

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos  
aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza"  
frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR LA:

**Bach. HUARANCCA HINOSTROZA, Delia**

AYACUCHO - PERÚ

2016



A mis padres con todo  
el amor del mundo.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma mater*, forjadora de profesionales competentes y de calidad humana, al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a toda su plana docente por los conocimientos impartidos durante mi formación académica profesional.

A mi Asesor Dr. Q.F. Edwin Carlos ENCISO ROCA docente de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y al Mg. Blgo. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ, docente de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por su apoyo y colaboración en el desarrollo del presente trabajo de investigación, materializado en este informe.



## ÍNDICE GENERAL

	página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Rumex crispus</i> L.	4
2.3. Compuesto fenólicos	6
2.4. <i>Escherichia coli</i>	8
2.5. Antimicrobiano	10
2.6. Ciprofloxacino	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
IV. RESULTADOS	19
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	43





## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"	4
Tabla 2	Clasificación científica de <i>Escherichia coli</i>	9
Tabla 3	Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	20
Tabla 4	Ensayos de Shinoda y cloruro férrico para identificar compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	21
Tabla 5	Características organolépticas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	22
Tabla 6	Parámetros Físicoquímicos de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	23
Tabla 7	Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	24
Tabla 8	Absorbancia de los espectros ultravioleta visible (UV-VIS) a escala preparativa de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	25
Tabla 9	Concentración mínima inhibitorio y concentración mínima bactericida de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza", Ayacucho 2016.	28



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Variabilidad del porcentaje de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, a diferentes concentraciones comparado con el halo que produce el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016.	26
Figura 2 Halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, a diferentes concentraciones comparado con el halo que produce el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016.	27



## ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Certificado de identificación sistemática de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	44
Anexo 2	Certificado de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.	45
Anexo 3	Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	46
Anexo 4	Esquema para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, Ayacucho 2016.	47
Anexo 5	Recolección y secado de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	48
Anexo 6	Tamizaje fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	49
Anexo 7	Extracción etanólica y aislado de compuesto fenólicos con éter de petróleo y acetato de etilo, Ayacucho 2016.	50
Anexo 8	Ensayos con reactivo de Shinoda y cloruro férrico al 5% para determinar la presencia de compuestos fenólicos en el aislado, Ayacucho 2016.	51
Anexo 9	Sembrado en placa de silica gel y revelado del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	52
Anexo 10	Revelado de las bandas en cromatografía de capa fina observada mediante la lámpara UV, Ayacucho 2016.	53
Anexo 11	Lectura en el espectrofotómetro UV/VIS de las 7 bandas observadas en la cromatografía de capa fina, Ayacucho 2016.	54
Anexo 12	Ensayos para determinar los halos de inhibición del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza” frente a <i>Escherichia coli</i> , Ayacucho 2016.	55
Anexo 13	Comparación de medias mediante la prueba de Tukey del diámetro de halo de inhibición en los tratamientos del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	56

Anexo 14	Halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, a diferentes concentraciones comparado con el halo que produce el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016.	57
Anexo 15	Test de Tukey, determina estadísticamente la diferencia de concentraciones comparando con cada grupo del efecto antibacteriano del aislado de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho2016	58
Anexo 16	Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje del efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	59
Anexo 17	Comparación mediante la prueba de Tukey del efecto antibacteriano en los tratamientos del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. “romaza”, Ayacucho 2016.	60
Anexo 18	Patrones estándares de diámetros de halo de inhibición para cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 empleado como control de calidad, Ayacucho 2016.	61
Anexo 19	Matriz de consistencia	62

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo conocer la actividad antibacteriana *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, el cual se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Salud y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, de abril a junio del 2016. El material vegetal fue recolectado en el distrito de Santiago de Pischa, provincia de Huamanga, región Ayacucho, Perú. La investigación fue de tipo básico-experimental. A partir del extracto etanólico se aisló compuestos fenólicos con éter de petróleo y acetato de etilo. Para la identificación de compuestos fenólicos se realizaron ensayos con  $\text{FeCl}_3$  al 5% y Shinoda, se evaluaron parámetros físico-químicos y organolépticos según Miranda y Cuellar, para determinar el efecto antibacteriano se empleó el método de difusión en discos según Kirby-bauer y la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida se determinó bajo el método de macrodilución en caldo nutritivo. Los compuestos fenólicos aislados presentan abundante cantidad de flavonoides, los parámetros físico químicos fueron para humedad de 8,1 cenizas de 2,1 *pH* de 4 a 5. Los compuestos fenólicos aislados muestran una mejor actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* al 20% con diámetro de inhibición de 22,8 mm. La concentración mínima inhibitoria y bactericida fue de 0,313 mg/mL y 0,625 mg/mL respectivamente. En conclusión, los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza” tiene efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli*.

**Palabras clave:** actividad antibacteriana, *Rumex crispus*, compuestos fenólicos, *Escherichia coli*.





## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas se comportan como uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, provocando una gran morbimortalidad y alcanzando millones de afectados cada año, el incremento de viajes, cambios demográficos y resistencia antimicrobiana contribuyen significativamente a este fenómeno.<sup>1</sup>

La mayoría de las enfermedades infecciosas son la consecuencia de una compleja red de interacciones que pueden implicar diversos factores, tanto del patógeno como del hospedador.<sup>2</sup>

La identificación, el conocimiento y la determinación del papel de los microorganismos como responsables de las enfermedades infecciosas no son hechos recientes, el interés por conocer las causas de la infección y el modo de combatirla comenzaron desde hace muchos años.<sup>3</sup>

En el Perú, existe gran variedad botánica con posibles usos medicinales en base a conocimientos empíricos sobre su uso terapéutico. Estos conocimientos para ser validados, deben ser probados experimentalmente mediante un proceso científico.

La necesidad de atender diferentes problemas de salud en nuestra población peruana, principalmente en las zonas rurales y urbano marginales; demanda no atendida, se debe a varios factores, entre ellos la cobertura insuficiente de medicamentos del Ministerio de Salud, el déficit económico de la población más pobre, que le impide destinar recursos para la atención de salud.<sup>3</sup>

Por ello un gran número de especies de plantas han sido evaluadas por diversos investigadores por sus efectos antibacterianos con fines de lograr resultados favorables frente a las enfermedades antibacterianas. En efecto, muchas plantas medicinales y nutrientes de la dieta han demostrado que poseen actividad antibacteriana guardando relación con actividades antioxidantes, atribuyéndole este efecto a los compuestos fenólicos que derivan del metabolismo secundario

de las plantas, con estructura química formada por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.<sup>4</sup>

En vista de que no existe evidencia científica sobre el efecto antibacteriano del aislado de los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L, el presente trabajo se orientó a demostrar experimentalmente dicha actividad usando el método de difusión en discos (Kirby-Bauer) frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 que es una bacteria presente en el intestino del ser humano y animales sanos, que puede causar cuadros gastrointestinales por consumo de alimentos contaminados.<sup>5</sup>

Teniendo como principales objetivos:

- Determinar el efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218
- Identificar los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza”.
- Establecer los parámetros físico-químicos de los compuestos fenólicos.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria de los compuestos fenólicos aislados.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Muhammad T, et al.<sup>6</sup> investigaron el efecto antibacteriano del extracto del tallo de *Rumex dentatus* contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Micococcis lateus* y *P aeruginosa*, en el que emplearon el método de difusión en agar, obteniendo extractos con metanol, agua fría y agua caliente; los dos primeros mostraron eficacia frente a las cepas antes mencionadas, mientras que el extracto en agua caliente no mostró ninguna actividad contra las cepas patógenas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) contra estas cepas estuvo en el rango de 0,10 mg/mL, los extractos indicaron presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides y cumarinas.

Yildirim A, et al.<sup>7</sup> evaluaron los efectos antioxidantes y antimicrobianos de *Rumex crispus* L, quienes realizaron extracción con éter, etanol y agua caliente de las hojas y semillas, la capacidad antioxidante se evaluó mediante la metodología de reducción de poderes de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), en cuyo resultado se encontró que la cantidad más alta de compuestos fenólicos totales se hallaban en el extracto etanólico, al cual se le aplicó el método de difusión de disco en placa, en proporción 1 mg/mL del extracto, utilizando el patrón penicilina G contra cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 60193, *Escherichia coli* ATCC 25922. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, evidenciando actividad antimicrobiana contra las cepas grampositivas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, no manifiesta actividad antimicrobiana detectable con bacterias gramnegativas ni hongos.

Borchardt J, et al.<sup>8</sup> investigaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de las semillas de las plantas de la Cuenca del río Mississippi, obteniendo extractos metanólicos de 158 especies; para la técnica antimicrobiana usaron el ensayo de difusión en disco frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Encontrándose que, de las 158 especies

estudiadas, 35 tuvieron actividad antimicrobiana, entre ellas *Rumex crispus* L, *Rumex verticillatus* L, *Spiraea tomentosa* L; la correlación entre las semillas con altos niveles de antioxidantes y los que tienen actividad antimicrobiana fue bastante baja; tanto *Rumex crispus* y *Rumex verticillatus* mostraron actividad antimicrobiana contra los cuatro microorganismos ensayados.

Harshaw D, et al.<sup>9</sup> evaluaron la bioactividad de *Rumex obtusifolius* L, a partir de extractos con n-hexano, diclorometano y metanol. La actividad de antimicrobiana se evaluó frente a 6 cepas, a concentraciones de 10 mg/mL y 2 mg/mL y se utilizó como estándar la ampicilina; en el extracto con n-hexano no se encontró actividad antibacteriana, sin embargo la extracción metanólica mostró propiedad antibacteriana significativa frente a cepas de *B subtilis*, *E coli*, *Staphylococcus aureus*.

Soto M, et al.<sup>10</sup> investigaron sobre los metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. en cuyo tamizaje fitoquímico se evidenció catequinas, lactonas, saponinas, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. La actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Stafilococcus aureus* a diferentes concentraciones, resultó la CMI de 1,0 y 2,5 mg/ml respectivamente teniendo como control la gentamicina.

## 2.2. *Rumex crispus* L.

### 2.2.1. Clasificación taxonómica

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Rumex crispus* L. “romaza”

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	POLIGONALES
FAMILIA	POLYGONACEAE
GÉNERO	<i>Rumex</i>
ESPECIE	<i>Rumex crispus</i> L.
N.V.	“romaza”, “lengua de vaca”,

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamanguensis* – 2016 (Anexo 1)

### 2.2.2. Descripción botánica

*Rumex crispus* L. es una hierba perenne, de hasta un metro de alto. Raíz de tipo axomorfo, gruesa y profunda. Tallos erectos, poco ramosos. Hojas inferiores largamente pecioladas, oblongo-lanceoladas con el margen encrespado. Hojas superiores lanceoladas, cortamente pecioladas. Flores bisexuales en general agrupadas en panojas densas, estrechas, alargadas, desprovistas de hojas en la

parte superior. Flores agrupadas en fascículos o pequeños grupos, perigonio calicino, formado por seis tépalos ligeramente verdes herbáceos en dos verticilios más o menos iguales. Androceo compuesto de seis estambres libres, de filamentos cortos. Gineceo de ovario súpero tricarpelar, con estilos cortos, terminados en estigmas penicilados. Fruto aquenio trígono con estructuras membranosas aladas, reticuladas, anchamente ovadas o semicirculares, que derivan de los tres tépalos internos. Se propagan usualmente por medio de semillas.<sup>11</sup>

### **2.2.3. Hábitat**

Crecen en prados y lugares con mucha hierba, orillas de ríos, acequias, costas, campos, terrenos baldíos y en bordes de caminos.<sup>12</sup>

### **2.2.4. Distribución**

Regiones templadas del hemisferio norte y tropical en todo el mundo.

### **2.2.5. Usos medicinales**

Las hojas verdes bien molidas se emplean en cataplasma en el tratamiento de muchas dermatosis; en la curación de llagas o heridas. El agua de la maceración de las hojas, se emplea como astringente en ciertas afecciones oculares; las hojas cocidas, hechas ensalada, se venden en el departamento de Arequipa con el nombre de “zarzaparrilla” y se emplean en cocimiento, como depurativo; el cocimiento de la raíz, en baños contra la sarna. El cocimiento de las raíces se usa como tónico y antiséptico, afecciones hepáticas, astringente, laxante, analgésico y antiinflamatorio.<sup>13</sup>

### **2.2.6. Composición química**

Antraquinonas (crisofanol, reocrisina, emodina, nepodina, crisofaneina, frangulina, reocrisina) proantocianidinas (cianidina, catequina, epicatequina), ácido ascórbico, proteínas, lípidos, Fosforo, Hierro, Calcio, Sodio, Magnesio, oxalatos, antocianinas, antracenos, antranolas, taninos, ácido crisofánico, ácido fosfórico, antranas, glucosa, fructosa, fitosterol, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido crucico, ácidos grasos insaturados y saturados, terpenos.<sup>14</sup>

### **2.2.7. Compuestos fenólicos presentes en el género *Rumex***

Fan J y Zhang Z.<sup>15</sup> realizaron los estudios sobre los componentes químicos de *Rumex crispus* L, entre otros, identificaron ácido gálico; catequinas; camferol; quercetina; camferol-3-O-alfa-L-ramnopiranósido, quercetina-3-O-alfa-L-ramnopiranósido.

Demirezer L, et al.<sup>16</sup> aislaron el flavan-3-ol y una 6-clorocatequina, de las raíces de *Rumex patientia* L. junto con siete compuestos fenólicos conocidos. También

aislaron un nuevo glicósido de antraquinona, emodina-6-O-beta-D-glucopiranosido, así como también un sencillo flava-3-ol y una 6-clorocatequina, de las raíces de *Rumex patientia* L junto con siete compuestos fenólicos conocidos. Sus estructuras fueron determinadas sobre la base de métodos espectroscópicos, demostrándose sus efectos citotóxicos y propiedad antiinflamatoria.

Gunaydin K, et al.<sup>17</sup> reportaron a partir de las raíces de *Rumex crispus* L., dos 1,5-dihidroxiantraquinonas y una antrona, fueron aisladas por medios espectroscópicos.

### **2.3. Compuestos fenólicos**

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan en diversas funciones, tales como asimilación de nutrientes, síntesis protéica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, alelopatía y defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales tales como: sabor, astringencia, dureza, las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.<sup>17</sup>

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, todos ellos presentan anillo aromático común, la formación del núcleo aromático lo realizan los vegetales y microorganismos. Mientras que la presencia en animales se debe a la ingesta del vegetal. El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.<sup>18</sup>

#### **2.3.1. Flavonoides**

Los flavonoides se distribuyen ampliamente en las plantas, donde cumplen muchas funciones, entre ellas la producción de pigmentos de color amarillo o rojo - azul en las flores y la protección ante los ataques de microorganismos e insectos. Existe una fuerte evidencia experimental de su capacidad para modificar la reacción del cuerpo a los alérgenos, virus y agentes carcinógenos. Estos resultados ponen de manifiesto su actividad antialérgica, antiinflamatoria,

antimicrobiana y anticancerígena. Los efectos beneficiosos de las frutas, verduras, té o vino tinto, se han atribuido a los compuestos flavonoides que contienen nutrientes y vitaminas.<sup>19</sup>

### **2.3.2. Actividad biológica de los compuestos fenólicos**

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH) y del virus simplex humano (VSH), inhiben la glucosil transferasa del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autooxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento.<sup>19, 20</sup>

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora.<sup>19, 20</sup>

Existe evidencia epidemiológica acerca de los beneficios para la salud del consumo abundante de frutas y verduras en la dieta.<sup>20</sup>

### **2.3.3. Los polifenoles como agentes antimicrobianos**

Los polifenoles son metabolitos secundarios distribuidos de forma ubicua en todas las plantas superiores, que tienen papeles importantes como la defensa contra patógenos de plantas y animales herbívoros y la agresión como respuesta a diversas condiciones de estrés abiótico, tales como las precipitaciones y la radiación ultravioleta. Con respecto a la estructura química, poseen una amplia variedad de moléculas con estructura de polifenoles y generalmente se dividen en flavonoides y nonflavonoides. Los flavonoides comparten un esqueleto de carbono común de propanos difenilo, dos anillos de benceno (anillo A y B) unidas por una cadena de tres carbonos lineal. Las centrales formas de cadena de tres carbonos un anillo de pirano cerrado (anillo C) con un anillo de benceno. Más de 4000 flavonoides se han identificado en las frutas, verduras y bebidas de origen vegetal, como el té y el vino y la lista está en constante crecimiento. Dependiendo del estado de oxidación del anillo central de pirano, los flavonoides pueden estar a su vez subdivididas en muchas subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanoles y también isoflavonas.<sup>20, 21</sup>

Por otra parte, la actividad antimicrobiana de los polifenoles que se producen en los alimentos vegetales y plantas medicinales ha sido detalladamente

investigada contra una amplia gama de microorganismos. Entre los polifenoles, flavan-3-oles, flavonoles y taninos recibieron más atención debido a su amplio espectro y una mayor actividad antimicrobiana en comparación con otros polifenoles y al hecho de que la mayoría de ellos son capaces de suprimir una serie de factores de virulencia microbiana (tales como la inhibición de la formación de biopelículas, la reducción de anfitrión ligandos de adhesión y la neutralización de toxinas bacterianas) muestran sinergia con antibióticos. Las propiedades antimicrobianas de ciertas clases de polifenoles han sido propuestos, ya sea para desarrollar nuevos conservantes de alimentos, debido a la creciente presión de los consumidores en la industria alimentaria para evitar conservantes sintéticos, o para desarrollar terapias innovadoras para el tratamiento de diversas infecciones microbianas, teniendo en cuenta el aumento de la resistencia microbiana contra la terapia antibiótica convencional.<sup>20, 21</sup>

#### **2.3.4. Actividad antimicrobiana de flavan-3-oles**

Teniendo en cuenta flavan-3-oles, la actividad antibacteriana de las catequinas se conoce a partir de la década de 1990, cuando se demostró que estos compuestos, en gran parte presentes en el té *oolong* y sobre todo el té verde (*Camellia sinensis*), inhibieron el crecimiento in vitro de varias especies bacterianas, tales como *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*.<sup>20, 21</sup>

#### **2.3.5. Actividad antimicrobiana de los flavonoides**

En lo que se refiere a los flavonoles, podemos ver una notable actividad contra varias bacterias grampositivas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Naeslundii actinomyces* y las bacterias gramnegativas, tales como *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogénica*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*, probablemente debido a diferentes mecanismos de acción, entre los cuales el más convincente identificado es el efecto agregante en todas las células bacterianas.<sup>21</sup>

### **2.4. *Escherichia coli***

En el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente y en el medio ambiente es posible encontrar una amplia variedad de cepas de *Escherichia coli* patógena que causan enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos. Algunos animales o especies de animales pueden ser portadores asintomáticos, las cepas de *Escherichia coli* son conocidas por su propensión al intercambio de material genético y su capacidad



de adaptación a los cambios de su ambiente. A veces estas características favorecen la aparición de cepas con una mayor patogenicidad y capacidad de supervivencia.<sup>22, 23</sup>

Se pueden encontrar bacterias en el suelo, aguas termales, acidas, aguas residuales, en el fondo del mar y en el volcán, también es la especie microscópica que puede habitar en el cuerpo de plantas y animales y son usadas en experimentos de genética y biotecnología molecular.<sup>24</sup>

#### 2.4.1. Características microbiológicas

Son bacterias gramnegativas cilíndricas con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. Son bacterias quimioheterotrofas facultativo teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y b-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito.

El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blatte*. Las especies de tipo *E. coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *E. hermanni* y *E. vulgaris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional.<sup>24</sup>

#### 2.4.2. Hábitat de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es la especie predominante de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente y se elimina por las heces al exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico.<sup>25, 26</sup>

#### 2.4.3. Clasificación científica

**Tabla 2.** Clasificación científica de *Escherichia coli*

REINO	BACTERIA
FILO	PROTEOBACTERIA
CLASE	GAMMAPROTEOBACTERIA
ORDEN	ENTEROBACTERIALES
FAMILIA	ENTEROBACTERIACEAE
GÉNERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>E. coli</i> (( <i>E. freundii</i> ))

Fuente: área de bacteriología microbiología UNSCH-2016.<sup>23</sup>

## **2.5. Antimicrobiano**

Molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. Hoy en día no se utilizan moléculas de origen natural, por lo cual no se establece más la diferenciación con quimioterápicos, término usado para referirse a las moléculas de origen sintético y sus derivados. Utilizaremos el término antibiótico para referirnos al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana. Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número los microorganismos.<sup>27</sup>

### **2.5.1. Tipos y objetivos del tratamiento antimicrobiano**

Cuando aparece una infección, por lo general los microorganismos son pocos al inicio. El grado de contaminación bacteriana aumenta al final, con la replicación del microorganismo. A veces el sistema inmunitario tiene la capacidad de eliminar la infección antes de que ocasione mayores daños. En otros casos, no queda eliminado del todo el microorganismo, sino que se esconde en las propias células del paciente y permanece inactivo, pero se reactiva cuando se deteriora la función inmunitaria en un momento futuro. En algunos individuos, el microorganismo puede vencer las defensas inmunitarias y en este caso ocasiona enfermedad. En un subgrupo de estos pacientes la enfermedad cede por sí sola. Por ejemplo, muchas de las infecciones virales de las vías respiratorias altas se resuelven en forma espontánea y es mejor no tratarlas con antimicrobianos. Sin embargo, otras necesitan de los antimicrobianos; en estos casos habrá que interrumpir su uso una vez que haya mostrado resolución el cuadro clínico. En casos especiales en que persiste algún defecto inmunitario o anatómico que originó la infección, se necesita tratamiento de supresión o de "mantenimiento". Una forma útil de organizar los tipos y objetivos del tratamiento antimicrobiano consiste en considerar, dentro del esquema evolutivo de la enfermedad, el momento de inicio del tratamiento. El tratamiento puede ser profiláctico, pre-sintomático, definitivo o supresor.<sup>28</sup>

## **2.6. Ciprofloxacino**

Es una fluoroquinolona derivado del ácido nalidixico, la primera quinolona usada como anti infeccioso en la práctica clínica. Activo frente a un amplio espectro de gérmenes gramnegativo que poseen actividad moderada frente a grampositivo y prácticamente nula frente a anaerobios. No se usan en infecciones sistémicas, pues las concentraciones que se logran en suero y muchos tejidos son bajas.<sup>29</sup>

Se usa para tratar o prevenir determinadas infecciones bacterianas, pertenece a una clase de antibiótico llamada fluoroquinolona y posee además un amplio espectro de acción según el nivel de actividad.<sup>29</sup>

### **2.6.1. Mecanismo de acción**

Ejerce efecto bactericida por inhibición selectiva de la síntesis de ADN en la bacteria. Bloquean el ADN girasa, uniéndose: a la subunidad de tipo A. las bacterias poseen una clase especial de topoisomerasas de tipo II necesaria para la replicación de del ADN y algunos aspectos de la transcripción, reparación, recombinación y transposición de las girasas, producen superenrollamiento negativo en la doble hélice del ADN.<sup>30,31</sup>

### **2.6.2. Farmacocinética**

Alrededor del 70% es absorbida después de la administración oral. Alimentos retardan la tasa de absorción. Pero no la magnitud. Los niveles picos en la sangre suero ocurren dentro de 1 a 2 horas después de la dosis oral. Unión a proteínas plasmáticas: 20 a 40%. Los niveles en el LCR son alrededor del 10% de los niveles en plasma. El metabolismo es probablemente hepático. La excreción es principalmente renal. El tiempo de vida media es alrededor de 4 horas en adultos con función renal normal.<sup>32,33</sup>



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Docencia, Investigación y Producción de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, los meses de abril a junio del 2016.

#### 3.2. Muestra vegetal

Se empleó 1 kg de hojas de *Rumex crispus* L. “romaza” recolectada en el distrito de Santiago de Pischa, provincia de Huamanga, Región Ayacucho.

#### 3.3. Microorganismo de ensayo

Se usó *Escherichia coli* ATCC 35218, adquiridas del laboratorio de Bacteriología del Área Académica de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

#### 3.4. Procedimiento para la recolección de datos

##### 3.4.1. Recolección de la muestra

Se recolectó las hojas de *Rumex crispus* L. “romaza” intactas por la mañana; se lavó con abundante agua y se secó a la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel periódico, aproximadamente por una semana, se procedió a triturar obteniendo partículas finas. 34

##### 3.4.2. Obtención del extracto etanólico.

Se maceró 500 g de la muestra seca triturada en un frasco ámbar con alcohol de 96°, durante 7 días con agitación diaria. Luego se procedió al filtrado con un sistema al vacío, la solución etanólica se concentró a presión y temperatura reducidas en un rotavapor, finalmente hasta obtener un extracto blando en la estufa a una temperatura no mayor de 50°C.

### **3.4.3. Extracción de compuestos fenólicos.**<sup>34</sup>

Para extraer los compuestos fenólicos se suspendió en agua destilada el extracto etanólico blando y se mezcló con éter de petróleo hasta obtener una fracción desengrasada, seguidamente se realizó una extracción líquido- líquido con acetato de etilo, hasta obtener la fracción de compuestos fenólicos y finalmente esta fracción se concentró a presión y temperatura reducidas en un rotavapor hasta obtener un extracto blando de color verde oscuro.

### **5.3.4. Identificación de los compuestos fenólicos.**<sup>34</sup>

#### **a. Pruebas cualitativas**

- **Reactivo cloruro férrico:** Se agregó unas gotas de solución de cloruro férrico al 5% sobre la fracción de acetato de etilo y se observó una coloración verde- azul que demostró la presencia de compuestos fenólicos.
- **Reactivo Shinoda:** para la identificación de flavonoides se agregó al extracto ácido clorhídrico y magnesio que dio un complejo coloreado (entre rojo y naranja).<sup>34</sup>

#### **b. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se realizó la cromatografía en capa fina con silicagel G60 HF254 B y cromatografía a escala preparativa con cromatofolios de un milímetro de espesor.

- La fracción de acetato de etilo se disolvió en 0,5 mL de metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria)
- Se utilizó como sistema de solventes ácido acético: ácido fórmico: acetato de etilo en proporción (100:11:26).
- Se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente no sobrepase a la muestra aplicada y se dejó que el líquido ascienda por capilaridad.
- Se sacó la placa de CCF de la cámara cromatografía cuando el eluyente llegó a 2 cm de la parte superior de la placa (frente del solvente).
- Se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó en la lámpara UV.
- Cada banda se separó y reconstituyó para su lectura espectrofotométrica UV-VIS.
- Se reveló con cloruro férrico al 5%.
- Se observó la presencia de manchas.

### 5.3.5. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos y organolépticos de los compuestos fenólicos.

#### a. Parámetros fisicoquímicos

##### • Prueba de solubilidad

Se colocó 0,5 g del extracto de las hojas de *Rumex crispus* L. “romaza” en un tubo de ensayo y se añadió 5 mL de disolvente (agua, etanol y metanol), se agitó y se observó bajo los indicadores de solubilidad: soluble, poco soluble e insoluble. 35

##### • Cenizas

Se procedió de acuerdo al método descrito por Miranda. 35

Cálculo:

$$C = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Dónde:

C: Porcentaje de cenizas totales.

M: Masa del crisol vacío (g).

M1: Masa del crisol con la porción de ensayo (g).

M2: Masa del crisol con la ceniza (g).

##### • Determinación de pH

El pH de la muestra se determinó utilizando el pH-metro. 35

##### • Determinación del contenido de humedad

Se procedió de acuerdo al método descrito por Miranda. 35

Cálculo:

$$Hg = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Dónde:

Hg: Pérdida de peso por desecación.

M: Masa de la placa Petri vacía (g).

M1: Masa de la placa Petri con la muestra de ensayo desecado (g).

M2: Masa de la placa Petri con la muestra de ensayo (g).

#### b. Pruebas organolépticas

**Color:** Se utilizó la cantidad suficiente de muestra en una luna de reloj, se colocó en un fondo blanco, para observar y determinar el color.

**Olor:** Una cantidad suficiente de muestra se colocó en una luna de reloj, para percibir y determinar el tipo de olor.

**Aspecto:** Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj, se observó y se determinó el aspecto de la muestra. 35

### 5.3.6. Determinación de la actividad antibacteriana

**Diseño metodológico:** 36

$G_e$	$X$	$O_e$
$G_b$	—	$O_b$
$G_c$	$C$	$O_c$

Dónde:

- $G_e$  : Grupo experimental (extracto)
- $G_b$  : Grupo blanco
- $G_c$  : Grupo control (Ciprofloxacino 30  $\mu$ g)
- O : Crecimiento bacteriano (halos de inhibición)

#### Distribución por grupos

- Grupo I : Control negativo (agua).
- Grupo II : Control positivo, ciprofloxacino 30  $\mu$ g.
- Grupo III : Tratado con muestra al 5% de concentración.
- Grupo IV : Tratado con muestra al 10% de concentración.
- Grupo V : Tratado con muestra al 15% de concentración.
- Grupo VI : Tratado con muestra al 20% de concentración.

**a. Método del antibiograma disco-placa.** - basado en el trabajo de Kirby-Bauer y colaboradores realizados para determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Consistió en depositar en la superficie de agar de una placa Petri previamente inoculada con microorganismos (*Escherichia coli*) discos de papel secante, tan pronto el disco impregnado de antibiótico (ciprofloxacino 30  $\mu$ g) y extracto de 5%, 10%, 15% y 20% se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico y extracto difunde al agar, incubar entre 18-24 horas apareciendo rodeados por una zona de inhibición. 37

**b. Preparación del inóculo.** - se realizó en un medio de cultivo líquido, se cogió de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y se sembró en 5 ml de un medio líquido (caldo nutritivo) se incubó en una estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0,5 de la escala de MacFarland. 37

**c. Inoculación de las placas.**- introducir un hisopo dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Inocular las placas de



Mueller-Hintón completamente sin dejar ninguna zona libre, deslizando el hisopo por la superficie 3 veces, rotando la placa unos 60°C cada vez y pasándola por ultimo por la periferie del agar para conseguir una siembre uniforme, se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos. 37

**d. Dispensación de los discos.** - colocar los discos con pinzas estériles, se presionó ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa y se distribuyeron de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Se incubo las placas de forma invertida (el agar en la parte superior) a 35 °C por 18 a 24 horas. 37

**e. Lectura de los resultados.** - pasado las 18 a 24 horas de incubación se lee el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla, si aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos, se deberá repetir la prueba de sensibilidad antimicrobiana. 37

**g. Cálculo del porcentaje de inhibición:** Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula: 37, 38

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

**f. Interpretación.** - se han fijado criterios para clasificar las cepas estudiadas, de esta forma se han fijado tres categorías: sensible (S), intermedia (I), resistente (R).

### **5.3.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del antimicrobiano, que se encuentre diluido en el medio de cultivo (caldo nutritivo), este método de dilución se considera de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos, son métodos indicados cuando además de la actividad inhibitoria se requiere determinar también la actividad bactericida. 37, 38

**a. Método de macrodilución.-** se empleó por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos, habitualmente se prepara la batería de tubos con 1 mL de medio estéril sin antimicrobiano. Añadiendo al primero 1 mL de la solución inicial del tubo de antimicrobiano. 37, 38

#### **b. Procedimiento:**

Se preparó 17 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al 17:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 17, se agregó 1 ml de caldo nutritivo.

- Posteriormente se agregó 1ml de las concentraciones de las muestras al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 ml al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1 ml y se descartó, el tubo N° 15 tiene caldo nutritivo y extracto, el tubo N° 16 tiene caldo e inóculo, el tubo N° 17 no tendrá extracto, siendo éstos tres últimos tubos los controles.
- Luego se agregó 1 ml del inóculo de *Escherichia coli* a todos los tubos (N° 1 al N° 14) y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.

**c. CMI:** Se observó el crecimiento de la bacteria mediante la aparición de turbidez en el medio, o mediante cambio de color. Por lo que el punto final de la CMI, se definió a simple vista por la falta de turbidez en el caldo, para ello se comparará el tubo con el control de crecimiento, anotando la concentración de dicho tubo. 39

### **5.3.9. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)**

Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana, se considera como CMB la menor concentración de antimicrobiano que ha matado el 99,9% del inóculo original.39,40

#### **a. Procedimiento:**

Se procedió a partir de la CMI, realizándose de la siguiente manera:

- Una vez observada la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con la ayuda de un hisopo estéril, los caldos no turbios en las placas con agar nutritivo.
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.

**b. CMB:** Se determinó la CMB verificando si hubo o no crecimiento de la bacteria en las placas sembradas. 39, 40

#### **Análisis de datos**

Los datos obtenidos de los tratamientos se presentan en cuadros y gráficos. Para el análisis de varianza de datos, se emplearon los instrumentos de la estadística inferencial como el ANOVA y la prueba de los rangos múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ) para detectar las diferencias existentes entre los tratamientos, considerando una significancia del 5 por ciento ( $p < 0,05$ ).

## **IV. RESULTADOS**

Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. “romaza”, Ayacucho 2016.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Aminoácidos	Ensayo de ninhidrina	-	Ninguna reacción
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	+++	Naranja carmelita
Fenoles y taninos	Ensayo de FeCl <sub>3</sub>	+++	Verde-azul
Alcaloides y aminas terciarias	Ensayo de Dragendorf	+	Ligeramente naranja
Alcaloides	Ensayo de Wagner	+	Ligeramente café
Saponinas	Prueba de espuma	+	

**Leyenda:**

- (+) : Escaso
- (++) : Moderado
- (+++): Abundante

Tabla 4. Ensayos de Shinoda y cloruro férrico para identificar compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Ensayos</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Compuesto fenólicos	Ensayo de cloruro férrico	+++	Coloración verde-azul
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	+++	rojo intenso

**Leyenda:**

- (+) : Escaso
- (++) : Moderado
- (+++): Abundante

Tabla 5. Características organolépticas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

<b>Características organolépticas</b>	
Color	Verde oscuro
Olor	Cítrico
Aspecto	Pastosa

Tabla 6. Parámetros Físico-químicos de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

<b>Parámetros Físico- químicos</b>	
	<b>Agua:</b> soluble
<b>Solubilidad</b>	<b>Metanol:</b> muy soluble
	<b>Etanol:</b> soluble
	<b>Cloroformo:</b> soluble
<b>pH</b>	4-5
<b>Cenizas (%)</b>	2,1
<b>Humedad (%)</b>	8.1

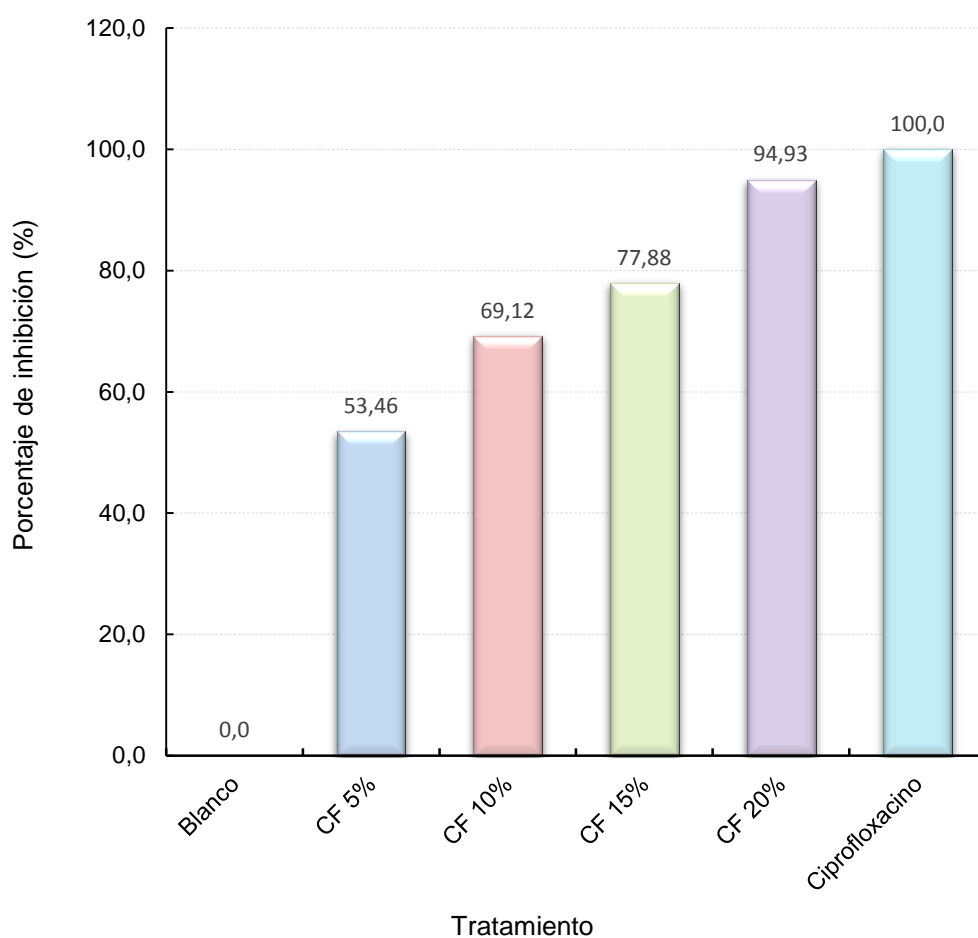
Tabla 7. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

Fracción	Luz UV (366 nm)	Revelador
		FeCl <sub>3</sub>
compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"	Fluorescencia verde	Amarillo
	Fluorescencia blanca	Marrón
	Fluorescencia verde limón	Verde
	Fluorescencia naranja	Amarillo
	Fluorescencia mostaza	Marrón
	Fluorescencia marrón	Ligero amarillo
	Fluorescencia gris	Amarillo



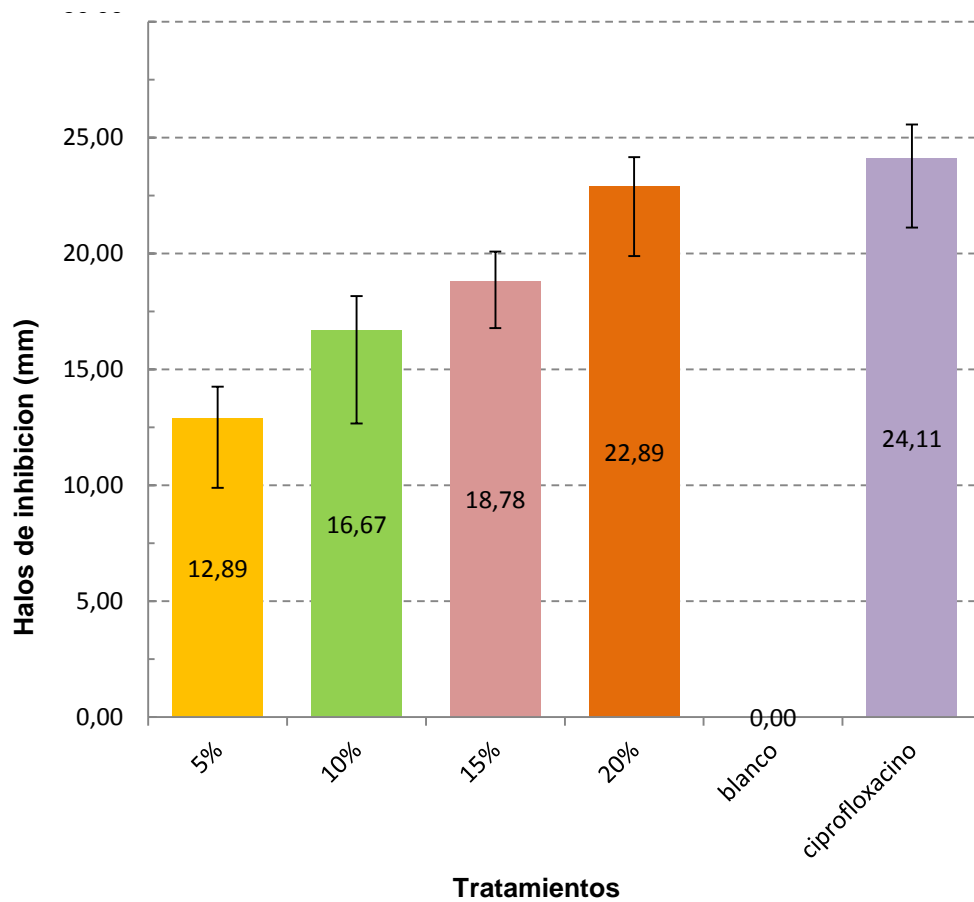
Tabla 8. Absorbancia de los espectros ultravioleta visible (UV-VIS) a escala preparativa de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

Máxima	Límite: 0,01 A				
Muestra 1: verde					
1	204 nm	0,407 A	2	206 nm	0,429 A
Muestra 2: blanco					
1	204 nm	0,661 A	2	206 nm	0,679 A
<b>Muestra 3: verde limón</b>					
<b>1</b>	<b>204 nm</b>	<b>0,567 A</b>	<b>2</b>	<b>206 nm</b>	<b>0,587 A</b>
<b>Muestra 4: naranja</b>					
<b>1</b>	<b>204 nm</b>	<b>0,479 A</b>	<b>2</b>	<b>206 nm</b>	<b>0,492 A</b>
Muestra 5: mostaza					
1	204 nm	0,402 A	2	206 nm	0,416 A
Muestra 6: marrón					
1	204 nm	0,430 A	2	206 nm	0,453 A
Muestra 7: gris					
1	204 nm	0,397 A	2	206 nm	0,403 A



- Leyenda:
- CF: compuestos fenólicos.
  - Blanco: control negativo (agua).
  - Ciprofloxacino 30 µg: control positivo.

Figura 1. Variabilidad del porcentaje de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. “romaza”, a diferentes concentraciones comparado con el halo que produce el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016.



Leyenda:

- CF: compuestos fenólicos.
- Blanco: control negativo (agua).
- Ciprofloxacino 30 µg: control positivo.

Figura 2. Halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", a diferentes concentraciones comparado con el halo que produce el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

Nº	Compuestos fenólicos (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
1	2,500	S
2	1,250	S
3	0,625	CMB
4	0,313	CMI
5	0,156	R
6	0,078	R
7	0,039	R
8	0,020	R
9	0,010	R
10	0,005	R
11	0,002	R
12	0,001	R
13	0,0006	R
14	0,00003	R

Leyenda:  
(S): sensible  
(r): resistente  
(\*\*): CMB  
(\*): CMI

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de comprobar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Rumex crispus* L “romaza” sobre un tipo de microorganismos *Escherichia coli* ATCC 35218, principal inductor de las afecciones gastrointestinales. La actividad antibacteriana sobre este microorganismo está representada por la presencia de halos de inhibición, mientras mayor sea el diámetro de halo de inhibición será mejor la actividad antibacteriana de la muestra en estudio, ya que es muy común el empleo de las semillas, hojas, raíz y corteza de diversas plantas con la finalidad de obtener un variado efecto terapéutico, entre ellas con efecto antibacteriano.

Para el aislamiento de los compuestos fenólicos se usó las hojas de *Rumex crispus* L. “romaza”, teniendo como solvente al etanol, según Lock, para la extracción de compuestos fenólicos se puede emplear agua, etanol, éter de petróleo, cloroformo, benceno, éter etílico, de acuerdo a su naturaleza.<sup>43</sup> En la tabla 3 se muestra los resultados del tamizaje fitoquímico preliminar realizado al extracto total de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza”, donde se observa una gran variedad de metabolitos secundarios presentes en este extracto como: saponinas, alcaloides en mínima cantidad, presentándose en alta intensidad los flavonoides y compuestos fenólicos. Estos metabolitos secundarios coinciden con lo reportado en otros trabajos de investigación realizadas a esta especie. Soto M, et al.<sup>10</sup> evaluaron el extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. quienes identificaron: catequinas, lactonas, saponinas, taninos, quinonas, catequinas, leucoantocianidinas y en mayor cantidad saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides y quinonas.

Muhammad T, et al.<sup>6</sup> trabajaron con extracto metanólico de *Rumex dentatus* y el análisis fitoquímico indicó presencia de alcaloides, flavonoides, compuesto

fenólicos y metabolitos secundarios, lo cual justifica la utilidad de esta planta en la cura de diversas afecciones.

Las pruebas químicas cualitativas realizadas al aislado de compuestos fenólicos plasmada en la tabla 4 fueron hechas con reactivo de cloruro férrico al 5% y Shinoda, el cloruro férrico dio una coloración verde-azul identificando a grupos fenólicos en una gran cantidad, mientras que el reactivo de Shinoda produjo coloración rojo intenso que indica la presencia de flavonoides en el extracto realizado con éter de petróleo y acetato de etilo, teniendo en cuenta estas pruebas se afirma que en el aislados de las hojas de *Rumex crispus* L realizados plasman la presencia de compuestos fenólicos.

Se realizó cromatografía de capa fina, con la finalidad de separar los compuesto fenólicos presentes en el extracto, las que se evidencian en la tabla 7 y anexo 9, para ello se usaron como fase estacionaria una placa de sílica gel y la fase móvil fue ácido acético; ácido fórmico; acetato de etilo en proporción de 100:11:26 posterior al revelado se llevó a la lámpara UV, se observó 7 bandas, las cuales fueron revelados con cloruro férrico al 5% observando coloraciones amarillo, marrón, verde, etc, a la luz visible el cual nos indica la presencia de compuestos fenólicos, posteriormente fueron separados por color y reconstituidos para su lectura en el espectrofotómetro UV/VIS ya que dada su naturaleza aromática, los compuestos fenólicos mostraron una intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para la identificación y análisis cuantitativo según lo afirmado por Lock O.<sup>43</sup>

La tabla 8 y anexo 11 muestra los cromatogramas de los espectros UV obtenidos por cada una de las bandas aisladas de los cromatofolios, las 7 bandas fueron designados como M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7, las fracciones M3 y M4, de acuerdo a las lecturas realizadas mostraron picos de absorción máximo en el rango de 260 -289 nm de la extracción liquido-liquido con acetato de etilo empleado para la extracción de compuestos fenólicos en general, teniendo en cuenta el rango de máxima absorción de 240-285 nm y 300- 550 nm, las fracciones corresponderían a isoflavonas, flavonoles y antraquinona respectivamente ya que se encuentran dentro de los rangos de referencia.<sup>43</sup>

Los parámetros físicoquímicos evidenciados en la tabla 6 muestran la humedad de 8,1; cenizas de 2,1 y *pH* de 4 a 5, asimismo reportó un grado de pureza adecuado, pues los valores de cenizas, humedad, *pH*, tiene valores que se encuentran dentro de los límites establecidos para otras drogas, la humedad que

debe ser entre 8 a 14 %, ceniza (<5%), ya que un exceso del agua en una planta medicinal inducirá a la hidrólisis, por eso es necesario que después de la desecación de la droga la humedad sea inferior o igual al 8- 14%, además a este porcentaje de humedad la droga se conserva por tiempo prolongado, sin deteriorar la calidad de la muestra, la determinación de cenizas permitió identificar rápidamente los componentes orgánicos e inorgánicos que contiene el vegetal; un exceso en el porcentaje de cenizas nos indicó presencia de materia extraña que se adhiere a ella por su contacto con el suelo según revela Miranda M. y Cuéllar<sup>35</sup>, con mayor solubilidad en metanol.

A lo largo de los años, han sido atribuidos algunos beneficios a los compuestos fenólicos y un gran número de estudios han sugerido que el consumo de frutas y verduras pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de cáncer, potencialmente a través de la actividad biológica de los compuestos fenólicos así como de las vitaminas como antioxidante, por lo que los polifenoles pueden prevenir a la oxidación lipídica, la mutación del ADN y el daño del tejido evidenciando su potencial benéfico en la salud del ser humano.<sup>40</sup>

Estos compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que participan también en la fisiología y el metabolismo celular; en la morfología, crecimiento, reproducción, defensa contra plagas y procesos germinativos. Estos compuestos fenólicos son reconocidos también por sus propiedades antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarios, antimicrobianas, antirradicales libres, antimutagénicas, anticarcinogénicas, etc.<sup>44</sup>

En la figura 1 se observa los valores promedios de los halos de inhibición del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L a concentración de 5%, 10%, 15% y 20% frente a *Escherichia coli*, siendo la concentración del 20% la que presentó mayores promedios de halos de inhibición de  $22,89 \pm 1,27$  mm frente a *Escherichia coli*. Por otro lado, el control negativo (agua) no presentó halos de inhibición, lo que indica la inocuidad del solvente frente a este microorganismo. Asimismo, el control positivo ciprofloxacino 30 µg presentó promedios de halos de inhibición de  $24,11 \pm 1,45$  mm. Según el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico y los estándares de halos de inhibición del libro de Procedimientos en Microbiología Clínica, estaría catalogado como sensible frente al microorganismo ensayado el cual se muestra en el anexo 17, Picazo J.<sup>37</sup>

Borchardt J, et al.<sup>8</sup> en la investigación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de las semillas de las plantas de la Cuenca del río Mississippi, mostraron actividad antimicrobiana contra *S aureus*, *E coli*, *P aeruginosa* y *Candidans albicans*, con zonas de inhibición de 13/14, 7/9, 10/10, 19/16 respectivamente siendo mucho mejor de lo esperado.

Harshaw D, et al.<sup>9</sup> evaluaron la bioactividad de *Rumex obtusifolius* L a partir de extractos con metanol, la actividad antimicrobiana se evaluó frente a 6 cepas, entre ellas *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus*, *Salmonella typhi* y otros a concentraciones de 20%, 50%, 80% y 100%, dando un mayor halo de inhibición para *Escherichia coli* 18 mm al 50%, y 30 mm para el control positivo ciprofloxacino 10 µg, que al comparar con los resultados obtenidos en la investigación vemos diferencias tanto del extracto como del control positivo.

Yildirim A, et al.<sup>7</sup> informaron que en los extractos de éter de hojas de *Rumex crispus* L tenían actividad antibacteriana contra *Stafilococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con diámetro de inhibición de 10 y 8 mm respectivamente, los extractos de éter de las semillas exhiben su acción solamente contra *Stafilococcus aureus* con 11mm, siendo inferior a lo reportado en el presente informe.

En la investigación realizada por Soto M, et al.<sup>10</sup> sobre la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L frente a *Stafilococcus aureus* y *Escherichia coli* reportando halos de inhibición de 25,3±0, 58 mm y 17,2±0, 29 mm respectivamente al 30% , se identificó que la mayor inhibición fue para *Stafilococcus aureus*, cepa más sensible al extracto y para *Escherichia coli* es inferior al presentado por el aislado de compuestos fenólicos, por ello se puede afirmar que el aislado de compuestos fenólicos tiene una mayor sensibilidad para *Escherichia coli*.

Por otro lado Surjeet K, et al.<sup>45</sup> evaluaron la eficacia antimicrobiana del extracto metanólico de las hojas de *Rumex nepalensis* (Mern) el cual se ensayó en cuatro cepas bacterianas y tres cepas de hongos, así mismo se usó como referencia a la ampicilina (10ug) y fluconazol (10ug), resultando tener como máxima inhibición de 12 mm para *Escherichia coli* (actividad antibacteriana) y 11mm para *Aspergillus niger* (actividad antifúngica), comprobando una vez más que el género *Rumex* tiene actividad antibacteriana.

En la figura 1 se observa el porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones, teniendo como máximo porcentaje 94,9%, valor muy cercano al control positivo (ciprofloxacino 30 µg) 100%, fundamentando así que los compuestos fenólicos aislados de las hojas presentan actividad antibacteriana.



El método de dilución se considera de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana. Son métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se requiere determinar la actividad bactericida. En la tabla 9 se muestra los valores obtenidos para la CMI y CMB de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L que fueron 0,313 mg/mL y 0,625 mg/mL respectivamente.

En la investigación de Muhammad T, et al.<sup>6</sup> del extracto del tallo de *Rumex dentatus* contra cepas bacterianas *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Micococcis lateus*.y *P. aeruginosa*, reportaron como concentración mínima inhibitoria (CMI), en un rango de 0,10 mg/mL.

Soto M, et al.<sup>10</sup> determinaron que la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L, fueron de 1,0 y 2,5 mg/ml frente a *Stafilococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. Los resultados de los trabajos de investigación reflejaron similitudes en los datos obtenidos en la parte experimental del presente trabajo, fundamentando así la posibilidad de usar los compuestos fenólicos como alternativa en procesos de infección con las bacterias mencionadas en cada uno de ellos.

Para el análisis de datos obtenidos se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95% y una significancia ( $p < 0,05$ ) plasmados en el anexo 14, en donde muestra que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", presentan una variación en los promedios, mostrando una similitud estadística entre grupos tratados con el control positivo (ciprofloxacino 30 µg) y los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L "romaza" a concentración del 20% mostrando una significancia de 0.327.

El mecanismo de acción por el cual actúan los compuestos fenólicos no es claro, pero la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos, de los flavonoides se le atribuye a su estructura química y a un número variable de grupos hidroxilo y fenólicos, que penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos.<sup>10</sup>

Según Soto M, et al.<sup>10</sup> las quinonas presentan un rango amplio de acción, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas.<sup>9</sup>

Surjeet K, et al.<sup>45</sup> en la investigación realizada sobre la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Rumex nepalensis*, menciona que la aloe-emodina,

antraquinona, aislado de las raíces de *Rumex nepalensis*. Se ha informado que Este compuesto aloe-emodina tiene efecto antimicrobiano, por lo tanto, la actividad antibacteriana de *Rumex nepalensis* puede ser atribuido a esta antraquinona presente en el extracto, sin embargo el mecanismo de acción exacto aún no está determinado.

Los resultados mostraron que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza” tienen efecto antibacteriano, la cual representa una alternativa para disminuir la infección por *Escherichia coli*, esto motiva a continúan las investigaciones en medicina natural, ya que la resistencia de bacterias frente a antimicrobianos requiere de mejores opciones para contribuir en la salud del ser humano.

## VI. CONCLUSIONES

- Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus L.* “romaza” tiene efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* ATCC 35218.
- Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus L.* “romaza” tiene abundante cantidad de flavonoides y antraquinonas.
- Los parámetros físico-químicos encontrados en los compuestos fenólicos aislados fueron pH de 4-5, cenizas de 8,1, humedad de 2,1 y mejor solubilidad en metanol.
- Los compuestos fenólicos aislados presenta mayor inhibición a la concentración del 20% con un halo de inhibición de 22,89 mm.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los compuestos fenólicos aislados fue de 0,313 mg/mL y 0,625 mg/mL respectivamente frente a *Escherichia coli* ATCC 35218.



## VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones farmacológicas del género *Rumex* frente a otros microorganismos.
- Realizar estudios comparativos con extracto de hojas y de raíz con diferentes solventes e identificar el extracto que posee mayor cantidad de compuestos fenólicos.
- Determinar la turbidez de los caldos con espectrofotómetro UV/VIS para tener la certeza de la cantidad exacta de bacterias presentes en los tubos de ensayo.
- Realizar la reacción de Borntrager para antraquinonas y su posterior aislamiento.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quero S, Parraga N, Garcia M, Sabria M. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. G model of Pharmacy. 2015; 23(4): 1 - 8 [Acceso marzo 2016] disponible en: <https://www.journals.elsevier.com/enfermedades-infecciosas-y-microbiologia-clinica>.
2. Cisneros J, Palomino J y Pachon J. La interconsulta de enfermedades infecciosas es una actividad clave para los servicios y unidades de enfermedades infecciosas y para el hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(10): 671 -675 [Acceso marzo 2016] disponible en: [www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica](http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica)
3. Ramos J, Pinargote H, Torrus D, Sánchez R, Merino E y Portilla J. Enfermedades infecciosas en población adulta extranjera ingresada en un hospital general. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33(8): 539 – 542 [Acceso marzo 2016] disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-enfermedades-infecciosas-poblacion-adulta-extranjera-S0213005X14003565>
4. Jimoh F, Adedapo A, Aliero A y Afolayan J. Polyphenolic contents and Biological Activities of *Rumex ecklonianus*. *Pharmaceutical Biology*. 2008; 46(5): 333 - 340 [Acceso marzo 2016] disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200801887765>
5. Artículos Elika, fundación vasca para la seguridad agroalimentaria, *Escherichia coli*. [Acceso marzo 2016] disponible en: [http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf).
6. Muhammad T, Hassan M, Ijaz F, Ahmad Z. In- vitro antibacterial Study of Stem extract of *Rumex dentatus* Against Different bacterial Pathogenic Strains. *American- Eurasian J. Agric & Environ*. 2014; 14(3): 199 - 202
7. Yildirim A, Mavi A, Aydan A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem*. 2011. (49)1; 4083- 4089 [Acceso marzo 2016] disponible en: [http://www.academicjournals.org/.../article1380376475\\_Borchardt%20](http://www.academicjournals.org/.../article1380376475_Borchardt%20).
8. Borchardt JR, Wyse D, Sheaffer C, Kauppi K, Fulcher G, Ehke N, Biesboer D, Bey R. Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009; 3 (10):707 - 718. [Acceso marzo 2016] Disponible en: <http://www.academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/1C0514C15132>
9. Harshaw D, Nahar L, Vadla B, Sarker S. Bioactivity of *Rumex obtusifolius*. extract *Arch. Biol. Sci [ Revista on line]* 2010; 62(2): 387-392. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.429.7701&rep=rep1&type=pdf>. [Acceso marzo 2016].
10. Soto M, Soto K, Santos A, Moncayo N. *Revista Química viva*- número 3, año 14, diciembre 2015. Hospital Belén de Trujillo, Perú. Disponible en: [www.researchgate.net/publication/289175302\\_Metabolitos\\_secundarios\\_actividad\\_antibacteriana\\_in\\_vitro](http://www.researchgate.net/publication/289175302_Metabolitos_secundarios_actividad_antibacteriana_in_vitro). [Acceso marzo 2016].
11. Sung I. *Plantas medicinales*. Séptima Edición. Editorial Isabel. Lima, Perú 2000.
12. Mi herbolaria. *Plantas medicinales*. Acedera (*Rumex crispus* L.) disponible en: <http://herbolaria.altervista.org/plantas/acedera.html> [Acceso marzo 2016].
13. Mostacero J, Mejia F. *Taxonomía de fanerógamas peruanas*. Trujillo-Perú. Editorial Libertad EIRL; 1993
14. Rodríguez, B. Jiménez, J. y Navarro, E. 2011. Componentes fitoquímicos de las especies botánicas de *Rumex*, plantas de uso medicinal. Disponible en: [http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/6105/1/0514198\\_00004\\_0010.pdf](http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/6105/1/0514198_00004_0010.pdf).

15. Fan J, Zhang Z. Studies one the chemical constituents of *Rumex crispus*. ZHong Yao Cai. [Revista on line] 2009. [Acceso marzo 2016]
16. Demirezer LO, Kuruüzüm Uz-A, Bergere I, Schiewe HJ y Zeeck A. The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. Phytochemistry. 2001; 58 (8):1213-7. [Acceso marzo 2016] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738410>.
17. Günaydin K, Topcu G y Ion RM. 1, 5 dyhidroxiantraquinonas and anthrone from roots of *Rumex crispus*. Nat Prod Lett. Abstract [Revista on line] 2002. [Acceso marzo 2016]; 16(1): 65-70
18. Maksimovic Z, Kovacevic N, Lakusic B. y Cebovic T. Antioxidant activity of yellow dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. Res Phytother. 2011; 25 (1):101-5. [Acceso marzo 2016] Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.3234/full>.
19. Suh H, Lee K, Kim S, Shin M y Park S. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. J Photochem Photobiol B. 2011;102 (2):102-7 *disponible en:* [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101113441000223X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101113441000223X).
20. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis para sus beneficios para la salud. OFFARM, ámbito farmacéutico nutrición [revista on line]. 2004 [acceso marzo 2016]; 23(6)
21. Baskan S, Daut-Ozdemir A, Gunaydin K, Erim FB. Analysis of anthraquinonas in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. Talanta. [revista on line] 2007. [Acceso marzo 2016]; 71(2): 747-50
22. MedlinePlus. *Escherichia coli*, características generales, taxonomía y cepas virulentas. [Acceso marzo 2016]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ecoliinfections.html>.
23. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. FAO- división de producción y sanidad animal. [Acceso junio 2016] Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>.
24. Wiwanitkit, V. 2011. *Escherichia coli* infections. Primera edición. Editorial MedPud.
25. Mohammed S, Paquin-veillette J, Dozois C. the ecological habitat and transmsion of *Escherichia coli* O157:H7. Canada. [revista on line] 2013. [Acceso junio 2016].
26. Dominguez M. La *Escherichia coli* enteropatógena y sus factores de patogenicidad. [Acceso marzo 2016], Disponible en: [www.analesranf.com/index.php/mono/article/download/509/527](http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/download/509/527).
27. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. 2012; 23: 174 – 181 [acceso marzo 2016], disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911006756>.
28. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica. 2006; 7(3): 720-734
29. Suárez A. Vera V. Farmacología clínica. Uso y abuso del ciprofloxacino. Medisan 2011. Disponible en : <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v15n3/san.pdf>
30. Tinco A. Farmacología básica y avanzada. Tomo 2. Quinolonas. Primera edición. Editor Dermofarm\_Perú. 2013. Ayacucho\_Perú.
31. Universidad autónoma de Madrid. Departamento de farmacología y terapéutica. [Acceso marzo 2016], disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a55-tetraciclinas>.



32. Ministerio de Salud. Centro de Atención Farmacéutica (CAF DIGEMID). Ciprofloxacino. Accesado en agosto 2016. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Ciprofloxacino.pdf>
33. Katzung B, Masters S, y Trevor A. Farmacología básica y clínica. Editorial Mc Graw Hill interamericana editores S.A. 2010. España
34. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid – España; Editorial Síntesis S.A; 1999
35. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana – Cuba: Editorial Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana; 2000.
36. Hernández R, Fernández C, y Baptista P. Metodología de la investigación. Quinta edición. Editorial Mc Graw- Hill. México 2010. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/0B7qpQvDV3vxvWfK3YkltMTJxb3M/edit?pref=2&pli=1> [Acceso junio 2016].
37. Picazo J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. 2000.
38. Granados P, Villaverde P. Microbiología tomo II: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general, Parasitología general. 2ª ed. España: Thompson Editores Spain Paraninfo S.A; 2007.
39. Taroco R, Seija V, y Vignoli R. Temas de Bacteriología y Virología Médica: Método de estudio de la sensibilidad antibiótica; 2008.
40. Lozina, L, Boehringer, S. y Acosta, O. Extrapolación en una forma posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad antifúngica del propóleo. Argentina. Universidad Nacional del Noreste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas [revista en internet] 2005 [Acceso marzo 2016]; Resumen: V-018. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-018.pdf>.
41. Mantilla, J. y Olazábal, O. 2008. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra- valle sagrado de los incas. Cusco, Perú.
42. Rodríguez, B. Jiménez, J. y Navarro, E. 2011. Componentes fitoquímicos de las especies botánicas de *Rumex*, plantas de uso medicinal. Disponible en: [http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/6105/1/0514198\\_00004\\_0010.pdf](http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/6105/1/0514198_00004_0010.pdf).
43. Lock O. Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo editorial 1994. Lima.
44. González F. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*salvia hispánica* L.) mediante electroforesis capilar. México D.F. Diciembre 2010.
45. Surjeet k, Lincy J, Mathew G, y Vivek B. antimicrobial activity of methanolic extract of *Rumex nepalensis* leaves. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2011. [Acceso junio 2016] disponible en: <http://www.ijppsjournal.com/Vol3Suppl4/2423.pdf>.



## **ANEXOS**

Anexo 1. Certificado de identificación sistemática de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD  
"NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srita. Delia, HUARANCCA HINOSTROZA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	:	POLIGONALES
FAMILIA	:	POLYGONACEAE
GENERO	:	Rumex
ESPECIE	:	<b><i>Rumex crispus</i> L.</b>
N.V.	:	"romaza", "lengua de vaca"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 12 de Marzo del 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Dña. Laura Aucasime Medina  
JEFE

Anexo 2. Certificado de *Escherichia coli* ATCC 35218.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA ACADÉMICA DE MICROBIOLOGÍA


El jefe del Laboratorio de Bacteriología, del Área Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

**CERTIFICA:**

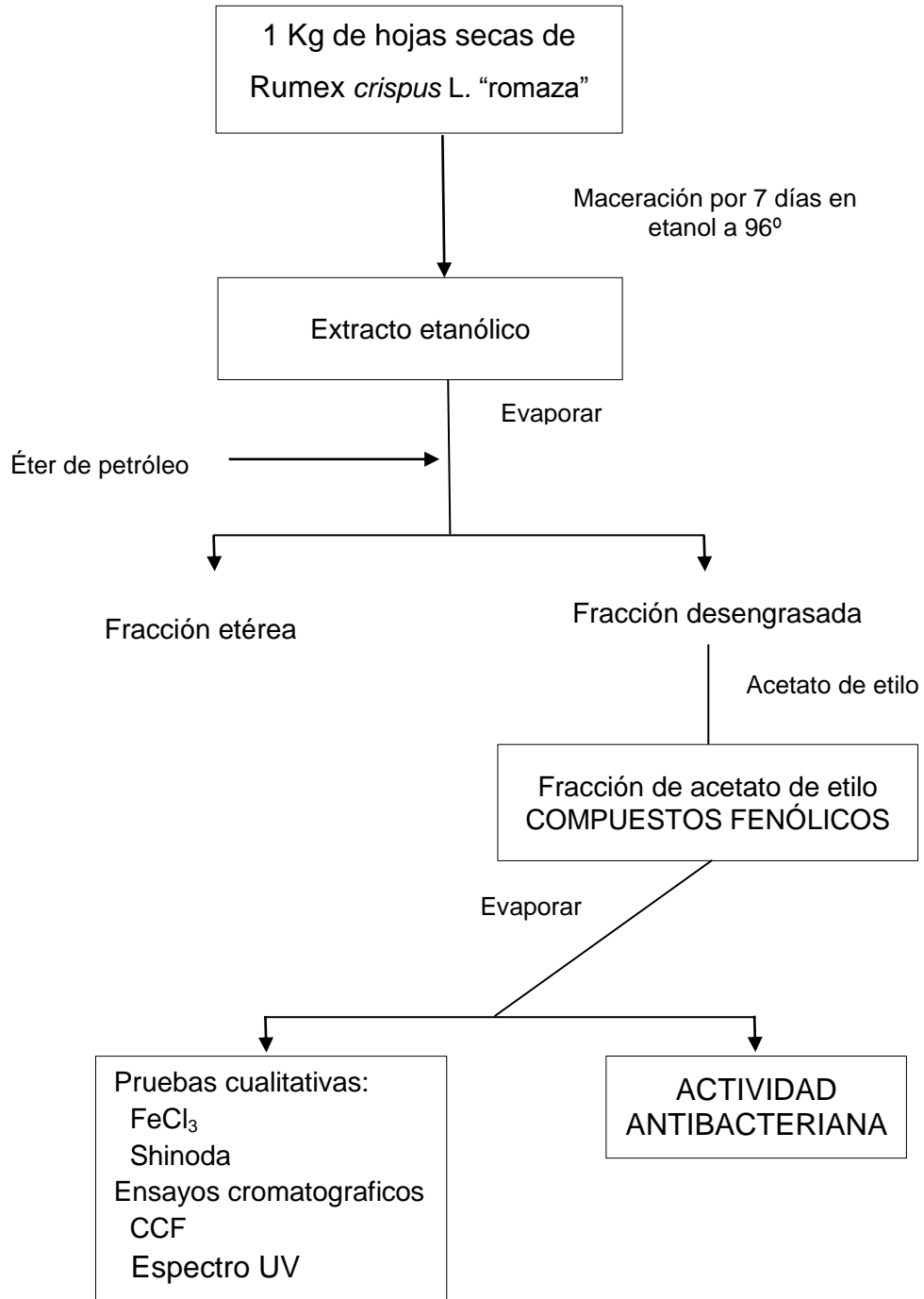
Que se ha proporcionado a la Srta. Delia HUARANCCA HINOSTROZA, la Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica a fin de que pueda desarrollar la tesis titulada: "Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* "romaza" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016".

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que creas por conveniente.

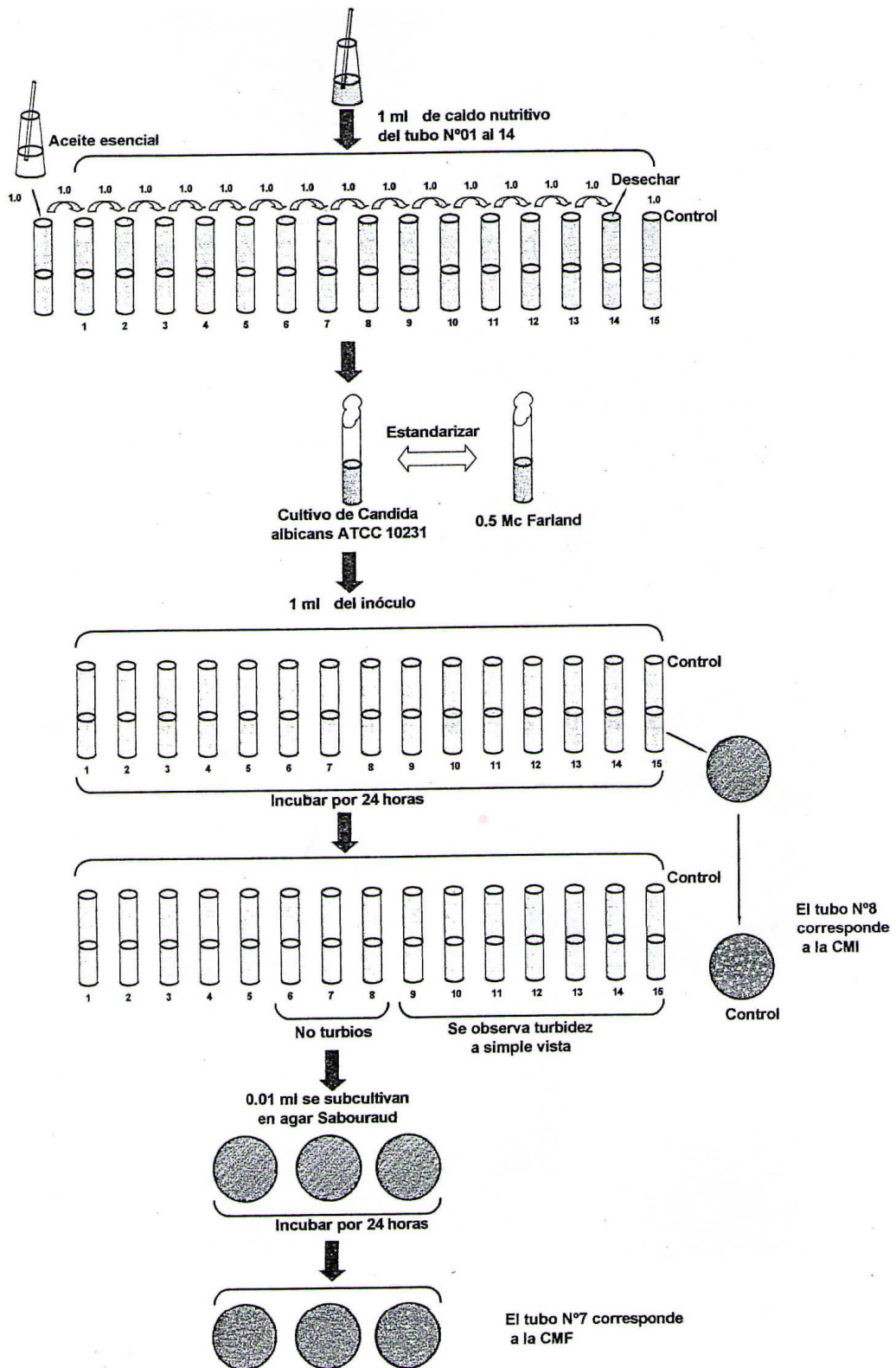
Ayacucho, 01 de noviembre de 2016

  
Mg. Víctor L. Cárdenas López  
Jefe del Laboratorio de Bacteriología  
Área Académica de Microbiología

Anexo 3. Flujo grama de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.



Anexo 4. Esquema para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, Ayacucho 2016.





Anexo 5. Recolección y secado de las hojas de *Rumex crispus* L. “romaza”, Ayacucho 2016.





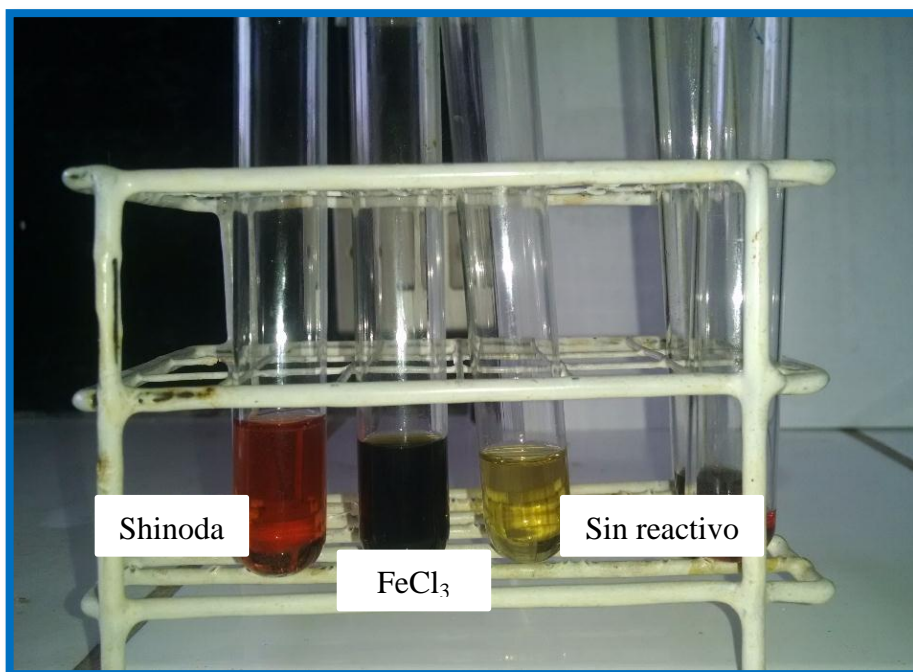
Anexo 6. Tamizaje fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.



Anexo 7. Extracción etanólica y aislado de compuesto fenólicos con éter de petróleo y acetato de etilo, Ayacucho 2016.

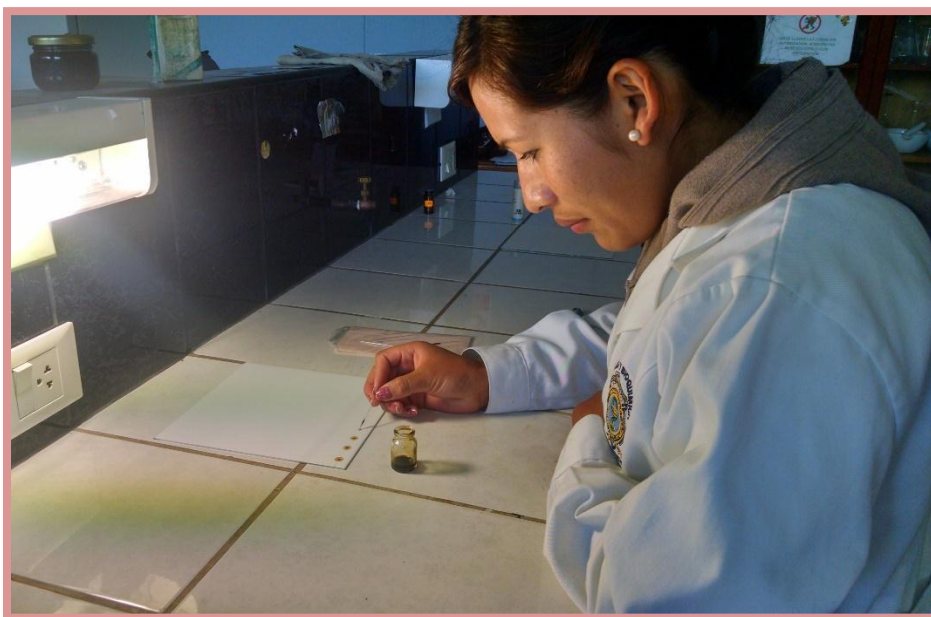


Anexo 8. Ensayos con reactivo de Shinoda y cloruro férrico al 5% para determinar la presencia de compuestos fenólicos en el aislado, Ayacucho 2016.

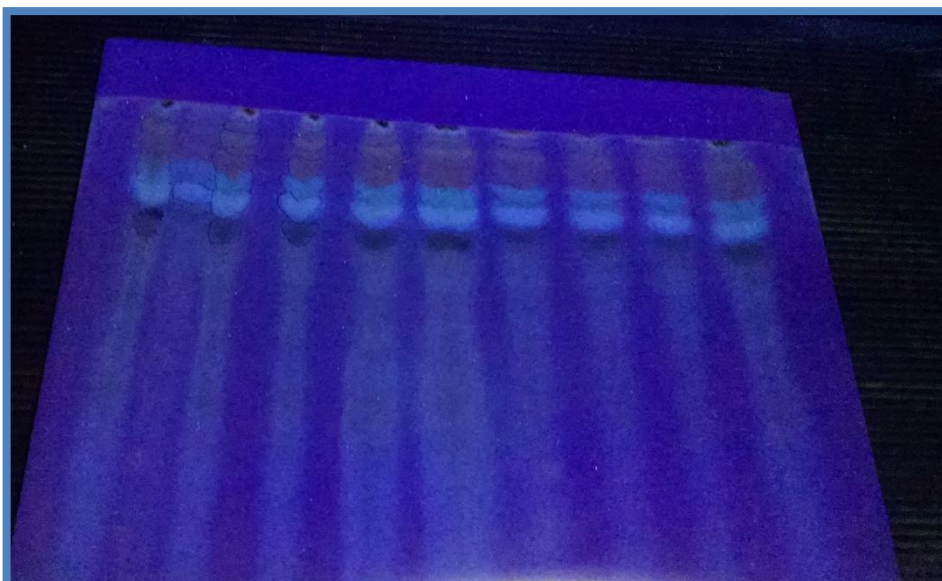




Anexo 9. Sembrado en placa de silica gel y revelado del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

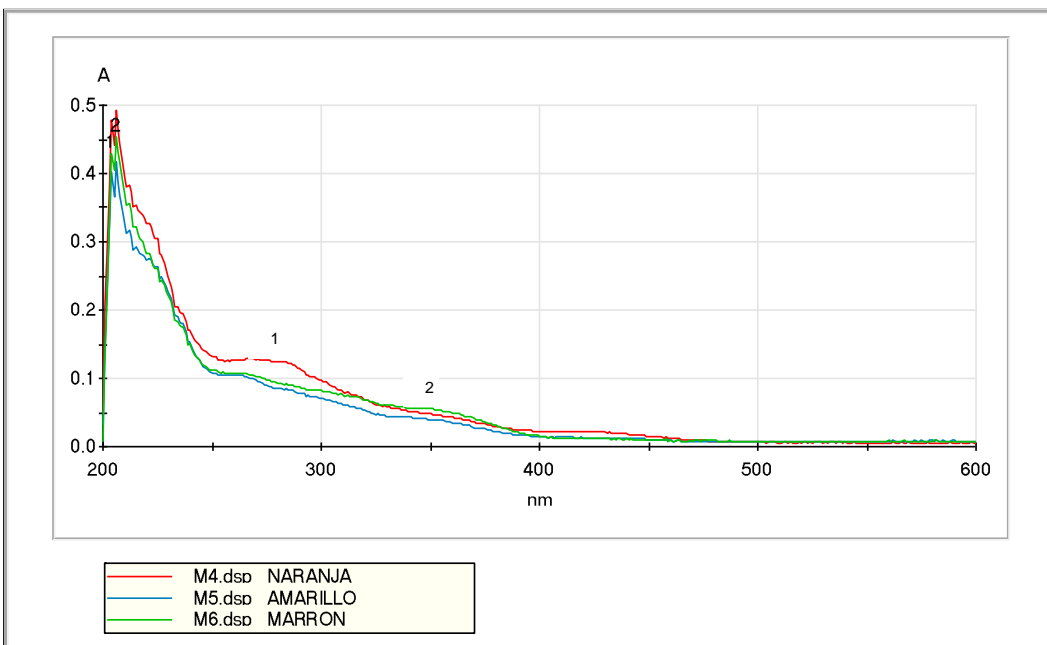
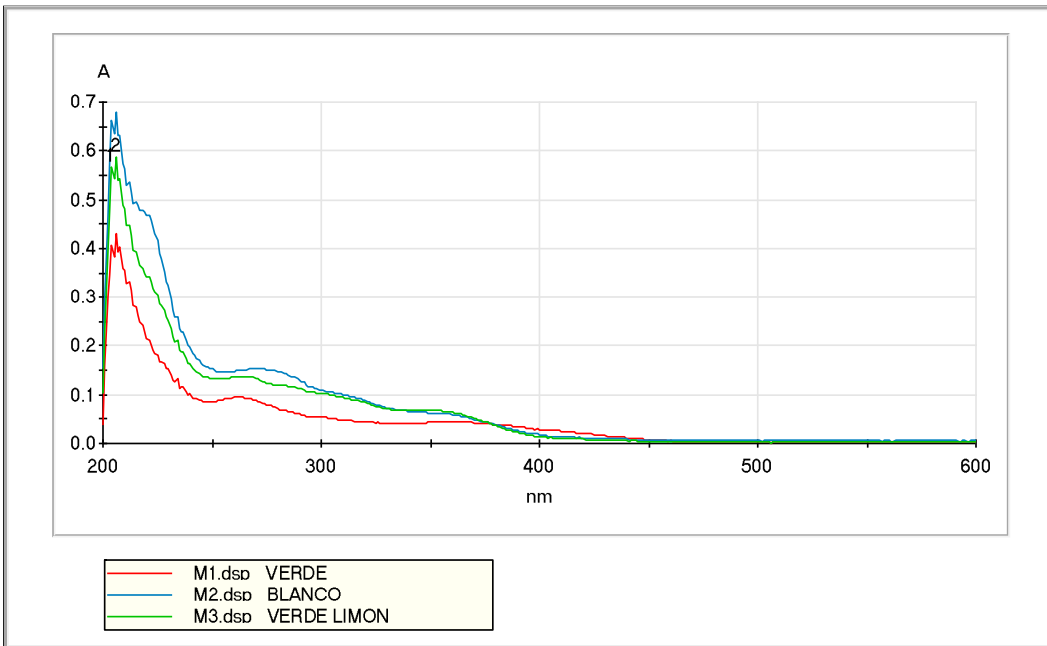


Anexo 10. Revelado de las bandas en cromatografía de capa fina observada mediante la lámpara UV, Ayacucho 2016.



Anexo 11. Lectura en el espectrofotómetro UV/VIS de las 7 bandas observadas en la cromatografía de capa fina, Ayacucho 2016.

Spectrum: M3.dsp  
Description: VERDE LIMON  
Operator: user/FARMACOGNOSIA  
Created: 26/07/2016 04:31:31 p.m.  
Spectrophotometer: GENESYS 6  
Serial number: 2M6H070001  
Firmware: 1.200

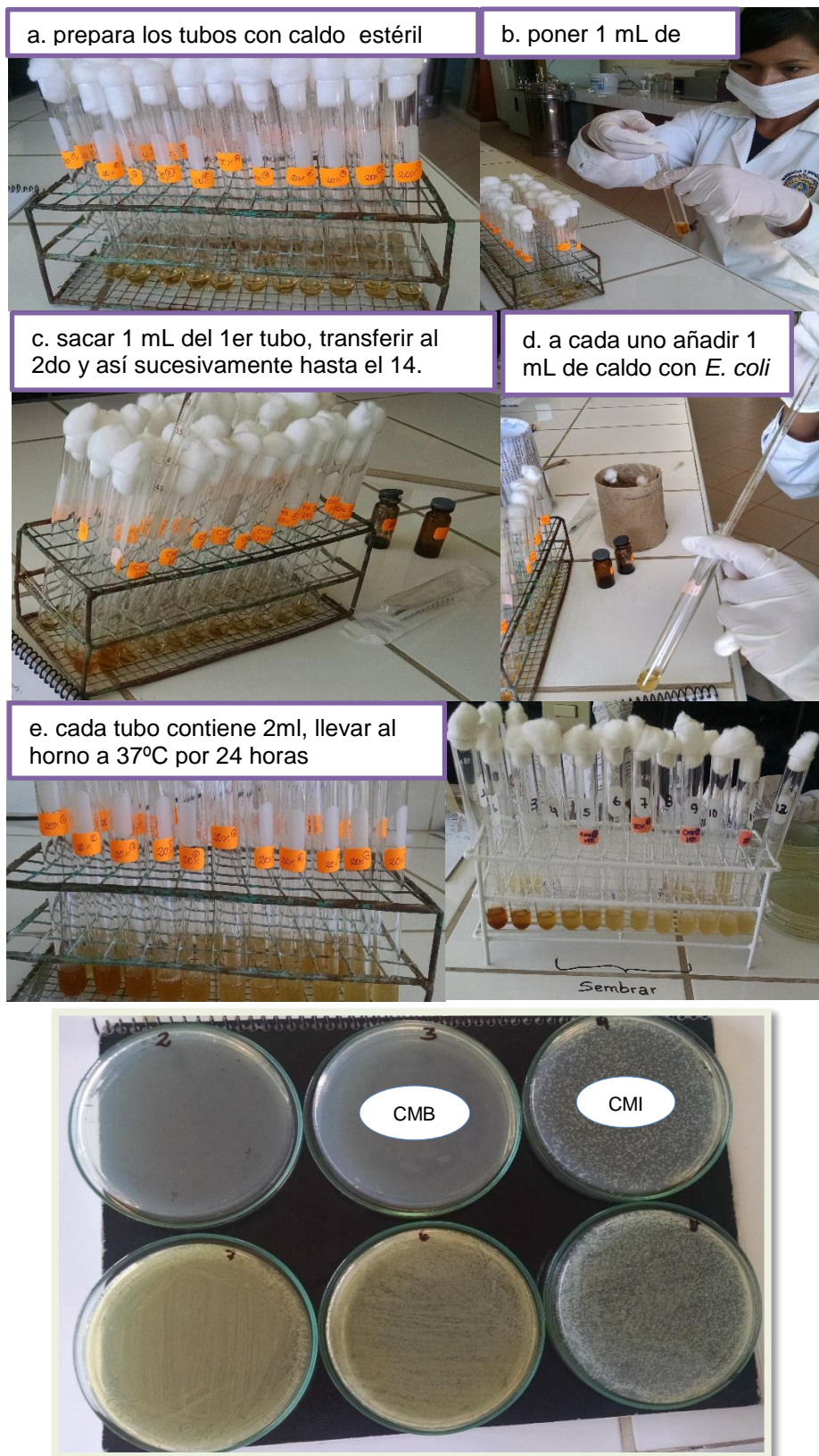




Anexo 12. Ensayos para determinar los halos de inhibición del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" frente a *Escherichia coli*, Ayacucho 2016.



Anexo 13. Determinación de la CMI y CMB del aislado de los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.





Anexo 14. Comparación de medias mediante la prueba de Tukey del diámetro de halo de inhibición en los tratamientos del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho 2016.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Blanco	9	0,00					
CF 5%	9		12,89±1,36				
CF 10%	9			16,67±1,50			
CF 15%	9				18,78±1,30		
CF 20%	9					22,89±1,28	
Ciprofloxacino	9						24,11±1,45
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,327

CF: Compuestos fenólicos

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

Anexo 15. Test de Tukey, determina estadísticamente la diferencia de concentraciones comparando con cada grupo del efecto antibacteriano del aislado de los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", Ayacucho2016.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
CF 5%	CF 10%	-3,78*	0,59	0,000	-5,54	-2,01
	CF 15%	-5,89*	0,59	0,000	-7,65	-4,13
	CF 20%	10,00*	0,59	0,000	-11,76	-8,24
	Ciprofloxacino	-11,22*	0,59	0,000	-12,99	-9,46
	Blanco	12,89*	0,59	0,000	11,13	14,65
CF 10%	CF 5%	3,778*	0,59	0,000	2,01	5,33
	CF 15%	-2,111*	0,59	0,011	-3,87	-0,35
	CF 20%	6,222*	0,59	0,000	-7,99	-4,46
	Ciprofloxacino	-7,444*	0,59	0,000	-9,21	-5,68
	Blanco	16,667*	0,59	0,000	14,90	18,43
CF 15%	CF 5%	5,889*	0,59	0,000	4,13	7,65
	CF 10%	2,111*	0,59	0,011	0,35	3,87
	CF 20%	-2,444*	0,59	0,000	-5,87	-2,35
	Ciprofloxacino	-5,333*	0,59	0,000	-7,10	-3,57
	Blanco	18,778*	0,59	0,000	17,01	20,54
CF 20%	CF 5%	10,000*	0,59	0,000	8,24	11,76
	CF 10%	6,222*	0,59	0,000	4,46	7,99
	CF 15%	4,111*	0,59	0,000	2,35	5,87
	Ciprofloxacino	-1,222*	0,59	0,327	-2,99	0,54
	Blanco	21,889*	0,59	0,000	21,13	24,65
Ciprofloxacino	CF 5%	11,222*	0,59	0,000	9,46	12,99
	CF 10%	7,444*	0,59	0,000	5,68	9,21
	CF 15%	5,333*	0,59	0,000	3,57	7,10
	CF 20%	1,889*	0,59	0,327	-0,54	2,99
	Blanco	24,111*	0,59	0,000	22,35	25,87
Blanco	CF 5%	-12,889*	0,59	0,000	-14,65	-11,13
	CF 10%	-16,667*	0,59	0,000	-18,43	-14,90
	CF 15%	-18,778*	0,59	0,000	-20,54	-17,01
	CF 20%	-21,889*	0,59	0,000	-24,65	-21,13
	Ciprofloxacino	-24,111*	0,59	0,000	-25,87	-22,35

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 16. Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje del efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza”, Ayacucho 2016.

**ANOVA**

Halos de inhibición (mm)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3143,11	5	696,62	438,68	8,2 x10 <sup>-39</sup>
Dentro de grupos	76,22	48	1,59		
Total	3559,33	53			

Anexo 17. Comparación mediante la prueba de Tukey del efecto antibacteriano en los tratamientos del aislado de compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L “romaza”, Ayacucho 2016.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mín	Máx
					Límite inferior	Límite superior		
					CF 5%	9		
CF 10%	9	16,67	1,50	0,50	15,51	17,82	14	19
CF 15%	9	18,78	1,30	0,43	17,78	19,78	17	21
CF 20%	9	22,89	1,27	0,42	21,91	23,86	20	24
Ciprofloxacino	9	24,11	1,45	0,48	22,99	25,23	22	26
Blanco	9	,00	0,00	,000	,00	0,00	0	0
Total	54	15,89	8,195	1,11	13,65	18,13	0	26

Anexo 18. Patrones estándares de diámetros de halo de inhibición para cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 empleado como control de calidad, Ayacucho 2016.

Tabla 1. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias <sup>a</sup> y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> ATCC25922 empleada como control de calidad								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo <sup>b</sup>
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Ampicilina <sup>a,c</sup>	10	<13	14-16	>17	>32	<8	16-22
	Cefalotina <sup>c,d</sup>	30	<14	15-17	>18	>32	<8	15-21
	Cefazolina <sup>c,d</sup>	30	<14	15-17	>18	>32	<8	23-29
	Gentamicina <sup>c</sup>	10	<12	13-14	>15	>8	<4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	<13	14-17	>18	>16/8	<8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	<11	12-14	>15	>32/16	<8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	<17	18-20	>21	>128/4	<16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	<14	15-19	>20	>128/2	<16/2	25-29
	Mezlocilina	75	<17	18-20	>21	>128	<64	23-29
	Ticarcilina	75	<14	15-19	>20	>128	<16	24-30
	Piperacilina	100	<17	18-20	>21	>128	<16	24-30
	Cefamandol	30	<14	15-17	>18	>32	<8	26-32
	Cefonicid	30	<14	15-17	>18	>32	<8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	<14	15-22	>23	>32	<4	20-26
	Cefpodoxima	10	<17	18-20	>21	>8	<2	23-28
	Cefixima	5	<15	16-18	>19	>4	<1	23-27
	Cefoxitina	30	<14	15-17	>18	>32	<8	23-29
	Cefotetan	30	<12	13-15	>16	>64	<16	28-34
	Cefmetazol	30	<12	13-15	>16	>64	<16	26-32
	Cefoperazona <sup>a</sup>	75	<15	16-20	>21	>64	<16	28-34
	Cefotaxima <sup>a,d</sup>	30	<14	15-22	>23	>64	<8	29-35
	Ceftizoxima <sup>a</sup>	30	<14	15-19	>20	>32	<8	30-36
	Ceftriaxona <sup>a,d</sup>	30	<13	14-20	>21	>64	<8	29-35
	Cefepima	30	<14	15-17	>18	>32	<8	29-35
	Imipenem	10	<13	14-15	>16	>16	<4	26-32
	Meropenem	10	<13	14-15	>16	>16	<4	28-34
	Amikacina	30	<14	15-16	>17	>32	<16	19-26
	Ciprofloxacino <sup>a,c</sup>	5	<15	16-20	>21	>4	<1	30-40
	Levofloxacino	5	<13	14-16	>17	>8	<2	29-37
	Trimetoprim/sulfametoxazol <sup>a,c</sup>	1,25/23,75	<10	11-15	>16	>8/152	<2/38	24-32

Anexo 19. Matriz de consistencia

Titulo	Problema	Objetivo	Marco teórico	Hipótesis	Variable	Metodología
Efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2016.	¿Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" tendrán efecto antibacteriano frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218?	<p><b>Objetivo general</b> Determinar el efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificar los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza".</li> <li>• Establecer los parámetros físico – químicos de los compuestos fenólicos.</li> <li>• Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislados frente a <i>Escherichia coli</i>.</li> <li>• Evaluar la concentración mínima inhibitoria de los compuestos fenólicos aislados.</li> </ul>	<p><b>Muhammad T, y et al.</b> Investigó los efectos antibacterianos del extracto del tallo de <i>Rumex dentatus</i> contra algunas cepas, el extracto metanolico y agua fría eran eficaces.</p> <p><b>Yildirim A, y et al.</b> Evaluaron los efectos antioxidantes y antimicrobianos de <i>Rumex crispus</i> L., encontrando que el extracto etanólico tenía más compuestos fenólicos, mostrando actividad antibacteriana.</p> <p><b>Borchardt J. y et al.</b> La actividad antioxidante y antimicrobiana de las semillas de las plantas de la Cuenca del río Mississippi, mostraron actividad antimicrobiana <i>Rumex crispus</i> L., <i>Rumex verticillatus</i> L., <i>Spiraea tomentosa</i> L. frente a <i>S.aureus</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>E. coli</i> y <i>Candida albicans</i></p> <p><b>Soto M, y et al.</b> Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de <i>Rumex crispus</i> L., la actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> a diferentes concentraciones, resultando la CMI de 1,0 y 2,5 mg/ml respectivamente.</p>	Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" poseen actividad antibacteriana frente a <i>Escherichia coli</i>	<p><b>Variable independiente:</b> Compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza".</p> <p><b>Indicadores:</b> Concentraciones 10%; 20%; 30%; 40% y 50%</p> <p><b>Variables dependiente:</b> Actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> "romaza".</p> <p><b>Indicadores:</b> -halos de inhibición. -Concentración Mínima Inhibitoria.</p>	<p><b>Tipo de investigación:</b> • Básica – explicativo experimental</p> <p><b>Muestra biológica:</b> <b>Población:</b> hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" que crecen en el distrito de Santiago de Pischa, provincia de Huamanga, Región Ayacucho.</p> <p><b>Muestra:</b> 1 kg de hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" recolectada en el distrito de Santiago de Pischa, provincia de Huamanga, Región Ayacucho.</p> <p><b>Unidad experimental</b> Cepas de <i>Escherichia coli</i>, adquiridas del laboratorio de Bacteriología del Área Académica de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la UNSCH.</p> <p><b>Procedimiento metodológico</b> 500 g de hojas serán molidas en un mortero. Se extraerá por maceración durante 7 días con etanol de 96°. Se filtrará y la solución hidroalcohólica se concentrará hasta obtener una muestra blanda, la cual será desengrasada con éter de petróleo, la fracción desengrasada se tratara con acetato de etilo volumen a volumen para finalmente concentrar a presión y temperatura reducidas en un rotavapor la fracción de acetato de etilo hasta obtener una muestra blanda. Se realizará la identificación de los compuestos fenólicos mediante reacciones con cloruro férrico, Rvo shinoda, cromatografía de capa fina y se determinará la actividad antibacteriana mediante el método de difusión con discos (kirby-bauer).</p>