{aa}			≤14	15 – 17	≥18						
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. and enterococci ^z			≤14 ⁱⁱ	15 – 17 ⁱⁱ	≥18 ⁱⁱ						
<i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c			—	—	≥18				33 – 41 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤33	34 – 37	≥38						45 – 56 ^d
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e			≤17 ⁱⁱ	18 – 20 ⁱⁱ	≥21 ⁱⁱ						24 – 31 ^e
Gemifloxacin	GEM-5	5 µg				29 – 36	27 – 33 ⁱⁱ	19 – 25 ^{mm,ii}			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{l,ddd}			≤15	16 – 19	≥20						
<i>H. influenzae</i> ^c and <i>H. parainfluenzae</i> ^c			—	—	≥18				30 – 37	—	
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤19	20 – 22	≥23						28 – 34
Gentamicin	GM-120	120 µg				6	7 – 9 ^{hh}	≥10			
Testing enterococci for high level resistance ^{n,o,99}											
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 14	≥15				19 – 26	19 – 27	16 – 21
Imipenem ^{h,i}	IPM-10	10 µg				26 – 32	—	20 – 28			
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^j			≤13	14 – 15	≥16						
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥16				21 – 29 ^c	—	
Kanamycin	K-30	30 µg				17 – 25	19 – 26	—			
<i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci			≤13	14 – 17	≥18						
Levofloxacin	LVX-5	5 µg				29 – 37	25 – 30	19 – 26			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci ^{aa} and enterococci			≤13	14 – 16	≥17						
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥17				32 – 40 ^c	—	
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e			≤13	14 – 16	≥17						20 – 25 ^e
Linezolid	LZD-30	30 µg				—	25 – 32 ⁱⁱ	—			
<i>Staphylococcus</i> spp.			—	—	≥21						
<i>Enterococcus</i> spp.			≤20	21 – 22	≥23						
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e			—	—	≥21						25 – 34 ^{e,ii}

Ofloxacin	OFX-5	5 µg		29 – 33	24 – 28	17 – 21			
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{ddd} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci ^{aa}			≤12	13 – 15	≥16				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			—	—	≥16		31 – 40 ^c	—	
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤24	25 – 30 ^w	≥31				43 – 51 ^d
<i>S. pneumoniae</i> ^e and other streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^e			≤12	13 – 15	≥16				16 – 21 ^e
Oxacillin	OX-1	1 µg		—	18 – 24	—			
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{j,n,n,oo}			≤10	11 – 12	≥13				
Staphylococci, coagulase-negative ^{j,nh}			≤17	—	≥18				
<i>S. pneumoniae</i> (for penicillin G susceptibility) ^{e,h}			—	—	≥20				≤12 ^e ,bbb
Oxolinic Acid ^f	OA-2	2 µg	≤10	—	≥11	20 – 24	10 – 13	—	
Penicillin ^h	P-10	10 U				—	26 – 37	—	
<i>Staphylococcus</i> spp. ^{j,pp}			≤28	—	≥29				
<i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o}			≤14	—	≥15				
<i>L. monocytogenes</i> ^f			≤19	20 – 27	≥28				
<i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,q,q,ii}			≤26	27 – 46 ^w	≥47				26 – 34 ^d
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) ^{e,j,rr,aaa,ccc}			—	—	≥24 ⁱⁱ				24 – 30 ^e
Piperacillin	PIP-100	100 µg				24 – 30 ^g	—	25 – 33	
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤17	18 – 20	≥21				
			≤17	—	≥18				
Piperacillin/ Tazobactam ^g	TZP-110	100/10 µg				24 – 30 ^g	27 – 36	25 – 33 ⁱⁱ	
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> ⁱⁱ			≤17	18 – 20	≥21				
<i>Staphylococcus</i> spp. ^{j,ii} and <i>P. aeruginosa</i> ⁱⁱ			≤17	—	≥18				
Polymyxin B ^{aa,dd}	PB-300	300 U	≤8	9 – 11	≥12	12 – 16	—	—	
Quinupristin/Dalfopristin ^{syn}	SYN-15	4.5/10.5 µg				—	21 – 28 ⁱⁱ	—	
<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecium</i> and <i>S. pyogenes</i> ^e only			≤15	16 – 18	≥19				19 – 24 ^{e,ii,ccc}
Rifampin	RA-5	5 µg				8 – 10	26 – 34	—	
<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp. ^{yy}			≤16	17 – 19	≥20				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤16	17 – 19	≥20				22 – 30 ^c
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤16	17 – 18	≥19				25 – 30 ^e
Sparfloxacin	SPX-5	5 µg				30 – 38	27 – 33	21 – 29 ⁱⁱ	
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 18	≥19				
			≤15 ⁱⁱ	16 – 18 ⁱⁱ	≥19				21 – 27 ^e
Spectinomycin	SPT-100	100 µg				—	—	—	23 – 29 ^d
<i>N. gonorrhoeae</i> ^d			≤14	15 – 17 ^w	≥18				
Streptomycin									
Testing enterococci for high level resistance ^{n,o,gg}			6	7 – 9 ^{hh}	≥10	—	—	—	
<i>Enterobacteriaceae</i>			≤11	12 – 14	≥15	12 – 20	14 – 22	—	
Sulfisoxazole ^{tt}	G-.25	250 µg				15 – 23	24 – 34	—	
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^m			≤12	13 – 16	≥17				
Telithromycin	TEL-15	15 µg	— ^{aa}	— ^{aa}	≥22	—	24 – 30	—	
<i>S. aureus</i>			≤11	12 – 14	≥15				17 – 23
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤15	16 – 18	≥19				27 – 33
<i>S. pneumoniae</i> ^e									
Tetracycline ^{ee}	Te-30	30 µg				18 – 25	24 – 30	—	
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> ^{aa} , staphylococci, enterococci ^{yy} and <i>V. cholerae</i> ^m			≤14	15 – 18	≥19				
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤25	26 – 28	≥29				14 – 22 ^c
<i>N. gonorrhoeae</i> ^{d,uu}			≤30	31 – 37 ^w	≥38				30 – 42 ^d
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ^e			≤18	19 – 22	≥23				27 – 31 ^e
Ticarcillin	TIC-75	75 µg				24 – 30	—	21 – 27 ⁱⁱ	
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤14	15 – 19	≥20				
			≤14	—	≥15				
Ticarcillin/ Clavulanic Acid ^g	TIM-85	75/10 µg				24 – 30 ^{g,ii}	29 – 37	20 – 28	
<i>Enterobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> <i>P. aeruginosa</i>			≤14	15 – 19	≥20				
<i>Staphylococcus</i> spp. ^j			≤14	—	≥15				
			≤22	—	≥23				
Tigecycline	TGC-15	15 µg				20 – 27	20 – 25	9 – 13 ^{mm}	23 – 31 ^{ll}
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{f,ss}			≤14	15 – 18	≥19				30 – 40 ^{zz}
<i>S. aureus</i> (including MRSA) ^f			—	—	≥19				
<i>E. faecalis</i> (vancomycin-susceptible isolates only) ^f			—	—	≥19				
Streptococcus spp. (other than <i>S. pneumoniae</i>) ^{e,f}			—	—	≥19				23 – 29 ^{cc}
Tobramycin	NN-10	10 µg				18 – 26	19 – 29	19 – 25	
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> and staphylococci			≤12	13 – 14	≥15				
Trimethoprim	TMP-5	5 µg				21 – 28	19 – 26	—	
<i>Enterobacteriaceae</i> and staphylococci			≤10	11 – 15	≥16				

Zone Diameter Interpretive Chart †												
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resis- tant	Inter- mediate ^a	Suscep- tible ^b	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 ^c	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766 ^c	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ^d	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 ^e
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole ^{tt}	SXT	1.25 µg 23.75 µg				23 – 29 ⁱⁱ	24 – 32	—				
<i>Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter, staphylococci and V. cholerae</i> ^m			≤10	11 – 15	≥16				24 – 32 ^c	—		
<i>Haemophilus</i> spp. ^c			≤10	11 – 15	≥16							
<i>S. pneumoniae</i> ^e			≤15	16 – 18	≥19							20 – 28 ^e
Vancomycin	Va-30	30 µg				—	17 – 21	—				
<i>Staphylococcus</i> spp. ^{vv,ii}			—	—	≥15							
<i>Enterococcus</i> spp. ^{n,o,ww}			≤14	15 – 16	≥17							
<i>S. pneumoniae</i> ^{xx} and other streptococci ^e			—	—	≥17							20 – 27 ^e