

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", Ayacucho 2009.

PRESENTADO POR:

Bach. BAUTISTA MARTÍNEZ, Rosa María

AYACUCHO, PERÚ

2011

A la memoria de mis padres, que me inculcaron valores humanos y el deseo de ser mejor, como persona y profesional.

A mi familia por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Con inmensa gratitud a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga "*Alma Mater*" por haberme albergado en su seno por segunda vez durante mi formación profesional.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas quienes me transmitieron sus valiosos conocimientos y experiencias; y de forma especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, quienes día tras día contribuyeron en mi formación profesional.

Al personal del Laboratorio de Referencia Regional de la Dirección Regional de Salud de Ayacucho, por haberme brindado todas las facilidades en el desarrollo del presente trabajo.

Mi reconocimiento al Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices y al Mg. Blgo. Aurelio Carrasco Venegas, por su asesoramiento e invaluable apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

TÍTULO : Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", Ayacucho 2009.
AUTOR : Bach. Rosa María Bautista Martínez.
ASESORES : Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices.
Mg. Blgo. Aurelio Carrasco Venegas.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado con el objetivo de demostrar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", realizado en el Laboratorio de Referencia Regional de la Dirección Regional de Salud Ayacucho, durante los meses de diciembre del 2008 a mayo del 2009.

El método utilizado fue el de difusión de placa excavada (pozo); se utilizaron diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo" (3,0; 1,5 y 0,75 mg), y como control positivo discos de sensibilidad para bacterias Gram negativas Ceftriaxona 30 µg, para bacterias Gram positivas, Amoxicilina 25 µg. y para *Candida albicans* la Nistatina 100.000UI/mL, las bacterias Gram negativas utilizadas fueron (*E. coli*, *Shigella sp*, *Salmonella typhi*), bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus cereus*) y una levadura (*Candida albicans*).

El extracto frente a *Staphylococcus aureus* presentó halos de inhibición de 17,7 mm, 14,3 mm y 11,3 mm., *Bacillus cereus* fue de 16,3 mm., 14,0 mm., 11,7 mm., y para *Streptococcus pyogenes* fue de 9,7 mm a la concentración de 3,0.

En cuanto a la concentración mínima inhibitoria fue la siguiente: Para *Staphylococcus aureus* 0,60 mg, para *Bacillus cereus* 0,70 mg. y para *Streptococcus pyogenes* fue 2,0 mg.

Se concluye que el extracto tuvo actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *B. cereus* y *S. pyogenes*.

Palabras claves: *Oenothera rosea*, Actividad antimicrobiana, extracto hidroalcohólico

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	04
2.1. Antecedentes.....	04
2.2. <i>Oenothera rosea</i> “yawar soqo”	07
2.3. Bacterias.....	12
2.4. Controles utilizados	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Ubicación.....	24
3.2. Población.....	24
3.3. Muestra	24
3.4. Cepas bacterianas.....	26
3.5. Control positivo.....	26
3.6. Determinación de la actividad antimicrobiana	26
3.7. Cálculo del porcentaje de inhibición.....	28
3.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	28
3.9. Análisis de datos.....	29
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	36
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	46

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en forma de fármaco o en preparaciones tradicionales: infusiones, vapores, ingesta directa entre otras; con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos (Sanabria y col., 1998 y Ali - Shyayet y col., 1998).

El primer tratado Helénico completo en materia de plantas medicinales del que se tiene conocimiento fue escrito por Diocles de Catystos (siglo IV D.C.) el tratado llamado *Phizotomicon*, expone el origen el reconocimiento y el valor medicinal de diversas plantas (Si y Gong, 2006).

Probablemente una de las drogas del folklore tradicional que se transforma en una moderna droga allá a finales del siglo XVIII, fue la digital (*Digitalis purpurea*), lo cual ilustra los principios de la Farmacología moderna (Goldman, 2001).

Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Rand,1991; Rojas y Hernández,1992).

Una de las ventajas del empleo de las plantas medicinales, es que poseen un amplio rango de actividad antimicrobiana, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que las hacen tóxicas para los microorganismos (Vander, 1985).

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de euros alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1,340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos. Pero se conocen más de 250,000 especies de plantas que contienen una diversidad de componentes bioactivos (Shiva, 2003).

La importancia en el estudio de las plantas medicinales es evaluar la eficacia de su uso como remedios caseros tradicionales haciendo una contribución a su validez científica y legislativa (Pio, 1990).

Nuestra población viene empleando preparados a base de plantas con fines medicinales para tratar diferentes infecciones, sin conocer a plenitud su efectividad; solo con un verdadero estudio analítico se podrá corroborar o desmentir estas creencias.

Oenothera rosea "yawar soqo", es una especie nativa de Perú, perteneciente a la familia Onagracea. *Oenothera* es un género de cerca de 125 especies, la especie medicinal *Oenothera rosea* "chupasangre", es ampliamente utilizada por sus propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas por la población peruana, en algunos casos sola o asociada a otras plantas medicinales (Aguilar y col., 2003).

El uso tradicional de esta planta y algunos estudios farmacológicos indican su posible utilización como agente antimicrobiano, por lo que se decidió realizar el presente trabajo con los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Demostrar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo".

Objetivos Específicos:

- Determinar la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, Gram positivas y *Candida albicans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo".
- Comparar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" con fármacos estándar.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

La Comisión Nacional de Biodiversidad en su estudio: "Herbolaria Mito o Realidad" sobre el estado actual y perspectivas de las plantas medicinales de México, consideran a *Oenothera rosea* "hierba del golpe" como una planta medicinal nativa y silvestre de uso intensivo, como antiinflamatoria y cicatrizante. (Aguilar y col., 2003)

Asimismo en dicho país, Betancourt y Gutiérrez (1999) citado por Aguilar y col., (2002), realizaron un estudio del mercado de plantas medicinales; siendo considerada *Oenothera rosea* dentro de la lista de plantas medicinales y aromáticas de procedencia nacional con mayor demanda comercial en México, utilizándose el tallo y las hojas.

Hurtado y Rodríguez, (2000) en el estudio de la flora medicinal del municipio de Copándaro de Galeana - México; llevaron cabo un estudio cuantitativo y cualitativo de la flora medicinal, dentro del cual se encontraba *Oenothera rosea*.

Oenothera rosea es una especie nativa del Perú, introducida a los Estados Unidos en 1783 por Monseñor Thouin, publicada en *Hortus Kewensis* (1789) y en 1796 en el *Botanical Magazine* editado por William Curtis.

En el Perú es reportada por Mc Bride en 1941 como parte de la flora peruana, perteneciente a la Familia Onagracea (Aguilar y col., 2003).

Palacios (1997), en su libro plantas nativas menciona a *Oenothera rosea* como una planta medicinal nativa del Perú.

A nivel internacional, nacional y regional no se han reportado trabajos referentes a la actividad antimicrobiana de *Oenothera rosea* "yawar soqo"; sin embargo, podemos mencionar algunos estudios de plantas medicinales con ésta propiedad.

Martínez y col. (1997), estudiaron la actividad antimicrobiana de dos concentraciones (10 y 50 mg/mL) de un extracto acuoso liofilizado de hojas de *Aloe vera* (sábila) frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y la levadura *Candida albicans*, los resultados que obtuvo fue solo el *Staphylococcus aureus* tuvo una ligera actividad inhibitoria.

Martínez y col. (2000), Estudió la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones del extracto fluido de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Copal) frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*, los resultados que obtuvieron fue que a concentraciones de 1% de apreció que inhiben el crecimiento de todos los microorganismos y la respuesta se incrementa gradualmente con la concentración.

Rangel y col. (2001), evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico, acetónico y acuoso, de las partes aéreas de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida albicans*; y los resultados obtenidos muestran actividad antimicrobiana de todos los extractos sólo frente a *Staphylococcus aureus*.

Ramírez y Darwin (2007), determinaron que los extractos y fracciones etanólicas de las raíces, hojas y espigas del *Rumex conglomeratus* presentaron actividad inhibitoria frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y la fracción etérea de las espigas fue activa contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

A nivel nacional se reportan los siguientes trabajos:

Alzamora y Soto (2001), con los resultados obtenidos permitieron validar el uso popular de *Tagetes pusilla* Lag. "anís serrano" y de *Cymbopogon citratos* "hierba luisa" en el tratamiento de afecciones intestinales como la salmonelosis y el cólera. El aceite de *Lepechinia meyenii* "salvia" no mostró actividad sobre ninguna de las bacterias Gram negativas empleadas.

Huapaya y col. (2001), evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Croton lechleri* "Sangre de grado", determinando una marcada actividad antimicrobiana frente al *Staphylococcus aureus* en diluciones de 50 y 100%; y no presentó actividad frente a *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Liu y col. (2002), estudiaron *in vitro* la actividad antibacteriana de extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp* "eucalipto" utilizando cepas bacterianas Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Shigella flexneri*. Se utilizó como solvente de extracción una mezcla de alcohol - acetona (1:1). La cáscara del fruto de *Caesalpinia spinosa* y las hojas de *Eucalyptus sp*, mostraron actividad selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas. No se mostró ningún efecto antimicrobiano sobre Gram negativas.

Eguizabal (2007), reportó que el extracto etanólico de Propóleo Peruano en solución al 0,8%, demostrando la acción antibacteriana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25173 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 que la clorhexidina al 0,12 %.

Trabajos a nivel regional son:

Zevallos (1998), concluyó que *Carica papaya*, presentó mayores halos de inhibición en sus extractos de semilla, cáscara y fruto entero frente a *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* "D"; y frente a *Shigella dysenteriae* "A", *E. coli* y *S. typhi*; hubo presencia de halos más pequeños.

Palomino (2000), demostró que los extractos de la cáscara de fruto y la corteza de la raíz de *Punica grantum* "granado" de la solución madre dilución 1/10 del extracto etanólico y la solución madre del extracto acetónico muestran actividades similares ; para la dilución 1/10 del extracto acetónico de la cáscara de fruto posee mayor actividad que la corteza de la raíz para los casos del *Vibrio cholerae*, *inaba* y *ogawa*.

Carhuallanqui (2003), demostró que los extractos etanólico y acuoso de hojas del *Juglans neotropica Diels* "nogal" a concentraciones de 500 mg el extracto acuoso de hojas posee mayor actividad que el etanólico frente a cepas de *Salmonella sp.*

Samanez (2006), demostró la sensibilidad de las bacterias enteropatógenas (*S. sonnej*, *S. paratyphi* y *E. coli*) frente a los extractos alcohólico de hojas y frutos de *Solanum radicans* L. "ñuchku".

2.2. *Oenothera rosea*

2.2.1. Clasificación Taxonómica (Según Engler y Prantl, modificado por Melchior 1904).

División	:	Antophita (Angiospermae)
Clase	:	Dicotiledoneae
Subclase	:	Archiclamideas
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Onagracea
Género	:	<i>Oenothera</i>
Especie	:	<i>Oenothera rosea</i> Ait.
Nombre Vulgar	:	"yawar soqo"

Fuente: Betalleluz 2007 citando Certificado emitido por el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de La Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.

2.2.2. Descripción Botánica (Mostacero y col., 2002)

Es una planta herbácea perenne, de más o menos 30 centímetros de alto, aunque existen arbustos que miden un metro o más, de raíz tuberosa.

Tallo. Herbáceo, erecto o ascendente y uniformemente decumbente delgado, simple o ramificado, coloreado de rojo violáceo, más intensamente en la base, presenta pelos blanquecinos.

Hojas. Oblongo - lanceoladas, sub enteras o groseramente sinuadas, irregularmente dentadas, de dos a cinco centímetros de longitud con pecíolo delgado. Las hojas de la parte superior están reducidas a brácteas verdosas en cuyas axilas nacen las flores. De color verde oscuro en el haz, un poco más claro en el envés.

Flores. Agrupadas en inflorescencias racimosas. Son hermafroditas, heteroclamídeas, pedunculadas y periginas; presenta hipanto que encierra al ovario ínfero, cuya parte externa presenta ocho estrias (cuatro más prominentes). Cáliz tetrámero, gamosépalo, los sépalos son reflexos durante la antesis, pubescente, con lóbulos largos y decumbentes. Corola tetrámera, dialipétala, constituida por cuatro pétalos aovados de color rosado o rojo violeta.

Fruto. Cápsula ovoide de 8 a 10 mm de longitud, extraídos con ocho costillas longitudinales y caras arrugadas, poseen como base un pedúnculo hueco. Semillas de forma oblonga, aovada y asimétrica, de color marrón.

2.2.3. Nombres populares

Sanguinaria, chupa sangre, San Juan, yahuar chungu, yahuar chonca, gahuar chunka, yawar soqo, yaguar sua, antañahui, hierba del golpe, rose evening primrose.

2.2.4. Distribución geográfica

Crece en forma silvestre en las orillas de las acequias y en contornos de terrenos cultivados en niveles bajos y medios de climas templados o subtropicales, se encuentra en las zonas alto andinas a alturas entre 1,500 m.s.n.m. a 4,000 m.s.n.m., pero con mayor frecuencia en valles intermedios a uno y otro lado de la cordillera de los andes: Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huanuco, Junín, Lima, Pasco, Piura; se extiende desde el sudoeste de Estados Unidos, México, Costa Rica, Bolivia y hasta en la India (Aguilar, 2004).

2.2.5. Usos Populares

Es una planta originaria de Sudamérica. El uso de esta planta en medicina por los antiguos peruanos data desde épocas precolombinas, era aplicada como infusión y cataplasma en el tratamiento de lesiones y traumatismos; también como infusión en casos de afecciones respiratorias, en el reumatismo, ciática y dolor en general; actualmente las flores, hojas y raíces son usadas también en contusiones, tratamiento de fracturas, en problemas respiratorios, heridas. Las flores y hojas usadas para el dolor de riñón, como vermífugo. Las hojas son usadas en forma de infusión como depurativa, sudorífica, para el dolor de cabeza.

Las ramas frescas son usadas en México para el tratamiento de la hemorragia durante el periodo menstrual, en el tratamiento de la infertilidad, dismenorrea, en heridas y contusiones. La planta entera es usada para el tratamiento de la diarrea, en forma de decocción.

En la India las hojas de *Oenothera rosea* son usadas para heridas y contusiones en forma de una pasta y aplicados externamente (Aguilar, 2004).

2.2.6. Composición Química

Wolf (1983), determinó la presencia de ácidos grasos insaturados en las semillas de *Oenothera rosea* y los identifica como: ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmítico y ácido oleico.

Rodríguez y col. (1996), reportó la presencia de los grupos de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides y glicósidos. Detectaron alcaloides en el extracto hexánico de *Oenothera rosea*.

Palacios (1997), describe la presencia de sustancias fenólicas: ácido elágico, gálico, cafeico, o-cumárico, m-digálico, neoclorogénico, kaemferol, quercetina, cianidina, delfinidina y glicósidos flavónicos los cuales estuvieron presentes en las hojas.

Averett (1998), determinó la presencia de flavonoides en las hojas *Oenothera rosea* y los identifica bajo la forma de glucósidos flavónicos.

Tinco (1998), reportan la presencia de taninos, flavonoides, azúcares reductores, saponinas, mucílagos, principios amargos, catequinas, resinas, lactonas y/o cumarinas, esteroides y triterpenos en los diferentes extractos: etéreo, alcohólico y acuoso.

2.2.7. Estudios Farmacológicos

Rodríguez y col. (1996), estudiaron la especie *Oenothera rosea*, junto a otras especies empleadas para males intestinales y para la inflamación de garganta. Midió su actividad antibacteriana y su toxicidad frente a *Artemia salina*. La planta presentó actividad antibacteriana frente a las especies de prueba y toxicidad frente a *Artemia salina*.

Tinco (1998), reportó la presencia de flavonoides, y demostró la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos de *Oenothera rosea* encontrándose mayor eficacia antiinflamatoria a 250mg/Kg. de peso en cobayos.

Aguilar y col. (2000), estudiaron la actividad antioxidante de extractos de acetato de etilo, acetónico, clorofórmico y metanólico de las hojas de *Oenothera rosea*, encontrando que el extracto clorofórmico muestra la mayor actividad antioxidante.

Rojas (2002), en su trabajo de investigación sobre la actividad hepatoprotectora contra el daño producido por el paracetamol; concluye que se obtienen mejores resultados a la dosis de 250mg/Kg del extracto acuoso liofilizado. Asimismo, afirma que los grupos fenólicos y los flavonoides podrían ser los responsables del efecto hepatoprotector. También determina que la DL_{50} del extracto acuoso liofilizado de *Oenothera rosea*, al ser administrado por vía oral es mayor de 2g/kg. de peso de ratón. No presentando muerte hasta las 72 horas de experimento; y La DL_{50} por vía intraperitoneal es de 165.2107 mg/Kg. de ratón a las 72 horas de evaluación.

Espinoza (2002), realizó un estudio sobre la bioactividad y toxicidad de las hojas y tallos en extractos acuosos y etanólicos; concluyendo que los extractos acuosos y alcohólicos de las hojas y tallo, son ligeramente tóxicos. La Concentración Letal 50 (CL_{50}) en *Artemia salina* para el caso de la extracción acuosa de las hojas y del tallo fue de 246.93 ppm y 1141.63 ppm respectivamente. La Concentración Letal 50 (CL_{50}) en *Artemia salina* en el caso de la extracción alcohólica de las hojas fue de 1.49 ppm y para el tallo fue de 5.38 ppm. La Dosis Letal 50 (DL_{50}) en ratones albinos para la extracción acuosa de las hojas fue de 1073.89 mg/Kg. y del tallo fue de 1298.32 mg/Kg. En la extracción alcohólica se obtuvo, para el caso de las hojas, una DL_{50} de 612.52 mg/Kg. y para el caso del tallo, una DL_{50} de 877.94 mg/Kg. Estos resultados difieren con los reportados por Rojas.

Aguilar y col. (2003), estudiaron la actividad fibrinolítica de un extracto acuoso liofilizado de las hojas, reportando una actividad fibrinolítica dependiente de la concentración.

Betalleluz (2007), estudió la actividad hipoglicemiante del extracto hidroalcohólico, reportando una actividad hipoglicemiante relacionada a la concentración.

2.3. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares microscópicos pertenecientes a los procariotes de organización muy sencilla. La célula bacteriana consta de un citoplasma que presenta un aspecto viscoso, y en su zona central aparece un nucleoide que contiene la mayor parte del ADN bacteriano.

Las bacterias se clasifican en Gram negativas y Gram positivas según su respuesta a la técnica de tinción Gram. Este procedimiento de tinción diferencial, denominado así por el histólogo Christiam Gram en 1884, quién lo desarrollo en un intento por teñir bacterias en los tejidos infectados. Las células se tiñen primero con cristal violeta y yodo luego se lavan con acetona o alcohol. El último paso decolora a una bacteria Gram negativa, pero no a una bacteria Gram positiva (Madigan y col., 1997; Brooks y col., 2002)

Bacterias Gram negativas. Son aquellas bacterias que no retienen el colorante primario (violeta de genciana o cristal violeta) en el método de coloración de Gram son decolorados por el alcohol y toman el color del colorante de contraste (safranina o fucsina) dando un color rojizo.

Componentes especiales de las paredes celulares Gram negativas

Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas contiene tres componentes que yacen exteriores a la capa de peptidoglucano: lipoproteína, membrana externa y lipopolisacárido (Madigan y col., 1997; Brooks y Col., 2002).

2.3.1. *Escherichia coli*

Es actualmente de gran significancia clínica en el hombre debido a su rol como agente patógeno oportunista, causante de infecciones en sangre, heridas y tracto urinario y enfermedades diarreicas (Brooks y col., 2002; Freeman y col., 1983).

Morfología

Son bacilos Gram negativos cortos. Cuando crecen *en vitro* sobre medios sólidos forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados.

Da reacción positiva para el indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol y produce gas a partir de la glucosa.

Patogenia

Las manifestaciones clínicas de las infecciones con *E.coli* dependen del sitio infectado y por los síntomas y signos no puede diferenciarse de los procesos causados por otras bacterias. Pueden causar septicemias, meningitis y enfermedades diarreicas (Brooks y col. 2002; Freeman y col., 1983).

Tratamiento

No se dispone de terapéutica específica única: sulfonamidas, ampicilina, cefalosporina, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, muestran efecto antibacteriano notable contra *E. coli*, pero es grande la variación en la susceptibilidad y las pruebas de laboratorio para la susceptibilidad a los antibióticos es indispensable. La resistencia a múltiples fármacos es común y está bajo el control de plásmidos transmisibles (Brooks y col. 2002; Freeman y col.1983).

2.3.2. *Salmonella*

Las salmonellas son patógenas para humanos o animales cuando se adquieren por vía oral. Se transmiten a los humanos a partir de animales y productos de

éstos, y causa enteritis, infección sistémica y fiebre entérica. (Brooks y col. 2002; Freeman y col., 1983)

Morfología e identificación

La mayor parte de las especies, están dotadas de motilidad mediante flagelos peritricos. Las salmonelas crecen rápidamente sobre medios simples, casi nunca fermentan lactosa o sacarosa. Forman ácido y a veces gas a partir de glucosa y manosa. Habitualmente producen H₂S. Sobreviven en agua congelada durante periodos prolongados.

Patogenia

Salmonella typhi produce la fiebre tifoidea, las salmonellas ingeridas alcanzan el intestino delgado, desde el cual penetran a los linfáticos y luego al torrente sanguíneo, se transportan por la sangre a muchos órganos, incluso al intestino. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y se excreta en las heces.

Luego de un periodo de incubación de 10 a 14 días, se presenta la fiebre, malestar, cefalea, estreñimiento, bradicardia y mialgia. La fiebre se eleva hasta una meseta máxima, el bazo y el hígado se hipertrofian.

Las principales lesiones son hiperplasia y necrosis del tejido linfoide, hepatitis, necrosis focal del hígado e inflamación de la vesícula biliar, periostio, pulmones y otros órganos (Brooks y col. 2002; Freeman y col. 1983).

Tratamiento

La terapéutica antimicrobiana de la infección invasora por salmonella se lleva a cabo con ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporina de tercera generación y cloranfenicol (Brooks y col. 1999; Litter 1988).

2.3.3. *Shigella*

El hábitat natural de las shigellas se limita al intestino de los humanos y de otros primates, donde produce disentería bacilar.

Morfología e identificación

Shigellas son bacilos Gram negativos delgados, en cultivos jóvenes se presentan formas cocobacilares.

Son anaerobios facultativos, pero crecen mejor en condiciones aerobias, colonias convexas, circulares, transparentes con bordes nítidos (Brooks y col. 2002).

Patogenia y patología

Las infecciones por shigellas casi siempre se limitan al aparato gastrointestinal, la invasión al torrente sanguíneo es poco frecuente.

El proceso patológico indispensable es la invasión de células epiteliales de la mucosa (Células M) por fagocitosis inducida etc. (Brooks y col. 2002; Freeman y col.1983).

Tratamiento

Ciprofloxacino, ampicilina, tetraciclina, trimetoprim – sulfametoxazol y cloranfenicol son comúnmente inhibitorios para la shigellas y pueden suprimir los ataques clínicos agudos de disentería y acortar la duración de los síntomas.

Bacterias Gram positivas. Aquellas bacterias que retienen el colorante primario del método de Gram, resisten la decoloración por el alcohol y no son coloreados por el colorante de contraste reteniendo el color azul púrpura inicial.

Componentes especiales de las paredes celulares Gram positivas.

Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas contiene tres componentes que yacen exteriores a la capa de peptidoglucano: lipoproteína, membrana externa y lipopolisacárido (Brooks y col. 2002; Freeman y col.1983; Marigan 1997).

2.3.4. *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus

Son células esféricas Gram positivas, habitualmente dispuestas en racimos irregulares parecidos a racimos de uvas. Son metabólicamente activos, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo intenso.

El género *Staphylococcus* contiene al menos 30 especies. *Staphylococcus aureus* es un patógeno importante para los humanos (Brooks y col. 2002; Freeman y col.1983).

Morfología e identificación

Los estafilococos son células esféricas de casi 1 μm de diámetro dispuestas en grupos irregulares. Están desprovistos de motilidad y no forman esporas. Viven de manera libre en el ambiente.

Cultivo

Los estafilococos crecen con facilidad en condiciones aerobias o microaerofilicas, crecen con mayor rapidez a 37 °C. Las colonias son redondas, lisas de color gris o amarillo (Brooks y col. 2002; Freeman y col.1983).

Características del crecimiento

Los estafilococos producen catalasa, que los diferencia de los estreptococos, fermentan muchos carbohidratos lentamente y producen ácido láctico pero no gas. Son relativamente resistentes a la desecación al calor (resisten 50 °C durante 30 minutos) y al cloruro de sodio al 9%.

Patogenia

La capacidad patógena del *S. aureus* es un efecto combinado de factores extracelulares y toxinas aunado a las propiedades invasoras de la cepa. Intoxicación alimentaria por estafilococos, atribuible únicamente a la ingestión de

enterotoxinas preformadas. Bacteremia estafilocócica y los abscesos diseminados en todos los órganos.

Patología

El prototipo de una lesión estafilocócica es el furúnculo y otros abscesos localizados. *S. aureus* puede causar neumonía, meningitis, empiema, endocarditis o septicemia con supuración de cualquier órgano.

Los efectos sistémicos de una infección por *S. aureus* se deben generalmente a la acción de las toxinas producidas por los microorganismos. Éstos pueden ser liberados por células vivas como exotoxinas (Brooks y col. 2002; Freeman y col. 1983).

Tratamiento

Los abscesos y otras lesiones supurantes cerradas se tratan mediante drenaje y terapéutica antimicrobiana. Muchos antimicrobianos muestran cierto efecto *in vitro* contra los estafilococos, sin embargo es difícil erradicar los estafilococos patógenos de las personas infectadas, debido a que el microorganismo desarrolla con rapidez resistencia a muchos fármacos antimicrobianos y dichos fármacos no pueden actuar en la porción central necrosada de una lesión supurante. También es difícil erradicar *S. aureus* de los portadores.

Bacteriemia, endocarditis, neumonía y otras infecciones graves causadas por *S. aureus* requieren de terapéutica intravenosa prolongada con penicilina resistente a β -lactamasa. La vancomicina con frecuencia se reserva para su empleo contra los estafilococos resistentes a la nafcilina. Las infecciones producida por *S. aureus* no productor de β – lactamasa, el fármaco preferido es la penicilina G.

Debido a la frecuencia de cepas resistentes a fármacos, todo estafilococo aislado de una infección significativa debe someterse a pruebas de sensibilidad

antimicrobiana para ayudar a seleccionar los fármacos para empleo sistémico (Brooks y col. 2002; Flores 1998).

2.3.5. Estreptococcus

Los estreptococos son bacterias esféricas Gram positivas que por lo general forman pares de cadena durante su crecimiento. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza, algunos son miembros de la flora humana normal; otros se vinculan con enfermedades humanas importantes atribuibles en parte a infección por estreptococos y en parte a sensibilización a ellos.

Streptococcus pyogenes

Es el principal patógeno humano vinculado con invasión local o sistémica y con trastornos inmunitarios después de infección con estreptococos. Contiene el antígeno del grupo A, son β hemolíticos (Brooks y col. 2002; Flores 1998).

Patología

La puerta de ingreso determina el cuadro clínico principal. Sin embargo, en cada caso existe una infección difusa propagada con rapidez que afecta los tejidos, se propaga por el trayecto de las vías linfáticas con supuración local mínima. Desde los linfáticos la infección puede extenderse a la corriente sanguínea.

- ✓ Erisipela: Si la puerta de entrada es la piel.
- ✓ Fiebre puerperal: Si después del parto penetran estreptococos al útero se desarrolla la fiebre puerperal.
- ✓ Septicemia: La infección con estreptococos de heridas traumáticas o quirúrgicas causa septicemia o fiebre escarlatina quirúrgica.
- ✓ Faringitis estreptocócica: La infección más común causada por los estreptococos hemolíticos β . Los estreptococos se adhieren al epitelio faríngeo por medio de pelos de ácido lipoteicoico que cubre su superficie.
- ✓ Hypoderma estreptocócico: La infección local de las capas superficiales de la piel, sobre todo en los niños se denomina impétigo.

Endocarditis aguda: Las bacterias pueden asentarse sobre las válvulas cardiacas, causando endocarditis aguda, la destrucción rápida de las válvulas casi siempre produce insuficiente cardiaca mortal.

Otras infecciones: Glomerulonefritis, fiebre reumática (Brooks y col. 2002; Freeman y col. 1983).

Tratamiento

Todos los estreptococos son sensibles a la penicilina G y la mayor parte también responde a la eritromicina. Algunos son resistentes a las tetraciclinas (Brooks y col. 2002; Flores 1998; Litter 1988).

2.3.6. *Bacillus*

El género bacillus, son bacilos aerobios grandes Gram positivas formadoras de esporas, son organismos saprofitos prevalentes en el suelo, agua, aire y sobre los vegetales como *Bacillus cereus*.

El *Bacillus cereus* puede desarrollarse en los alimentos y producir una enterotoxina o una toxina emética y causar intoxicaciones alimentarias (Brooks 2002; Koneman 1995; Frazier y Col 1978).

Morfología

Las células típicas, miden 1x3 a 4 μm , poseen extremos cuadrados y se disponen en largas cadenas; las esporas se localizan en el centro del bacilo desprovisto de motilidad.

Patología

Bacillus cereus produce toxinas que causan enfermedad; ésta es más bien una intoxicación que una infección de origen alimentario. La variante emética se manifiesta por náusea, vómito, cólicos abdominales y en ocasiones diarreas.

En ocasiones estos microorganismos producen enfermedades en humanos inmunodeficientes (por ejemplo, meningitis, endocarditis, conjuntivitis o gastroenteritis aguda) (Brooks y col. 2002; Freeman y col. 1983).

Tratamiento

Se puede usar la penicilina, tetraciclina, eritromicina o clindamicinas son eficaces (Brooks y col. 2002; Flores1998).

2.3.7. Hongos

Son organismos eucariotes y cada célula fúngica posee al menos un núcleo y membrana nuclear, retículo endoplasmático, mitocondrias y aparato secretor. La mayor parte de hongos son aerobios obligados o facultativos, son quimiotróficos, secretores de enzimas que descomponen gran variedad de sustratos orgánicos para dar nutrientes solubles que después se absorben pasivamente o son captados por la célula mediante transporte activo (Brooks y col. 2002; Capella 1971).

Clasificación

Los hongos crecen en dos formas básicas: Levaduras y Mohos.

Candida albicans

Son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas y del aparato gastrointestinal.

Morfología

Es un hongo pequeño de tipo levaduriforme, que se reproduce por gemación de 3 a 6 μm de tamaño. Desarrolla pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento sin desprenderse. La candida crecen colonias de color cremoso con olor a levadura.

Patología

La candidiasis superficial (cutánea o mucosa) se establece a consecuencia de un incremento en la población local de *candida albicans* y del daño a la piel o el epitelio que permite la invasión local por la levadura y las *Pseudohifas*.

La candidiasis sistémica se presenta cuando la candida penetra al torrente sanguíneo (Ejm. artritis, meningitis, etc) (Brooks y col. 2002).

Tratamiento

Las variedades mucó cutáneas de candidiasis en general se tratan con: nistatina, violeta de genciana, ketoconazol o fluconazol tópicos.

La candidiasis sistémica se trata con anfotericina B. a veces junto con flucitosina por vía oral.

2.4 Controles utilizados

2.4.1 Ceftriaxona

La ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación de uso parenteral, muestra gran actividad frente a gérmenes Gram negativos, penetra a través de la barrera hematoencefálica, lo que le hace útil en el tratamiento de la meningitis.

Mecanismo de acción ceftriaxona, como todos los antibióticos beta-lactámicos es bactericida, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana al unirse específicamente en las proteínas llamadas "proteínas ligandos de la penicilina (PBPs)" que se localizan en dicha pared. Las PBPs son responsables de varios de los pasos en la síntesis de la pared bacteriana., con lo que la bacteria pierde su capacidad para formar la pared, siendo el resultado final la lisis de la bacteria (Litter 1988; Flores 1998).

Farmacocinética ceftriaxona se administra parenteralmente debido a que no se absorbe por vía digestiva. Después de una dosis intramuscular, las máximas concentraciones séricas tienen lugar entre 1 y 4 horas. La unión del antibiótico a las proteínas del plasma es del orden del 58 a 96%. Ceftriaxona se distribuye ampliamente en la mayor parte de los órganos, tejidos y fluidos, incluyendo la vesícula biliar, el hígado, los riñones, los huesos, útero, ovarios, bilis y los fluidos pleural y sinovial. La duración de las concentraciones plasmáticas eficaces es considerable: así, por ejemplo, después de la dosis intramuscular de 50 mg/kg se obtienen en el oído medio concentraciones de 35 a 20 µg/ml que se mantienen hasta 48 horas.

Aproximadamente el 35-65% del fármaco se elimina en la orina, principalmente por filtración glomerular. El resto, se elimina a través de la bilis, por vía fecal. Una pequeña cantidad de ceftriaxona es metabolizada en los intestinos ocasionando un metabolito inactivo antes de ser eliminada. En los pacientes con la función renal normal, la eliminación es de 5.5 a 11 horas aumentando hasta las 12-18 horas en los pacientes con enfermedad renal terminal. Sin embargo, debido a la eliminación biliar relativamente extensa, no son necesarios reajustes de las dosis en estos pacientes (Flores1998; Litter 1988).

2.4.2 Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico semi sintético derivado de la penicilina. Se trata de una amino penicilina. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram positivos como Gram-negativos. La amoxicilina fue aprobada por primera vez en 1987.

A pesar de su amplio espectro, no es estable frente a β lactamasas, por lo que no debe usarse frente a infecciones por gérmenes productores de las mismas (Flores 1998; Litter 1988).

Indicaciones

Amoxicilina está indicada en el tratamiento de infecciones sistémicas o localizadas causadas por microorganismos Gram positivos y Gram negativos sensibles, en el aparato respiratorio, tracto gastrointestinal o genitourinario, de piel y tejidos blandos, neurológicas y odonto estomatológicas.

2.4.3 Nistatina

Nistatina es un antimicótico obtenido a partir de *Streptomyces noursei*, posee propiedades fungistáticas y fungicidas *in vitro* frente a una amplia variedad de levaduras y hongos relacionados.

Mecanismo de Acción

Actúa uniéndose a los esteroides de la membrana celular de las especies sensibles de *Candida* (*Candida albicans* y otras especies), y formando canales iónicos en las mismas provocando cambios en la permeabilidad de membrana y la consiguiente salida de los elementos intracelulares (Flores1998; Litter 1988).

Propiedades farmacocinéticas

La absorción gastrointestinal de nistatina es mínima, por eso su acción es esencialmente local. La mayor parte de la dosis de nistatina administrada por vía oral se elimina inalterada en las deposiciones (Flores1998; Litter 1988).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El presente trabajo fue ejecutado en las instalaciones del Laboratorio de Referencia Regional de la Dirección Regional de Salud Ayacucho, Área de Bacteriología, durante los meses diciembre de 2008 a mayo de 2009.

3.2 Población

Todas las plantas de *Oenothera rosea* "yawar sogo" que crecen en la localidad de Muyurina, distrito de Jesús Nazareno, provincia de Huamanga, departamento Ayacucho, ubicado a 2670 m.s.n.m.

3.3. Muestra

1,0 Kg de hojas frescas de *Oenothera rosea*, que fueron recolectada al alzar y que no mostraban ningún daño mecánico ni biológico en el mes de diciembre del 2009, plantas que han alcanzado un buen desarrollo biológico, fueron transportadas en bolsas de papel al Laboratorio de Referencia Regional.

Para el tratamiento inicial de la muestra se siguió los siguientes pasos:

- Se seleccionaron las hojas en buenas condiciones.
- Se lavaron con abundante agua para eliminar los componentes de contaminación.

3.3.1 Deseccación y estabilización

Las hojas de la especie vegetal en estudio fueron sometidos a un tratamiento de limpieza y selección para eliminar todo elemento extraño. Luego fueron desecados a la sombra extendiéndose apropiadamente durante tres semanas y posteriormente se prosiguió con la estabilización en estufa a 40 °C, por cuatro horas (Lock de Ugaz 1994).

3.3.2 Molienda

Las hojas fueron sometidos a molienda, utilizando un mortero de porcelana, obteniéndose un polvo menudo, seco y se pasó a través de un tamiz de 0.6 mm. Se obtuvo 200 g. de muestra y se guardó en un frasco color ámbar (Lock de Ugaz 1994; Miranda 1996).

3.3.3 Obtención del Extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “yawar soqo”.

Se tomó 200 g. de muestra pulverizada y se colocó en frasco y luego se añadió alcohol al 80% (500 mL), se dejó a temperatura ambiente por 07 días, con agitaciones permanentes (sometido a una extracción por maceración).

Transcurrido el tiempo se filtró utilizando papel filtro (Watman N° 02) desechando el residuo. El filtrado se concentró, evaporando el disolvente a 40 °C en estufa, por espacio de 05 días. Es esta forma se obtuvo el extracto hidroalcohólico seco (Cáceres 1996).

3.3.4 Preparación de la solución madre del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea*.

- Se pesó 10 gramos del extracto seco de *Oenothera rosea*, luego se colocó en una fiola de 100 mL, añadiéndole como diluyente agua bidestilada estéril hasta el enrase respectivo obteniéndose una solución al 100 mg/ml.

- A partir de esta solución se prepararon las siguientes concentraciones de 3,0; 1,5 y 0,75 mg/ml.

3.4 Cepas bacterianas

Se utilizaron:

- *E. coli* ATCC 25922 del Instituto Nacional de Salud Pública - Lima
- *Salmonela typhi* – Laboratorio de Microbiología de Hospital Regional de Ayacucho
- *Shigella sp.* – Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional de Ayacucho.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, del Instituto Nacional de Salud - Lima.
- *Bacillus cereus* ATCC 11778, del Instituto Nacional de Salud - Lima.
- *Streptococcus pyogenes* .– Instituto Nacional de Salud - Lima
- *Candida albicans* – Instituto Nacional de Salud – Lima.

3.5 Control Positivo

- Disco de sensibilidad de Ceftriaxona 30 µg. (Marca sensi disco), para bacterias Gram negativas.
- Disco de sensibilidad de Amoxicilina 25µg. (Marca sensi disco), para bacterias Gram positivas.
- Nistatina en jarabe 100.000UI/mL (Bristol-Mayer Squibb), para la levadura *Candida albicans*.

3.6 Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar sogo”.

Mediante el uso de la técnica de difusión, esta técnica fue estandarizada y es actualmente recomendada por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer

en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre las cepas bacterianas (Ramírez y Darwin 2009).

3.6.1 Activación de las cepas.

Se procedió a activar las cepas sembrando una azada de cada microorganismo en placas de Petri conteniendo Agar Trypticase Soya (TSA), para el caso de *Streptococcus pyogenes* se le adicionó sangre humana al 5% y para *Candida albicans* se utilizó Agar Sabouroud. Se incubaron a 37 °C por 24 horas (Sacsquispe 2002).

3.6.2 Preparación del Inóculo.

Método Directo de inoculación a partir de colonias aisladas.

De una placa de cultivo con agar no selectivo e incubada por 18 a 24 horas, se seleccionaron colonias aisladas y se preparó una suspensión directa en solución salina. La suspensión fue inmediatamente ajustada con el tubo Nº 0,5 de la escala de Mc. Farland (Sacsquispe 2002).

3.6.3 Prueba de sensibilidad.

- Se utilizó el agar Mueller Hinton preparado en placas con un grosor de 4 mm.
- Se rotuló el nombre del microorganismo de prueba.
- Seguidamente se procedió a realizar 04 excavaciones equidistantes en el Agar Mueller Hinton con punch de 06 mm de diámetro. Realizándose tres repeticiones.

3.6.4 Inoculación de las placas.

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió el hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Luego se inoculó sobre la superficie seca de la placa de agar Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar

los extractos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido (Sacsquispe 2002).

3.6.5 Inoculación del extracto.

- Se depositó en los pocillos 30 µl de las diferentes concentraciones (3,0; 1,5; 0,75 mg.) del extracto hidroalcohólico con ayuda de una micropipeta.
- Con ayuda de una pinza se colocó el disco de sensibilidad en el centro de la placa, como control positivo. Control negativo se colocará 30 µl agua bidestilada estéril.
- Se incubó las placas a 35 °C por 24 y 48 horas.

3.6.6 Lectura de las placas e interpretación de los resultados.

La evaluación de los resultados mediante la lectura en mm (usando regla milimetrada) del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de todo microorganismo (incluyendo el diámetro del punch), (Martínez y col.2000).

Los diámetros de inhibición fueron interpretados. Halo de inhibición actividad antimicrobiana, sin halo de inhibición sin actividad antimicrobiana. (Cáceres 1996).

3.7 Cálculo del porcentaje de inhibición.

Aplicando la siguiente formula (Villanova 1991).

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro del halo control}} \times 100$$

3.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.):

Es una técnica cuantitativa para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, basado en los métodos de dilución y crecimiento.

Es definida como la menor concentración del extracto que inhibe el desarrollo *in vitro* de las bacterias ensayadas (Marigan y col.1997); (Díaz y col. 2002).

Procedimiento de la CMI

- A partir de la solución madre de la solución hidroalcohólica de *Oenothera rosea* "yawar soqo", se prepararon diluciones sucesivas utilizando agar Mueller Hinton.
- Cada tubo se trasvasó en placas Petri estériles.
- Se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente.
- Se sembró el inóculo microbiano estandarizado con tubo Nº 0,5 de la escala de Mc Farland, con una micropipeta se puso 2 µl. Se dejó en reposo 30 minutos.
- Se incubó a 37 °C por 24 y 48 horas.
- Se realizó la lectura teniendo en cuenta el crecimiento del microorganismo.
- Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria. Modificado por Romero y col. citando a Cowan (1982).

3.8 Análisis de Datos.

Con los datos obtenidos de halo de inhibición y el porcentaje de inhibición se hallaron los promedios, la desviación standard. Con las cepas que fueron sensibles, los datos se procedió a determinar el análisis de varianza y la prueba de Tukey con un 95 % de confianza.

IV. RESULTADOS

Cuadro N° 01: Promedios de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a bacterias Gram negativa, Gram positiva y *Candida albicans*. Ayacucho - 2009.

Cepas	Extractos (mg)		
	3,00.	1,50.	0,75.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0
<i>Salmonella Typhi</i>	0	0	0
<i>Shigella sp.</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 25923	17,7	14,3	11,3
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	16,3	14,0	11,7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	9,7	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	0

Cuadro N° 02: Promedio del porcentaje de Inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar soqo”, frente a bacterias Gram negativo, Gram positivo y *Candida albicans*. Ayacucho - 2009.

Cepas	Extracto (mg)		
	3,00	1,50	0,75
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	0
<i>Shigella sp.</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	61,6	50,0	39,5
<i>Bacillus cereus</i>	69,0	59,2	49,4
<i>Streptococcus pyogenes</i>	39,2	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	0

Cuadro N° 03: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", para *Staphylococcus aureus*.
Ayacucho - 2009.

Concentración mg	<i>Tiempo (horas)</i>	
	24	48
0,700	-	-
0,600 CMI	-	+
0,500	+	+
0,400	+	+
0,300	+	+

No hubo desarrollo : (-).

Hubo desarrollo: (+).

Cuadro N° 04: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", para *Bacillus cereus*. Ayacucho - 2009.

Concentración mg	Tiempo (horas)	
	24	48
0,700 CMI	-	+
0,600	+	+
0,500	+	+
0,400	+	+
0,300	+	+

No hubo desarrollo: (-).

Hubo desarrollo: (+).

Cuadro N° 05: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", para *Streptococcus pyogenes*. Ayacucho - 2009.

Concentración mg	Tiempo (horas)	
	24	48
3,00	-	-
2,00 CMI	-	+
1,00	+	+
0,50	+	+
0,4	+	+

No hubo desarrollo: (-).

Hubo desarrollo: (+).

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo, es una contribución al conocimiento científico de la medicina tradicional, en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de las diversas patologías causadas por bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos.

En el cuadro Nº 1 se muestran los valores promedios de los halos de inhibición a tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a bacterias Gram negativa, Gram positiva y *Candida albicans*, en el que se aprecia, frente a las bacterias Gram negativas: como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* y *shiguella sp.* no presentaron halo de inhibición.

Frente a las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *bacillus cereus* y *Streptococcus pyogenes*, si presentaron halos de inhibición. Evidenciándose para el *Staphylococcus aureus* un halo de inhibición de 17,7 mm para la concentración de 3,0 mg., disminuyendo de acuerdo a la concentración.

Staphylococcus aureus, constituye la especie bacteriana de mayor importancia clínica humana dentro de su género, aunque esta bacteria en ocasiones puede estar presente en la micro biota normal como comensal, en otros casos puede ser agente etiológico de enfermedades infecciosas muy severas y diversas que inclusive puede conducir a procesos fatales. Es un agente poderoso y temerario

en el campo de la salud humana sobre todo en las infecciones hospitalarias, por lo que requiere de una terapéutica acertada para su tratamiento. (Rojas, 2001).

Ninguna bacteria patógena humana es tan versátil ni ha desarrollado tantos mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos como *Staphylococcus aureus*, esta resistencia constituye un problema de grandes implicancias clínicas, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos fármacos casi siempre más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones, además ha obligado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico a muchas drogas que inicialmente fueron útiles. (Noble, 1997).

Las plantas sintetizan y almacenan en el curso de su crecimiento varios compuestos denominados metabolitos secundarios, los cuales le sirven como mecanismo de defensa contra los microorganismos, insectos y animales herbívoros, algunos les proporcionan características organolépticas, como el olor (terpenoides), color (quinonas y taninos) y el sabor, mientras otros poseen una actividad farmacológica. (Cowan, 1999).

Carson y col., (2002), mencionan que el mecanismo de acción de los compuestos de origen vegetal frente al *Staphylococcus aureus* parecen alterar la membrana citoplasmática.

Por otro lado el efecto inhibitorio que presentaron las cepas bacterianas Gram positivas, es debido a la estructura y constitución de la pared celular. Domínguez (1973) y Brooks y col. (2002).

Según Calvo (2006), los mecanismo exactos de acción de muchos extractos naturales no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente, deben su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a las que se somete a la membrana celular de los microorganismos que determinan que pierda su control integral.

No existen trabajos de investigación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" buscando el efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, que nos permita comparar nuestros resultados, sin embargo existen trabajos de otras plantas que utilizaron al *Staphylococcus aureus* como microorganismo de ensayo, entre las que mencionaremos: Martínez y col., (2000), en el estudio realizado sobre la Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius raddi* "copal", encontró un halo de inhibición de 16,6 mm para una concentración de 5% y de 16,2 mm para 1% frente a *Staphylococcus aureus*. Ramirez y col., (2007), en el estudio de la actividad antibacteriana de extractos y fracciones de Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*) halló un 68% de porcentaje de inhibición para una concentración de 100 µg/ml para *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos fueron de 61,1 % para una concentración de 3,0 mg.

En cuanto a trabajos a nivel local cabe mencionar el trabajo de Romero y col., (2009), Ensayo pre clínico de *Dactylopius coccus costa* "Cochinilla" frente a bacterias Gram positivas de referencia y aisladas de pacientes con infecciones respiratorias aguda, reportaron para una concentración de 200 mg, un halo de inhibición de 13,0 y 13,1 frente a *Staphylococcus aureus* para las cepas de referencia y aisladas respectivamente; para *Streptococcus pyogenes* 15,0 mm. a la concentración de 200 mg.

El extracto frente a *Bacillus cereus*, presentó un halo de inhibición de 16,3 mm, a la concentración de 3 mg.

Esta especie bacteriana es responsable de intoxicaciones alimentarias y en ocasiones puede producir: gastroenteritis aguda, endocarditis, meningitis y conjuntivitis.

Murphy (1999), señala que los compuestos derivados de plantas que poseen actividad antimicrobiana son los fenoles y polifenoles dentro de los cuales se

encuentran: quinonas, flavonas, flavonoides taninos y cumarinas. Entre otros están los terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lecitinas y polipéptidos.

Los sitios de grupos hidroxilos en el grupo fenol se cree que está relacionado la toxicidad contra los microorganismos con la evidencia de que incrementa la hidroxilación aumenta su toxicidad. El mecanismo de acción, se cree que produce una inhibición enzimática o una interacción inespecífica con las proteínas. (Cowan, 1999).

El mecanismo de acción de los flavonoides es debido a su habilidad para formar complejos con las proteínas solubles extracelulares y con la pared de las células bacterianas. Los flavonoides lipofílicos podrían también desbaratar las membranas microbianas, los isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. (Cowan, 1999).

En los taninos la actividad antimicrobiana se debe a la interacción sobre las proteínas de la pared celular y a su capacidad de unirse a los polisacáridos.

En los terpenoides, el mecanismo de acción se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. (Cowan, 1999).

Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de plantas. A su vez la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud.

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales han revelado el potencial de las plantas superiores como fuentes de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica. Ramírez y col., (2007).

Dentro del grupo de bacterias Gram positivas cabe destacar que frente a *Streptococcus pyogenes*, se produjo un halo de menor tamaño 9,7 mm a la concentración de 3,0 mg.

Los *Streptococcus* son patógenos importantes para los humanos, que pueden ser aislados del tracto respiratorio superior del adulto sano y se convierten en patógeno cuando el sistema inmunológico del hospedero está bajo causando infecciones estreptocócicas agudas. (Brooks y col., 2002).

La experiencia médica ha mostrado que muchas de las cepas aisladas muestran alta resistencia a uno o varios antimicrobianos utilizados normalmente, como la penicilina (metecilina o cloxacilina). (Fukuda y col., 1996).

Palomino (2000), señala que la existencia de un halo de inhibición aunque sea pequeño, cuando se trabaja con material vegetal determina cierta actividad antibacteriana, que pueda ser mejorada con el uso de nuevas técnicas de extracción a fin de conseguir mayor concentración de principios activos y obtener mejores resultados.

Los resultados obtenidos, están de acuerdo con muchas investigaciones, donde se demuestra que las bacterias Gram positivas son más sensibles que los Gram negativos. (Ramírez y Darwin, 2007).

Así mismo Lock de Ugaz (1994), refiere que los flavonoides poseen mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas que con las Gram negativas. Los flavonoides presentan actividad antibacteriana por la presencia de hidroxilos en los anillos, inhibiendo la síntesis de ADN.

Frente a las bacterias Gram negativas utilizadas en el presente trabajo no presentaron efecto inhibitorio. Esta inactividad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", puede deberse al tipo de extracto y concentración de sólidos totales. Martínez y col. (1997).

No existen trabajos de investigación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" buscando el efecto antibacteriano sobre bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella sp*), que nos permitiera comparar nuestros resultados sin embargo existen, trabajos de extracto de otras plantas que utilizaron a bacterias Gram negativas, entre los trabajos realizados mencionados tenemos a Rangel y col., (2001) en el trabajo: Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* extracto puro y a dilución 1:10 no hubo halo de inhibición en ninguna de las concentraciones pero si para *Staphylococcus aureus* fue de 16,0 mm y 14,0 mm respectivamente.

A nivel local el trabajo de Samanez (2006) en el estudio realizado para determinar la sensibilidad de bacterias entero patógenas frente a extractos de *Solanun radicans* "nuschku", para el extracto alcohólico a una concentración de 500 mg halló un halo de 12,6 mm y un porcentaje de inhibición de 58,88; para *E.coli*, de 18,3 mm y 76,88% ;para *Salmonella paratyphi* de 14,3 mm y 81,89% para *Shiguella sonnei*, la diferencia frente a nuestro trabajo es que utilizaron concentraciones mayores (500 mg.).

Frente a la levadura *Candida albicans*, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" tampoco presentó actividad antifungico.

En el Cuadro N° 2 se presenta el promedio del Porcentaje de Inhibición frente a las bacterias Gram positivas, teniendo en consideración para el cálculo respectivo la lectura del control positivo. La cepa en la que se presentó mayor porcentaje de inhibición fue *Bacillus cereus* con 69,0%, seguido de *Staphylococcus aureus* con 61,8% y finalmente *Streptococcus pyogenes* con 39,2%.

El porcentaje de inhibición fue disminuyendo de acuerdo a la concentración y el caso de la cepa de *Streptococcus pyogenes* solo presentó porcentaje de inhibición a la concentración de 3,0 mg.

Estos resultados sugieren una buena fuente de potenciales como antimicrobianos frente a bacterias Gram positivas. Los flavonoides, taninos, y triterpenoides, posiblemente son los responsables de la actividad antimicrobiana.

En el Cuadro N° 3, se presenta la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a la cepa *Staphilococcus aureus*, realizado mediante el método de dilución en medio Mueller Hinton, fue de 0,600 mg. (Anexo N°18).

La Concentración Mínima Inhibitoria da mayor precisión para detectar la concentración de los extractos. Donde no se observó crecimiento bacteriano fue tomada como la concentración mínima inhibitoria. (Ramirez y col., 2007).

En el Cuadro N° 4, se presenta la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Bacillus cereus*, siendo 0,700 mg. (Anexo N°19).

En el cuadro N° 5, se presenta la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Streptococcus pyogenes*, encontrando un valor de 2,0 mg. (Anexo N° 20).

Esta bioactividad puede ser debido a la presencia de los flavonoides y taninos, su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares de la pared celular de forma similar que las catequizas. (Domingo y López, 2003).

Lock de Ugaz, (1994), refiere que los taninos forman precipitados con las sales metálicas, y proteínas, especialmente con este último, que lo transforma en sustancias insolubles y resistentes produciendo la muerte de los microorganismos.

Al efectuar el análisis de varianza considerando solo a las bacterias sensibles Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Streptococcus pyogenes*) para comparar el efecto de los tratamientos (tres concentraciones del extracto, el blanco y el control positivo), los que se muestran en las tablas N° 08, 10 y 12 (Anexo), se halló la existencia de significancia estadística, lo que quiere decir que por lo menos uno de los tratamientos tiene efecto diferente.

Para *Staphylococcus aureus*, al efectuar el test de Tukey (Tabla N°9 de Anexo) se observó que el mayor efecto tuvo fue el control con 28,67 mm. de halo de inhibición, mientras que el menor efecto lo mostró el blanco. Para el caso de las tres concentraciones del extracto se observa que a mayor concentración mayor es el efecto inhibitorio mostrando valores de 11,3; 14,3; 17,7 para las concentraciones de 0,75; 1,5 y 3,0 mg. respectivamente.

Para *Bacillus cereus*, el test de Tukey (Tabla N°11, Anexo), muestra resultados similares al anteriormente descrito, mayor efecto en el control positivo, menor efecto control negativo; y en relación con las tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo", mayor efecto inhibitorio a medida que la concentración se incrementa.

Para *Streptococcus pyogenes*, el test de Turkey (Tabla N° 13 del Anexo), muestra efecto inhibitorio solo para el control con 24,7 mm. y en el extracto de mayor concentración (3,0 mg.) con 9,7 mm siendo el primero de los mencionados el que mayor efecto inhibitorio tuvo.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y considerando los objetivos planteados, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a las bacterias Gram positivas presentó actividad antimicrobiana, presentando un halo de inhibición de 17,7 para *Staphylococcus aureus*, 16,3 para *Bacillus cereus* y 9,7 para *Streptococcus pyogenes*; frente a las Gram negativas: *Eschericia coli*, *Salmonella typhi* y *Shiguella Sp.* En ninguna de las concentraciones trabajadas, al igual que a la levadura *Candida albicans*, no presentó actividad antimicrobiana.
2. El porcentaje de inhibición de las bacterias Gram positivas, para el *Bacillus cereus* fue 69,0%, para *Staphylococcus aureus* 61,8% y para el *Streptococcus pyogenes* fue 39,2%, con referencia al control positivo.
3. En cuanto a la Concentración Mínima Inhibitoria para *Bacillus cereus* es de 0,70 mg/ml, para *Staphylococcus aureus* es de 0,60 mg/ml., y para el *Streptococcus pyogenes* fue de 2,0 mg.
4. El fármaco estándar presenta una mayor actividad antimicrobiana en comparación al extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo".

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con estudios de actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo" a concentraciones mayores a las utilizadas en el presente trabajo e incluir otras bacterias Gram negativa de interés clínico aislada de pacientes.
2. Utilizar otros solventes, para obtener otros principios activos que podrían tener actividad antimicrobiana.
3. Dado que *Staphylococcus aureus* es un microorganismo de alta morbilidad, creemos que debemos estudiar a profundidad, para aislar el principio activos puros para la evaluación antimicrobiana y posterior formulación farmacéutica.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **Aguilar, E.; Anaya, B. y Diez, J.** (2000). Efecto antioxidante de extractos de *Oenothera rosea* "yawar soqo". Ayacucho. Resumen del Primer Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia. FITO 2000. Lima – Perú.
2. **Aguilar, E.; Anaya, B. y Diez, J.** (2003), Fibrinógeno en obesos e hipertensos y Actividad fibrinolítica de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo". Informe del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de san Cristóbal de Huamanga.
3. **Aguilar, E.** (2004). Etnobotánica, Química y Farmacología de *Oenothera rosea* "chupa Sangre". Monografía del Curso de Post-Grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
4. **Ali-Shyayet, M.; Yaghmour, R.; Faidi, Y; Salem, K.** (1998) Antimicrobial Activity of 2^o Plants Used Infolkloric Medicine Inthe Palestinian Area of Etnopharmacol 60: 265 – 271.
5. **Alzamora, N.; Soto, V.;** (2001) Medicina tradicional en el Perú "Actividad Antibacteriana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas" Segunda edición, Anales de la Facultad de Medicina UNMSM. VOL.62 Lima.
6. **Aricada, D.** (2009) Actividad Antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas Bacteriología. Bogotá.
7. **Averett, J.; Huang, S.** (1998). Flavonoid survey of *Oenothera* (Onagraceae): Gaurosis, Hartmannia, Kneffia, Paradoxus, and xylopleurum. University Missouri Department Biology. (Napraler) U. S.
8. **Baker, F.** (1976). Manual de técnicas bacteriológicas. Segunda Edición. Editorial Acribia. Barcelona España.

9. **Betalalleluz, A** (2007). Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo". Tesis de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. UNSCH; Ayacucho – Perú.
10. **Brooks, G.; Batel, J.; Morse, S.** (2002). "Microbiología Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg". Diecisiete Edición. Editorial El Manual Moderno. México.
11. **Cáceres, A.** (1996) "Plantas de uso medicinal en Guatemala" Quinta Edición, Editorial Universitaria. Universidad San Carlos de Guatemala.
12. **Cáceres, A.; Cano, O.** (1990) Plants Used In Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders Enterobacteria. JU. Ethnopharmacol 30: 55 – 77.
13. **Calvo, M; Angulo, E; Costa-Batlloiri, P; Shiva,C.**(2006). Natural Plant Extracts and Organic Acids; Synergism and Implication on Piglet s Intestinal Microbiota Biotechnology. 5 (2): 137 –142. España.
14. **Carson, C.; Mee, M.; Riley, T.** (2002) Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia oil on Staphylococcus aureus Determined by time – kill,lysis, leakage and sal tolerance assays and electron microscopy Antimicrob Agents Chemother, 46: 1914–1920.
15. **Carhuallanqui, R.** 2003) "Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso de hojas de *Juglans neotropica Diels* (nogal).Escuela de Formación Profesional de Farmacia Y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH. Ayacucho - Perú.
16. **Cowan, M.** (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents Clinical Microbiol Gic. Rev. 12 (4):564- 82.
17. **Cowan, S. & Steels, T.;** (1982) "Manual de la identificación de bacterias de Importancia medica". Segunda Edición. Editorial continental S.A. De C.V México.
18. **Díaz, R.; Gamazo, C.; López-Goñi, I.** (2002) Manual de Práctica de microbiología. Segunda Edición. Editorial Masson. Barcelona – España. Pg (51-58).

19. **Domínguez, X.** (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Edición Limusa. México.
20. **Domingo, D y López, M.** (2003) Plantas de acción antibacteriana. Prous Science, S.A. Sociedad Española de Quimioterapia. Madrid.
21. **Eguizabal, M.** (2005). Actividad Antibacteriana *In vitro* del extracto etanólico de Propoleo Peruano sobre *Streptococcus mutani* y *Lactobacillus casei*. Lima – Perú.
22. **Espinoza, I.** (2001). Toxicidad del tallo y hojas de *Oenothera rosea* “yawar soq” Tesis de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. UNSCH. Ayacucho – Perú.
23. **Flores, J.** (1998). Compendio de la Farmacología Humana. Décimo tercera Edición Mosby-Doyma libros S.A. Barcelona España.
24. **Freeman, R.; Merigo, J. y Montiel, F.** (1983). Tratado de Microbiología de Burrws 21ª Edición. Editorial Interamericana.
25. **Fukuda, J.; Echevarria, J.; LLanis, F.; Yi, A.; Palomino, S.; Gotuzzo, E.; Carrillo, C.** (1996) *Streptococcus pneumoniae* resistentes a Penicilina en Lima – Perú. Rev Med Hered 1996; 7(1): 11-1. En URL: C:\Documents and Settings\escuela de biología\Escritorio\Streptococcus pneumoniae resistentes a Penicilina en Lima – Perú.htm.
26. **Goldman, P.** (2001) Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. Ann. Inter. Med 16:135.
27. **Huapaya, J.; Flores, M.; Larrea, H.** (2001). Control Microbiológico y Evaluación de la Actividad Antibacteriana *In vitro* de *Croton lechleri* “Sangre de grado”. Artículo publicado en la Rev. AguaTIC N°14, julio. Lima.
28. **Hurtado y Rodríguez.** (2000). Estudio de la flora medicinal del municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán. XV Congreso de Botánica. Sección Etnobotánica.

29. **Jacoby, G.; Archer, G.** Nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos. NEJM. USA. 1991. 324:601
30. **Koneman, A.** (1995). Diagnostico microbiológico. Editorial. Médica Panamericana. Tercera Edición. Buenos Aires Argentina.
31. **Litter, M.** (1988) Tratado de Farmacología. Editorial El Ateneo, cuarta edición.
32. **Liu, H. ; Lengua,L.; León, I. y Latorre, D.** (2002) Evaluación de la Actividad Antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto". Universidad San Martín de Porres. Lima.
33. **Lock de Ugaz, Oiga.** (1997). Investigación Fitoquímica: Métodos de estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima – Perú. Fondo Editorial
34. **López, R.** (1997) Actividad antifúngica *In vitro* de *Pinus caribea*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales, 2:25-29.
35. **Martínez, J.; López, M. y Morejon, Z.** (1997) Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del *Psidium guayaba* (guayaba). Rev. Cubana Plant Med. V.2 N°1.Habana
36. **Martínez, J.; López, M.; Morejon, Z. y Rubalcova, Y.** (2000) Actividad Antimicrobiana de un extracto fluido al 80%de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal). Rev, Cubana. Plantas Medicinales V 5(1):23-25
37. **Marigan, M.; Martinko, J. y Parker, J.** (1997) Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Editorial Prentice Hal. España.
38. **Martínez, J. y col.** (2000) Actividad Antimicrobiana de un extracto fluido al 80%de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal). Rev, Cubana. Plantas Medicinales V 5(1):23-25
39. **Miranda, M.** (1996). "Métodos de Análisis de Drogas y Extractos" Universidad Habana Cuba.
40. **Mostacero, J.; Mejía, F.** (2002) Taxonomía de fanerógamas peruanas. CONCYTEC. Lima – Perú.

41. **Murphy, M.** (1999). *Plants Products As Antimicrobial Agents*. Oxford, Ahio. P 464 -582.
42. **Nongeli, E.** (2002). Nuevos Medicamentos en Medicina de uso popular a la Industria. Rev. De divulgación científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia No 12 :2-3.
43. **Noble, W.** Antibiotic resistance in the *Staphylococci*. Sci Prog. USA. 1997(5) pp 80.
44. **Palacios, J.** (1997). *Plantas Medicinales Nativas del Perú*. CONCYTEC. Lima-Perú.
45. **Palomino, S.** (2000). "Actividad Antibacteriana de *Punica granatum* "granado" en cepas de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, Aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda (E.D.A). Escuela de Formación profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH Ayacucho - Perú.
46. **Pio, F.** (1990). *Plantas Medicinales*. Editorial Vander. España.
47. **Ramirez, L.; Díaz, H.** (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibardo (*Rumex conglomeratus*). Scientia Et técnica, Vol. XIII número 033 Pereira-Colombia.
48. **Ramirez, L.; Darwin, M.** (2009). Metodologías para evaluar *In vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Universidad de Pereira.
49. **Rand, D.** (1991). Antimicrobial scrining of Medicinal plants from Baja California, Mexico Sur. *Ethnopharmacol* 31: 181-182
50. **Rangel, D.; García, I.; Velasco, J.**(2001). Actividad antimicrobiana de los Extractos Acetónico y acuoso de *Baccharis nítida Pers*. Revista de la Facultad de Farmacia Universidad de los Andes Vol.42 .Venezuela.
51. **Rodríguez, J.; Castillo, R.; Cerón A.** et al. (1996). Estudio Fitoquímico Biodirigido de Extracto de Cuatro Plantas Medicinales del Municipio de Epazoyucan, Hgo. Resumen de Ponencias del Primer Congreso Nacional de

Plantas Medicinales de México, Tlaxcala, Tlax., 24-30 de junio de 1996, pp: 60-61.

52. **Rojas, N; Espino, M.; Fernández, M.** (2001) Patrones de droga resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. Rev. Cubana. Med. Trop. (1): 53–58.
53. **Rojas, A.** (2002). Evaluación del efecto hepatoprotector de extracto acuoso de *Oenothera rosea* "Yawar soqo". Tesis Universidad Nacional de san Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú.
54. **Rojas, A.; Hernandez, L.** (1992) Screening for antimicrobial activity of crude, drug extract pure natural products from Mexican. Medicinal Plants. J. Ethnopharmacol.
55. **Romero, S.; Guevara, R.; Carrasco, A.** (2009) Ensayo preclínico de *Dactylopius coccus* Costa "cochinilla" frente a bacterias Gram positivas de referencia y aisladas de pacientes con infección respiratoria aguda, Ayacucho 2009. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. UNSCH – Ayacucho.
56. **Sacsquispe, R.** (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Serie de normas Técnicas del INS No 30 Lima-Perú.
57. **Samanez, D.** (2006). Sensibilidad de bacterias enteropatógenas a extractos de *Solanum radicans* L. "ñuchku". Tesis de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica. UNSCH Ayacucho – Perú.
58. **Sanabria, A.; Mendoza, A. y Moreno, A.** (1998). Actividad Antimicrobiana *in vitro* de angiospermas colombianas. Rev. Colombiana de Ciencias Químico farmacéuticas.
59. **Shiva, L.** (2007) Estudio de la Actividad Antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos posible alternativa a los antibióticos promotores

de crecimiento. Tesis Doctoral Facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. España.

60. **Si, W; Gong, J.** (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic.
61. **Silva, J.** (2000). Acción Antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cubana Plant Med. V.5n.1 Habana.
62. **Tinco, A.** (1998). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antiinflamatoria de *Oenothera rosea* "yawar soqo". Tesis. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú.
63. **Villanova, P.** (1991). Performance Standard For Antimicrobial Susceptibility Test Hira Informational Supplement. (NCCLS); EEUU.
64. **Vander, J.** (1985). Plantas medicinales. Primera Edición, Editorial Vander. Barcelona. España.
65. **Wolf, R.** (1983). New Sources of gamma- linolenic Acid. Northern Regional Res. Center Ars (Napralert). United States.
66. **Zevallos, P.**(1998). Estudio Fitoquímico y Actividad Antibacteriana de *Carica papaya* .Escuela de Formación Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho – Perú.

ANEXOS

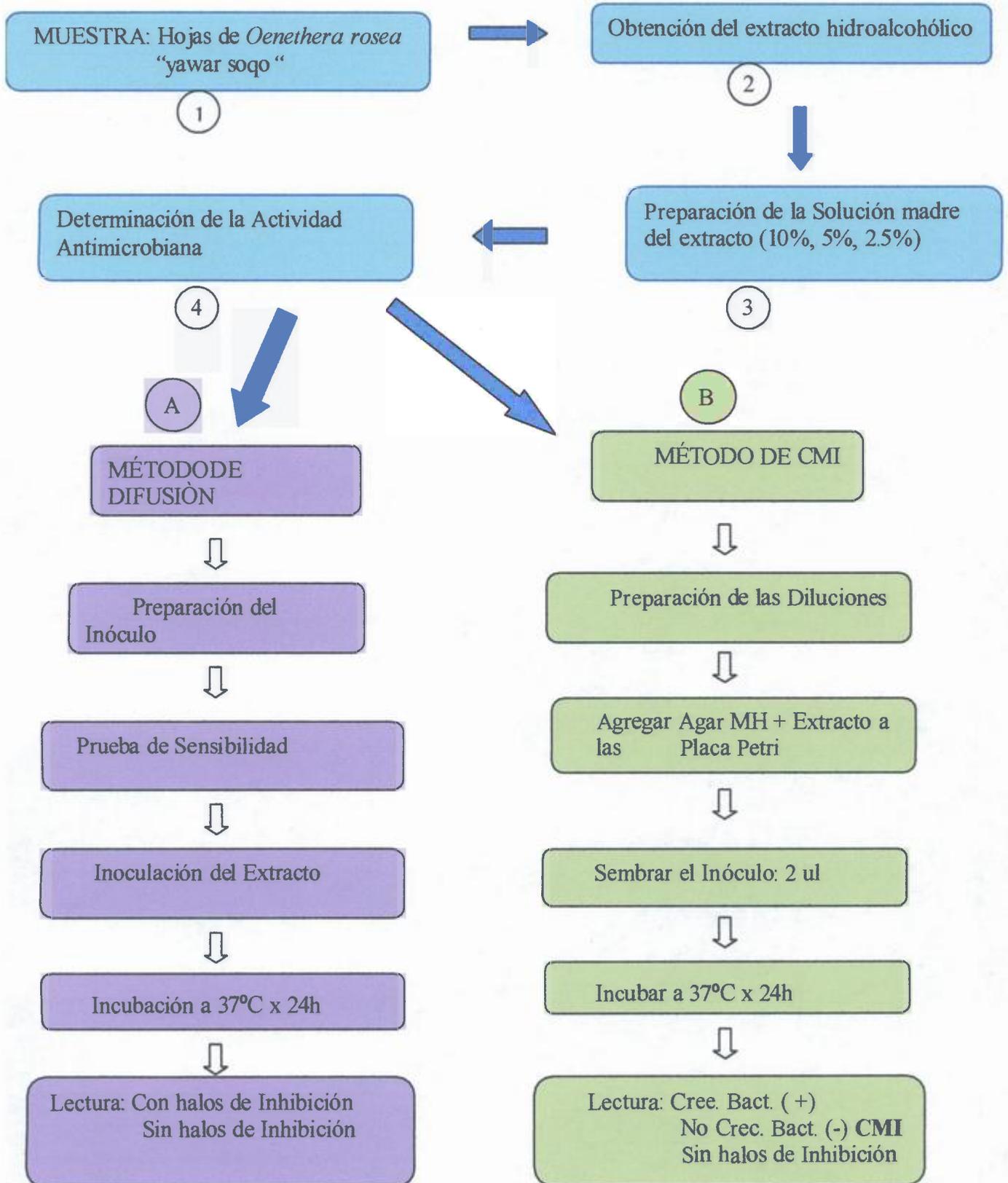
Anexo N° 1



Fig. N° 1 Hoja, Flor y Fruto de *Oenothera rosea*. "yawar soqo"

Anexo N° 2

Flujograma de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Hidroalcohólico de la *Oenothera rosea* "yawar soqo" (Lock de Ugaz y Sacsquispe).



Anexo N° 3

Tabla N° 06: Promedio de diámetros del halo de inhibición del Control positivo y negativo frente a el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar soqo”. Ayacucho 2009.

Conc.Micro. /mm.	Control Positivo	Control Positivo	Control Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Ceftriaxona 30µg	24,4	0
<i>Salmonella Typhi</i>	Ceftriaxona 30µg	24,7	0
<i>Shigella Sp.</i>	Ceftriaxona 30µg	19,7	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Amoxicilina 25 µg	28,7	0
<i>Bacillus cereus</i>	Amoxicilina 25 µg	23,7	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Amoxicilina 25 µg	24,7	0
<i>Candida albicans</i>	Nistatina µg	22,4	0

Anexo N° 4

TABLA N° 8: Análisis de varianza de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Staphylococcus aureus*. Ayañcucho– 2009.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Halo de inhibición (mm)	Inter-grupos	1292.933	4	323.233	1212.125	.000
	Intra-grupos	2.667	10	.267		
	Total	1295.600	14			

Anexo N° 5

TABLA N° 9: Prueba de Tukey de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Staphylococcus aureus*. Ayacucho – 2009.

Halo de inhibición (mm)

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Blanco	3	.0000				
0.75	3		11.3333			
1.50	3			14.3333		
3.00	3				17.6667	
Control	3					28.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Anexo N° 6

TABLA N° 10: Análisis de varianza de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Bacillus cereus*. Ayacucho – 2009.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Halo de inhibición (mm)	Inter-grupos	889.733	4	222.433	1112.167	.000
	Intra-grupos	2.000	10	.200		
	Total	891.733	14			

Anexo N° 7

TABLA N° 11: Prueba de Tukey de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Bacillus cereus*. Ayacucho – 2009.

Halo de inhibición (mm)

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Blanco	3	.0000				
0.75	3		11.6667			
1.50	3			14.0000		
3.00	3				16.3333	
Control	3					23.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Anexo N° 8

TABLA N° 12: Análisis de varianza de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Streptococcus pyogenes*. Ayacucho – 2009.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Halo de inhibición (mm)	Inter-grupos	1398.400	4	349.600	2622.000	.000
	Intra-grupos	1.333	10	.133		
	Total	1399.733	14			

Anexo N° 9

TABLA N° 13: Prueba de Tukey de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar soqo” frente a *Streptococcus pyogenes*. Ayacucho – 2009.

Halo de inhibición (mm)

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Blanco	3	.0000		
0.75	3	.0000		
1.50	3	.0000		
3.00	3		9.6667	
Control	3			24.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Anexo N° 10

TABLA N° 14: Análisis de varianza factorial de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus aureus* y *Staphylococcus aureus*. Ayacucho – 2009.

ANOVA^{a,b}

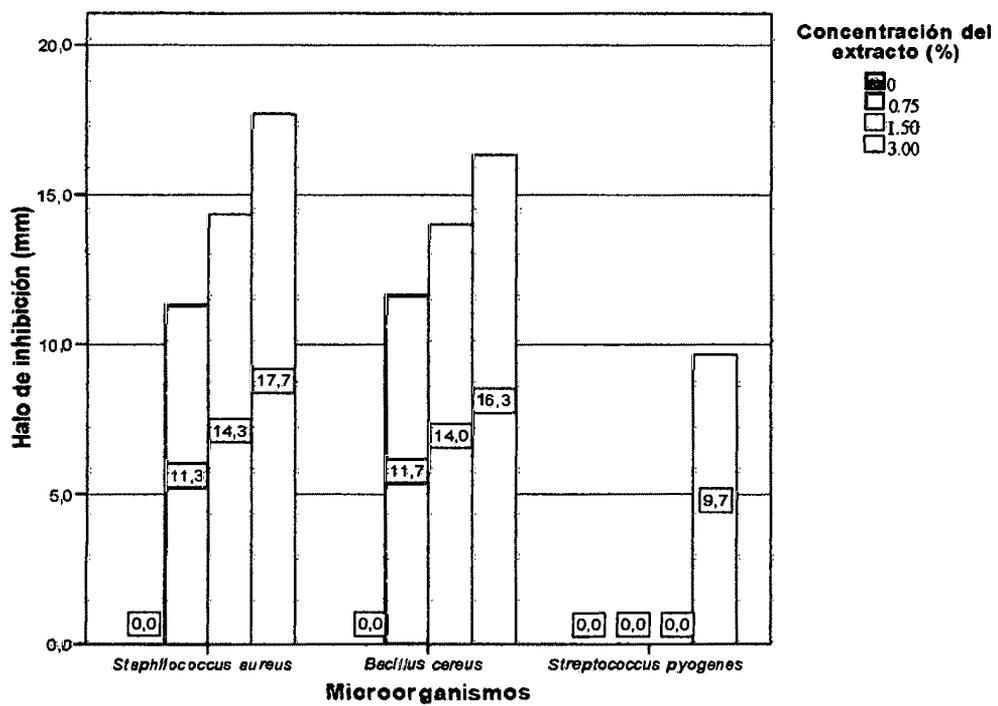
			Método único				
			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Halo de inhibición (mm)	Covariables	Bacterias	425.633	1	425.633	41.623	.000
	Efectos principales	Tratamientos	3250.756	4	812.689	79.473	.000
	Modelo		3676.389	5	735.278	71.903	.000
	Residual		398.811	39	10.226		
	Total		4075.200	44	92.618		

a. Halo de inhibición (mm) por Tratamientos con Bacterias

b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

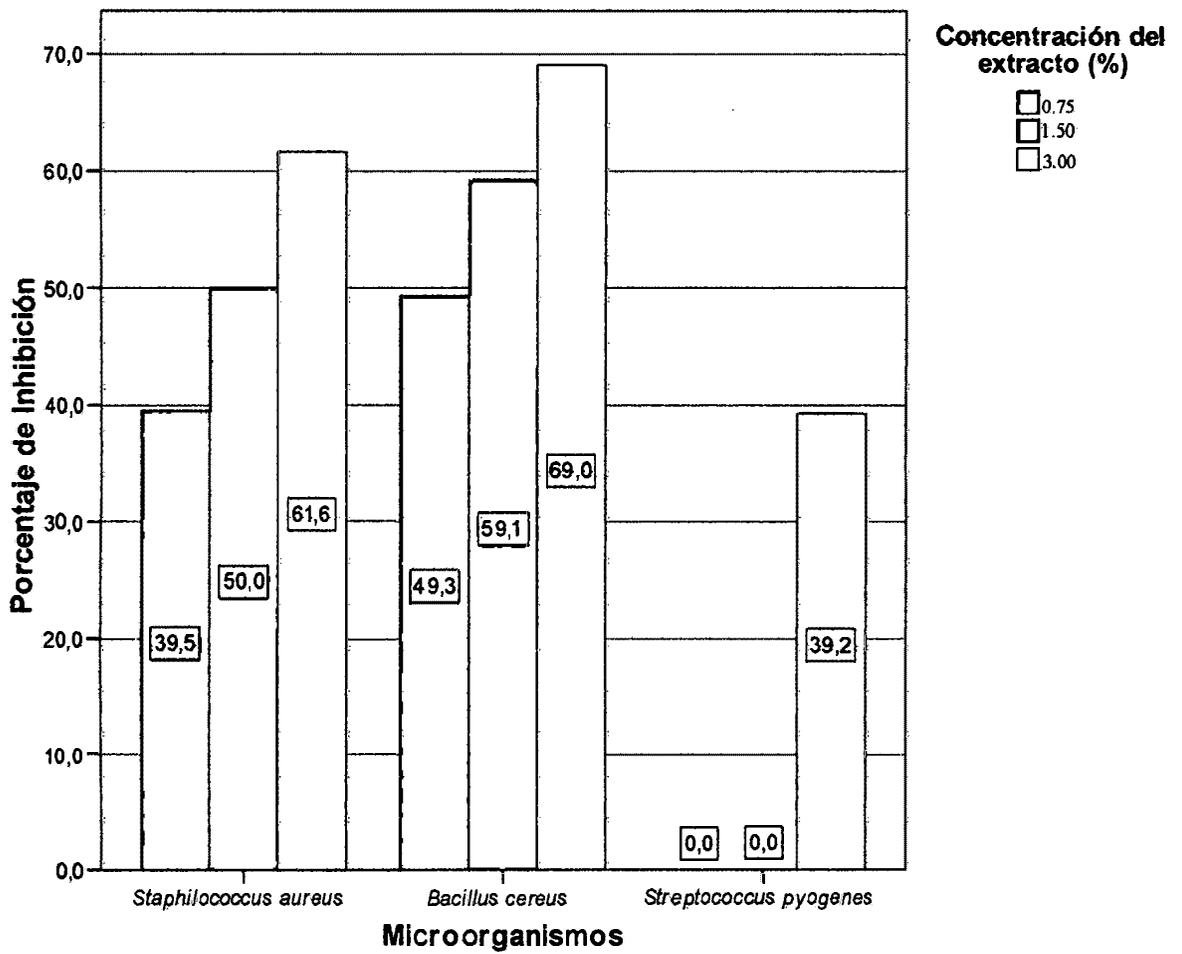
Anexo N° 11

Grafico N° 01: Promedio de halo de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soq" frente a bacterias Gram positivas. Ayacucho - 2009.



Anexo N° 12

Gráfico N° 02: Promedio del Porcentaje de Inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo" frente a bacterias Gram positivas. Ayacucho - 2009.

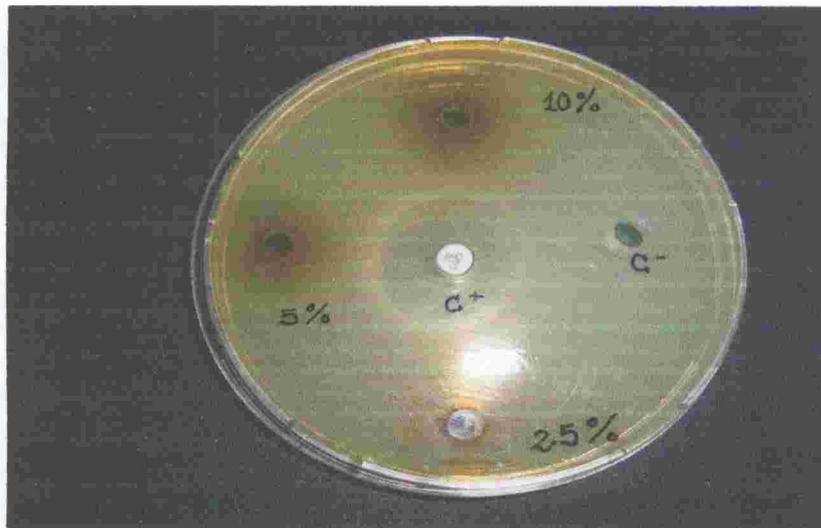


Anexo N° 13



Fotografía N° 1 y 2: Halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a *Eschericia coli* y *Shigella sp.* Ayacucho - 2009.

Anexo N° 14



Fotografía N° 3 y 4: Halos de Inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a *Salmonella typhi*. Ayacucho - 2009

Anexo N° 15



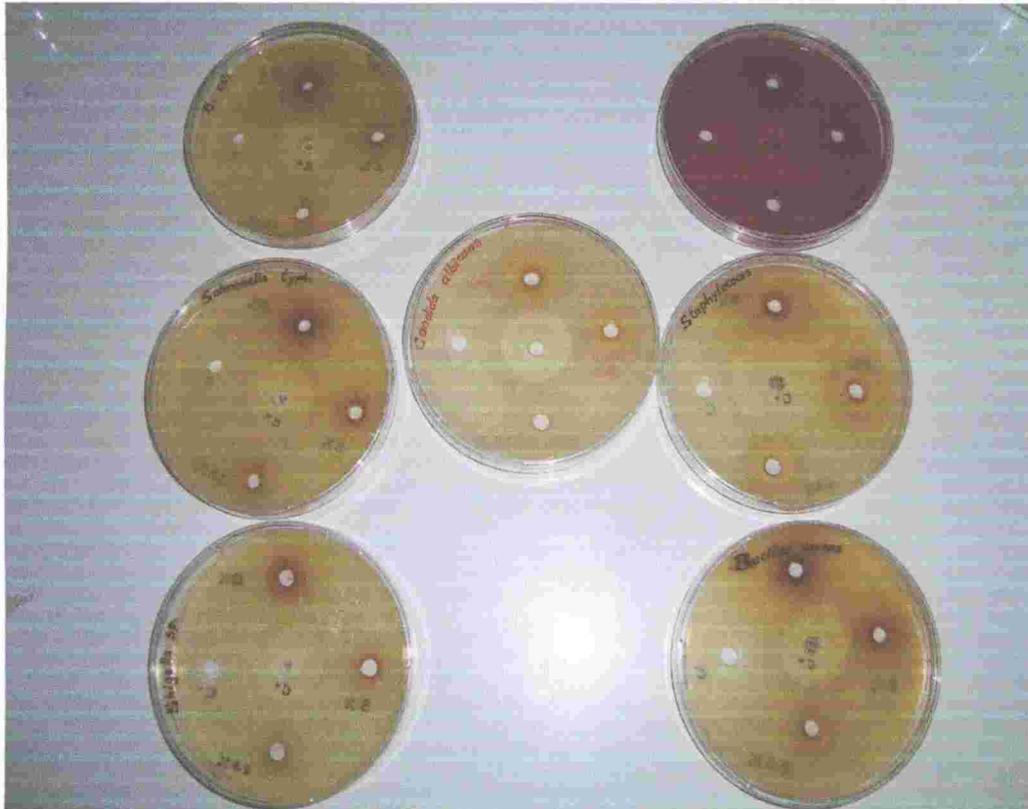
Fotografía N° 5 y 6: Halos de Inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a *Staphylococcus aureus*. Ayacucho - 2009.

Anexo N° 16



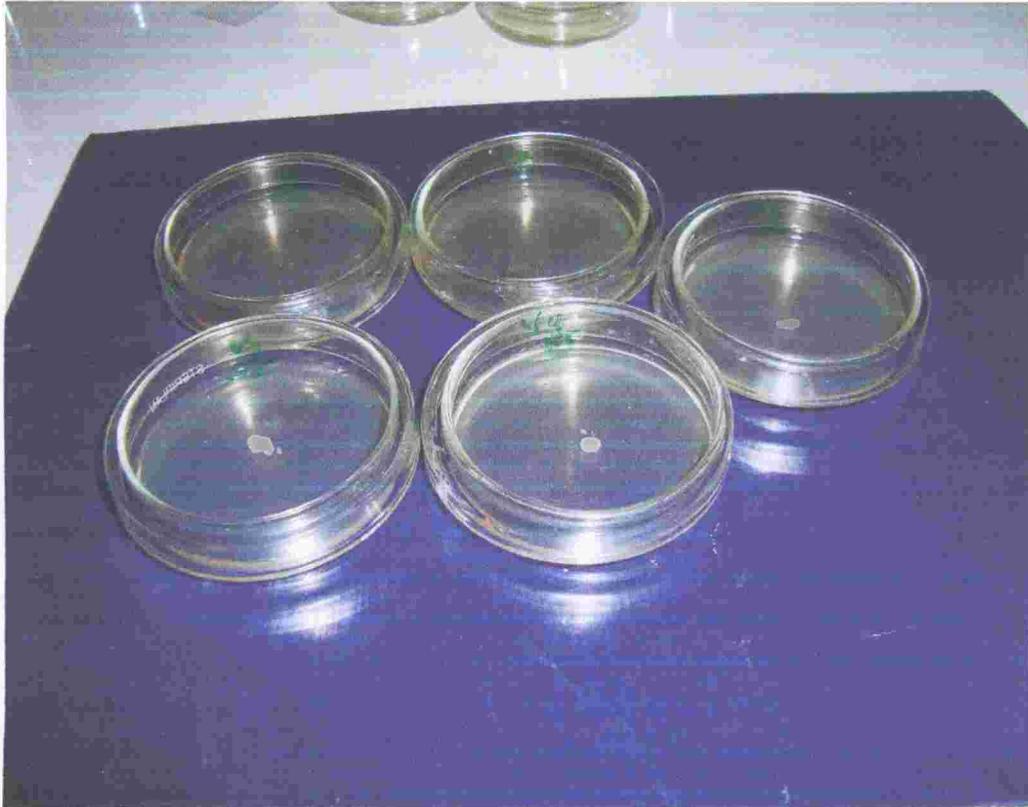
Fotografía N° 7 y 8: Halos de Inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo", frente a *Bacillus cereus* y *Streptococcus pyogenes*. Ayacucho - 2009.

Anexo N°17



Fotografía N° 9: Halos de Inhibición a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “yawar soqo”, frente a bacterias Gram Negativas Gram positivas y *Candida albicans*. Ayacucho – 2009.

Anexo N°18



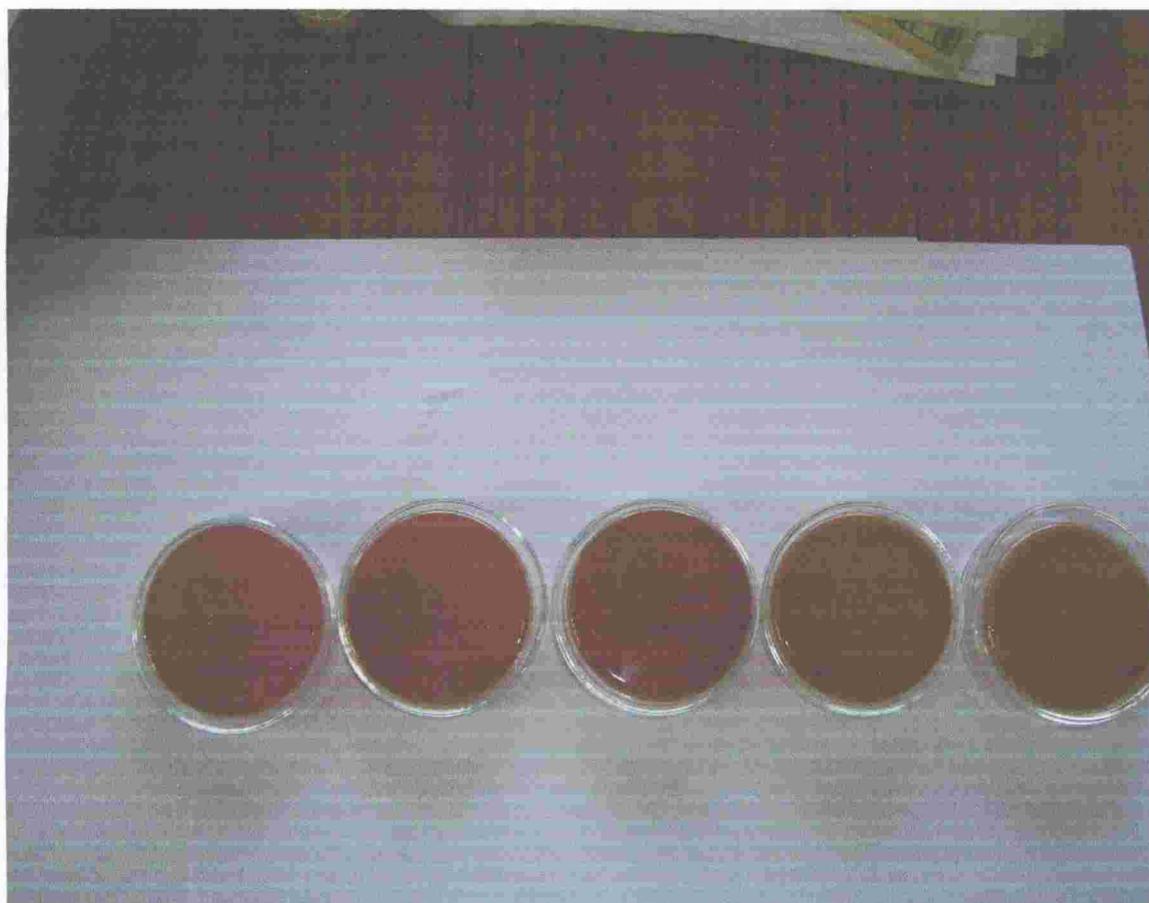
Fotografía N° 10: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* para *Staphylococcus aureus*. Ayacucho - 2009.

Anexo N°19



Fotografía N° 11 : Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* para *Bacillus cereus*. Ayacucho - 2009.

Anexo N° 20



Fotografía N°12: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* para *Streptococcus pyogenes*. Ayacucho - 2009.

Anexo N° 21



Fotografía N° 13: Área de Bacteriología del Laboratorio de Referencia Regional.

Ayacucho - 2009.