

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antibacteriana de los extractos etanólico
y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.)
Jacq. "chamana". Ayacucho – 2010.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

Bach. GUEVARA ROMANÍ, YOEL

AYACUCHO – PERÚ

2011

A Dios, a mi madre Tarcila Romani Santillana, a mi abuela María Santillana Espinoza, y a la memoria de mi abuelo Gregorio Romani Oré, a mis familiares por el apoyo que me brindaron para lograr mi aspiración de ser un excelente profesional.

A ti Xiangmei Sun, eres el ser más maravilloso que me impulsa a ser mucho mejor en mi vida profesional y emocional, a mis compañeros de estudio que serán un recuerdo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme acogido durante mis estudios universitarios.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica por haberme brindado los conocimientos científicos.

A la plana de docentes que lo conforman, quienes con su esfuerzo hicieron posible mi formación profesional.

A la Mg. Rosa G. GUEVARA MONTERO, docente de la EFP de Biología de la UNSCH, asesora del presente trabajo de investigación, por su valioso apoyo y dedicación.

Al Mg. Enrique J. AGUILAR FELICES, docente de la EFP de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH, por su constante apoyo, sugerencias y dedicación.

Al Mg. Marco R. ARONÉS JARA, DOCENTE DE LA EFP de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH, por sus sugerencias, críticas y observaciones.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	03
2.1 Antecedentes	03
2.2 Aspectos botánicos de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana"	05
2.3 Descripción botánica	08
2.4 Aspectos biológicos de las <i>sapindaceaes</i>	09
2.5 Distribución geográfica	10
2.6 Composición química	12
2.7 Etnomedicina	13
2.8 Metabolitos secundarios	16
2.9 Principales compuestos antibacterianos derivados de plantas	19
2.10 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.11 <i>Streptococcus sp.</i>	20
2.12 <i>Escherichia coli</i>	21
2.13 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.14 Ciprofloxacina	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Lugar de ejecución	28
3.2 Materiales	28
3.3 Diseño metodológico	29
3.4 Obtención de los extractos	29
3.5 Determinación de los metabolitos secundarios	30
3.6 Determinación de la actividad antibacteriana	30
3.7 Prueba de difusión (Método de Kirby Bauer)	31
3.8 Método de dilución	33
3.9 Análisis de datos	35
IV. RESULTADOS	36
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	56
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
IX. ANEXOS	63

Actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana". Ayacucho– 2010

Autor: Bach. Yoel GUEVARA ROMANÍ

Asesora: Mg. Rosa G. GUEVARA MONTERO

RESUMEN

Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. durante los meses de abril a setiembre del 2010 en los Laboratorios de Farmacognosia y Microbiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Las hojas fueron recolectadas en el pago de Ccechua, distrito de Iguain, provincia de Huanta, departamento de Ayacucho; se realizó el tamizaje fitoquímico, y la determinación de la actividad antibacteriana con el Método de Kirby Bauer, se utilizó concentraciones de 100 mg/mL, 80 mg/mL, 60 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL y 10 mg/mL de extractos, agua destilada como control y Ciprofloxacina 1mg/mL como estándar; el efecto del extracto etanólico fue probado en *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *E.coli* ATCC 25922 y *Paeruginosa* ATCC 27853.

Los metabolitos presentes en el extracto etanólico fueron compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides, catequinas, resinas, saponinas, antraquinonas, cumarinas, azúcares reductores y aceites esenciales. Y en el extracto acuoso fueron taninos, flavonoides, saponinas, azúcares reductores y principios amargos.

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus sp.* ATCC 77492, mostrando mayor sensibilidad con 27.4 ± 0.1 mm, *E.coli* ATCC 25922 27.2 ± 0.2 mm, *S. aureus* ATCC 25923 21.0 ± 0.1 mm y *Paeruginosa* ATCC 27853 20.0 ± 0.2 mm de diámetro de halo de inhibición. La CMI y CMB, se determinó por el Método de dilución, resultando *S. aureus* ATCC 25923 2.5 mg/mL y 5 mg/mL, *Streptococcus sp.* ATCC 77492 5 mg/mL y 10 mg/mL, *E.coli* ATCC 25922 5 mg/mL y 10 mg/mL, y *Paeruginosa* ATCC 27853 10 mg/mL para ambas concentraciones respectivamente. Respecto al porcentaje de inhibición comparado con la Ciprofloxacina, *E. coli* ATCC 25922 obtuvo 74.32 ± 0.35 %, *Streptococcus sp.* ATCC 77492 63.43 ± 0.09 %, *S.aureus* ATCC 25923 58.01 ± 0.04 % y *Paeruginosa* ATCC 27853 54.95 ± 0.25 %. El extracto etanólico tiene actividad antibacteriana frente a las cepas bacterianas en estudio.

Palabras clave: *Dodonaea viscosa*, actividad antibacteriana.

I. INTRODUCCIÓN

Existe la necesidad imprescindible de atender los diferentes problemas de salud en nuestra población peruana, principalmente en las zonas rurales y urbano - marginales; demanda no atendida que se debe a varios factores, entre ellos la cobertura insuficiente que brinda el Ministerio de Salud, el permanente déficit económico de la población más pobre que le impide destinar recursos para la atención de salud y por último la poca o ninguna importancia que se da a la Medicina Tradicional Andina (Mantilla y Olazábal, 2008).

El uso de plantas medicinales en el Perú es tan antiguo como nuestra cultura andina, muchos conocimientos se encuentran arraigados en el saber popular, sin embargo, la excesiva "modernización" de la Medicina Occidental ha hecho que estos conocimientos sean olvidados. Por ello, el uso de las plantas medicinales ha sido y seguirá siendo una alternativa preventiva y curativa para la salud, pero como todo recurso natural está sujeto a la extracción indiscriminada por simple recolección y su consumo no estará garantizado mientras no existan normas que aseguren su sanidad y calidad (Mantilla y Olazábal, 2008).

Consecuentemente, la búsqueda de nuevos antimicrobianos se ha intensificado durante los recientes años. Esto se puede comprobar en el incremento del número de artículos científicos publicados sobre las actividades antimicrobianas de plantas medicinales durante los años 1966 – 1994 que fueron 115, y el número

de artículos en el mismo tema durante los años 1995 – 2004 fueron 307 (Ríos y Reico, 2005).

La aparición y propagación de la resistencia microbiana está creciendo cada día, por consiguiente se necesita el desarrollo de nuevos antimicrobianos de origen natural o sintético (Gislene et al., 2000).

Los pobladores de las zonas rurales del distrito de Iguain, provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, utilizan las hojas frescas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana” para curar la gastritis aguda y úlceras gástricas, asimismo las hojas secas maceradas en alcohol son usadas para curar dolores musculares y el reumatismo. Los usos tradicionales de la mencionada especie vegetal, indican que es sumamente seguro y no producen reacciones adversas.

Por todo lo manifestado anteriormente, en el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana”.
- Realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana”.
- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), para cada una de las bacterias en estudio.
- Comparar los resultados obtenidos de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana” frente al antibiótico Ciprofloxacina.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Actualmente en nuestro país y en el continente americano hay pocos estudios científicos realizados de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".

Bentham en 1863, Radlkofer en 1900 y Sherff en 1947, citados por Calderón de Rzedowski y Rzedowski (2006), fueron los primeros en circunscribir apropiadamente la especie y en subdividirla en tres variedades. Entre los intentos posteriores de perfeccionar este esquema, cabe destacar las propuestas de reconocimiento de cuatro variedades y once formas.

Ninguna de ellas; sin embargo, ha encontrado buena aceptación y en la mayor parte de las floras se prefiere obviar la existencia de una sola entidad sin mencionar subdivisiones.

Lippold en 1978, citado por Calderón de Rzedowski y Rzedowski (2006), reconoció para el continente americano la existencia de cinco especies, a mencionar: 1. *Dodonaea arizónica*, restringida a Arizona, noroeste de México y la Isla Socorro del Archipiélago Revillagigedo; 2. *Dodonaea bialata* H.B.K., distribuida desde el norte de México, Florida y las Antillas hasta Bolivia y Argentina; 3. *Dodonaea elaeagnoides* Rudolphi ex– Ledeb. & Adlerst., propia de Florida y de las Antillas; 4. *Dodonaea linearifolia* Linden ex – Turcz., limitada a

Cuba, y 5. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq., que crece en las playas arenosas de Florida, de las Antillas y de la costa oriental de Sudamérica.

Leenhouts en 1983, citado por Calderón de Rzedowski y Rzedowski (2006), en su estudio de los representantes extraaustralianos de *Dodonaea*, modificó esta propuesta definiendo también cinco especies, de las cuales dos son exclusivas del Antiguo Mundo. En cuanto a las tres restantes, la circunscripción de *Dodonaea elaeagnoides* coincide con la de Lippold, *Dodonaea viscosa* se define como una planta costera de amplia distribución en las regiones calientes del mundo, mientras que *D. angustifolia* L.f. engloba a todo el conjunto restante a nivel pantropical.

De esta manera las plantas de la región de estudio quedarían ubicadas en *D. bialata* H.B.K. (según Lippold) o en *D. angustifolia* L.f. (de acuerdo con Leenhouts).

Según Calderón de Rzedowski y Rzedowski (2006), la variabilidad de *Dodonaea viscosa*, ha llamado la atención de manera singular a los aspectos de la forma, del tamaño, de la textura y de la pubescencia de las hojas, así como del tamaño, del color, de la forma, de la pubescencia y de la abundancia de las glándulas del fruto. Otros caracteres que se han mencionado y a menudo utilizado en la definición de taxa separados son el número de los lóculos del fruto y la distribución de los sexos en las flores. Un examen más minucioso revela, sin embargo, la existencia de otras desusuales discrepancias morfológicas, muchas de las cuales cabe observar dentro de las poblaciones naturales y no pocas veces en un solo individuo. Este es el caso del largo del estilo y de sus ramas, del número de los sépalos y de la presencia o ausencia de estaminodios en las flores femeninas. Aunque en algunas zonas geográficas en estudio, la especie vegetal puede comportarse como perfectamente dioica, con frecuencia existen también las flores hermafroditas.

Eloff (1998), estudió la planta *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* y determinó que las hojas tienen principios activos que poseen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Difteria corynebacterium*, y actividad antiviral exhibida en contra del virus *Coxsackie B3* y el virus de la influenza A.

Muhammad et al. (2009), realizaron el aislamiento de principios activos del extracto etanólico, n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, n-butanol y fracciones acuosas de *Dodonaea viscosa* Linn. por cromatografía de capa delgada; la investigación preliminar demostró tener actividad inhibitoria en contra de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las fracciones etanólicas mostraron estar dentro de un rango de 5.0 – 20.0 mg/mL.

2.2. ASPECTOS BOTÁNICOS DE *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana”

2.2.1. CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA

Según el sistema de clasificación de Engler & Prantl, modificado por Melchior en 1964, la “chamana” se ubica en la siguiente categoría taxonómica.

División : Antophyta (Angiospermae)

Clase : Dicotiledoneae

Sub clase : Archyclamideas

Orden : Sapindales

Familia : Sapindaceae

Género : *Dodonaea*

Especie : *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

N. V. : “chamana”

Fuente: Constancia emitida por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo N° 22).



Fotografía N° 01. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".



Fotografía N° 02. Tallo de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".



Fotografía N° 03. Flores de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".



Fotografía N° 04. Fruto sámara de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".



Fotografía N° 05. Semillas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto o arbolito perennifolio, viscido glanduloso, hasta de 5 m de alto; tallo a menudo tendiendo a rojizo, algo anguloso y fisurado, glabro o pubérulo hacia las porciones tiernas y provisto de pequeñas lenticelas; hojas simples, atenuadas hacia la parte inferior en una base pecioliforme de 0.2 a 2 cm de largo, láminas elípticas, lineares o linear – lanceoladas, oblanceoladas u oblongo – lanceoladas, de 4 a 15 cm de largo por 0.6 a 4 cm de ancho, ápice por lo común agudo, a veces acuminado o por el contrario obtuso a redondeado, base atenuada, margen entero, con frecuencia diminutamente revuelto, de textura subcartácea, algo discoloras, brillantes, glanduloso – resinosas y olorosas, generalmente glabras por ambas caras, con excepción del margen ciliado; inflorescencias axilares y terminales en los ápices de las ramillas, en forma de panículas cortas corimbiformes o racemiformes; flores hermafroditas y/o unisexuales, verdosas, amarillentas o algo blanquecinas, por lo común con 4 sépalos ovados a oblongos

López (2006), en un estudio etnobotánico; menciona el crecimiento abundante en lugares perturbados de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. en el distrito de Sexi, departamento de Cajamarca.

En las provincias de Huanta y Huamanga; *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana”, prospera en la vegetación secundaria desde matorrales y pastizales; crece en forma silvestre en las quebradas, empinados y al borde de las vías de comunicación del departamento de Ayacucho (Figura Nº 1).

Crece a una altitud comprendida entre los 1000 hasta los 3000 m.s.n.m., se ha encontrado en flor y en fruto prácticamente todo el año.



Figura Nº 01. Mapa geográfico de la ubicación del distrito de Iguain – Huanta.

2.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las hojas y brotes de *Dodonaea viscosa* Jacq., contienen elementos químicos diversos como: aluminio (Al), calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), fósforo (P), azufre (S), Zinc (Zn) (Pirzada et al., 2010).

Estos elementos son biológicamente importantes en el tratamiento de diversas enfermedades cutáneas de la piel (Saily et al., 1994).

Tabla Nº 01. Concentración de elementos químicos de *Dodonaea viscosa* Jacq. (Pirzada et al., 2010).

Nombre del elemento	Fórmula	Cantidad (mg/Kg)
Aluminio	Al	6.93 – 7.44
Calcio	Ca	11683.98 – 12054.90
Cobre	Cu	6.48 – 9.69
Hierro	Fe	83.85 – 120.08
Magnesio	Mg	2711.53 – 2965.67
Manganeso	Mn	11.42 – 14.25
Fósforo	P	167.37 – 224.11
Azufre	S	213.66 – 222.31
Zinc	Zn	55.30 – 59.45

La investigación fitoquímica de *Dodonaea viscosa* Linn. ha resultado en el aislamiento de flavonoides (Sachdev y Kulshreshtha, 1983) (Sachdev y Kulshreshtha, 1986) y (Rojas y et al., 1992), saponinas (Wagner et al., 1987) y diterpenos (Ortega et al., 2001).

Entre otros principios activos aislados notables están la pinocembrina, santín, penduletina, alizarín, 5 – hidroxí – 3, 6, 7, 4' – tetrametoxi flavona, 5, 7, 4' – trihidroxí – 3, 6 – dimetoxi flavona, isorhamnetin – 3 – ramosilgalactósido, 5, 7 – dihidroxí – 3' – (hidro ximetibutil) – 3, 6, 4' – trimetoxi flavonas (Sachdev y Kulshreshtha, 1983), 5, 6, 4' trihidroxí – 3, 7 – dimetoxi flavona (Rojas et al., 1992),

viscosol, aliarín y ácido dodónico (Sachdev y Kulshreshtha,1986), ácido hautriwaico (Ortega et al., 2001) (Rojas et al.,1992), ácido dihidrohautriwaico, metil dodonatos (Ortega et al., 2001), ent – 15,16 – epoxi – 3 β , 8 α – dihidroxi – 9 α H – labda – 13,14 – dieno (Forbes et al., 2007) (Rojas et al.,1992), dodonósido A y dodonósido B (Wagner et al.,1987), estigmasterol, isorhamnetina (Ramachandran et al.,1975), quercetina, doviscogenina (Khan et al., 1988).

La investigación de las partes aéreas de *Dodonaea viscosa* Jacq., condujo al aislamiento de interesantes estructuras como el éster del ácido p – cumárico de 1 – L– mio – inositol [L–1 – O – metil – 2 – acetil – 3 – p – cumaril – mio – inositol], junto con otros compuestos conocidos (Rachel et al., 1991).

Teffo et al. (2009), evaluaron la actividad antibacteriana y antioxidante de cuatro éteres de metil caenferol aislados de las hojas de *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* utilizando técnicas espectroscópicas, estos compuestos aislados fueron el 3, 5, 7 – trihidroxi – 4' – metoxiflavona; 5, 7, 4'– trihidroxi – 3, 6 – dimetoxiflavona; 5, 7 – dihidroxi – 3, 6, 4' – trimetoxiflavona y 5 – hidroxil – 3, 7, 4'– trimetoxiflavona junto con el 3, 4', 5, 7 – tetrahidroxiflavona (caenferol).

2.7. ETNOMEDICINA

2.7.1.USOS TRADICIONALES DE *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

Camacho et al. (1992), reportaron que la chamana es utilizada como tutor para cultivos hortícolas. Se pueden plantar setos de esta especie como cortinas de viveros en zonas secas, y como ornamental en áreas con temporal limitado y sin riego. En algunos países lo utilizan como leña, carbón, mangos de herramientas y en construcciones rústicas.

Calderón de Rzedowski y Rzedowski (2006), reportaron que esta planta es utilizada en el control de la erosión, como cortina rompe vientos y como restaurador de suelos.

2.7.2.USOS MEDICINALES DE *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

En un sentido común, los usos medicinales de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. var. *angustifolia* fueron empleados ampliamente como analgésico, antiinflamatorio, antiviral, espasmolítico, laxativo, antimicrobiano e hipotesivo (Ghisalberti, 1998).

En India, la infusión de las hojas de *D. viscosa* son utilizadas para el tratamiento de reumatismo, gota, hemorroides, fracturas y la mordedura de serpientes (Kirtikar y Basu, 1995) (Nadkarni y Nadkarni, 1982).

Las hojas frescas de *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* son usados con frecuencia en desórdenes neurológicos (Krupanidhi et al., 2008).

Aswal et al. (1984), estudió el efecto hipoglicemiante en el extracto acuoso de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

Sukkawala y Desai (1962), evaluaron las propiedades medicinales del aceite esencial, extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* Linn., estos mostraron tener propiedades antibacterianas, depresores cardiacos y una leve actividad antihelmíntica.

Rojas et al. (1996), evaluaron las propiedades medicinales de las hojas frescas de *D. viscosa* (L.) Jacq., utilizadas en infecciones de la piel, fiebres, hinchazones, relajantes del músculo liso, dolencias, desórdenes gastrointestinales incluyendo diarrea.

La decocción de la corteza o de las hojas se usan en baños o fomentos, emolientes y como astringentes, asimismo las hojas machacadas se usan en cataplasmas resolutivas en tumores (Arrillaga de Maffei, 1969).

Mantilla y Olazábal (2008), mencionaron que la chamana es empleada para curar dolores reumáticos, golpes, contusiones y como leña en el departamento de Cuzco.

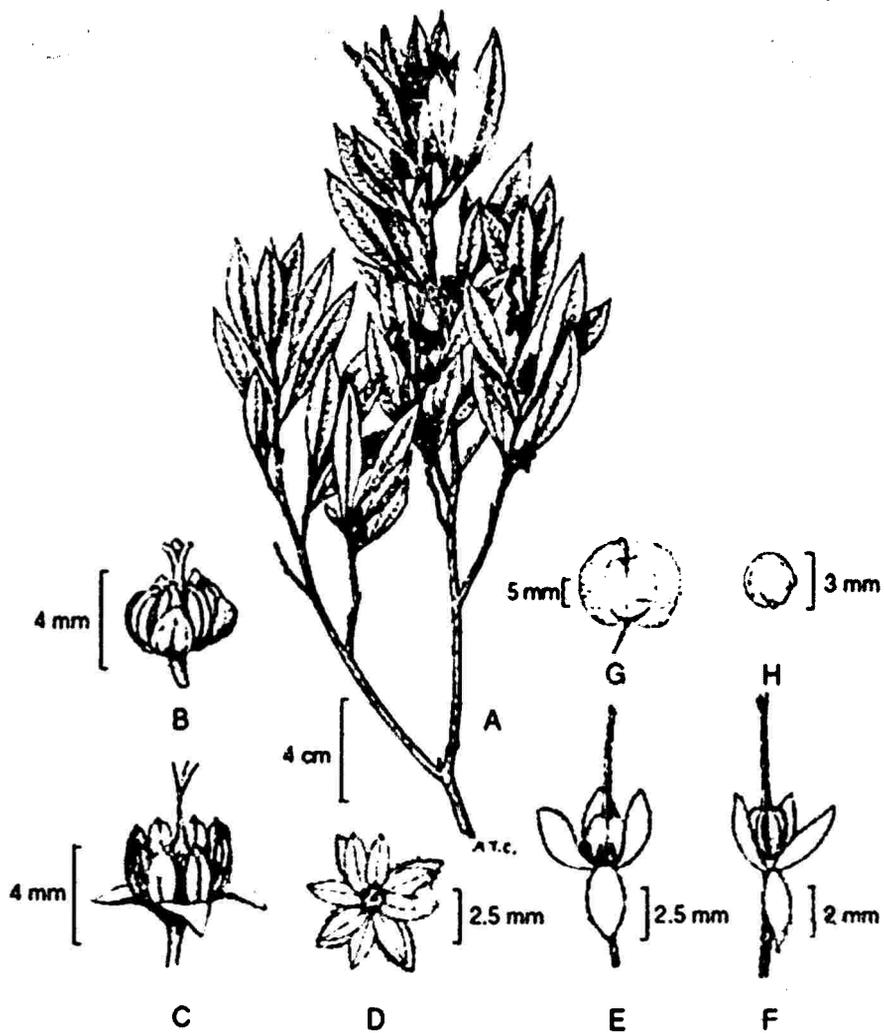


Figura N° 02. Esquema taxonómico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana" (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2006).

A. rama con hojas e inflorescencias; B. flor hermafrodita con estilo y ramas de estilo cortos; C. flor hermafrodita con estilo y ramas del estilo alargados; D. flor masculina; E. flor femenina con estambres estériles; F. flor femenina desprovista de estambres; G. fruto; H. semilla; A y B ilustrados por María T. Cabrera y reproducidos de la Flora de la Provincia de Buenos Aires, 1965; C reproducido de Flora de Panamá, 1976; G es obra de Humberto Sánchez Córdova; D, E, F y H dibujados por Rogelio Cárdenas.

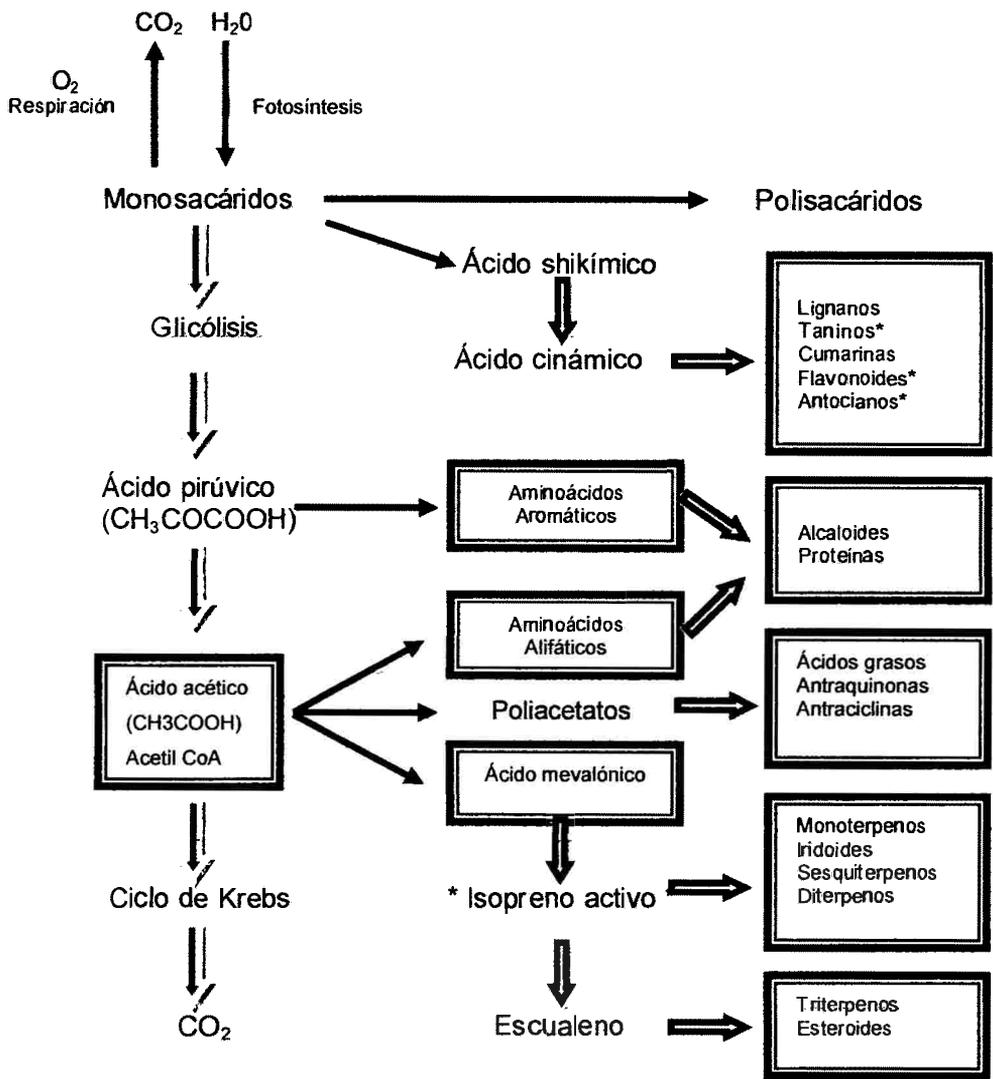
2.8. METABOLITOS SECUNDARIOS

2.8.1. COMPUESTOS FENOLICOS

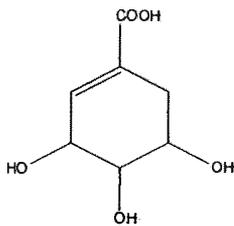
Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios de las plantas. Se caracterizan por presentar en su estructura un anillo de benceno con, al menos, un grupo hidroxilo (fenólico), generalmente funcionalizado. En la naturaleza, la síntesis del anillo aromático la realizan únicamente las plantas y los microorganismos, y las vías de síntesis más frecuentes son la del shikimato (ácido shikímico) y la vía del acetato. La vía del acetato conduce a la formación de cadenas de poliacetato que, mediante la ciclación, dan lugar a compuestos policíclicos aromáticos como las antraquinonas y los floriglucinoles.

Algunos compuestos fenólicos como, los flavonoides, los estilbenos y las xantonas, proceden de la participación simultánea de la vía del ácido shikímico y del acetato. Otros compuestos fenólicos como los carabinoles, son metabolitos mixtos de la vía de los acetatos y del mevalonato; por último cabe destacar los metabolitos mixtos del ácido shikímico y mevalonato, como las quinonas terpénicas y las cumarinas compuestas (pirano y furanocumarinas).

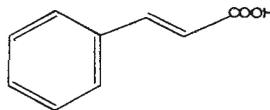
Los compuestos fenólicos se pueden clasificar según su complejidad estructural y su origen biosintético. El grupo más sencillo corresponde a los fenoles propiamente dichos: ácidos fenólicos y cetonas polifenólicas. Los fenilpropanoides, basados en un núcleo C_6C_3 , son un amplio grupo constituido por diferentes compuestos: cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos (Vanaclocha, 2003).



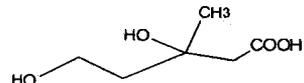
(*) Metabolitos mixtos (poliacetatos y shikimatos)



Ácido shikímico



Ácido cinámico



Ácido mevalónico

Figura Nº 03. Biosíntesis de metabolitos secundarios (Vanaclocha, 2003).

2.8.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides son productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico, intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación ultravioleta, en la defensa durante la interacción planta – patógeno (Villar del Fresno, 1999).

2.8.3. CUMARINAS

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias *Umbeliferae* y *Rutaceae*; se encuentran en todas las partes de la planta desde la raíz a flores y frutos siendo más abundante en estos últimos; se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos (Lock de Ugaz, 1994).

2.8.4. TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES

Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonado con seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente completa generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides (Lock de Ugaz, 1994).

Los esteroides, biogenéticamente están muy relacionados a los triterpenoides, y con un esqueleto cíclico base al igual que los triterpenoides tetracíclicos, de ciclopentanoperhidrofenantreno, pueden ser clasificados como esteroides (C_{27} ó más), saponinas esteroidales (o sus agliconas apongeninas).

2.8.5. SAPONINAS

Las saponinas son glicósidos de triterpenos y esteroides, dan soluciones jabonosas, y algunos extractos crudos de plantas han encontrado uso como detergentes, y para la producción de espumas estables para la elaboración de champúes y otros productos cosméticos (Lock de Ugaz, 1994).

2.8.6. TANINOS

Son compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 Dalton. Sus principales características son su capacidad antioxidante debido al elevado número de grupos hidroxilo y la capacidad de unirse a proteínas. También pueden ligarse a alcaloides, gelatinas y otras sustancias, aunque parece que las interacciones tanino – proteína son la base de sus actividades biológicas. Por su capacidad astringente, las plantas con taninos se utilizan frecuentemente como antidiarreicas y en el tratamiento de heridas y quemaduras, favoreciendo la cicatrización de las mismas (Lock de Ugaz, 1994).

2.9. PRINCIPALES COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS DERIVADOS DE PLANTAS

Las plantas producen una gran cantidad de compuestos secundarios como protección contra ataques microbianos e insectos. De hecho, mucho de estos compuestos han sido usados en forma pura o extractos vegetales como alimento o aplicaciones médicas en humanos (Wallace, 2004).

Otros de los compuestos derivados de plantas que poseen actividad antimicrobiana son los fenólicos y polifenoles dentro de los cuales se encuentran: quinonas; flavonas, flavonoides y flavonoles; taninos; y cumarinas (Murphy, 1999).

Otros son los terpenoides y aceites esenciales, los alcaloides, lecitinas y polipéptidos, entre otros. Además los terpenoides, proporcionan a la planta sus olores, otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento de la planta (Murphy, 1999).

2.10. *Staphylococcus aureus*

Es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales. El hombre es portador sintomático entre un 20% y un 40% de los adultos sanos y forma parte de la flora normal en muchos sitios del

organismo como la piel, la nasofaringe y el sistema tracto gastrointestinal, causando diversas manifestaciones clínicas. Casi toda persona presenta algún tipo de infección por *S.aureus* durante su vida, que varía en gravedad desde intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales (Sánchez, 1997).

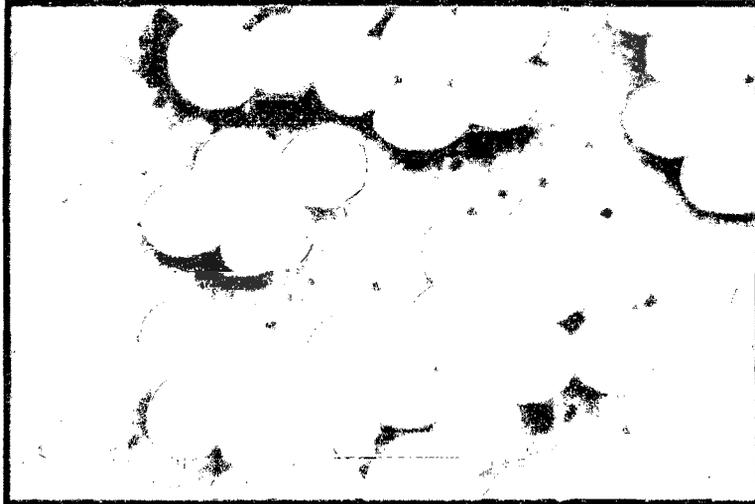


Figura Nº 04. *Staphylococcus aureus*

Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg

2.11. *Streptococcus sp.*

Los estreptococos comprenden un grupo heterogéneo de bacterias responsables de diferentes cuadros clínicos (Jawetz, 2006), tanto en el hombre como en los animales, a partir de varios factores tales como: las características propias del tipo de *Streptococcus* responsables, la puerta de entrada y las particularidades intrínsecas del huésped (Salazar, 2006).

Los *Streptococcus sp.* están distribuidos de una forma muy amplia en la naturaleza, unos forman parte de la microbiota y otros se relacionan con enfermedades en cuadros clínicos muy disímiles atribuibles en parte a la susceptibilidad hacia ellos (Todd, 2000).

Se ha observado que esta entidad, aunque afecta con mayor frecuencia a cerdos

bovinos y humanos, puede infectar a otras especies como carneros, perros y gatos (Martínez, 2001).

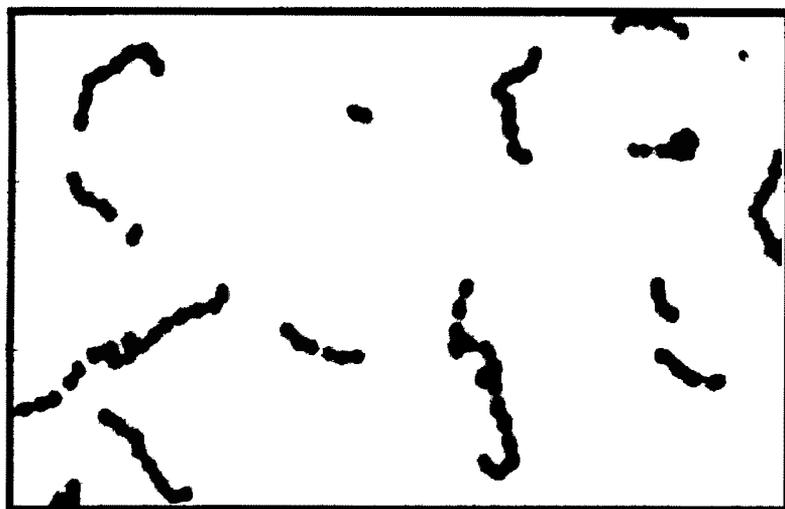


Figura Nº 05. *Streptococcus* sp.

Fuente: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Streptococci.jpg>

2.12. *Escherichia coli*

Es una de las especies bacterianas minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing et al., 1985).

Puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización (Nataro y Kaper, 1998).

Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios – anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl,

fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos. Son de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Nataro y Kaper, 1998).

Como integrante microflora del hombre y de muchos animales, se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".



Figura Nº 06. *Escherichia coli*

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:EscherichiaColi_NIAID.jpg

2.13. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa, perteneciente a la rama g de las proteobacterias, produce pigmentos como la plocianina, fluoresceína. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, dentro del

género *Pseudomonas* se encuentran otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. alcaligenes* y *P. aeruginosa*.

Se puede aislar muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana*, a invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y a insectos como *Drosophila melanogaster*.

Es una bacteria capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P.aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón.

Todos nosotros estamos en contacto diariamente con esta bacteria, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria de entre 2 y el 8% de las heces de personas sanas (Soberón, 2002).

Representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. Una vez que se establece la infección, produce una serie de compuestos tóxicos que causan no solo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección por *P.aeruginosa* encontramos toxinas, como las enterotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *P.aeruginosa*, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes (Vilar - Compte, 2003).



Figura N° 07. *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Pseudomonas.jpg>

2.14. CIPROFLOXACINA

Durante los años ochenta, se introdujo un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo de piperazina en el C-7, originándose nuevas estructuras (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, etc.), las cuales presentaron mejoras, tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas (buena absorción oral y amplia distribución tisular); convirtiendo a esta generación de quinolonas en fármacos de primera línea frente a numerosas infecciones y constituyendo un nuevo grupo de agentes antimicrobianos llamados piperazinil fluorquinolonas o simplemente fluorquinolonas (Flores, 1997).

La Ciprofloxacina es una Fluorquinolona, se utiliza en el tratamiento de infecciones urinarias, intestinales, biliares, profilaxis de la diarrea de los viajeros y descontaminación intestinal en inmunodeprimidos. Posee gran difusión tisular, semivida prolongada, buena absorción oral y resistencia no cruzada con otros antibióticos, en el tratamiento de enfermedades infecciosas, preferentemente en pacientes hospitalizados (Flores, 1997).

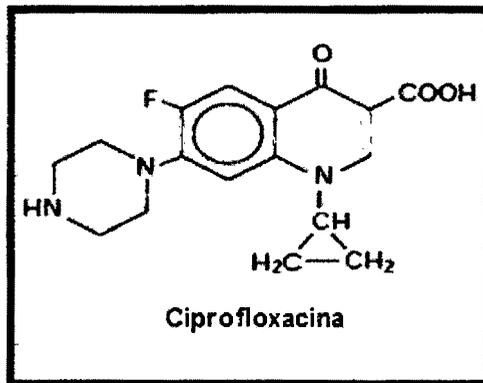


Figura N° 08. Estructura química de la Ciprofloxacin (Flores, 1997).

2.14.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CIPROFLOXACINA

Las quinolonas son antibióticos cuyo blanco primario son la ADN girasa en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos.

La ADN girasa es un heterotetrámero A_2B_2 con la subunidad A (Gyr A, 97kDa) como responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y reunión de ADN; y la subunidad B (Gyr B, 90 kDa) como la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción con Gyr A y ATP. La ADN girasa introduce superenrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción; mientras que la topoisomerasa IV presenta una potente actividad decatenante.

Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular.

La inhibición de la ADN girasa puede categorizarse dentro de los cinco tipos siguientes:

- Mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr A.
- Mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr B.
- Intercalación en el ADN.
- Unión al hueco menor del ADN.

➤ Quelación no específica.

La enzima ADN girasa actúa a través del enrollamiento de la doble cadena del ADN alrededor de sí mismo, ruptura del ADN en las dos hebras con la formación de un segmento de apertura a través del cual se pasa el ADN sin cortar y finalmente reunión del ADN. La unión de ATP a Gyr B captura el segmento de ADN sin cortar y lo dirige a través de la apertura, seguido por la hidrólisis de ATP para permitir que la enzima regrese a su conformación inicial. En un ciclo de reacción de superenrollamientos, la ADN girasa une e hidroliza dos moléculas de ATP, con una velocidad intrínseca de hidrólisis de ATP generalmente baja, donde la actividad de ATPasa es estimulada por la presencia de ADN. Las moléculas de quinolona, unidas en complejos tetraméricos, se acoplan a las hebras de ADN y a determinados puntos de las subunidades (A y B) de la girasa y estabilizan el complejo ternario de girasa ADN–fluoroquinolona–ADN, impidiendo su reversión y poniendo en marcha una serie de procesos, incluso hoy todavía desconocidos, que desembocan en la lisis celular (Leyva y Leyva, 2008).

Existen estudios estructurales para explicar la acción de las quinolonas, donde se propone que se requiere una interacción directa entre la quinolona y el ADN de cadena doble o sencilla. Uno de los modelos sugiere que el Mg^{2+} juega un papel importante en la unión de la quinolona al complejo ADN–girasa, existiendo una interacción electrostática y/o covalente entre el ión Mg^{2+} y una molécula de quinolona junto con los grupos fosfato y las bases del ADN. En otros estudios, se sugiere también la presencia de puentes de hidrógeno y/o atracciones electrostáticas entre el flúor del C-6 y el sustituyente del C-7 de la quinolona y el receptor o enzima particularmente en algunos aminoácidos como serina 83 y/o ácido aspártico 87. También se propone este tipo de interacciones con los grupos fosfatos del ADN.

2.14.2. RESISTENCIA BACTERIANA

Los principales mecanismos de resistencia en microorganismos son cinco: alteración de la Gyr A, alteración de la Gyr B, alteración de la topoisomerasa IV, dificultad de paso del antibiótico a través de la pared bacteriana y exceso de salida por alteración de los mecanismos de flujo externo. Todos ellos, por mutaciones de los distintos genes que codifican la estructura o función correspondiente, que reciben el nombre de la estructura modificada, o de los selectores con que se han detectado (Gyr A, Gyr B, parC y parE para las topoisomerasas; norC, nalB, nalD, nfxB, nfxC, marA y sox para las alteraciones de las proteínas de membrana externa como ompF y ompC; y mexA, mexB, mexC, mexD, oprK, oprM y norA para las alteraciones en el flujo externo) (Leyva y Leyva, 2008).

La mayoría de las resistencias a ciertos microorganismos, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Neisseria gonorrhoeae*, se deben a alteraciones de la Gyr A, siendo secundarios los otros mecanismos, aunque pueden coexistir más de uno y ser múltiples.

En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* son más importantes las alteraciones en la topoisomerasa IV; mientras que para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter jejuni* también es importante un aumento del flujo externo (Leyva y Leyva, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo fue ejecutado en las instalaciones de los Laboratorios de Farmacognosia y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga – Ayacucho, entre los meses de abril a setiembre del 2010.

3.2. MATERIALES

3.2.1. MUESTRA

Las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “chamana” fueron recolectados en el pago de Ccechua, distrito de Iguain, provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, el mes de junio entre las 7 a.m. a 9 a.m., antes que los rayos solares incidan sobre las plantas provocando su transpiración y se volaticen sus aceites esenciales. Se recolectaron las hojas en buen estado de conservación y que estén verdes y hayan alcanzado un buen desarrollo biológico.

3.2.2. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas utilizadas para determinar la actividad antibacteriana en los extractos etanólico y acuoso fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suministradas por el Área Académica del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH.

3.3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1. DESECACIÓN Y ESTABILIZACIÓN

Las hojas frescas de *D. viscosa* (L.) Jacq. "chamana" fueron sometidos a un tratamiento de limpieza y selección para eliminar elementos extraños. Luego se secaron a temperatura ambiente, con una buena ventilación por un periodo de dos semanas.

3.3.2. MOLIENDA

Una vez secas las hojas fueron seleccionadas y se sometieron a molienda utilizando un mortero con pilón, hasta obtener un polvo fino y seco, luego se tamizaron con una malla de 3 mm de diámetro para obtener partículas uniformes para facilitar el proceso de extracción, y se pesó para conocer la cantidad exacta a extraer (Miranda y Cuellar, 2000).

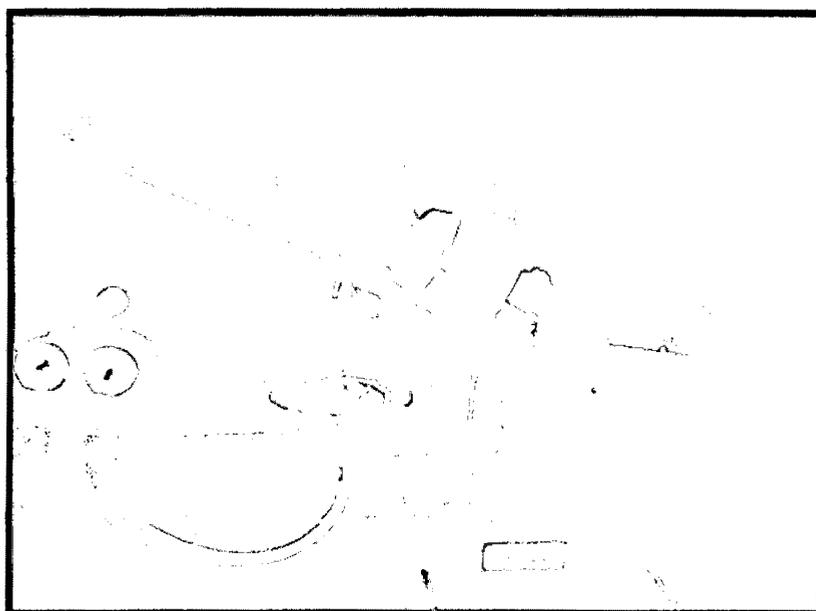
3.4. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

3.4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Se pesó 200 g de hojas pulverizadas para luego añadir 2 litros de etanol de 96°. La muestra fue macerada en un frasco de color ámbar por dos semanas con agitaciones permanentes. Seguidamente se filtró y se concentró utilizando el rotavapor Buchi 3000 a una temperatura de 30°C haciendo girar el balón a 40 r.p.m. con vacío constante, hasta obtener un extracto semisólido (Cáceres, 1996). Los extractos obtenidos se almacenaron hasta el momento de utilizarlos a 4°C (Torres, 2007).

3.4.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

El procedimiento de extracción con agua caliente se basó en el método de decocción del herbario tradicional, con una concentración ajustada para encontrar la definición farmacéutica promedio de 1:10 p/v (100mg/mL) (Painter, 1998).



Fotografía N° 06. Concentración del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. en rotavapor Buchi 3000.

3.5. DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", se empleó las reacciones de coloración propuesta por (Miranda y Cuellar, 2000) (Anexo N°13) (Anexo N°14).

3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para la determinación de la sensibilidad de una bacteria frente a un agente antibacteriano se utilizó el Método de Kirby Bauer; además de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) (USP XXIII) (Anexo N°12) (Anexo N°15).

3.6.1.PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

Se preparó el fármaco patrón Ciprofloxacina de 500 mg, marca comercial (Medco) para una concentración de 1 mg/mL.

3.6.2.PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pesó y disolvió 1 g de la muestra del extracto etanólico con tween 80 y se vertió en una fiola de 10 mL, se enrasó con agua destilada estéril obteniéndose una concentración de 100 mg/mL. De esta solución se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones de 100, 80, 60, 40, 20 y 10 mg/mL. Estas mismas concentraciones fueron preparadas para el extracto acuoso.

3.6.3.REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas bacterianas en estudio: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, fueron reactivados en caldo nutritivo y luego fueron repicadas en viales conteniendo agar nutritivo.

3.6.4.PREPARACIÓN DEL TUBO Nº 5 DE LA ESCALA DE MC FARLAND

La escala de Mc Farland se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico. La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Aquí están los pasos para la preparación de la Escala de Mc Farland:

Se preparó una solución al 1% (w/v) de cloruro de bario anhidro (BaCl_2).

Se preparó una solución al 1% (v/v) de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Se mezcló estas dos soluciones usando estas proporciones para obtener la Escala de McFarland.

Para la preparación del Tubo Nº 5 de la Escala de Mc Farland se vertió a un tubo de ensayo estéril 0.2 mL de BaCl_2 1% mas 9.5 mL de H_2SO_4 1%, obteniéndose una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/ mL de bacterias.

Luego el tubo Nº 5, se selló herméticamente y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.

3.7. PRUEBA DE DIFUSIÓN (Método de Kirby Bauer)

3.7.1.PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y PLACAS

Se disolvió el agar Müller Hinton previamente esterilizado y se enfrió a 45°C, luego se vertió el medio fundido en las placas Petri estériles, sobre una superficie nivelada y horizontal hasta una altura aproximada de 4 mm. Se dejó solidificar el medio.

3.7.2.PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se seleccionó 4 colonias de las cepas bacterianas en estudio, se transfirió estas bacterias con ayuda de un asa de Kolle a varios tubos conteniendo aproximadamente 3 mL de caldo nutritivo. Después se incubaron los tubos a 37 °C por 24 horas en una estufa hasta que se produzca una suspensión de microorganismos con turbiedad equivalente al tubo N° 5 de la Escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), el crecimiento bacteriano se dio dentro de las 24 horas (Madigan et al., 2000).

3.7.3.SIEMBRA DEL INÓCULO EN LAS PLACAS PETRI

Se realizó 6 excavaciones de 10 mm de diámetro por placa Petri conteniendo agar Müller Hinton. A parte, la comparación de la actividad antibacteriana se realizó en cuatro placas Petri, con el control positivo Ciprofloxacina (1mg/mL) y el control negativo fue agua destilada estéril.

Se empapó un hisopo estéril que se introdujo en el inóculo, después se removió el exceso del inóculo del hisopo por rotación varias veces con presión firme sobre la pared interna del tubo. Se realizó la siembra directamente de la bacteria en estudio elegida en una placa Petri, utilizando un hisopo estéril por agotamiento se sembró en cuatro direcciones (horizontal, vertical, oblicuo y circular), evitándose dejar marcas sobre la superficie del agar Müller Hinton.

En cada pocillo se agregó 100 µL de las diferentes concentraciones del extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".

Luego se colocaron las placas Petri a la estufa a 37°C por 24 horas (Madigan et al., 2000).

Todos los ensayos de actividad antibacteriana se realizaron por triplicado.

3.7.4. LECTURA DE PLACAS

El registro de la medida del diámetro de cada zona de inhibición (incluyendo el diámetro del orificio del pocillo), se realizó con ayuda de una regla milimetrada (Cáceres, 1996) (Madigan et al., 2000).

3.7.5. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana"

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro del halo del fármaco}} \times 100$$

3.8. MÉTODO DE DILUCIÓN

Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de un agente antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo). En general se prepararon diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base a 2; se inoculó la suspensión microbiana en el medio de cultivo y se hizo su respectiva incubación, se realizó la lectura de la turbidez generada, determinando qué concentración del agente antimicrobiano está generando la inhibición del crecimiento del microorganismo.

3.8.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Se define como la menor concentración de principio activo que inhibe el crecimiento *in vitro* de las bacterias ensayadas (Koneman et al., 1992) (Schoennech et al., 1985).

3.8.2.CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Es la concentración más baja de un fármaco que produce la muerte del 99,9% del microorganismo probado y solo permite la supervivencia del 0.1% de los microorganismos en cultivo (Koneman et al., 1992)(Schoennech et al., 1985).

Ambas pruebas, la CMI y CMB se efectúan bajo condiciones estandarizadas y se expresan generalmente en mg del fármaco.

A fin de diferenciar la actividad bacteriostática de la bactericida, se realizó una siembra de la zona de inhibición a las placas de cultivo estériles. Esta siembra consistió en coger una asada en la zona de inhibición las que fueron sembradas sobre placas de agar Müller Hinton y luego incubadas a 37°C por 24 horas. La confirmación de la actividad bacteriostática se evidenció por el crecimiento de los microorganismos de prueba (Washington, 1984).

3.8.3.PREPARACIÓN DEL INÓCULO

a. Método de suspensión directa de colonias:

A partir de una placa de cultivo de 24 horas, se cogió 4 colonias con un asa de Kolle y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al tubo N° 5 de la Escala de Mc Farland en una solución salina fisiológica. Agitando luego durante 15 – 20 segundos.

b. Inóculo:

Se preparó verificando la turbidez con la Escala de Mc Farland $1,5 \times 10^9$. Una vez ajustado el inóculo y dentro de los 15 minutos de preparado, se procedió a diluir en caldo nutritivo para lograr 0.1/9.9 (inóculo de trabajo = $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

c. Determinación de la CMI

➤ A partir de la solución madre del extracto etanólico, se realizó diluciones en caldo nutritivo, hasta obtener las concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25 0.625 y 0.312 mg/mL.

- 1 mL de la suspensión de los microorganismos ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) se agregó a los tubos que contienen 1mL de caldo nutritivo con el extracto etanólico en sus concentraciones indicadas (mg/mL).
- Luego los tubos contienen 2 mL con $1,5 \times 10^7$ UFC/mL con el extracto etanólico en las concentraciones indicadas (mg/mL).
- Se incubó durante 24 horas a 37°C.
- El punto final de la CMI, se definió a simple vista por la falta de turbidez en el caldo, para ello se comparó el tubo con el control de crecimiento.

d. Determinación de la CMB

- Luego de haber observado la turbidez a simple vista 0.1 mL de los caldos no turbios se cultivó en agar Müller Hinton.
- Se incubó por 24 horas a 37 °C.
- Se determinó la UFC en los subcultivos de los caldos no turbios.
- Se determinó la CMB verificando si el crecimiento corresponde menos del 0.1% del inóculo original.

3.9. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos son representados en cuadros y gráficos donde se muestra estadísticos de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de comparar el efecto de las concentraciones del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", se efectuó el análisis de varianza y en caso de tener significancia estadística se empleó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

IV. RESULTADOS

Tabla N° 02. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana". Ayacucho–2010.

Metabolitos Secundarios	Ensayo	Extracto etanólico	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	-	No precipita
	Mayer	-	No precipita
	Wagner	-	No precipita
Quinonas	Bomträger	+	Coloración rojo pálido
Lactonas y Cumarinas	Baljet	+	Coloración rojo pálido
Glucósidos Cardiotónicos	Kedde	-	No hay coloración
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intensa
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración rojo cereza
Azúcares Reductores	Fehling	++	Coloración anaranjada
Aminoácidos Libres	Ninhidrina	-	No hay coloración
Triterpenos y Esteroides	Liebermann – Burchard	+++	Coloración verde oscuro – negro
Catequinas	Catequinas	+++	Mancha verde carmelita a la luz UV
Antocianidinas	Antocianidinas	-	No hay coloración
Resinas	Resinas	+++	Precipitado blanco
Saponinas	Espuma	++	Presencia de espuma

Leyenda: (-): Ausente (+): Escasa (++) : Buena (+++) : Excelente

Tabla Nº 03. Metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana". Ayacucho–2010.

Metabolitos Secundarios	Ensayo	Extracto acuoso	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	-	No precipita
	Mayer	-	No precipita
	Wagner	-	No precipita
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	++	Coloracion verde intensa
Flavonoides	Shinoda	++	Coloracion rojo cereza
Saponinas	Espuma	+++	Presencia de espuma
Azúcares reductores	Fehling	+++	Coloracion rojo ladrillo
Mucílagos	Mucílagos	-	No hay coagulación
Principios amargos	Principios amargos	++	Ligeramente amargo

Leyenda: (-): Ausente (+): Escasa (++) : Buena (+++) : Excelente

Tabla Nº 04. Valores promedio de halos de inhibición en mm del extracto etanólico frente a las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho– 2010.

Concentraciones del extracto etanólico (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus sp.</i> ATCC77492	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853
100	0.0	0.0	0.0	0.0
80	0.0	0.0	0.0	0.0
60	0.0	0.0	0.0	0.0
40	0.0	0.0	0.0	0.0
20	10.3 ± 0.1	12.4 ± 0.2	11.6 ± 0.1	10.0 ± 0.1
10	21.0 ± 0.1	27.4 ± 0.1	27.2 ± 0.2	20.0 ± 0.2
Ciprofloxacina	36.2 ± 0.2	43.2 ± 0.1	36.6 ± 0.1	36.4 ± 0.2
Agua destilada	0.0	0.0	0.0	0.0

* ANVA $p < 0.05$

* Ciprofloxacina = 1mg/mL

Tabla N° 05. Valores promedio de halos de inhibición en mm del extracto acuoso frente a las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho – 2010.

Concentra- ciones del extracto etanólico (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus sp.</i> ATCC77492	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
100	0.0	0.0	0.0	0.0
80	0.0	0.0	0.0	0.0
60	0.0	0.0	0.0	0.0
40	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0
Ciprofloxacina	34.6 ± 0.1	41.2 ± 0.2	35.3 ± 0.1	37.6 ± 0.1
Agua destilada	0.0	0.0	0.0	0.0

* ANVA $p < 0.05$

Tabla N° 06. Porcentaje de inhibición de las cuatro cepas bacterianas en estudio a la concentración de 10 mg/mL y 20 mg/mL del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana" frente a la Ciprofloxacina. Ayacucho– 2010.

BACTERIAS	% INHIBICIÓN	
	10 mg/mL	20 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	58.01 ± 0.04 %	28.45 ± 0.12 %
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	63.43 ± 0.09 %	28.70 ± 0.39 %
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	74.32 ± 0.35 %	31.69 ± 0.19 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	54.95 ± 0.25 %	27.47 ± 0.12 %

* ANVA $p < 0.05$

Tabla Nº 07. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) en mg/mL del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana" frente a las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho – 2010.

Concentración (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus</i> sp. ATCC 77402	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25822	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
20	-	-	-	-
10	-	CMB	CMB	CMI-CMB
5	CMB	CMI	CMI	+
2.5	CMI	+	+	+
1.25	+	+	+	+
0.625	+	+	+	+
0.312	+	+	+	+

Leyenda:

(+): Presencia de bacterias;

(-): Ausencia de bacterias

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMB: Concentración Mínima Bactericida.

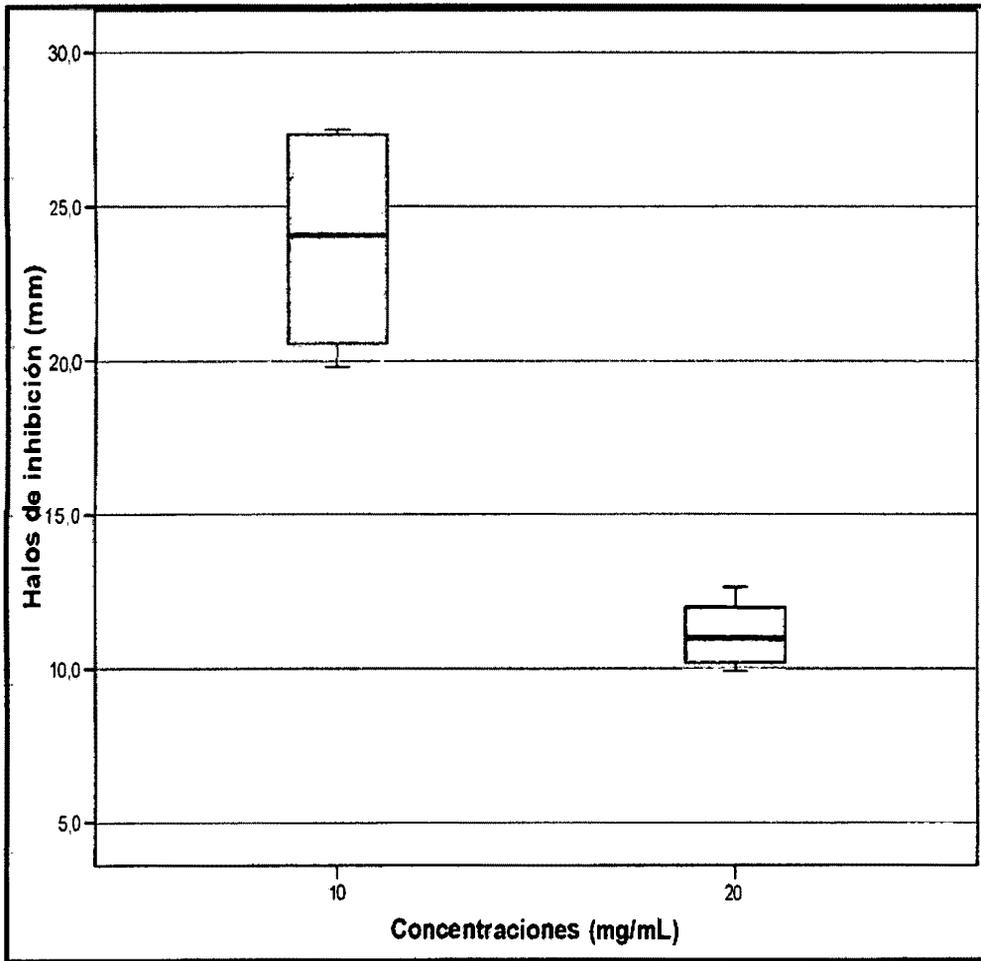
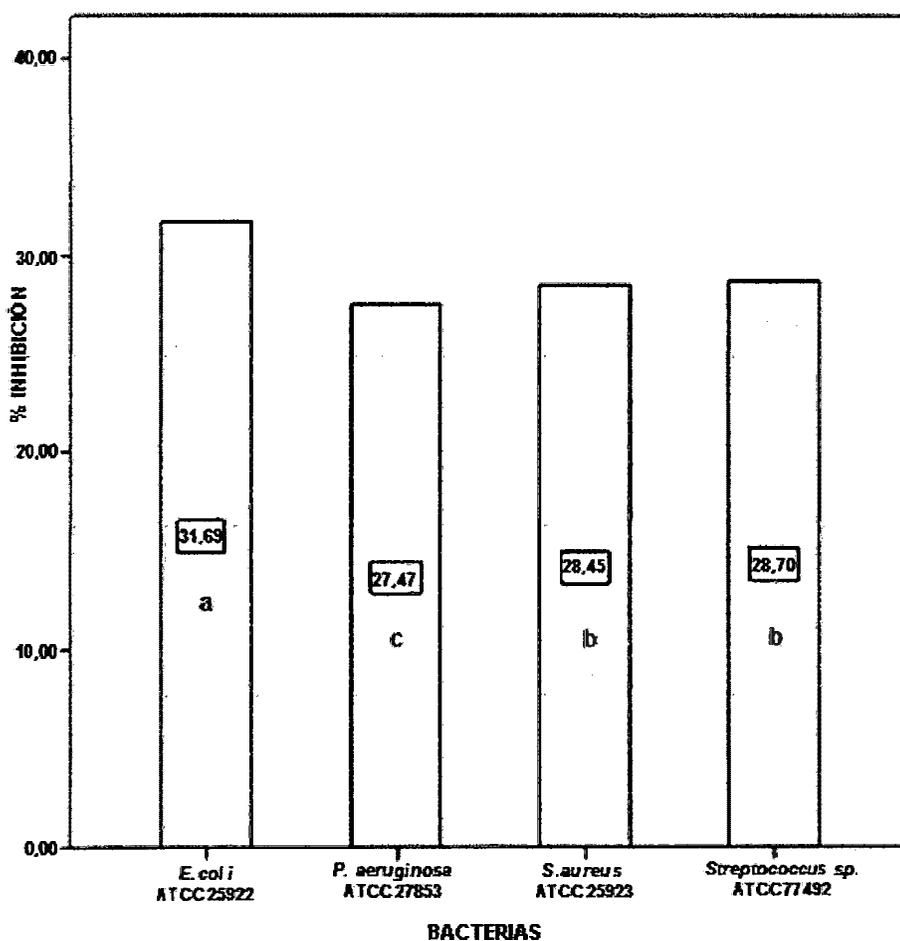


Gráfico N°01. Diagrama de caja de los halos de inhibición generados por dos concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".



a, b, c: Rangos originados por la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Gráfico N° 04. Valores promedio del porcentaje de inhibición de las cuatro cepas bacterianas enfrentadas a la concentración de 20 mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".

V. DISCUSIÓN

El estudio de la actividad antibacteriana realizado en el presente trabajo de investigación constituye uno de los primeros en nuestro medio para *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq., encontrándose escasa bibliografía específica que nos permita realizar comparaciones con nuestros resultados.

En el presente estudio, el extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", fue ensayado en *S.aureus* ATCC 25923, *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *E.coli* ATCC 25922 y *P.aeruginosa* ATCC 27853 para evaluar la actividad antibacteriana comparado con la Ciprofloxacina como patrón de referencia.

Al realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico, se observaron la presencia de compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides, catequinas, resinas, saponinas, antraquinonas, cumarinas, azúcares reductores y aceites esenciales (Tabla N° 02), y en el extracto acuoso; taninos y fenoles, flavonoides, saponinas, azúcares reductores y principios amargos (Tabla N° 03).

Para demostrar la actividad antibacteriana se trabajó con concentraciones de 100, 80, 60, 40, 20 y 10 mg/mL de extracto etanólico, los mismos que se enfrentaron a *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *E.coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, donde se observó halos de inhibición

promedio de 10.3 ± 0.1 mm y 12.4 ± 0.2 mm de diámetro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus sp.* ATCC 77492 a la concentración de 20 mg/mL, y de 21.0 ± 0.1 mm y 27.4 ± 0.1 mm de diámetro a la concentración de 10 mg/mL frente a las cepas bacterianas. Asimismo se observó halos de inhibición promedio de 11.6 ± 0.1 mm y 10.0 ± 0.1 mm frente a *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 a la concentración de 20 mg/mL, y de 27.2 ± 0.2 mm y 20.0 ± 0.2 mm a la concentración de 10 mg/mL frente a las mismas cepas bacterianas en estudio respectivamente (Tabla N° 04).

Del mismo modo se determinó la actividad antibacteriana del extracto acuoso a concentraciones de 100, 80, 60, 40, 20 y 10 mg/mL, los mismos que se enfrentaron a las cuatro cepas bacterianas en estudio, no habiéndose formado los halos de inhibición en ninguno de los casos, demostrándose de esta manera que el extracto acuoso de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. no tiene actividad antibacteriana (Tabla N° 05).

El porcentaje de inhibición de las cepas bacterianas se determinó con las concentraciones de 10 y 20 mg/mL de extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. "chamana" frente a la Ciprofloxacina (1 mg/mL), donde *S. aureus* ATCC 25923 mostró un 58.01 ± 0.04 %, *Streptococcus sp.* ATCC 77492 63.43 ± 0.09 %, *E. coli* ATCC 25922 74.32 ± 0.35 % y *P. aeruginosa* 54.95 ± 0.25 % de porcentaje de inhibición a 10 mg/mL de extracto etanólico (Tabla N° 06).

La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. fue demostrada a concentraciones de 10 mg/mL y 5 mg/mL frente a *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 respectivamente (Tabla N° 07).

con los solventes apolares (diclorometano y acetona) para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* variaron de 16 µg/mL a más de 250 µg/mL.

Según Muhammad et al. (2009), doterminaron la actividad antibacteriana de los extractos etanólico y n – hexano, diclorometano, etil acetato, n – butanol y fracciones acuosas de *D.viscosa* que fueron probados frente a bacterias Gram positivos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus aereus*, *Micrococcus luteus*, *staphylococcus aureus*, y tres bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

En la investigación preliminar demostraron la inhibición contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En la cromatografía de capa delgada, las fracciones demostraron zonas de inhibición con diversos valores del Rf frente a *Bacillus Subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* demostrándose la presencia de componentes antibacterianos.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las fracciones crudas mostraron un rango de 5 a 20.0 mg/mL. Los niveles altos de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) de las fracciones fueron atribuibles al hecho de que éstos presentaron ciertos componentes activos de crecimiento para las bacterias, de tal modo, necesitando la presencia de gran cantidad de fracciones del extracto crudo para inhibir su crecimiento.

Getie et al. (2003), demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, metanólico, etanólico y etil acetato do las hojas de *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia*, fueron probados contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Mycobacterium smegmalis*. La mejor actividad fue observada con la prueba de difución líquida realizada con todos los extractos,

donde los extractos etanólico y metanólico de *D. viscosa*, mostraron una buena inhibición contra *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmalis* con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 2.5 mg/mL y 1.25mg/mL respectivamente en el bioensayo.

En el gráfico N° 01, se observa en el diagrama de caja los halos de inhibición promedio de las bacterias en estudio enfrentadas a las concentraciones de 10 y 20 mg/mL del extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq., en el cual, se observa que la mayor inhibición fue a la concentración de 10 mg/mL, mientras el menor valor de inhibición se encontró a la concentración de 20 mg/mL.

Esta diferencia de valores se debió por la presencia de resinas ácidas y grasas presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", tales componentes evitaron una adecuada solubilidad y dispersión homogénea de los metabolitos secundarios en el disolvente, es por ello, el uso del tween 80 como agente emulsificante, fue útil para obtener una óptima dispersión de los principios activos que evitó la formación de zonas oleosas sobre el agar, es así, a la concentración de 10 mg/mL se obtuvo un mejor halo de inhibición, debido a la abundante presencia de flavonoides que le confiere acción antibacteriana, se debería a que éstos, presentan en su estructura hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos, esto resultados se deben probablemente que además de contener sustancias activas de propiedades químicas semejantes, existen otras sustancias como los taninos y principios amargos aromáticos que incrementan en cierta forma esta actividad, estos resultados observados podrían ser causados por un sinergismo de los constituyentes (Lock de Ugaz, 1994).

En el gráfico N° 02, se observa los valores medios de los halos de inhibición de las cuatro cepas bacterianas en estudio enfrentadas a las concentraciones de 10 y 20 mg/mL de extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. en el cual se observa que los mayores valores de inhibición se obtienen a la concentración de 10 mg/mL, mientras a la concentración de 20 mg/mL las cepas bacterianas presentan menores valores de inhibición.

Se obtuvo mejor resultado a la concentración de 10 mg/mL de extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. debido a que los flavonoides presentes, tienen un mecanismo de acción que actúa a través de la inhibición de enzimas claves, tales como las proteína-kinasas, tirosín-kinasas y lípido-kinasas, que participan en la transducción de señales entre las células bacterianas (Cowan, 1999).

En cambio a la concentración de 20 mg/mL, la posible explicación corresponde a la posibilidad que el compuesto activo no alcance el sitio blanco de acción o bien, la estructura de las porinas impida el paso del principio activo al interior de las células bacterianas (Cowan, 1999).

En el gráfico N° 03, se observa el porcentaje de inhibición a la concentración de 10 mg/mL enfrentadas a las cuatro cepas bacterianas en estudio, en el cual, los mayores valores de inhibición fueron para *E. coli* ATCC 25922 y *Streptococcus* sp. ATCC 77492, mientras *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 mostraron menores valores de inhibición. Al realizar la prueba de ANVA se halló significancia estadística ($p < 0.05$), esto nos indica que existe diferencia en por lo menos en una de las bacterias en estudio.

Por ello se realizó la prueba de Tukey, en el cual se determinó que las cuatro cepas bacterianas son diferentes en cuanto a los porcentajes de inhibición que presentan frente al extracto etanólico de concentración 10 mg/mL, siendo *E. coli* ATCC 25922 que presenta mayor porcentaje de inhibición, mientras el menor valor inhibitorio fue para *P. aeruginosa* ATCC 27853 respectivamente.

Por otra parte, el extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. a la concentración de 10 mg/mL, mostró actividad antibacteriana comprobable con el fármaco patrón (Ciprofloxacina) para *E. coli* ATCC 25922, esto es corroborable por (Ramirez y Días, 2007); donde mencionan una acción antibacteriana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición relativo es $> 70 \%$, intermedio entre el $50 - 70 \%$ y baja cuando es $< 50 \%$. Esto explicaría que a ésta concentración, hay una mejor obtención de porcentajes de inhibición, por el sinergismo que se habría dado por el mecanismo de sumación de los componentes activos, debido a que los principios activos presentes en el extracto etanólico producen el efecto por mecanismos diferentes, y juntos dan como resultado un mayor efecto inhibitorio (Cowan, 1999).

En el gráfico N° 04, se observa el porcentaje de inhibición a la concentración de 20 mg/mL enfrentadas a las cepas bacterianas en estudio, en el cual se observa que el mayor valor inhibitorio fue para *E. coli* ATCC 25922, mientras *Streptococcus sp.* ATCC 77492 y *S. aureus* ATCC 25923 mostraron valores similares y finalmente *P. aeruginosa* ATCC 27853 presentó menor valor inhibitorio. Al realizar la prueba de ANVA se halló significancia estadística ($p < 0.05$), esto nos indica que existe diferencia en por lo menos en una de las bacterias en estudio.

Por ello se realizó la prueba de Tukey, en el cual se determinó que por lo menos dos bacterias son similares en cuanto a los valores de porcentaje de inhibición, mientras *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 mostraron diferentes valores inhibitorios respectivamente.

En cambio, el extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. a la concentración de 20 mg/mL, mostró una baja actividad antibacteriana comprobable con el fármaco patrón (Ciprofloxacina) para las cuatro cepas bacterianas, esto es corroborable por (Ramirez y Días, 2007). Esto explicaría que a ésta concentración, las

bacterias fueron menos sensibles al extracto etanólico, debido posiblemente a una enmascaración de los componentes activos por la presencia de resinas, la cual hizo que las bacterias activaran sus mecanismos de defensa como son los compuestos anfipáticos presentados por las bacterias Gram negativas que operan como bombas de expulsión de diversas sustancias, por lo cual, el componente antibacteriano es expulsado de manera inmediata, sin alcanzar a cumplir el efecto inhibitorio (Cowan, 1999).

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", tiene actividad antibacteriana, mientras el extracto acuoso no presenta dicha actividad.
2. El extracto etanólico de hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana" contiene compuestos fenólicos; triterpenos y esteroides; catequinas; resinas; saponinas; antraquinonas; cumarinas; azúcares reductores y aceites esenciales, y el extracto acuoso posee taninos; flavonoides; saponinas; azúcares reductores y principios amargos.
3. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico son de 5 y 10 mg/mL frente a *Streptococcus sp.* ATCC 77492, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
4. Se comparó los resultados obtenidos del extracto etanólico con el estándar ciprofloxacina 1mg/mL, demostrándose porcentajes de halos de inhibición de 74.32 ± 0.35 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, 63.43 ± 0.09 % frente a *Streptococcus sp.* ATCC 77492, 58.01 ± 0.04 % frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 54.95 ± 0.25 % frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a concentración de 10 mg/mL del extracto etanólico.

VII. RECOMENDACIONES

1. En futuras investigaciones utilizando esta planta se debe hacer un tratamiento para la extracción de resinas y de esta forma evitar interferencias en su actividad antibacteriana.
2. Continuar con el estudio de la especie vegetal *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", para aislar, caracterizar y elucidar sus componentes químicos.
3. Determinar la toxicidad de esta especie vegetal, a fin de proponer su adecuado uso a nivel posológico y fitoterapéutico.
4. Profundizar estudios microbiológicos y farmacológicos en el extracto etanólico para una futura obtención de una fórmula farmacéutica.
5. Realizar estudios de conservación y manejo de la especie vegetal *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana", y así evitar la destrucción, uso desmesurado y extinción en el departamento de Ayacucho.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguilar, E., Aronés, N. y Cárdenas, V.** 1999. Guía de Práctica de Farmacognosia II. E.F.P. de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho, Perú.
2. **Alarcón, J., Ango, H., Cárdenas, V. y Guevara, R.** 2010. Guía de Prácticas de Microbiología Clínica. E.F.P. de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho, Perú.
3. **Arrillaga de Maffei, B.** 1969. Plantas Medicinales. Editorial Nuestra tierra. Edición Ampa. Montevideo, Uruguay.
4. **Aswal, B., Bhakuni, D., Goel, A., Kar, K. and Mehrotra, B.** 1984. Screening of Indian Plants for Biological Activity-Part XI, Indian Journal Express. Biol. 22, p. 487. India.
5. **Bruneton, J.** 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Segunda edición. Acribia S.A. Zaragoza, España.
6. **Cáceres, A.** 1996. Plantas Medicinales de Guatemala. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos. Guatemala.
7. **Camacho, F., Gonzales, V. y Olivera, A.** 1992. Germinación y Manejo en Vivero del Chapulixtle (*Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.). Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigación de la Región del Centro, Campo Experimental Coyoacán. México, D.F.
8. **Calderón de Rzedowski, G. y Rzedowski, J.** 2006. *Sapindaceae*. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. Fascículo N° 142, p.15 – 23. México.
9. **Cowan, M.** 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology. Rev. 12(4):564 – 582.
10. **Eloff, J.** 1998. A sensitive and quick microplate method to determine Minimum Inhibitory Concentration of plant extracts of bacteria. *Planta Medica*. (64):711 – 714.
11. **Ewing, W. and Edwards, E.** 1985. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th edition. Edit. Elsevier. USA.
12. **Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica, Inc.** 1995. USP XXIII. NF 18. Washington, USA.
13. **Flores, J.** 1997. Farmacología humana. Tercera edición. Masson, S.A. Barcelona, España.

14. **Forbes, B., Sahn, D. and Weissfell, A.** 2007. Diagnostic Microbiology. 11th Edition. Mosby, Inc. Elsevier: St. Louis Missouri, USA, p. 205.
15. **Getie, M. et al.** 2003. Evaluation of the antimicrobial and antiinflammatory activities of medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Phytotherapy*. 74 (1-2):139–143.
16. **Ghisalberti, E.** 1998. Ethnopharmacology and phytochemistry of *Dodonaea* species. *Phytotherapy*, Vol. LXIX, p. 99 – 113. India.
17. **Gislene, G., Juliana, L., Paulo, C. and Giuliana, L.** 2000. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic Resistant Bacteria. *Brazil Journal Microbiological*, (31):247 –256. Brasil.
18. **Harrison, P.** 1983. Farmacognosia I. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, Perú.
19. **Jawetz, E., Melnick, J. y Adelberg, E.** 2006. Microbiología Médica. Décima edición. Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. Cuba.
20. **Khan, M., Shamshad, A. and Jain, P.** 1988. Chemical investigation of root bark of *Dodonaea viscosa* Linn. *Journal Nature. Products*. (4):12–13.
21. **Kirtikar, K. and Basu, B.** 1995. Indian Medicinal Plants. (International Book Publisher, Dehradun, India), (1):641 –643.
22. **Koneman, E., Allen, S., Dowell, V., Janda, W. y Winn, C.** 1992. Diagnóstico Microbiológico. Tercera edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
23. **Krupanidhi, A., Vagdevi, H. and Shreedhara C.** Study of analgesic and anticonvulsant activities of ethanolic extracts of *Dodonaea viscosa* Jacq. Seeds. India; disponible en: www.rirdc.gov.au/eshop, 2008.
24. **Leyva, S. y Leyva, E.** 2008. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quim. Méx.* 2(1):1 –13.
25. **Lock de Ugaz, O.** 1994. Investigación fitoquímica. Métodos de Estudio de los Productos Naturales. Segunda edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
26. **López, A.** 2006. Catálogo de la Flora del Departamento de Cajamarca. *Amaldoa* 13(2):360 – 369. Perú.

27. **Madigan, T., Martinko, J. y Parker, J.** 2000. *Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, España.
28. **Mantilla, J. y Olazábal, O.** 2008. *Pachamama Hampi Qhoranchiskuna. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra - Valle Sagrado de los Inkas*. Cusco, Perú; disponible en:
http://www.andeanmedicine.com/.../Plantas_Medicinales_Cusco.pdf.
29. **Martínez, M.** 2001. *Flavonoides*. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
30. **Miranda, M. y Cuellar, A.** 2000. *Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana, Cuba.
31. **Muhammad, K., Murad, A. and Abdul, H.** 2009. Antibacterial Activity of *Dodonaea viscosa* using Contact Bioautography Technique. *Molecule* (14):1332 – 1341.
32. **Murphy, C.** 1999. *Plants Products as Antimicrobial Agents*. Oxford, UK.
33. **Nadkarni, K. and Nadkarni, A.** 1982. *Indian's medica matter*. Vol. I. Bombay Popular Prakashan. Bombay, India, p. 457.
34. **Nataro, J. and Kaper, J.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology. Rev.*(11):142–201.
35. **Neidhardt, F.** 1999. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. 2dn edition. ASM Press. Washington, USA.
36. **Ortega, A., García, P., Cárdenas, J., Mancera, C. and Maldonado, E.** 2001. Methyl Dodonates, A New Type of Diterpenes with a Modified Clerodane Skeleton from *Dodonaea viscosa*. *Tetrahedron*. (57): 2981 – 2989. México.
37. **Painter, G.** 1998. *A herbalists medicine-making workbook*. Gilian Painter. Auckland, Australia.
38. **Palomino, J.** 2000. *Actividad antibacteriana de Punica granatum "granado" en Cepas de Vibrio cholerae y Escherichia coli. Aisladas de Pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)*. Ayacucho 2000. Tesis. UNSCH. Ayacucho, Perú.
39. **Pirzada, A., Shaikh, W., Usmanghani, K. and Mohiuddin, E.** 2010. Antifungal activity of *Dodonaea viscosa* Jacq. extract on pathogenic fungi isolated from superficial skin infection. *J. Pharm. Sci.*, Vol 23, Nº. 3, p. 337 – 340. Pakistan.

40. **Porter, M.** 1970. The genus *Dodonaea* (*Sapindaceae*) in the Galápagos Islands. In: Occasional Papers of The California Academy of Sciences. USA.
41. **Rachel, M., José, L., Daniel, C., Rogelio, P., Perla, C. and Federico, D.** 1991. Chemical Studies On Mexican Plants Used In Tradicional Medicine, XVIII. New Secondary Metabolites from *Dodonaea viscosa*, Journal of Natural Products, Vol. 54, Nº. 3, p. 913–917. México.
42. **Ramachandran, N., Subramanian, A. and Sankara, S.** 1975. Isorhamnetin and quercetin glycosides from *Dodonaea viscosa* and *Sapindus emarginatus*. Indian J. Chem. (13):639 – 640.
43. **Ramírez, L y Díaz, M.** 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibardo (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica. 13 (33):397 – 400.
44. **Ríos, J. and Reico, M.** 2005. Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. Journal Ethnopharmacology. (100):80 – 84.
45. **Rojas, A., Hernández, L., Pereda, R. and Mata, R.** 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal Ethnopharmacology. (35):275 – 283. México.
46. **Rojas, A., Cruz, S., Ponce, M. and Mata, R.** 1996. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. Planta Medica. (62):154 –159.
47. **Sachdev, K. and Kulshreshtha, D.** 1983. Flavonoids from *Dodonaea viscosa*. Phytochemistry. (22):1253 –1256.
48. **Sachdev, K. and Kulshreshtha, D.** 1986. Viscosol a C-3' prenylated flavonoid from *Dodonaea viscosa*. Phytochemistry. (25):1967 –1969.
49. **Saily, A., Sahu, R., Gupta, B. and Sondhi, S.** 1994. Analysis of mineral elements of medicinal plants used for the treatment of asthma, syphilis, diarrhea, skin diseases and rheumatism. Hamd. Med. (37):18– 22.
50. **Salazar, V.** 2006. Infecciones estreptocócicas. Escartatina. Tratado de Pediatría. Séptima edición. La Habana, Cuba.
51. **Sánchez, R.** 1997. *Staphylococcus*. Un patógeno de gran virulencia. Revista Médica. Edición Nº 16 –17. Lima Perú.
52. **Soberón, G.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

53. **Schoennecht, F., Sabath, L. and Thornsbrry, L. Susceptibility Test: Special Test. In Lennette and Others. 1985. Manual Of Clinical Microbiology. 4th edition. USA.**
54. **Sukkawala, V. and Desai, V. 1962. Physiological activity of the leaves of *Dodonaea viscosa*. Journal Sciences. Ind. Res. (21): 349–351.**
55. **Teffo, L., Aderogba, M. and Eloff, J. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. Phytomedicine Programme, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, South Africa, p.1 – 5.**
56. **Todd, J. 2000. Infecciones estreptocócicas. En: Tratado de Pediatría. Décima sexta edición. Editorial McGraw- Hill. Madrid, España.**
57. **Torres, C. 2007. Investigación en procesos de transformación de sustancias de interés presentes en hojas, tubérculos, semillas y frutos de especies andinas, para generar productos agroindustriales que pueden ser destinados a nivel industrial, medicinal o alimenticio. Segundo Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis – Subdirección Científica. Bogotá, D.C.**
58. **Vanaclocha, B. 2003. Fitoterapia. Cuarta edición. Editorial Masson S.A. Madrid, España.**
59. **Vilar – Compte, D. 2003. Brote de *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizados. Rev. Salud Pública México. (45):371 – 378.**
60. **Villar del Fresno, M. 1999. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. Madrid, España.**
61. **Wagner, H., Ludwig, C., Grotjahn, L. and Khan, M. 1987. Biologically Active Saponins from *Dodonaea Viscosa*. Phytochemistry. 26(3): 697 – 702. Oxford, UK.**
62. **Wallace, J. 2004. Symposium on plants as animal food: a case of catch 22 antimicrobial properties of plant secondary metabolites.**
63. **Washington, J. 1984. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology.1st Edition by Little Brow and Company. USA.**
64. **Yarupaitán, G. y Galván, J. 2004. Fanerógamas de la provincia de Huancayo, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Rev. Perú, biol. 11(2):193 – 202. Lima-Perú.**

IX. ANEXOS

ANEXON°01

Tabla N° 07. Análisis de varianza de dos concentraciones del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana" para las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho–2010.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1138,526(a)	7	162,647	7653,958	,000
Intersección	7339,504	1	7339,504	345388,41	,000
Bacterias	114,251	3	38,084	1792,176	,000
Concentraciones mg/mL	986,884	1	986,884	46441,588	,000
Bacterias * Concentraciones mg/mL	37,391	3	12,464	586,529	,000
Error	,340	16	,021		
Total	8478,370	24			
Total corregida	1138,866	23			

a R cuadrado= .967 (R cuadrado corregida = .960)

Si: Sig > 0.05: todos los tratamientos son estadísticamente similares.

Si: Sig. < 0.05: Por lo menos uno de los tratamientos es diferente del resto.

ANEXON°02

Tabla N° 08. Valores de las medias marginales estimadas para las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho – 2010.

Bacterias	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Limite inferior	Limite superior
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19,400	,060	19,274	19,526
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	15,000	,060	14,874	15,126
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15,650	,060	15,524	15,776
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	19,900	,060	19,774	20,026

ANEXON°03

Tabla N° 09. Valores de las medias marginales estimadas para las concentraciones del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana". Ayacucho–2010.

Concentraciones (mg/mL)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
10	23,900	,042	23,811	23,989
20	11,075	,042	10,986	11,164

ANEXO N° 04

Tabla N° 10. Valores de las medias marginales estimadas de los halos de inhibición de las cuatro cepas bacterianas en estudio versus las dos concentraciones del extracto etanólico de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana". Ayacucho – 2010.

Bacterias	Concentraciones (mg/mL)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Limite inferior	Limite superior
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	27,200	,084	27,022	27,378
	20	11,600	,084	11,422	11,778
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	20,000	,084	19,822	20,178
	20	10,000	,084	9,822	10,178
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10	21,000	,084	20,822	21,178
	20	10,300	,084	10,122	10,478
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	10	27,400	,084	27,222	27,578
	20	12,400	,084	12,222	12,578

ANEXON°05

Tabla N° 11. Prueba de Tukey de las medias de los halos de inhibición para las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho – 2010.

DHSdeTukey

Bacterias	N	Subconjunto			
	1	d	c	b	a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6	15,000			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6		15,650		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6			19,400	
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	6				19,900
Significación		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,021.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b Alfa= ,05.

ANEXO N°06

Tabla N° 12. Valores descriptivos y análisis de varianza del porcentaje de inhibición a la concentración de 10 mg/mL del extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. "chamana" enfrentadas a las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho–2010.

Bacterias	N	Media	Desviación típ.	Error típ.	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3	74,3167	,34501	,19919	73,4596	75,1737
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	54,9467	,24502	,14146	54,3380	55,5553
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	58,0100	,04000	,02309	57,9106	58,1094
<i>Streptococcus sp.</i> 77492	3	63,4267	,08505	,04910	63,2154	63,6379
Total	12	62,6750	7,70551	2,22439	57,7792	67,5708

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	652,748	3	217,583	4631,884	,000
Intra-grupos	,376	8	,047		
Total	653,124	11			

ANEXO N°07

Tabla N° 13. Prueba de Tukey del porcentaje de inhibición a la concentración de 10 mg/mL para las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho–2010.

HSDdeTukey

Bacterias	N	Subconjunto para alfa = .05			
	1	d	c	b	a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	54,9467			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3		58,0100		
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	3			63,4267	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3				74,3167
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANEXON°08

Tabla N° 14. Valores descriptivos y análisis de varianza del porcentaje de inhibición a la concentración de 20 mg/mL del extracto etanólico de *D. viscosa* (L.) Jacq. "chamana" enfrentados a las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho – 2010.

Bacterias	N	Media	Desviación típ.	Error típ.	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Limite inferior	Limite superior
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3	31,6933	,18502	,10682	31,2337	32,1530
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	27,4700	,12000	,06928	27,1719	27,7681
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	28,4500	,12000	,06928	28,1519	28,7481
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	3	28,7000	,39000	,22517	27,7312	29,6688
Total	12	29,0783	1,66020	,47926	28,0235	30,1332

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	29,889	3	9,963	185,241	,000
Intra-grupos	,430	8	,054		
Total	30,319	11			

ANEXO N°09

Tabla N° 15. Prueba de Tukey del porcentaje de inhibición a la concentración de 20 mg/mL para las cuatro cepas bacterianas en estudio. Ayacucho–2010.

HSDdeTukey

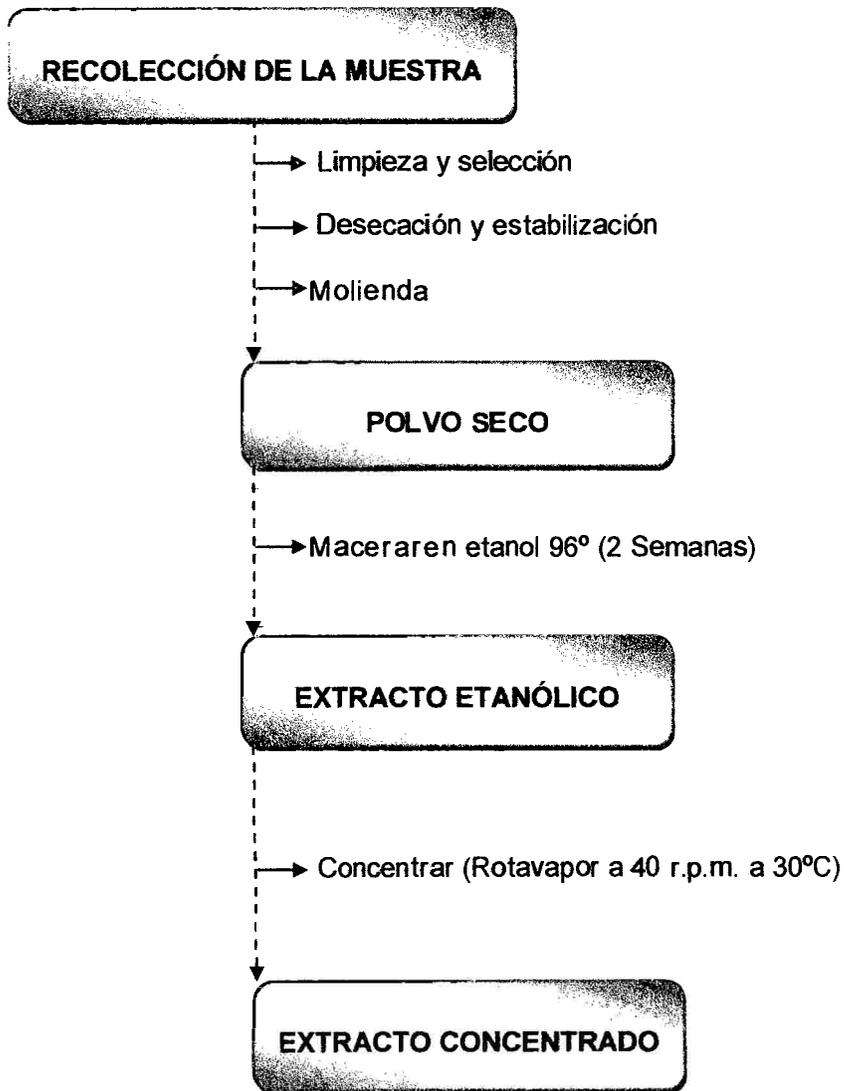
Bacterias	N	Subconjunto para alfa = .05		
	1	c	b	a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	27,4700		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3		28,4500	
<i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492	3		28,7000	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3			31,6933
Significacia		1,000	,576	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

ANEXON° 10

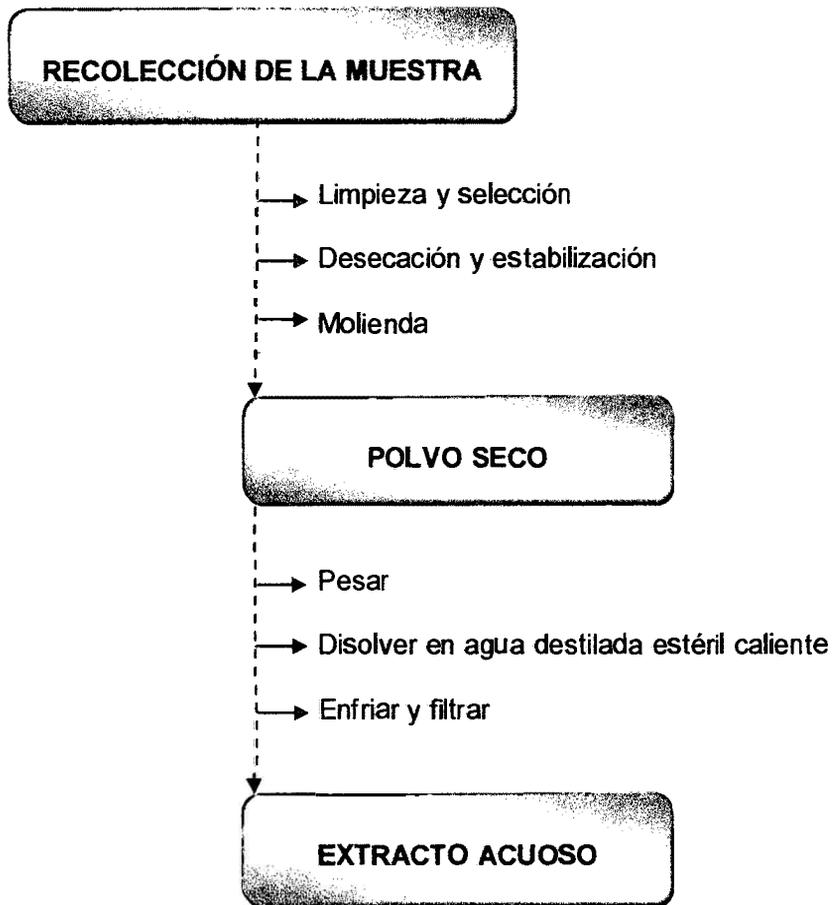
DISEÑO EXPERIMENTAL DEL EXTRACTO ETANÓLICO



Fuente: Lock de Ugaz, (1994)

ANEXO N° 11

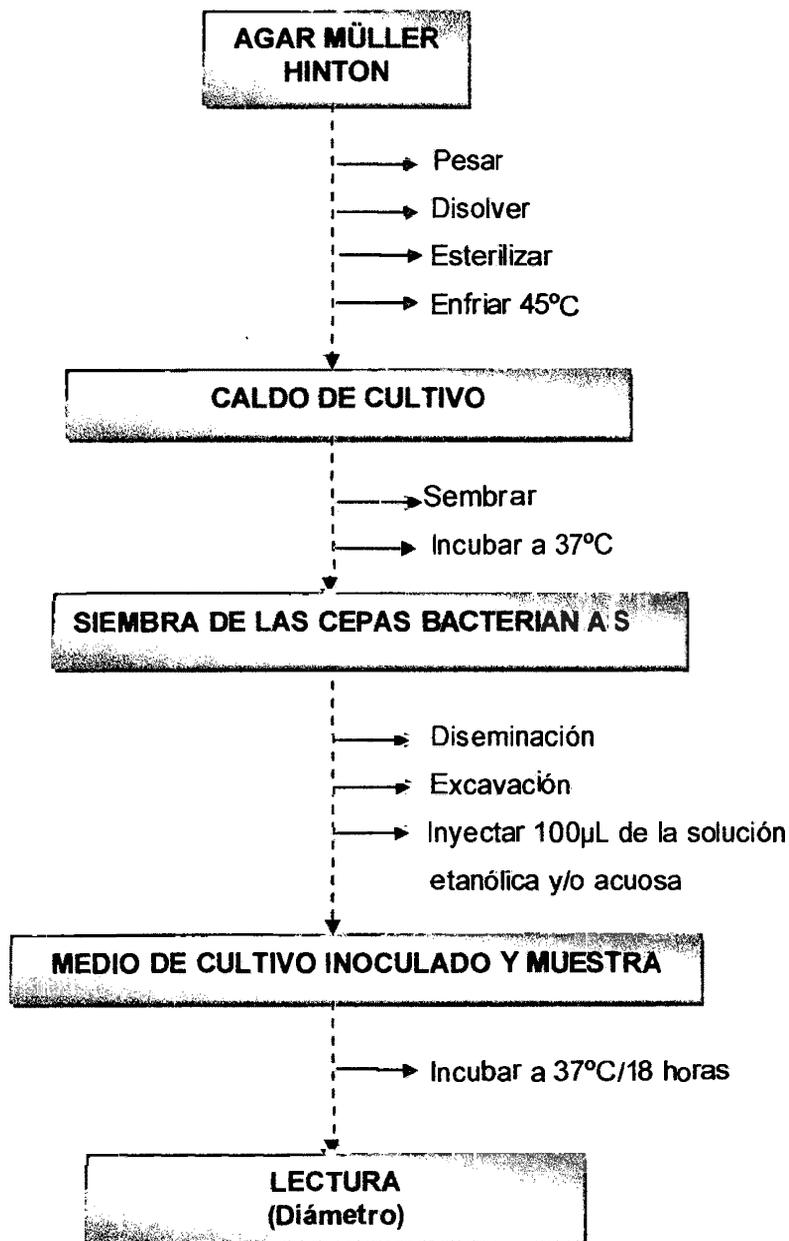
DISEÑO EXPERIMENTAL DEL EXTRACTO ACUOSO



Fuente: Lock de Ugaz, (1994).

ANEXO Nº 12

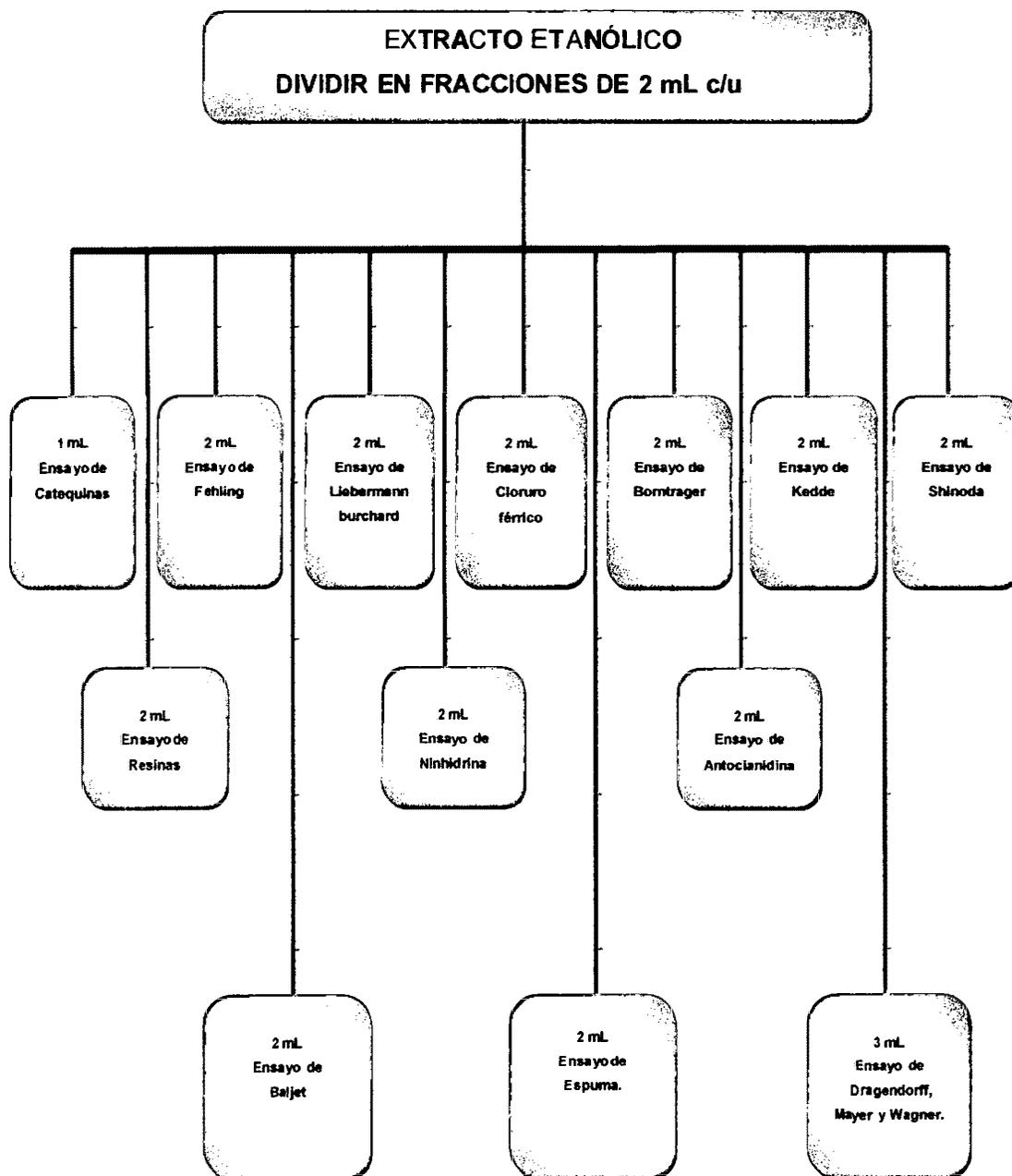
ESQUEMA DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



Fuente: Alarcón et al., (2010).

ANEXON° 13

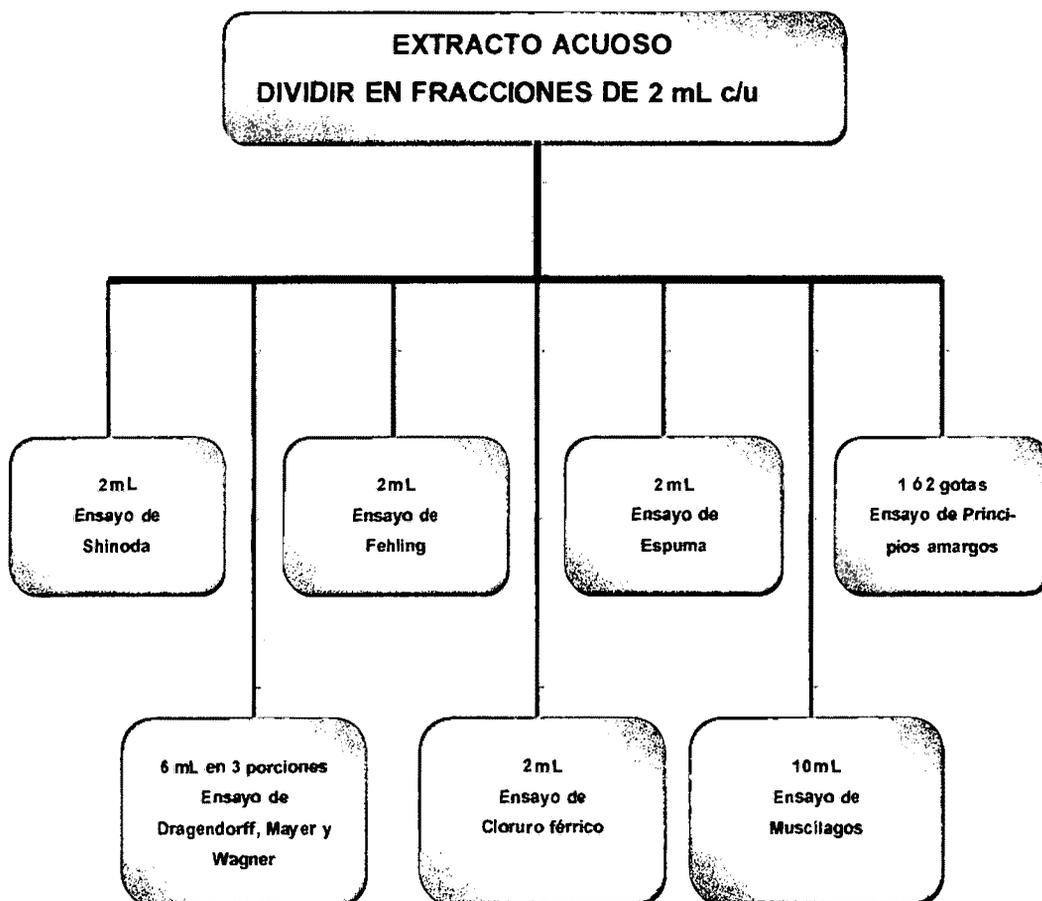
ESQUEMA DEL ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO ETANÓLICO



Fuente: Miranda y Cuellar, (2000).

ANEXON° 14

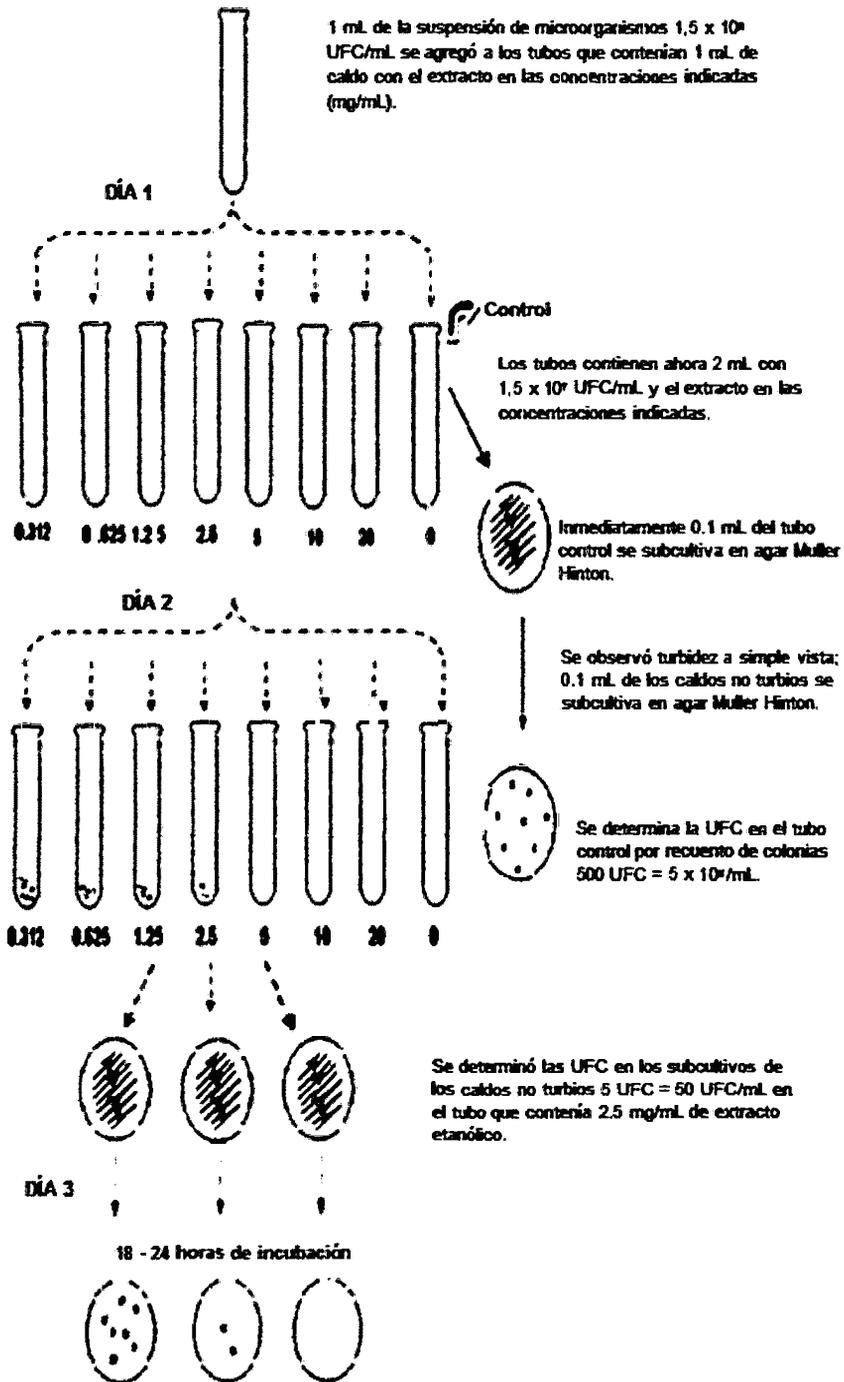
ESQUEMA DEL ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO ACUOSO



Fuente: Miranda y Cuellar, (2000).

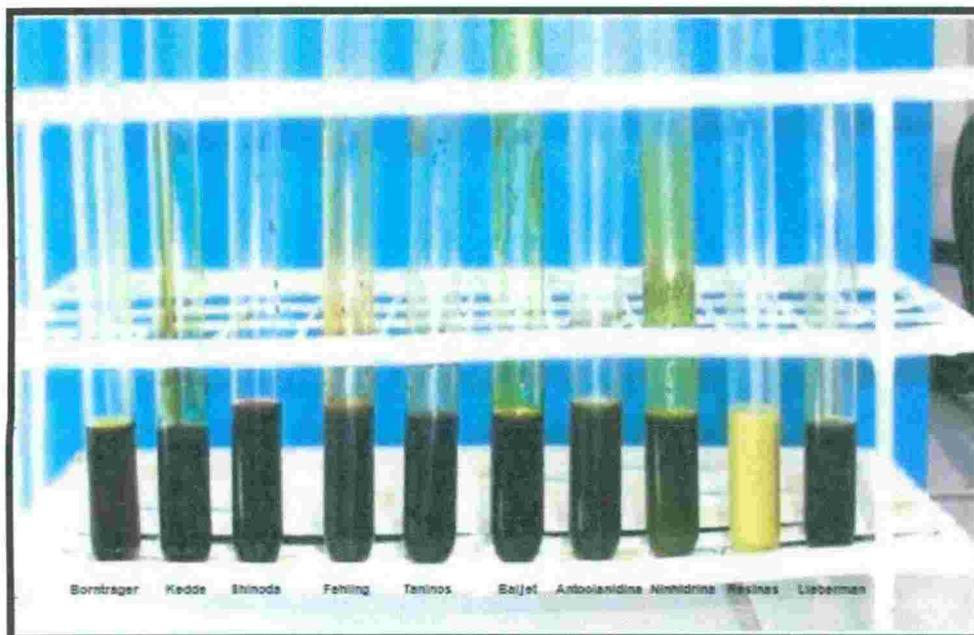
ANEXO N°15

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN DE LA CMI Y CMB PARA MICROORGANISMO Y EXTRACTOS VEGETALES

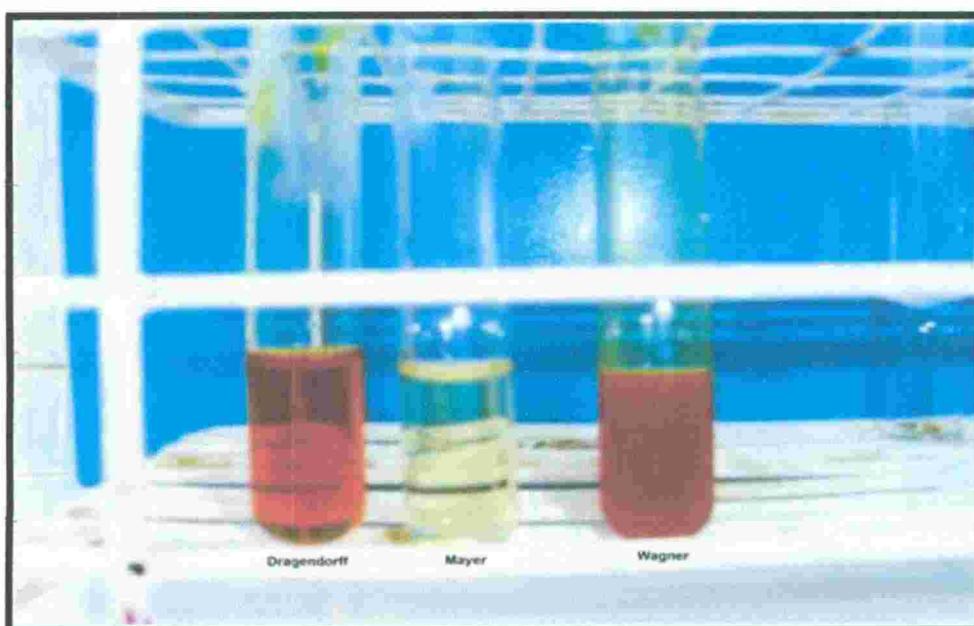


Fuente: Alarcón et al., (2010).

ANEXO Nº 16

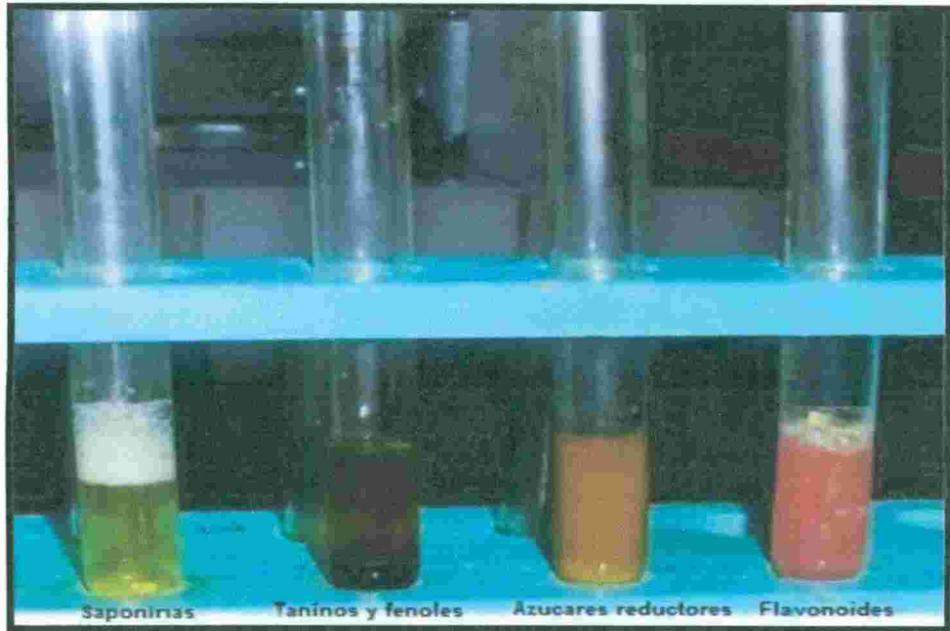


Fotografía Nº 07. Coloraciones características al realizar el reconocimiento de metabolitos secundarios del extracto etanólico en *Dodonaea viscosa* (L) Jacq. "chamana".

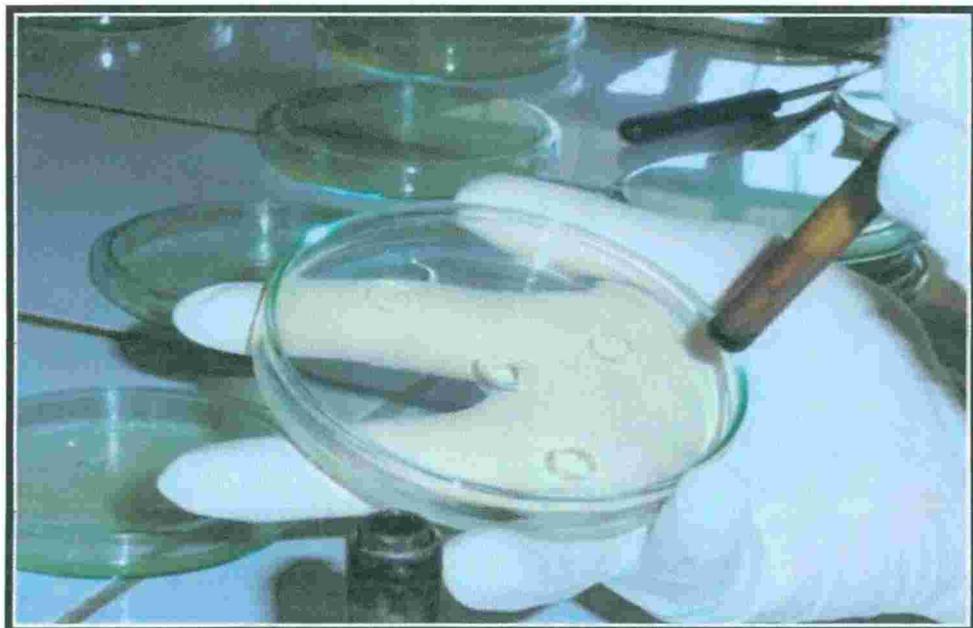


Fotografía Nº 08. Coloraciones características al realizar el reconocimiento de alcaloides en *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".

ANEXO Nº 17



Fotografía Nº 09. Coloraciones características al realizar el reconocimiento de metabolitos secundarios del extracto acuoso en *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. "chamana".



Fotografía Nº 10. Excavación de orificios en placas con agar Müller Hinton.

ANEXO Nº 19



Fotografía Nº 13. Resultados de la formación de los halos de inhibición en las cuatro cepas bacterianas en estudio.

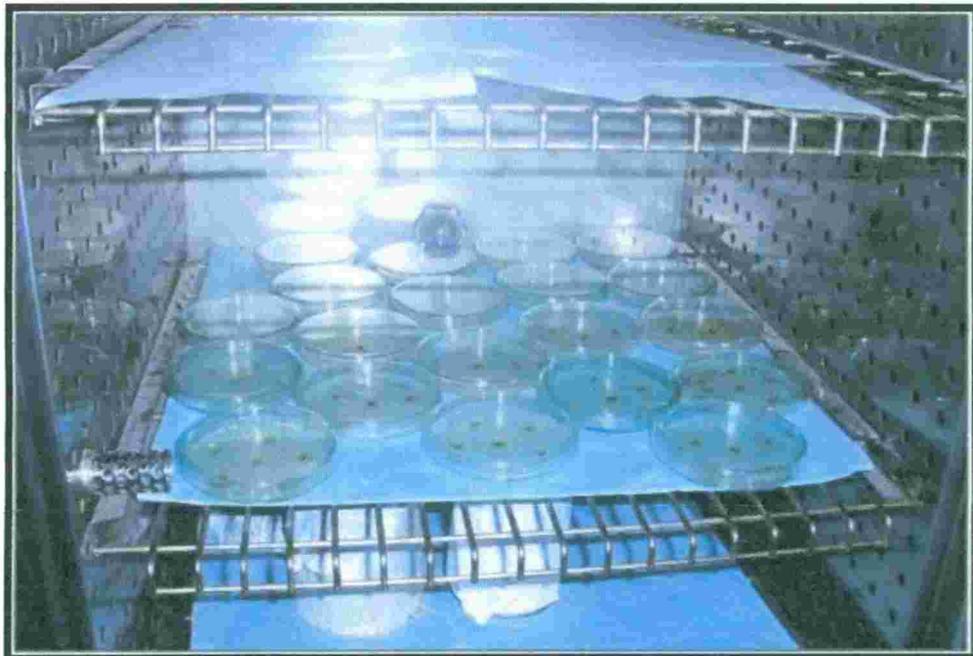


Fotografía Nº 14. Grupo de tubos con el extracto etanólico diluidos a diferentes concentraciones (lado izquierdo) y tubos conteniendo las cuatro cepas bacterianas en estudio comparados con la Escala de Mc Farland (lado derecho).

ANEXO Nº 18

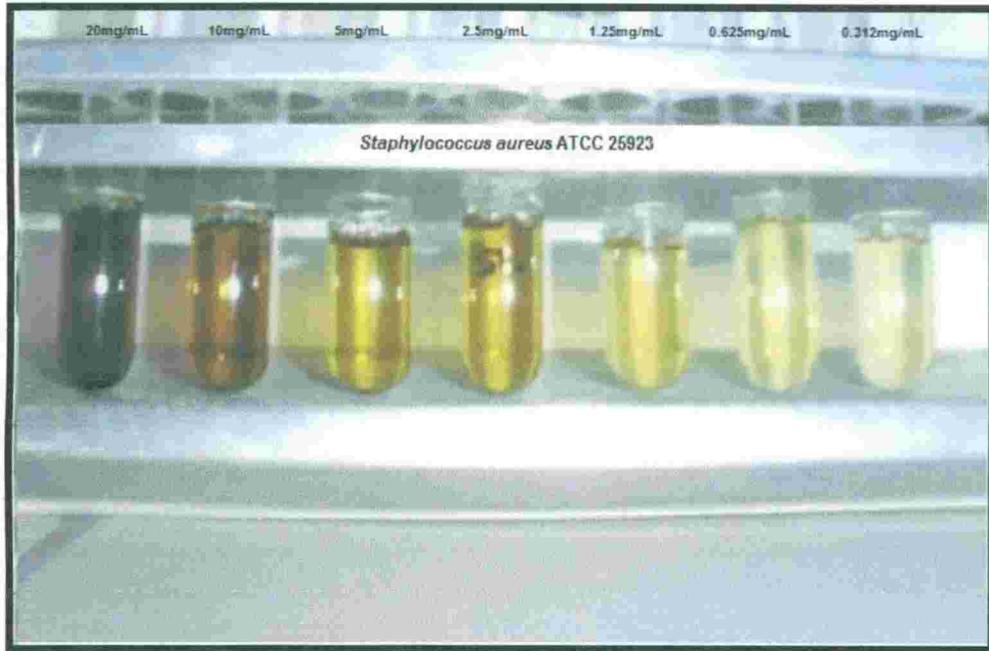


Fotografía Nº 11. Placas Petri inoculados con diferentes concentraciones del extracto etanólico sobre las cuatro cepas bacterianas en estudio.



Fotografía Nº 12. Incubación de las placas Petri a 37°C en la estufa.

ANEXO Nº 20

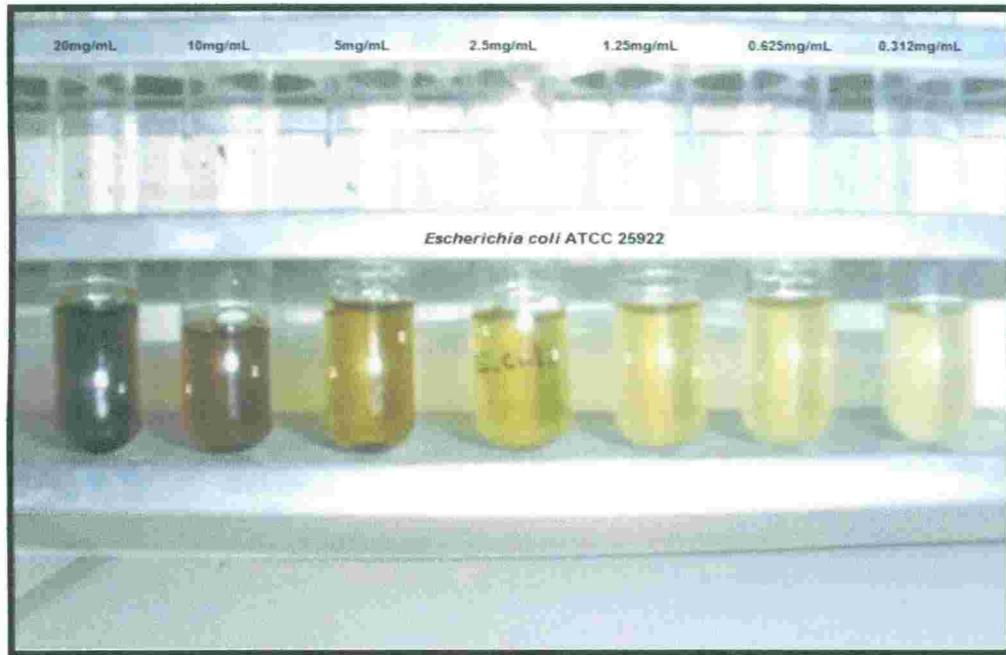


Fotografía Nº 15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

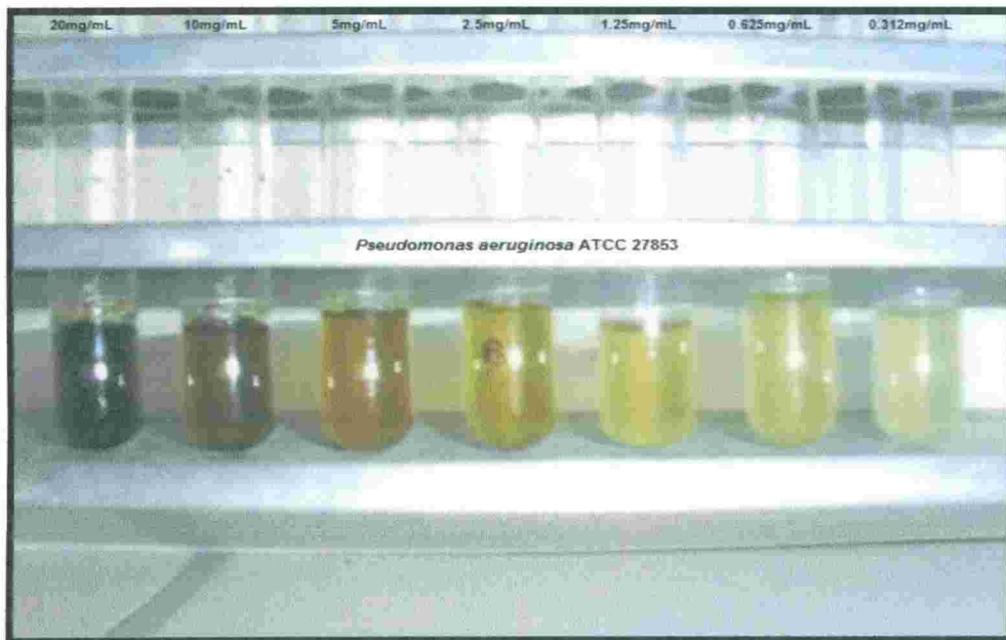


Fotografía Nº 16. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Streptococcus sp.* ATCC 77492.

ANEXO Nº 21



Fotografía Nº 17. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Escherichia coli* ATCC 25922.



Fotografía Nº 18. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

ANEXO N°22

CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.



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, el Bach. En Farmacia y Bioquímica, Sr. Yoel, GUEVARA ROMANÍ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Engler y Prantl, modificado por Melchior en 1904, y es como sigue:

DIVISIÓN	:	ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)
CLASE	:	DICOTILEDONEAE
SUBCLASE	:	ARCHYCLAMIDEAS
ORDEN	:	SAPINDALES
FAMILIA	:	SAPINDACEAE
GENERO	:	<i>Dodonaea</i>
ESPECIE	:	<i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq.
N.V.	:	"chamana"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 10 de Mayo del 2011



Herbarium Huamangensis

Blga. Laura Aucasime Medina
Jefe

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana". Ayacucho – 2010.	¿Cuál será la actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana"?	<p>Objetivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana". -Realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana". -Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para cada una de las bacterias en estudio. -Comparar los resultados obtenidos del extracto etanólico y acuoso de las hojas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana" frente a la Ciprofloxacina. 	<p><i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana" Arbusto perennifolio, viscido glanduloso, hasta de 5 m de alto; inflorescencias axilares y terminales; flores unisexuales y hermafroditas verdoso amarillentas algo blanquecinas (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2006).</p> <p>Cepas bacterianas Las cepas bacterianas utilizadas para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso serán: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus sp.</i> ATCC 77492, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, suministradas por el Laboratorio del Área Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH.</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> Es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales (Sánchez, 1997).</p> <p><i>Streptococcus sp.</i> comprenden un grupo heterogéneo de bacilarias responsables de diferentes cuadros clínicos (Jawetz, 2006).</p> <p><i>Escherichia coli</i> Es una de las especies bacterianas minuciosamente estudiadas en modelos de investigación metabólica, genética, poblacionales y otra índole (Neidhardt, 1999).</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> Es un bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa, produce pigmentos como la pioclanina, fluoresceína.</p> <p>Ciprofloxacina Es una Fluorquinolona, se utiliza en el tratamiento de infecciones urinarias, intestinales, biliares, profilaxis de la diarrea de los viajeros y descontaminación intestinal en inmunodeprimidos (Flores, 1997).</p> <p>Actividad antibacteriana Es un agente antiinfeccioso de amplio espectro, activo contra un amplio rango de gérmenes aeróbicos Gram positivos y Gram negativos (Flores, 1997).</p>	<p>A menor concentración del extracto etanólico tendrá mayor actividad antibacteriana.</p>	<p>Variable independiente: -Concentración de los extractos etanólico y acuoso de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana".</p> <p>Indicador: Concentraciones de 100, 80, 60, 40 20 y 10 mg/mL.</p> <p>Variable dependiente: -Actividad antibacteriana.</p> <p>Indicador: -Diámetro del halo de inhibición. -Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). -Concentración Mínima Bactericida (CMB).</p>	<p>1. Tipo de Investigación: Básico – experimental.</p> <p>2. Método: Método de Kirby Bauer.</p> <p>3. Diseño: Diseño factorial.</p> <p>4. Muestreo: Población Plantas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana" de la Provincia de Huanta, Ayacucho.</p> <p>Muestra 1 Kg de hojas secas de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana" del Distrito de Iguain (2300-3500 m.s.n.m.).</p> <p>5. Control: 1mg/mL de Ciprofloxacina.</p> <p>6. Técnica: Prueba de difusión en agar Müller Hinton.</p> <p>7. Análisis de datos: Los datos son representados en cuadros y gráficos donde se muestra estadísticos de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de comparar el efecto de las concentraciones del extracto etanólico de <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. "chamana", se efectuó el análisis de varianza y en caso de tener significancia estadística se empleó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D Nº 179-2011-FCB-D

Bach. YOEL GUEVARA ROMANÍ

En la Ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día jueves 09 de junio del dos mil once en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas reunidos los docentes miembros de Jurado bajo la presidencia del Maestro Elmer Ávalos Pérez en su calidad de Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y con la asistencia del Magister Enrique Javier Aguilar Felices, Magister Marco Rolando Aronés Jara y la Magister Rosa Guevara Montero como Asesora del trabajo de investigación, actuando como secretaria docente la Magister Maricela López Sierralta, para recepcionar la tesis titulada: **“Actividad antibacteriana de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. “Chamana”, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica YOEL GUEVARA ROMANÍ, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutico.**

El Decano inicia el acto de sustentación indicando a la secretaria docente la revisión de los documentos en mesa y la lectura de la Resolución Decanal Nº 179 – 2011 – FCB – D, para luego indicar al sustentante, aspectos relacionados al proceso de exposición durante el tiempo correspondiente no mayor a cuarenta y cinco minutos, evitar realizar solo la lectura de las diapositivas empleadas para la exposición del trabajo de investigación. Inmediatamente el sustentante inicia su exposición de tesis durante el tiempo correspondiente haciendo uso del equipo multimedia.

El Decano inicia la segunda etapa de la sustentación en la cual los miembros del jurado calificador realizan las observaciones y preguntas que crean conveniente para realizar la evaluación correspondiente, iniciando su participación el profesor Marco Aronés, luego el profesor Enrique Aguilar y finalmente la profesora Rosa Guevara como Asesora del trabajo de investigación, luego el Decano solicita al sustentante y público en general que abandonen el auditorio para que el jurado pueda deliberar y evaluar como sigue.

JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTAS	PROMEDIO
Mg. Enrique Aguilar Felices	17	16	17
Mg. Marco Aronés Jara	17	17	17
Mg. Rosa Guevara Montero	17	16	17

De la evaluación correspondiente el sustentante obtuvo la nota promedio de **DIECISIETE (17)** de lo cual dan fe los miembros estampando su firma al pie de la presente. Culmina el Acto de Sustentación, siendo las Seis y treinta de la noche.



M.S. ELMER A. ÁVALOS PÉREZ
Presidente



Mg. ENRIQUE J. AGUILAR FELICES
Miembro



Mg. MARCO R. ARONÉS JARA
Miembro



Mg. ROSAG. GUEVARA MONTERO
Miembro-Asesor



Mg. MARICELA LÓPEZ SIERRALTA
Secretaria Docente