



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CARRASQUILLA
(*Berberis hallii*) SOBRE *Escherichia coli* ATCC N° 9637,
Candida albicans ATCC N°10231, *Pseudomona aeruginosa*
ATCC N° 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR:

PAMELA CRISTINA BONILLA PAREDES

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

DEDICATORIA

El culminar un trabajo es un paso más para engrandecernos y llegar a alcanzar nuestros ideales. Pero nada hubiese sido posible sin ayuda del esfuerzo mancomunado de personas que han sabido apoyarme en el transcurso de mi preparación profesional.

Dedico éste trabajo a Dios por ser el eje principal de mi vida, el motor de mis valores y mi gran libro de la sabiduría.

A mis padres Mario y Mariana por su sacrificio constante y por enseñarme a ser perseverante y a no desmayar frente a las adversidades.

A mis hermanos Mario y Augusta, por el cariño y el apoyo que día a día han sabido dedicarme, a mis sobrinos Ethan, Doménica e Ignacio quienes han sido mi fuerza para seguir adelante.

A mi esposo Javier que ha sido mi compañero fiel y mi gran amigo, por su apoyo incondicional e impulsador de nuevos logros. Y por sobre todo a mi hijo quien será la nueva guía de mis metas e ideales.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser los forjadores de mi enseñanza.

A la Dra. Cumandá Játiva por su asesoramiento en la dirección de la presente tesis y por motivarme a la realización de la misma.

Al Dr. Francisco Portero, por la colaboración desinteresada que me ha brindado en el transcurso del trabajo de tesis y por sus conocimientos que han sido el pilar fundamental para la culminación de mi trabajo.

A los Drs. Miembros del tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A mi esposo Javier por su amable colaboración durante toda la experimentación y realización de mi trabajo.

A todas las personas que se involucraron de cualquier manera para la finalización de este trabajo de investigación.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CARRASQUILLA (*Berberis hallii*) SOBRE *Escherichia coli* ATCC N° 9637, *Candida albicans* ATCC N°10231, *Pseudomona aeruginosa* ATCC N° 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538” de responsabilidad de la señora Pamela Cristina Bonilla Paredes, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Días DECANA FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Luis Guevara DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Cumandá Játiva DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dr. Francisco Portero MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS	-----	

Yo, Pamela Cristina Bonilla Paredes, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

PAMELA CRISTINA BONILLA PAREDES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de tipos de cultivo)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
bbi	Bisbencilitetrahydroisoquinolínicos
BNF	Bacilo Gram negativo no fermentadores
°C	Grados centígrados
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ECDA	<i>E. coli</i> difusamente adherente
EMB	Agar Eosina azul de metileno
EtOH	Etanol
g	Gramos
HEPA	High Efficiency Particle for filter
k	Velocidad de crecimiento
KIA	Agar con hierro de Kligler
lb/pulg²	Libras por pulgada cuadrada
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Termolábiles
m	Metros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
mg/ mL	Miligramo por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
M.O	Microorganismos
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
O	Antígeno somático
O-F	Oxidativo - Fermentativo
P	Parcialmente Activo

pH	Potencia Hidrógeno
ppm	Partes por Millón
PO⁻⁴	Ión Fosfato
ST	Termoestables
SH₂	Gas sulfhídrico
TSB	Caldo Soya Tríptica
TSA	Agar Soya Tríptica
μL	Microlitros
μg	Microgramos
USP	United States Pharmacopeia
V	Variante (50-50%)
V⁺	Variante 75% positivo
Vi	Antígeno de virulencia

ÍNDICE GENERAL

1.	PARTE TEÓRICA.....	17
1.1.	Medicina natural.....	17
1.2.	Medicina tradicional.....	19
1.3.	Antecedentes de la medicina tradicional.....	19
1.4.	Fitoterapia.....	21
1.4.1.	Fitofármacos.....	22
1.4.2.	Formas de preparaciones fitoterápicas.....	23
1.4.2.1.	Métodos de extracción.....	23
1.4.2.1.1.	Factores de extracción.....	24
1.4.2.2.	Extractos.....	25
1.5.	Características de la planta en estudio carrasquilla.....	26
1.5.1.	Clasificación botánica.....	27
1.5.2.	Descripción botánica.....	28
1.5.3.	Distribución geográfica.....	28
1.5.4.	Usos y propiedades farmacológicas.....	29
1.5.4.1.	Aplicaciones.....	29
1.5.4.2.	Aprovechamiento integral de la carrasquilla.....	31
1.5.4.3.	Actividad farmacológica.....	34
1.5.5.	Descripción morfológica.....	34
1.5.5.1.	Composición química de la <i>Berberis hallii</i>	34
1.5.5.2.	Berberina.....	35
1.5.5.2.1.	Propiedades físico químicas de la berberina.....	36
1.5.5.2.2.	Toxicidad de la berberina para los organismos y el medio ambiente.....	36
1.5.5.2.3.	Aplicaciones de la berberina.....	37
1.5.6.	Información de la especie del género <i>Berberis hallii</i>	41
1.6.	Actividad biológica.....	42

1.6.1.	Actividad antimicrobiana.....	42
1.6.1.1.	Agentes antimicrobianos.....	44
1.6.2.	Metabolismo microbiano.....	45
1.6.3.	Cultivo y crecimiento de microorganismos.....	45
1.6.3.1.	Requerimientos para el crecimiento.....	46
1.6.3.1.1.	Fuentes de energía metabólica.....	46
1.6.3.1.2.	Factores nutricionales.....	46
1.6.3.2.	Factores ambientales que afectan el crecimiento.....	48
1.6.3.2.1.	Factores nutricionales.....	49
1.6.3.2.2.	Factores físicos.....	49
1.6.4.	Métodos de cultivo.....	52
1.6.4.1.	Aislamiento de un organismo en cultivo puro.....	52
1.6.5.	Crecimiento microbiano.....	54
1.6.5.1.	Curva de crecimiento microbiano.....	54
1.7.	Descripción de bacterias en estudio.....	57
1.7.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	57
1.7.1.1.	Taxonomía.....	57
1.7.1.2.	Morfología.....	57
1.7.1.3.	Crecimiento.....	59
1.7.1.4.	Patogenicidad.....	60
1.7.1.5.	Características bioquímicas.....	61
1.7.1.6.	Características generales de cultivo de <i>S. aureus</i>	61
1.7.2.	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	62
1.7.2.1.	Taxonomía.....	62
1.7.2.2.	Morfología.....	62
1.7.2.3.	Patogenicidad.....	63
1.7.2.4.	Características bioquímicas.....	65
1.7.2.5.	Características generales de cultivo de <i>Ps. aeruginosa</i>	65
1.7.3.	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	66

1.7.3.1.	Taxonomía.....	66
1.7.3.2.	Morfología.....	66
1.7.3.3.	Patogenicidad.....	67
1.7.3.4.	Características bioquímicas.....	68
1.7.3.5.	Características generales de cultivo de <i>C. albicans</i>	69
1.7.4.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637.....	69
1.7.4.1.	Taxonomía.....	69
1.7.4.2.	Morfología.....	70
1.7.4.3.	Patogenicidad.....	71
1.7.4.4.	Características bioquímicas.....	73
1.7.4.5.	Características generales de cultivo de <i>E. coli</i>	73
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	74
2.1.	Lugar y pruebas de ensayo.....	74
2.2.	Recursos naturales.....	74
2.2.1.	Materia prima.....	74
2.2.2.	Equipos.....	75
2.2.3.	Materiales de laboratorio.....	75
2.2.4.	Reactivos.....	77
2.3.	Factores de estudio.....	78
2.4.	Material biológico.....	79
2.5.	Metodología.....	79
2.5.1.	Recolección.....	79
2.5.2.	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	79
2.5.3.	Procesamiento de materia prima: limpieza y desinfección del material vegetal.....	80
2.5.4.	Obtención del extracto.....	80
2.5.4.1.	Procedimiento.....	80

2.6.	Métodos generales para el análisis del extracto.....	81
2.6.1.	Determinación de los requisitos organolépticos.....	81
2.6.2.	Determinación de la densidad relativa.....	82
2.6.3.	Determinación del índice de refracción.....	83
2.6.4.	Determinación del pH del extracto.....	83
2.7.	Reactivación de cepas microbiológicas ATCC.....	83
2.7.1.	Preparación de medios.....	83
2.7.2.	Suspensión de microorganismos ATCC.....	85
2.7.3.	Siembra de microorganismos ATCC.....	86
2.7.4.	Lectura de cajas incubadas.....	86
2.7.4.1.	Procedimiento.....	86
2.7.5.	Almacenamiento de microorganismos ATCC reactivados.....	87
2.8.	Ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher en el extracto etanólico de carrasquilla (<i>Berberis hallii</i>).....	87
2.8.1.	Preparación de medios (día 1).....	87
2.8.2.	Preparación de muestras para ensayo (día 2).....	88
2.8.3.	Preparación de la siembra (día 3).....	92
2.8.4.	Lectura de resultados (días 4 y 5).....	94
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	95
3.1.	Control de calidad de la droga.....	95
3.1.1.	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	95
3.1.2.	Estudio macroscópico.....	95
3.2.	Análisis del extracto.....	96
3.3.	Reactivación de cepas ATCC.....	97
3.4.	Actividad antimicrobiana.....	99
4.	CONCLUSIONES.....	104
5.	RECOMENDACIONES.....	105

6.	RESUMEN.....	106
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	107
8.	ANEXOS.....	117

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°1.	Determinación de parámetros de calidad para extracto etanólico de <i>Berberis hallii</i> . LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	96
CUADRO N°2.	Identificación y caracterización para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	97
CUADRO N°3.	Identificación y caracterización para <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	97
CUADRO N°4.	Identificación y caracterización para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	98
CUADRO N°5.	Identificación y caracterización para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	98
CUADRO N°6.	Actividad antimicrobiana en siembra radial en placa de petri del extracto etanólico de <i>Berberis hallii</i> . LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	99
CUADRO N°7.	Actividad antimicrobiana de sulfato de estreptomicina frente a microorganismos utilizados. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.....	101

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1.	Clases de <i>Escherichia coli</i> considerados como patógenos entéricos, con su fenotipo y patología	72
--------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1. Cromatograma de bandas B1 y B2 de raíces de *Berberis hallii*.....**125**

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1. Estructura química iónica de la Berberina.....	35
FIGURA N°2. Estructura química desarrollada de la Berberina.....	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N°1.	Carrasquilla (<i>Berberis hallii</i>).....	26
FOTOGRAFÍA N°2.	Curva de Crecimiento Microbiano.....	55
FOTOGRAFÍA N°3.	Plantilla utilizada en el test de Mitscher para el estriado de microorganismos.....	93

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1.	Extracción del Principio Activo de un vegetal.....	117
ANEXO N°2.	Obtención de Extracto etanólico de Carrasquilla.....	118
ANEXO N°3.	Parámetros de Calidad del Extracto Etanólico de <i>Berberis hallii</i>	118
ANEXO N°4.	Resultados de la Reactivación de microorganismos ATCC.....	119
ANEXO N°5.	Resultados Microscópicos de la Reactivación de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	123
ANEXO N°6.	Resultados de la Siembra en placas petri para el Extracto etanólico de la raíz de <i>Berberis hallii</i> “Carrasquilla” a distintas concentraciones.....	124
ANEXO N°7.	Cromatografía en capa fina a partir del residuo seco de Alcaloides. Tesis BQF. Carolina Silva.....	125

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. MEDICINA NATURAL

La medicina Natural es un concepto amplio que nos permitirá tratar una gran variedad de medicinas complementarias y alternativas, incluyendo: medicina herbaria, suplementos dietéticos, homeopatía, acupuntura, terapia neural, biomagnetismo, digitopuntura, y otras de las muchas medicinas alternativas que existen actualmente. (52)(55)

La teoría del poder curativo de la naturaleza comenzó alrededor del siglo V y IV antes del Cristo y fue descrito por seguidores de Hipócrates y Galeno entre los años 460 y 200 A.C. La doctrina sostiene que la naturaleza dota al organismo humano con poderes internos para restaurarse a si mismo su salud. Esta teoría explica la diarrea, la inflamación y la fiebre (entre otros síntomas y signos fisiológicos) como intentos del organismo para alcanzar la homeostasis. (60)

Una teoría más moderna por el Dr. Henry Lindlahr establece que la enfermedad es causada por la desviación de las leyes naturales, y que la enfermedad por sí misma es una evidencia del intento del organismo por intentar corregir la situación retornando el organismo a su estado natural, es decir a la homeostasis con su ambiente. El Dr. Lindlahr postula que la enfermedad tiene una de las siguientes causas: disminución de la vitalidad, intoxicación de la sangre e intoxicación de la linfa. (52)(60)

Otro elemento importante de la Medicina Natural es el principio del tratamiento de la persona total. La Medicina Natural es el arte del tratamiento de la persona y no la enfermedad, mediante el tratamiento individualizado. (48)

La importancia en la actualidad de la Medicina Natural se evidencia por el alto consumo de los productos recomendados por esta alternativa para el manejo de las enfermedades. En Inglaterra, un sondeo efectuado por una organización de 28.000 consumidores descubrió que 80 personas de cada 100 habían recurrido a alguna forma de medicina complementaria. (52)

Las razones que motivan este enorme auge de las medicinas alternativas son varias:

- Abordaje integral de la persona
- Mejores y más rápidos resultados en ciertos tipos de enfermedades y padecimientos
- Único tratamiento disponible en algunos trastornos ya que la Medicina convencional sólo ofrece en esos casos un tratamiento para los síntomas.
- Menos complicaciones y menos efectos secundarios
- Algunos tratamientos son menos traumáticos.
- Por lo general son de más bajo costo.

La medicina fabricada por la naturaleza y diseñada por el creador de la naturaleza, será siempre mucho más compleja y avanzada que la inventada por el hombre, pero nuestro trabajo es sacarle provecho consistiendo en estudiarla, investigarla y utilizarla a la altura de nuestra capacidad científica. (55)(60)

La medicina natural se utilizará siempre de forma masiva por la simple razón de que funciona, pero cuando se practica con apoyo profesional e institucional, los resultados superan cualquier expectativa. Tal es el ejemplo que da la OMS (Organización Mundial de la Salud) la cual estima que aproximadamente un millón de personas se salvan de morir anualmente de Malaria Resistente por la utilización masiva y controlada de extracto de *Artemisa annua*, planta de origen Chino pariente de Estafiate. (54)

En la parte de hierbas medicinales, en los últimos años 14 países de Europa han establecido su política y reglamentación de estos productos homologados entre sí y a la OMS, dando como resultado un gran avance científico en esta área. En Canadá es el país que más ha avanzado en la integración de la medicina natural a su sistema de salud, y el gran beneficio que ha significado para la población es un aliciente para cualquier país. En el aspecto herbolario, México es uno de los países de mayor tradición y riqueza física de plantas medicinales. (54)(55)

1.2. MEDICINA TRADICIONAL

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales. (35)(37)

1.3. ANTECEDENTES DE LA MEDICINA TRADICIONAL

En 1976, hace más de tres décadas, se inició en el mundo un movimiento político y científico que buscó desarrollar modernos medicamentos a partir de plantas medicinales usadas, desde tiempos remotos, en la llamada ‘Medicina Tradicional’, ese ‘conocimiento médico social’ ó popular que prevalece en la mayor parte de los países de Asia, África y Latinoamérica, como parte de su cultura autóctona. (7)

Este movimiento promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y que fuera concretado como “Programa de Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional” tuvo diferentes repercusiones en el mundo dependiendo de las distintas realidades socio-económicas y políticas de los países que atendieron al llamado, pero lo que resultó evidente en Occidente fue que los conocimientos alcanzados en la segunda mitad del siglo XX sobre botánica, química y farmacología, habían creado las condiciones para demostrar científicamente los beneficios curativos de muchas plantas medicinales que eran utilizadas como infusiones, tisanas, emplastos u otras formas farmacéuticas populares, heredadas del siglo XIX. (7)(54)

También quedó claro que las plantas medicinales eran en el siglo XX el recurso fundamental de miles de millones de personas que las utilizaban como recursos de su Medicina Tradicional, un fenómeno cultural particularmente vigente en los países pobres, llamados en esa época del “Tercer Mundo”. (48)

La abundancia y diversidad de estos recursos bio-culturales se debía a la importante utilidad que tenían para el 75% de la población mundial, no obstante que estas plantas permanecían ignoradas por la Medicina Occidental. Si bien, la industria químico-farmacéutica reconocía en 1980 que más del 40% de los medicamentos modernos y en uso en Occidente provenían de plantas, las industrias farmacéuticas occidentales no manifestaban interés por indagar las potencialidades comerciales de unos recursos naturales usados por la cultura médica autóctona de países considerados “subdesarrollados”. (7)

No obstante que estudiar las plantas medicinales de la Medicina Tradicional o Indígena no interesó en esos años a los gobiernos e instituciones académicas de salud de los EUA y de Europa, el hecho es que el interés científico por evaluar las propiedades curativas de tales recursos naturales sí creció rápidamente entre algunos grupos de intelectuales y científicos de Asia, de África y de Latinoamérica. La estrategia de impulsar el desarrollo industrial y comercial de tales recursos se dio predominantemente en China, India y Japón, países en donde pronto se planteó la posibilidad de que con las mismas plantas usadas por siglos de manera empírica en sus culturas locales se fabricaran medicamentos para todo el mundo, cuya eficacia fuera científicamente comprobada y promoviendo el desarrollo de un nuevo tipo de “medicamentos de plantas” que posteriormente serían denominados: fito-medicamentos. (51)(64)

Fue así que, a partir de 1980, se inició la comercialización de plantas medicinales en todo el mundo y cuyo slogan de que lo natural es mejor. (7) (55)

Con el pasar de tiempo y el crecimiento de los mercados de productos naturales, considerados suplementos, quedó claro que las decisiones tomadas no eran suficientes. Infinidad de productos no cabían en la definición de suplemento, pero sobre todo las propiedades y efectos terapéuticos de la mayoría de los productos que salían al mercado eran las de un medicamento, un fitomedicamento. (22)(69)

Es así como se considera a la medicina tradicional, al conjunto de sistemas de atención a la salud que tiene sus raíces en profundos conocimientos sobre la salud y la enfermedad que los diferentes pueblos indígenas y rurales de nuestro país han acumulado a través de su historia, fundamentados en una interpretación del mundo (cosmovisión), de la salud y enfermedad de origen prehispánico, que ha incorporado elementos provenientes de otras medicinas, como la medicina antigua española, la medicina africana y en menor medida por la interacción de la propia medicina occidental. (64)(69)(70)

1.4. FITOTERAPIA

Básicamente consiste en el uso de las plantas con fines curativos, constituyendo una de las terapias más antiguas que existen, aunque muchos intenten desprestigiarla. Pero por ejemplo para poder tener en cuenta la propia eficacia de la fitoterapia, se deben recordar que, a día de hoy, muchos de los fármacos que existen son derivados de plantas medicinales. (38)

Simplemente por este hecho no hay que menospreciar el valor medicinal de las plantas, aunque tampoco podemos pensar que por tratarse de terapias o remedios naturales, carecen de cierta toxicidad, en especial porque contienen principios activos que pueden provocar efectos indeseables si no son usadas de forma correcta. (38)(44)

Muchos de los preparados a base de hierbas o plantas medicinales en sí pueden llegar a resultar una buena solución para pequeños problemas de salud. Si no se tienen unos conocimientos adecuados, es informarse lo mayor posible de las propiedades, beneficios y virtudes de aquella planta que vayamos a utilizar, pero teniendo siempre en cuenta las dosis correctas para que sólo obtengamos de las mismas las propiedades que deseamos. (64)(69)

1.4.1. FITOFÁRMACOS

Los fitofármacos son compuestos que poseen como principio activo, un extracto estándar de ingredientes de carácter vegetal, de una planta o elaboraciones realizadas a partir de ella. Se obtienen a través de tecnologías modernas de producción industrial, mediante diversos procesos, cortes, pulverización, jugos, extractos, etc., de plantas, para convertirlos en

productos que poseen una configuración galénica específica, bien sean comprimidos, granulados, grageas, infusiones, entre otros. Estudios de comprobación de tolerancia y eficacia, usados para la medicina académica, confirman que un extracto está constituido por compuestos químicos que interactúan con una gran variedad de moléculas biológicas; esta característica comprueba que los fitofármacos actúan de la misma manera que los medicamentos convencionales. (35)

Mientras en el caso de un medicamento químico el principio medicamentoso activo es un compuesto químico (molécula), en el caso del fitofármaco el principio activo proviene de una preparación vegetal, en general, un extracto. El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos variados, lo esencial es la parte vegetal que se emplea. (36)(37)

Por ejemplo, los frutos pueden contener principios activos fitoquímicos totalmente diferentes de las raíces o de las hojas, de la corteza o de las flores. (20)

También depende del solvente empleado para extraer una parte vegetal definida. El agua disuelve los principios hidrosolubles de una parte vegetal específica; el alcohol o acetona disuelve los principios activos liposolubles. Mezclas de alcohol y agua, en relaciones cuantitativas y cualitativas diferentes, disuelven, según la proporción de mezcla, los principios activos hidrosolubles, así como liposolubles de una parte vegetal específica. Los fitofármacos de modo estricto son:

- Aquellos que contienen como principio activo preparaciones vegetales, sobre todo extractos estandarizados, a diferencia de los “fármacos químicos”.
- Que se elaboran en preparaciones galénicas normales como son gotas, comprimidos, grageas, cápsulas o cremas.
- Que se emplean en el campo de la medicina científica.

- Cuyos efectos farmacológicos se prueban mediante experimentos y cuya eficacia clínica se demuestra en estudios clínicos y en la práctica médica. (37) (42)

1.4.2. FORMAS DE PREPARACIONES FITOTERÁPICAS

1.4.2.1. Métodos de extracción

Los principales activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas o bien pueden ser administrados como tales, en la planta desecada o en la planta fresca. (49)

A lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear (caracteres organolépticos), de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. (53)

Cuando utilizamos el agua como vehículo extractivo reciben el nombre genérico de Tisanas, que son preparaciones acuosas en las que se aprovecha el poder de extracción que el agua posee. Manteniendo el agua en contacto con la planta ésta cede parte de sus principios activos a la misma, aquellas sustancias que son solubles en agua. Ocurre un fenómeno de difusión celular. Una vez que la planta ha sido embebida, es decir, impregna de agua, vuelve a reconstruir el estado que tenía la planta fresca. En la planta seca los protoplasmas celulares están retraídos hacia las paredes celulósicas de rigidez indeformable, con lo cual se llenan de finas películas de aire, el cual es expulsado por el fenómeno de la imbibición y sustituido por agua. La difusión celular y por tanto la extracción de principios activos durará mientras no se alcance un equilibrio osmótico entre protoplasma celular y líquido extractivo, en este caso agua. (20)(48)

Entre los métodos más utilizados son:

MACERACIÓN.- se introduce la planta en agua a temperatura ordinaria durante varias horas (generalmente de 8 a 12 horas). Esta forma de extracción se suele emplear para plantas ricas en mucílagos como las semillas de lino. (42)

MACERACIÓN-DECOCCIÓN.- se utiliza para ciertas tisanas, compuestas de partes vegetales duras y tiernas, en donde está indicado ponerlas en maceración antes de cocerlas.(16)(56)

1.4.2.1.1. Factores de extracción

La extracción depende de varios factores, como son:

- La cantidad de agua, cuanto mayor sea la cantidad de agua más elevada será el agotamiento de los principios activos dentro de la planta.
- Las influencias que entre unos y otros principios activos pueden ocurrir, se dé en solución una mayor o menor solubilidad.
- La temperatura; la infusión o el cocimiento a una temperatura cercana a los 100°C favorece la extracción. No obstante, a veces conviene hacer la extracción con agua fría, ya que puede interesar no extraer determinados principios activos que solamente pasarían al agua con la ayuda del calor.
- El tiempo, esto es la duración del contacto de la planta con el agua o solventes.
- El sistema empleado para la extracción.
- El grado de pulverización de la planta, aumentando la extracción cuanto más troceada esté la planta, pero hasta ciertos límites para evitar una serie de procesos físicos que dificulten el proceso. (19)(31)(32)

1.4.2.2. Extractos

Los extractos son preparaciones todavía más concentrados que las tinturas. Se basan en el principio de que las sustancias como el agua o el alcohol pueden disolver las sustancias curativas de las plantas, así tenemos que hay extractos hidroalcohólicos y extractos puramente acuosos. Los extractos hidroalcohólicos tienen la ventaja que se les puede calcular en dosis exactas. Así, 1 mL de extracto fluido representa un gramo de la droga en polvo. (33)

Se puede elevar la concentración de principios activos procedentes de una tintura, cocimiento o jugo de las plantas por medio de la evaporación del disolvente, sea alcohol o sea agua. (19)

Mediante calor y evaporación con baño María se logra que el extracto tome diferentes consistencias, pueden quedar blandos como la miel, secos como polvo y líquidos o fluidos. (20)(31)

Dado que esta evaporación dañaría y alteraría los principios activos, deberá siempre hacerse al vacío, con lo cual se consigue que la evaporación se haga a una temperatura que no supere los 50°C, ya que el punto de ebullición de un líquido depende de la presión a la que esté sometido. (53)

Disminuyendo esta presión, vacío o presión negativa se consigue disminuir el punto de ebullición. Así, se pueden concentrar más o menos las preparaciones extractivas, pudiéndose llegar incluso al extracto seco, que es el más concentrado. Por estos métodos, se pierden los aceites esenciales de la planta, al evaporar. (33)

Existen diversos aparatos para tal efecto, dependiendo del resultado que se quiera conseguir:

- Concentradores a vacío.

- Nebulizadores o atomizadores.- Producen una evaporación instantánea haciendo atomizar el líquido a través de una corriente de aire caliente. Así se obtienen los nebulizados.
- Liofilizadores.- Consiste en enfriar a muy bajas temperaturas, por medio de una potente fuente de vacío el disolvente solidificado por el frío, pasa directamente a vapor, sin pasar por estado líquido. A este proceso se le llama sublimación y así se obtienen los liofilizados. (51)(53)(62)

1.5. CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA EN ESTUDIO CARRASQUILLA



FOTOGRAFIA N°1. CARRASQUILLA (*Berberis hallii*)

Arbusto espinoso que alcanza un máximo de 2 metros de altura. Sus ramas (generalmente enmarañadas) tienen hojas ovaladas, lampiñas, ligeramente denticuladas, transformadas en fuertes espinas y agrupadas en número impar (de tres en tres, o de cinco en cinco). Las pequeñas flores amarillas, que aparecen entre mayo y junio, cuelgan agrupadas en racimos.

Los frutos son bayas ovaladas rojizas, ácidas, alargadas, de unos 8 a 10 mm., que maduran en otoño o finales del verano. Su hábitat natural es el clima continental de montaña; nace de forma natural en espinares, zonas abiertas, lindes de los campos y suelos calizos y pedregosos. (11)(13)

1.5.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ranunculales
Familia	Berberidaceae
Subfamilia	Berberidoideae
Tribu	Berberideae
Subtribu	Berberidinae
Género	Berberis
Especie	Hallii
Nombre binomial	Berberis hallii

(11)

1.5.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Nombres vernáculos: Carrasquillo, Chinia, Chivo, Espino, Espuela casha.

Es un arbusto denso armado de espinos simples o triples. Tiene los tallos leñosos que alcanzan hasta los 3 m de altura, son erectos y ramificados con la corteza de color ceniza. Las hojas son ovales, alternas, con peciolo corto de unos 3 cm de longitud. Presentan una gradación desde hojas hasta espinas, de forma que las de más de un año se van transformando en espinas. Las flores aparecen entre abril y junio, son pequeñas y amarillas, agrupadas en pequeños racimos colgantes. Los frutos son bayas de 1 cm de longitud de color rojo brillante, ácidas pero de sabor agradable. Son arbustos o pequeños árboles, espinosos, leño amarillo:

- Hojas alternas, coriáceas, margen entera o espinosa, a menudo con el envés pruinoso; ramas secundarias con entrenudos muy cortos apareciendo las hojas fasciculadas.
- Inflorescencia racimosa o paniculada o flores solitarias. Flores bisexuales, amarillas o anaranjadas; 6 sépalos, en 2 series de 3; pétalos 6 en 2 series, con glándulas basales en la superficie interna; estambres en igual número que pétalos, dentados o edentados; ovario súpero, unicarpelar, con pocos óvulos en placentas marginales, estigma papiloso con el ápice cóncavo, generalmente sésil.
- Drupa negro-morada, generalmente pruinosa. (24)

1.5.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Berberis es un género de distribución cosmopolita con alto número de representantes en Sur América y algunos pocos en el nororiente de África. Cabe recalcar la ausencia de especies en Australia y Nueva Zelanda. En Sur América se encuentran alrededor de 178 especies de *Berberis* distribuidas desde Venezuela, Chile y Argentina.

El género *Berberis* consta de más de 500 especies ampliamente distribuidas, pero mejor representadas en los Himalayas, el oeste de China y en los Andes. En el Ecuador están representadas 32 especies: *Berberis chillacochensis* Camargo, *B. chimboensis* C. Schneider, *B. conferta* H.B.K., *B. engleriana* C. Schneider, *B. farinosa* Benoist, *B. glauca* Kunth, *B. grandiflora* Turcz., *B. hallii* Benoist, *B. hirtellipes* Ahrendt, *B. hyperythra* Diels, *B. jamesonii* Lindley, *B. laidivo* Camargo, *B. lechleriana* C. Schneider, *B. lehmannii* Hieron., *B. lobbiana* C. Schneider, *B. loxensis* Benth., *B. lutea* Ruiz & Pavón, *B. minzaensis* Camargo, *B. multiflora* Benth., *B. paniculata* Juss., *B. papillosa* Ahrendt, *B. pectinata* Hieron., *B. pichinchensis* Turcz., *B. pindilicensis* Hieron., *B. quinduensis* H.B.K., *B. reicheana* C. Schneider, *B. retinervia* Triana & Planchon, *B. rigida* Hieron., *B. saxorum* Ahrendt, *B. schwerinii* C. Schneider, *B. spruceana* (C. Schneider) Ahrendt y *B. warszewiczii* Hieron., entre otras todas sobre los 2000 m y especialmente en el subpáramo. La especie *hallii* se la encuentra en Pichincha y zonas de páramo. (24)(25)(26)

1.5.4. USOS Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

1.5.4.1. Aplicaciones

a) INDUSTRIA TEXTIL: TINCIÓN DE TEJIDOS

En la industria de curtidos que consiste en la transformación de pieles de animales en cuero, de amplia utilización industrial y comercial en la elaboración de calzado, prendas de vestir (guantes, confección), marroquinería y pieles. Los tintoreros la aprecian por sus raíces, que son sangradas para extraer el líquido de intenso color amarillo con que tiñen sus tejidos. Este color se le atribuye a que la mayoría de alcaloides son amarillos. (68)

b) MEDICINA

Desde la antigüedad los egipcios la usaban para curar fiebres. La parte más usada es la raíz y corteza, que se cree tienen la mayor cantidad de alcaloides y que se le atribuye propiedad anti cancerígenas. Los alcaloides como la berberina le brindan un poder antibacteriano. En estudios con animales se ha demostrado que este alcaloide reduce los espasmos musculares, lo que puede explicar por qué puede ayudar a la digestión. (63)(68)

Se usa para combatir infecciones como la de *Helicobacter pylori*, que está asociada con la gastritis y la úlcera péptica, y para tratar infecciones por levaduras, como las provocadas por *Candida albicans*. La berberina actúa también sobre la vejiga estimulando la secreción de bilis, que arrastra los residuos fuera del hígado. (9)

Externamente, por sus propiedades anti inflamatorias, la *Berberis* sirve para tratar ojos doloridos o irritados, eccema, psoriasis, reumatismo, hepatitis y muchos otros tipos de inflamaciones. Recientes estudios realizados en Bulgaria han confirmado el efecto anti inflamatorio de la berberina extraída de la raíz. (13)(64)

- **En diarrea:** La berberina combate las infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias. El *Berberis* suele usarse principalmente para la diarrea de origen bacteriano, diarrea del viajero, infecciones por parásitos y candidiasis crónica. (29)
- **En infecciones del tracto urinario:** Los estudios han mostrado que esta planta puede actuar contra la *E. coli* y la *Pseudomonas aeruginosa*. Algunas fuentes indican que la baya es más eficaz que la raíz de la planta para este tipo de infecciones. (29)(67)

A principios de siglo XX se preconizó la utilización de la berberina para la deshabitación de la dependencia a los opiáceos. (68)

c) ALIMENTACIÓN

Los frutos son refrescantes y tienen un ligero poder laxante. Se pueden consumir frescos, en conserva o secos. Pueden servir para elaborar diversas bebidas refrescantes, compotas o mermeladas y vinos medicinales aperitivos. También puede utilizarse para la falta de apetito, espasmos digestivos, relajante muscular y para la hipertensión. (10)(12)

1.5.4.2. Aprovechamiento integral de carrasquilla

La carrasquilla es una planta no muy estudiada sin embargo se ha demostrado tener alcaloides que poseen actividad en diversos campos medicinales. Desde la antigüedad ha sido utilizado por los indígenas americanos para tratar estómagos ulcerados, encías ulceradas y dolores de garganta. Los usos tradicionales ayurvédicos del vegetal incluyen, para debilidad, fiebre, disentería, colitis, ictericia y agrandamiento del hígado, etc. (17)(18)

Dentro de los usos de la planta, se suele aprovechar sus bondades en:

Cerebro y Sistema Nervioso: produce una sensación de bienestar y promueve el vigor.

Condiciones cardiovasculares: dilata los vasos sanguíneos.

Condiciones gastrointestinales: Para el estreñimiento (a dosis mayores), diarrea, acidez, mejora el apetito, regula la digestión, alivia el malestar estomacal.

Condiciones inflamatorias: las bayas sirven para fiebres inflamatorias, como la fiebre tifoidea, actúa como antiescorbútico como fuente de vitamina C, astringente reduciendo las secreciones o los vertidos de mucosas y fluidos del cuerpo, como laxante, refrigerante, reduciendo el calor corporal anormal, alivia la sed y da una sensación de frescor.

Condiciones del hígado: para trastornos biliares, crisis hepática, enfermedades y alteración funcional del hígado, vesícula biliar, ictericia.

Afecciones del tracto respiratorio: Se utiliza para hacer gargarismos para la boca y la irritación y dolor de la garganta, el alivio de la piorrea, el fortalecimiento de las encías.

Otros usos: En la debilidad en general, reduce la fiebre intermitente y se usa para problemas del bazo. (52)

Se puede usar como jalea, encurtidos, la corteza interior de los tallos hervidos con alumbre teñirán ropa de color amarillo, las bayas maduras se pueden utilizar para hacer mermelada, las raíces hervidas sirve como tinte amarillo de piel.

También tiene un efecto de amplio espectro antimicrobiano, la lucha contra las bacterias asociadas a gastroenteritis. Esto ayuda a reducir el dolor abdominal, distensión abdominal, cólicos y flatulencia. (18)(49)(66)

Además de haber sido probada en el tiempo, la investigación reciente ha hecho dado crédito a los usos tradicionales de *Berberis*. El principal componente activo es la berberina, ha sido recientemente objeto de mucha investigación que ha demostrado que sea eficaz contra una variedad de dolencias. (15)

La investigación científica ha demostrado que la berberina:

- Inhibió el crecimiento de una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y parásitos.
- Inhibe el crecimiento de hongos *Candida*, pero no afectó a las bacterias beneficiosas como *Acidophillus* y *Bifidus*.
- Fue de beneficio en el tratamiento de la diarrea y la frente así a los productos farmacéuticos de la gastroenteritis.
- Fue más eficaz que un producto farmacéutico en la mejora de la gastritis.
- Demostrada actividad anti-inflamatoria.
- Prevenir la química inducida por daño hepático.

En la medicina moderna a base de hierbas, éste vegetal se usa para mejorar todos los aspectos de la función digestiva. Debido a que es significativo con propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios, es un arma muy eficaz contra las infecciones intestinales. (17)(23)(61)

Se recomienda para su uso contra la diarrea en la gastroenteritis, ya sea de tipo no específico, o de una fuente identificada. También es capaz de inhibir el crecimiento de *Giardia*,

Trichomonas y Entamoeba. También se recomienda para el fortalecimiento del paciente durante la convalecencia ya que actúa como un estimulante inmunológico y estimulante del apetito eficaz. (42)(61)

Se han realizado ensayos clínicos utilizando la berberina. Existe alguna evidencia que apoya su uso en el tratamiento de tracomas (infección de los ojos), diarrea bacteriana y en la enfermedad por parásitos. También se ha demostrado la efectividad de la berberina como un agente antimicrobiano contra las bacterias, virus, hongos, protozooario, helmintos (lombrices) y la clamidia (enfermedad de transmisión sexual). Se requiere investigación clínica adicional en esta área, así como en las áreas de enfermedades cardiovasculares, trastornos de la piel y hepáticos. (17)(29)

Por último el *Berberis* es huésped intermedio de la conocida y temida roya de los cereales (*Puccinia graminis*), puede observarse en el envés de algunas de estas plantas unas manchas de color amarillento, anaranjado o rojizo, de las que surgen una pequeña cadena de esporas que son dispersadas por el viento, pudiendo afectar a los cultivos de cereales, donde se propaga a través de sus hojas, dando lugar a la temida y conocida plaga, la que puede terminar con cosechas enteras. Motivo por los que en muchas regiones ha sido exterminado este arbusto por los agricultores. (61)(70)

1.5.4.3. Actividad farmacológica

La parte más usada es la raíz y corteza, que se cree tienen la mayor cantidad de alcaloides y que se le atribuye ciertas propiedades farmacológicas. Los alcaloides como la berberina le brindan un poder antibacteriano. (11)

1.5.5. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

1.5.5.1. Composición química de *Berberis hallii*

Toda la planta, excepto los frutos, contiene alcaloides (2-3%). Se conoce que el vegetal contiene berberina, el potente agente que tiene numerosos usos en el control de diferentes enfermedades (estimula la digestión y reduce los dolores gastrointestinales). Se sabe también

que esta sustancia ayuda en el sistema inmunológico. Aparte de berberina en la composición química de la planta hay un gran número de sustancias activas. (11)(26)

El principal es la berberina, junto con la magnoflorina, berbamina, berberrubina y bervulcina. La corteza contiene un gran número de alcaloides (berberina, berbamina, oxycatina) y taninos. Los frutos contienen Dextrosa, glucosa, levulosa, fructosa, ácido tartárico y málico, goma, pectosa, vitamina C. Las sustancias activas de la hierba puede lograr los siguientes efectos: hemostático, diurético, vasodilatador, hipertensor, antibacterianos (mata las bacterias y parásitos), y anti-inflamatorios. (25)

Sólo la corteza seca de las raíces y el tronco se utiliza en fines medicinales. *Berberis* se puede encontrar en el mercado bajo la forma de té, tintura, pastillas y ungüento, por lo general el porcentaje de berberina de estos productos es entre el 8 y el 12%. (26)(44)

1.5.5.2. Berberina

La berberina es un tónico de sabor amargo con importantes acciones aperitivas y coleréticas; éstos alcaloides tienen acciones hipotensoras, colagogas y antipiréticas, en la planta *Berberis*; los frutos son refrescantes y tienen un ligero poder laxante. (4)(5)

La berberina posee acción antimicrobiana y protozoocida. Estructuralmente, la berberina se asemeja a la morfina el alcaloide más importante del opio y las acciones que ejerce son similares, aunque no iguales. (11) (45)

- **NOMBRE QUÍMICO (IUPAC):**

9,10-Dimetoxi-5,6-dihidro[1,3]dioxolo[4,5g]isoquino[3,2-a]isoquinolin-7-ilo, 8,13,13a-Tertadehidro-9,10-dimetoxi-2,3-[metilenbis(oxi)]berbinio. (11)

- **SINÓNIMOS:**

Rizoma de Coptis; Umbellatina; Umbellatine; Umbellatin; Thalsine; Majarine; Berbinium, 7,8,13,13^a tetrahidro-9,10-dimetoxi-2,3-(metilendioxi)-; Berberine; Berberin; 9,10-Dimetoxi-2,3- (metilendioxi)-7,8,13,13^a tetrahidroberbinio; Benzo(g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a)quinolizinio, 5,6-dihidro-9,10-dimetoxi-; catión 5,6-dihidro-9,10 dimetoxibenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinio (26)

ESTRUCTURA QUÍMICA: (30)

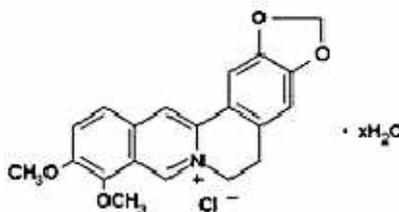


FIGURA N^o1. ESTRUCTURA QUÍMICA IÓNICA DE LA BERBERINA

FÓRMULA QUÍMICA: C₂₀ H₁₈ Cl NO₄

PESO MOLECULAR: 336.37

CLASIFICACIÓN: Alcaloide isoquinolínico

1.5.5.2.1. Propiedades físico químicas de la berberina

Alcaloide obtenido de plantas (raíces, rizomas y corteza) de las familias Berberidaceae, incluyendo especies de los géneros *Berberis*, *Mahonia*, *Coptis*, *Thalictrum* e *Hydrastis*. (11)

Es un sólido cristalino en forma de agujas, de color amarillo. Su punto de fusión es igual a 145°C, soluble en agua y etanol, pero insoluble en benceno, éter y cloroformo.

Su solubilidad estimada en agua es de 0.116 mg/L a 25 °C o de 3.53×10^{-4} mg/L. En forma aislada se presenta siempre como una sal ácida (hidrocloruro, sulfato o sulfato ácido). Frecuentemente su sal cristaliza como solvato (hidrato). (11)(13)

1.5.5.2.2. Toxicidad de la berberina para los organismos y el medio ambiente

Este compuesto presenta actividad bacteriostática, bactericida, fungicida, antiviral, antiprotozoaria (antimalárica) e insecticida. En diferentes tipos de microorganismos inhibe el metabolismo, la formación de endotoxinas y la adherencia que permite la colonización de la piel y las mucosas. (61)(66)

Es muy tóxica por lo que hay que manejarla con precaución, ya que se ha descrito un efecto oxitónico (contraindicado en el embarazo), por ello su potencial de toxicidad por la presencia de estos alcaloides con acción citotóxica, la intoxicación se manifiesta por medio de náuseas, diarrea, epistaxis y afección renal. (4)(17)

1.5.5.2.3. Aplicaciones de la berberina

En la antigüedad se empleó para combatir los dolores reumáticos, la falta de apetito, dispepsias hipo secretoras, disquinesia y litiasis biliar, espasmos gastrointestinales, hipertensión, tos, afecciones bronquiales, hipertermia y como purificador de la sangre. (4)

A principios de siglo XX, la utilización de la berberina se dio para la deshabituación de la dependencia a los opiáceos. (41)

La berberina muestra actividad frente a bacterias, virus, hongos, protozoos, helmintos y clamidias, con resultados *in vitro* y en fase clínica. (30)

La berberina es antibacteriano; la corteza de la raíz contiene un 3% de berberina. Éste compuesto explica ciertas propiedades de la planta. En estudios con animales se ha demostrado que este alcaloide reduce los espasmos musculares, lo que puede explicar por qué el *Berberis* puede ayudar a la digestión. (68)

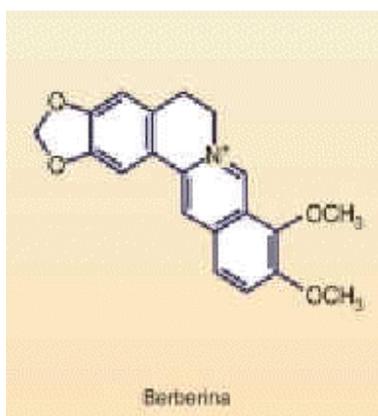


FIGURA N^o2. ESTRUCTURA QUÍMICA DESARROLLADA DE LA BERBERINA (68)

La berberina actúa también sobre la vejiga estimulando la secreción de bilis, que arrastra los residuos fuera del hígado. Esto apoya el uso tradicional de la planta, que se usaba para rectificar los desórdenes del hígado como la ictericia y los cálculos. (4) (5)

La berberina es un alcaloide amarillo y de sabor amargo con un amplio historial de uso médico. Presente en las raíces, rizomas y corteza del tallo de las plantas, por ello también se le ha utilizado históricamente para teñir, dado su color amarillo. (17)(64)(68)

En la mayoría de los ensayos clínicos, la berberina ha demostrado ser segura. Sin embargo, existe una interacción potencial entre la berberina y muchos medicamentos que se venden con receta; no debe administrarse a mujeres embarazadas o lactantes dados sus potenciales efectos adversos en los recién nacidos. (11)(12)(13)

a) APLICACIÓN FARMACOLÓGICA

Dentro de las acciones farmacológicas de la berberina incluyen:

- Acción antibacteriana: Inhibición metabólica de ciertos microorganismos, inhibición de la formación de enterotoxinas, inhibición de la adherencia bacteriana (inhibe una lipasa bacteriana que permite la colonización de piel y mucosas).
- Acción anti-diarreica: Inhibición de la secreción intestinal iónica.
- Acción anti-espasmódica: Inhibición de la contracción de músculos lisos.
- Acción anti-inflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral.
- Aumento del recuento plaquetario en ciertos casos de trombocitopenia.
- Efectos Cardiovasculares: inotrópicos positivos, negativos cronotrópicos, antiarrítmicos y vasodilatadores.
- Acción hipoglicémica: inhibe la alfa-glucosidasa disminuyendo el transporte de glucosa a través del epitelio intestinal. Además, aumenta el consumo celular de glucosa, sin aumentar la secreción de insulina. (11)

b) APLICACIÓN CLÍNICA

INFECCIONES INTESTINALES: Numerosos estudios han demostrado la efectividad de la berberina en casos de diarrea causada por *Vibrio cholerae* (cólera), *Escherichia coli* enteropatógena y enterotoxigénica. Los resultados de estos estudios indican que mejora los casos de diarrea. Un estudio demostró que la berberina reduce la secreción intestinal de agua y electrolitos inducida por la toxina colérica. (11) (17)

Otros estudios demuestran que inhibe algunas enterotoxinas de *V. cholerae* y *E. coli*, disminuye significativamente la peristaltismo intestinal, reduciendo la contracción de los músculos lisos, retraso del tránsito intestinal en seres humanos. Se ha demostrado efectos bactericidas directos sobre el cólera. En casos de Infección por *E. coli*, inhibe la adherencia bacteriana siendo, paso del proceso infeccioso, probablemente como resultado de su efecto inhibitorio sobre la formación de fimbrias en la superficie bacteriana.(11)(17)

INFECCIONES BUCO-FARÍNGEAS RESPIRATORIAS: Su espectro antimicrobiano es de especial importancia a nivel de las mucosas, ya que actúa sobre patógenos causantes de infecciones de la orofaringe y vías respiratorias, como: *Streptococcus pyogenes* del grupo A, *Stafilococcus aureus*, neumococo, *Neisseria meningitidis*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corinebacterium difteriae* y *Micobacterium tuberculosis*, incluso cepas resistentes al estilo de terapia antituberculosa convencional. Un estudio reporta que la berberina bloquea la adherencia de los estreptococos del grupo A, a las células del huésped. En vista de su espectro antimicrobiano, puede ser utilizado en casos de infecciones de amígdalas, infecciones faríngeas, gingivitis, piorrea, la sinusitis, etc. (11)(12)(17)(68)

ACCIÓN ANTICARIES: Estudios *in vitro* demuestran que la berberina ejerce una acción bactericida contra el *Streptococcus mutans*, microorganismo cariogénico. (68)

INFECCIONES URINARIAS: Dado que la berberina por sí misma, se da una concentración en la vejiga, los servicios de utilidad en el tratamiento de infecciones urinarias causadas por gérmenes susceptibles. (61)(68)

INFECCIONES VAGINALES: La berberina inhibe rápidamente el crecimiento de *Trichomonas vaginalis* formando grandes vacuolas autofágicas que eventualmente producen la lisis de los trofozoitos. Se ha demostrado efectividad contra otros patógenos vaginales como, *Candida albicans*, *Gonorrhea*, *Neisseria*, *Treponema pallidum* y *Clamidia*. (61)(68)

PALUDISMO: Estudios *in vitro* demuestran la acción de la berberina contra *Plasmodium falciparum*. Aparentemente interfiere con la replicación del parásito por inhibición de la enzima telomerasa. (68)

LEISHMANIASIS: En casos de infección por *Leishmania donovani*, la berberina disminuye marcadamente la carga parasitaria y mejora rápidamente los parámetros hematológicos en animales infectados. Los resultados de pruebas *in vitro* indican que inhibe la multiplicación de los amastigotes y su transformación en promastigotes. Inhibe la incorporación de nucleótidos de los ácidos nucleicos de los amastigotes, interfiriendo la síntesis de macromoléculas. Y así, evitando la respiración y la maduración de este parásito. (61)

EFFECTOS CARDIOVASCULARES: Estudios clínicos en humanos y animales indican que la berberina tiene efectos inotrópicos positivos, y cronotrópicos negativos, antiarrítmicos y vasodilatadores. Previene isquemia, taquiarritmias, inducidas por la contractilidad miocárdica. Estimula y disminuye la resistencia vascular periférica. Estos efectos atribuyen un bloqueo de los canales de potasio y estimulación del intercambio de sodio y calcio. Además, la prolongación en la duración del potencial de acción ventricular. (68)(70)

ACCIÓN ANTI-INFLAMATORIA: Estudios *in vitro* demuestran sobre células humanas que la berberina inhibe la proteína activadora 1 (AP-1), siendo el factor clave de las Naciones Unidas en la transcripción para evitar la inflamación y la carcinogénesis. Otro estudio, utilizando linfocitos humanos, demostró que la berberina ejerce sin efecto inhibitorio significativo sobre la transformación linfocitaria, concluyendo que la acción anti-inflamatoria puede deberse a una inhibición de la síntesis en los linfocitos activados. Un tercer estudio concluyó que durante la activación plaquetaria en respuesta al daño tisular, la berberina ejerce efecto directo en diversos aspectos del proceso inflamatorio. Inhibe la liberación de ácido arquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular, inhibe la liberación de tromboxano A2 plaquetario, e inhibe la formación de trombos. (11)(30)

1.5.6. INFORMACIÓN SOBRE LA ESPECIE DEL GÉNERO *Berberis hallii*

Berberis (*Bér-sea-ris*, bérbero, arbusto del pepperidge) género de cerca 450-500 especies de hojas caducas y árbol de hoja perenne arbustos a partir de la 1-5 m de alto con los lanzamientos espinosos, nativa a las regiones templadas y subtropicales de Europa, Asia, África, Norteamérica y Suramérica. (41)

Son plantas arbustivas de hasta 2m de altura, con tallos espinosos azucarados, los de un año son amarillentos, y floridos los de más años son grisáceos. Las espinas que son hojas modificadas, son de color pardo amarillento, simples o con hasta 5 ramas. La espina central es la mayor de hasta 30mm y las laterales menores de hasta 25mm. Las hojas de 15-50mm x 7-25mm. Son simples fasciculadas aparecen en la axila de las espinas y tienen forma elíptica, abovada u oblanceolada, con la base cuneada, sésil o con un corto peciolo hasta 20mm. Las flores aparecen en racimos alargados entre 9-20 flores, son amarillas y miden 4-6mm de diámetro, el cáliz tiene 6 sépalos, la corola de igual manera consta de 6 sépalos. El androceo está formado por 6 estambres opuestos a los pétalos y el gineceo por un ovario, que carece de estilo y un estigma truncado, persistente en el fruto. (10)(19)

El fruto es una baya de 5 - 9mm x 3 - 4,5 mm de forma oblonga, elipsoidal, de color rojo generalmente, con 2 semillas en el interior.

Crece en espinares, setos y bosques despejados, en zonas continentales, de sustrato calizo, pero con influencia atlántica, Desde los 300 a los 18000 m de altitud. Florece de mayo a junio. Dentro de los requerimientos ecológicos: (10)

- Luz: no soporta la sombra.
- Temperatura: calor moderado, piso Montaña principalmente
- Humedad: suelos muy secos, es un indicador de sequedad.
- Acidez: suelos ricos en bases, pH 5.5-8. Es indicadora de alcalinidad.
- Nitrógeno: suelos pobres en nitrógeno

Aparecen en Europa, al oeste de Asia y norte de África en la península aparece en norte este centro y sur. (13)

1.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Es una expresión que describe los efectos benéficos o adversos de una droga sobre la materia viva. Cuando la droga es una mezcla química compleja, esta actividad es ejercida por los principios activos de la sustancia pero puede ser modificado por los otros constituyentes. La principal clase de actividad biológica es la toxicidad de la sustancia. La actividad es generalmente dependiente de la dosis y no es común que tenga efectos en un rango de beneficioso a adverso para una sustancia cuando va de bajas a altas dosis. (3)(16)

Considerando que un material se considera bioactivo si tiene una interacción o efectos sobre cualquier tejido celular en el cuerpo humano, la actividad farmacológica es usualmente tomada para describir efectos benéficos. (23)(59)

1.6.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los agentes antimicrobianos son aquellos utilizados para destruir o impedir el crecimiento de los microorganismos. Por su estado pueden ser: líquidos, sólidos o gases y por su naturaleza, físicos y químicos. (1)(2)

La eficacia de estos agentes está condicionada por varios factores como son: la naturaleza y concentración del mismo, así como la concentración y características de la población microbiana presente, la temperatura, la duración del contacto entre el agente y los microorganismos, la naturaleza del material a descontaminar, particularmente la presencia de material orgánico, y el pH. (1)(2)

Los agentes antimicrobianos actúan sobre la estructura de la célula bacteriana y sobre sus procesos metabólicos, y sus modos posibles de acción son: desnaturalización de la proteína, rompimiento de la membrana o de la pared celular, remoción de grupos sulfhidrilos libres, interferencia con reacciones enzimáticas de los microorganismos y acción sobre el ADN.(59)

A continuación, algunos de los términos relacionados con los agentes antimicrobianos:

BACTERIOSTÁTICO.- Agente que inhibe el crecimiento de la bacteria; este se reanuda cuando se retira el agente.

BACTERICIDA.- Agente que mata a las bacterias. La mayoría no mata a las esporas bacterianas. Esta acción es irreversible.

GERMICIDA.- Agente capaz de matar microorganismos rápidamente, algunos de estos agentes actúan matando ciertos microorganismos, pero solamente inhiben el crecimiento de otros.

VIRUCIDA.- Agente que inactiva a los virus.

FUNGICIDA.- Agente que mata a los hongos.

ESPORICIDA.- Agente que mata a las esporas bacterianas o micóticas.

DESINFECTANTE.- Agente químico usado para matar microorganismos sobre objetos inanimados, pero que resulta tóxico para ser aplicado directamente a los tejidos.

ANTISÉPTICOS.- Son desinfectantes que pueden ser utilizados sobre la piel y, en casos especiales, sobre las mucosas.

ESTÉRIL.- Libre de vida de cualquier clase. Tenemos que señalar, que dado que el criterio de muerte para los microorganismos es su incapacidad para reproducirse, el material estéril puede contener células microbianas metabólicamente intactas.

SÉPTICO.- Presencia de microorganismos perjudiciales en el tejido vivo.

ASÉPTICO.- Ausencia de microorganismos patógenos. (2)(59)

1.6.1.1. Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos, según su acción, se pueden considerar bacteriostáticos o bactericidas y según su naturaleza pueden ser físicos o químicos. Entre los agentes físicos de esterilización se utiliza especialmente el calor (calor húmedo y calor seco), la filtración y las radiaciones. (8)

En cuanto a los agentes químicos, algunos tienen inconvenientes para su uso, por no cumplir el principio de toxicidad selectiva, porque resultan muy tóxicos e irritantes para el hombre o porque afectan los materiales a esterilizar. (59)

Hay agentes químicos que pueden emplearse como esterilizantes, por su enérgica acción sobre los microorganismos, pero muchos tienen que ser utilizados diluidos, con el objetivo de disminuir su toxicidad y poder irritante, y en este caso se usan habitualmente como desinfectantes o antisépticos. (28)

1.6.2. METABOLISMO MICROBIANO

La palabra microbiología deriva de las voces griegas **mikros**, pequeño; **bios**, vida y **logos**, estudio; por lo que etimológicamente en ella se estudian los organismos demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista. (39)

El crecimiento microbiano requiere la formación de estructuras bioquímicas complejas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos a partir de elementos preformados en el medio de crecimiento o ser sintetizados por la propia célula; a su vez, este crecimiento necesita de una fuente de energía para ser llevado a efecto; todo este proceso se designa con el nombre de metabolismo, que se define como todas las transformaciones químicas que ocurren en una célula. (29)

Cuando este va dirigido a la síntesis de macromoléculas se le nombra biosíntesis o anabolismo. (50)

1.6.3. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE M.O

Se denomina cultivo al proceso de propagar los microorganismos, proporcionándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en fase de crecimiento realizan réplicas de sí mismos y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química. Se le deben brindar los elementos nutritivos en una forma accesible desde el punto de vista metabólico. Además, los microorganismos requieren energía metabólica con el objetivo de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Durante el crecimiento se deben regular los factores nutricionales (carbono, nitrógeno, azufre y fósforo, elementos trazas y vitaminas) y los factores físicos (pH, temperatura, oxígeno, humedad, presión hidrostática, presión osmótica y radiación). (43)(50)(59)

1.6.3.1. Requerimientos para el crecimiento

El peso seco de los microorganismos consiste en materia orgánica que contiene carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. Se requieren, además, iones inorgánicos como potasio, sodio, hierro, magnesio, calcio y cloruro para facilitar la catálisis enzimática y conservar los gradientes químicos a través de la membrana celular. La materia orgánica se encuentra en macromoléculas formadas por enlaces anhídridos entre los bloques estructurales. Para la síntesis de los enlaces anhídridos se requiere la energía química proporcionada por los dos enlaces fosfodiéstericos del ATP (trifosfato de adenosina). Para conservar una composición citoplásmica relativamente constante, se necesita una energía adicional derivada de la fuerza motriz protónica que es la energía potencial que se puede liberar al pasar un protón a través de una membrana. (43)(50)

1.6.3.1.1. Fuentes de energía metabólica

Los tres modos principales de generar energía metabólica son: fermentación, respiración y fotosíntesis. Los microorganismos, para poder crecer, deben utilizar, por lo menos, uno de estos mecanismos. (46)(50)

1.6.3.1.2. Factores nutricionales

- NUTRICIÓN

La nutrición es la provisión de nutrientes para el crecimiento de un organismo. Los nutrientes de los medios de cultivo deben contener todos los elementos necesarios para la síntesis biológica de los microorganismos e incluyen carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, elementos trazas y vitaminas. (40)(50)

- FUENTE DE CARBONO

La mayoría de las bacterias utilizan compuestos de carbono como fuente de energía y otras, para la síntesis de elementos celulares. Los organismos fotosintéticos reducen el dióxido de carbono (CO_2) a glucosa y otras moléculas orgánicas. Los organismos autótrofos emplean nutrientes completamente inorgánicos; mientras que los heterótrofos requieren nutrientes orgánicos. (40)(50)

- FUENTE DE NITRÓGENO

Todos los organismos, incluyendo los microorganismos, necesitan nitrógeno para sintetizar enzimas, proteínas y ácidos nucleicos. Algunos microorganismos obtienen el nitrógeno a partir de fuentes inorgánicas y otros adquieren la energía mediante el metabolismo de sustancias que contienen nitrógeno inorgánico. Los procesos por los cuales las proteínas y los ácidos nucleicos son sintetizados, están directamente relacionados con la información genética contenida en la célula. El producto final de todas las vías de asimilación del nitrógeno es la forma más reducida del elemento, el ion amonio (NH_4^+).

Muchos microorganismos poseen capacidad para asimilar el nitrato (NO_3^-) y el nitrito (NO_2^-) de manera reductiva al convertir a estos iones en amoníaco (NH_3). (40)(50)

- AZUFRE Y FÓSFORO

Además del carbono y el nitrógeno, los microorganismos necesitan un suministro de ciertos minerales, especialmente azufre y fósforo, los cuales son componentes celulares importantes. Ellos obtienen el azufre a partir de las sales inorgánicas de sulfato y de los aminoácidos que contienen azufre, y lo utilizan en la elaboración de proteínas, coenzimas y otros componentes celulares. El fósforo es adquirido, principalmente, mediante iones fosfato inorgánico (PO_4^{3-}) y lo emplean para sintetizar ATP, fosfolípidos y ácidos nucleicos. (50)

- **ELEMENTOS TRAZAS**

Muchos microorganismos requieren una variedad de elementos trazas, usualmente en la forma de iones. Todos los organismos necesitan cierta cantidad de sodio y cloro, y los halófilos lo requieren en grandes cantidades. Potasio, Zinc y Manganeseo son usados para activar ciertas enzimas. El Cobalto es necesario a los organismos que sintetizan vitamina B₁₂. El Hierro es importante para la síntesis de compuestos que contienen el núcleo heme y para ciertas enzimas. (50)

Las bacterias Gram positivas requieren calcio para la síntesis de las paredes celulares y los organismos formadores de esporas, para la síntesis de las paredes de la espora. (50)

- **VITAMINAS**

Las vitaminas necesarias para algunos microorganismos incluyen inositol, ácido fólico, vitamina B₁₂ y vitamina K. Los microorganismos patógenos humanos requieren a menudo una variedad de vitaminas y por esta razón son capaces de crecer solamente cuando pueden obtener esas sustancias a partir del organismo hospedero. El desarrollo de tales organismos en el laboratorio necesita un medio complejo el cual contenga todos los nutrientes que normalmente obtiene de sus hospederos. (40)(50)

1.6.3.2. Factores ambientales que afectan el crecimiento

El crecimiento microbiano puede estar influido por una variedad de factores, tanto físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen: la concentración de iones hidrógeno (pH), la temperatura, la concentración de oxígeno, la humedad, la presión hidrostática, la presión osmótica y la radiación. Los factores nutricionales comprenden: la disponibilidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales, y en algunos casos vitaminas. (59)

1.6.3.2.1. Factores nutricionales

Para realizar estudios sobre metabolismo microbiano, por lo general es necesario preparar medios completamente sintéticos en los cuales las características y la concentración de cada ingrediente sean exactamente conocidas. La mayoría de los microorganismos de vida libre crecen bien en extracto de levaduras, mientras que las formas parásitas pueden requerir sustancias especiales que se encuentran únicamente en la sangre o en extractos de tejidos animales.

Para muchos organismos, un solo compuesto (como un aminoácido) puede servir como fuente de energía, de carbono y de nitrógeno; otros requieren un compuesto diferente para cada una de ellas. (50)

1.6.3.2.2. Factores físicos

- CONCENTRACIÓN DE IONES HIDRÓGENO (pH)

La acidez o alcalinidad de un medio es expresada en términos de pH. Los microorganismos tienen un pH óptimo en el cual se obtiene el mejor crecimiento. Comúnmente, el pH óptimo es neutro (pH 7), y la mayoría de los microorganismos no se desarrollan a una unidad de pH por encima o por debajo de su pH óptimo. (50)(59)

Las bacterias son clasificadas como acidófilas, neutrófilas y alcalinófilas de acuerdo con las condiciones de acidez o alcalinidad que ellas puedan tolerar. Las bacterias *acidófilas* se desarrollan en un rango que va desde pH 0,0 hasta 5,4. Las bacterias *neutrófilas* crecen en un rango de pH 5,4 hasta 8,5; incluyéndose en este grupo a la mayoría de las bacterias que causan enfermedades en el hombre. Las bacterias alcalinófilas se desarrollan entre un pH 7,0 hasta 11,5. *Vibrio cholerae*, agente causal del cólera, se desarrolla mejor a un pH cercano a 9. (59)

- TEMPERATURA

La mayoría de las bacterias se desarrollan a un rango de temperatura por encima de 30°C, pero las temperaturas mínimas y máximas varían considerablemente para las diferentes especies. Las bacterias pueden ser clasificadas, de acuerdo con el rango de temperatura al cual se desarrollan, en psicrófilas, mesófilas y termófilas; y a su vez sub-clasificadas como obligadas o facultativas. Obligada significa que el organismo debe tener las condiciones ambientales específicas, y facultativa que el organismo es capaz de tolerar las condiciones ambientales, pero puede desarrollarse, además, en otro ambiente.

Las bacterias psicrófilas se desarrollan mejor entre 15 y 20°C, y pueden ser subdivididas en psicrófilas obligadas cuando no crecen por encima de 20°C y psicrófilas facultativas cuando son capaces de crecer por debajo y por encima de 20°C. Las bacterias mesófilas incluyen a la mayoría de las bacterias y se desarrollan en un rango de temperatura entre 30 y 37°C. Las bacterias patógenas al hombre están incluidas en esta categoría y la mayoría de ellas crecen mejor a una temperatura cercana al cuerpo humano (37°C). Las bacterias termófilas se desarrollan mejor a temperaturas entre 50 y 60°C. (59)

- **CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO**

Las bacterias, especialmente las heterótrofas, pueden ser divididas en aerobias, que requieren oxígeno para crecer, y anaerobias, las cuales no lo requieren. Los microorganismos aerobios obligados, tales como *Pseudomonas*, que causa muchas infecciones adquiridas en el hospital, se desarrollan en presencia de oxígeno libre; mientras que los anaerobios obligados, tales como *Bacteroides*, mueren en presencia de oxígeno libre. Entre estos extremos se encuentran los microorganismos microaerofílicos que se desarrollan mejor en presencia de una pequeña cantidad de oxígeno libre. Los microorganismos anaerobios facultativos son capaces de desarrollarse en ausencia y en presencia de oxígeno. *Bacillus* y *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y se encuentran en el tracto intestinal y urinario donde sólo está disponible una pequeña cantidad de oxígeno. (43)(59)

- **HUMEDAD**

Generalmente todas las células con un metabolismo activo requieren agua del ambiente. A diferencia de los organismos superiores, los organismos unicelulares están expuestos

directamente a su ambiente. La mayoría de las células vegetativas sólo pueden vivir pocas horas sin humedad; sólo las esporas y los organismos formadores de esporas pueden existir en un ambiente seco. (43)(59)

- **PRESIÓN HIDROSTÁTICA**

Las bacterias que viven a altas presiones mueren si son mantenidas en el laboratorio pocas horas en condiciones de presión atmosférica estándar.

- **PRESIÓN OSMÓTICA**

La mayoría de las bacterias pueden tolerar un rango amplio de concentraciones de sustancias disueltas. Su membrana celular contiene un sistema enzimático llamado permeasas que regulan el movimiento de las sustancias disueltas a través de las membranas. Si la concentración fuera de la célula se torna demasiado alta, la pérdida de agua puede inhibir o detener el crecimiento celular. Ciertas bacterias llamadas halofílicas requieren de una moderada a gran cantidad de sal y se hallan en el océano donde la concentración de sal (3,5%) es óptima para su crecimiento. (59)

- **RADIACIÓN**

La energía radiante, particularmente la luz ultravioleta, puede causar mutaciones y eventualmente ocasionar la muerte de los organismos. Sin embargo, algunos microorganismos tienen pigmentos que los protegen de la radiación y ayudan a prevenir el daño del ADN. Otros poseen sistemas enzimáticos que pueden reparar algunos tipos de daños del ADN. (43)(59)

1.6.4. MÉTODOS DE CULTIVO

Debido al pequeño tamaño de los microorganismos, la información que puede obtenerse acerca de sus propiedades a partir del examen de los individuos es limitada; en la mayoría de los casos se estudian poblaciones que contienen millones o miles de millones de individuos.

Estas poblaciones se obtienen al hacer crecer los microorganismos bajo condiciones más o menos bien definidas, como cultivos. Un cultivo que contiene solamente una clase de microorganismo se conoce como -cultivo puro-; el que comprende más de una clase de microorganismo se denomina -cultivo mixto-. En el estudio de los microorganismos es importante tener presente que el cultivo es un procedimiento mediante el cual se promueve el crecimiento de los microorganismos al brindarles las condiciones ambientales adecuadas, y el aislamiento de un organismo en cultivo puro, mediante la aplicación de técnicas de laboratorio para separarlo de las poblaciones mixtas. (43)(50)(59)

1.6.4.1. Aislamiento de un organismo en cultivo puro

Para estudiar las propiedades de un organismo, es necesario no sólo su aislamiento a partir de una población microbiana natural mixta, sino también su mantenimiento y el de su descendencia en estado aislado, en un ambiente artificial en el que se impida el acceso de otros microorganismos. Para esto se cuenta con varios métodos: (43)(47)

- SIEMBRA EN PLACA

La manera más fácil de obtener cultivos puros de los microorganismos que forman colonias sobre los medios sólidos, se lleva a cabo mediante la separación e inmovilización de los organismos individuales sobre o dentro de un medio nutritivo solidificado; cada célula crecerá dando una colonia aislada cuya transferencia puede hacerse fácilmente. (59)

La sustancia solidificante ideal para la mayor parte de los medios de cultivo microbiológicos es el agar, un polisacárido ácido extraído de ciertas algas rojas. En una concentración de 1,5-2 %, en suspensión acuosa, se disuelve a 100°C formando una solución clara que solidifica a 45°C, la cual no volverá a licuarse hasta temperaturas mayores de 80°C, de manera que cualquier temperatura empleada para la incubación posterior puede ser usada. (59)

La siembra por estría es el método más útil de sembrar en placa y se realiza empleando un asa de alambre estéril que se introduce en la suspensión original para luego hacer una serie

de estrías paralelas, no superpuestas, sobre una placa de agar. Al ir avanzando la estría, el inóculo va disminuyendo hasta obtener colonias bien aisladas sobre el agar. (43)

Alternativamente, los aislamientos pueden hacerse con placas sembradas por vertido, para ello una suspensión del microorganismo se mezcla con el medio de cultivo que contiene agar fundido el cual se vacía en placas de Petri estériles; cuando el agar se solidifica, las células se inmovilizan y se desarrollan dando colonias aisladas. (28)

- **DILUCIÓN**

Los métodos de siembra en placa por lo general son satisfactorios para el aislamiento de bacterias y hongos. Sin embargo, muchos protozoos son sólo cultivables en medio líquido. Con una suspensión del microorganismo, se realiza una dilución en serie utilizando un medio estéril y se inocula un gran número de tubos con el medio de cultivo, con partes alícuotas de cada una de las diluciones sucesivas. Como resultado de esto, si un tubo muestra algún crecimiento subsiguiente, existe una elevada probabilidad de que este crecimiento sea el resultado de la introducción de un solo organismo. (28)

Cuando no puede aplicarse ni el método de siembra en placa ni el de las diluciones, una alternativa consiste en recurrir al aislamiento microscópicamente controlado, de un solo organismo a partir de una población mixta. (16)(28)

- **CULTIVO DE HONGOS**

La mayor parte de los hongos existen en la naturaleza y proliferan con facilidad en presencia de fuentes simples de nitrógeno y carbohidratos. Los cultivos para hongos se hacen comúnmente en juegos de pares, uno incubado entre 25 a 30°C y el otro entre 35 a 37°C. (50)

1.6.5. CRECIMIENTO MICROBIANO

Se define como crecimiento al aumento ordenado de todos los componentes químicos de un organismo. El aumento de masa (tamaño) no resulta un crecimiento verdadero, ya que las células pueden estar incrementando sus reservas, captando agua, etc.

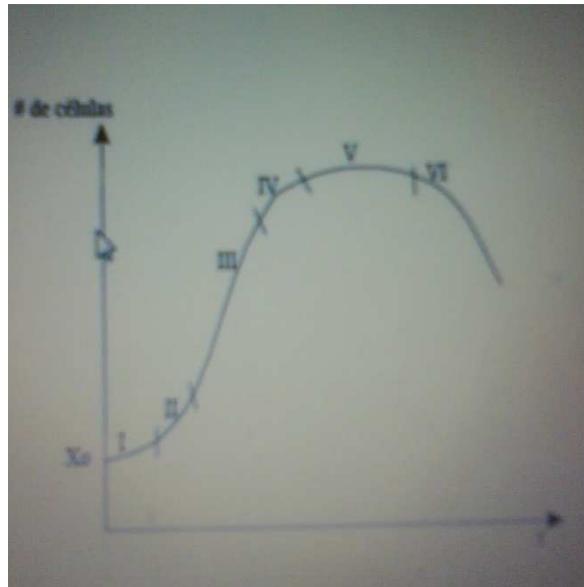
Las bacterias que se adaptan a un medio adecuado se encuentran en un estado de crecimiento equilibrado donde la duplicación de la biomasa representa la duplicación de todas las demás propiedades medibles como son el ARN, ADN, proteínas y el agua intracelular.

La existencia de este crecimiento equilibrado es de gran ayuda a la hora de medir el crecimiento bacteriano pues, como todos los componentes poseen la misma velocidad de crecimiento, basta medir uno de ellos para determinar la misma. (50)

La multiplicación celular es una consecuencia del crecimiento, esta conduce al aumento en número de individuos originando una población o cultivo. (16)(27)(50)

1.6.5.1. Curva de crecimiento microbiano

En un crecimiento equilibrado, la velocidad de aumento de bacterias en un tiempo determinado es directamente proporcional al número o masa de bacterias presentes en ese tiempo. (50)



FOTOGRAFIA N°2 CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO (50)

1. FASE I: FASE LAG O DE RETRASO $V_c = 0$

Adaptación a un medio ambiente de células empobrecidas del arsenal metabólico (enzimas) y de sustratos como resultado de las condiciones desfavorables al final del cultivo. Existe un cese parcial de las funciones metabólicas.

Formación de enzimas y metabolitos intermediarios necesarios para la reanimación del crecimiento. (50)

2. FASE II: FASE DE ACELERACIÓN POSITIVA $V_c = \text{CRECIENTE}$

Las células disminuyen de tamaño, comienzan a utilizarse las reservas, aparecen nuevas funciones. (50)

3. FASE III: FASE EXPONENCIAL O DE CRECIMIENTO LOGARÍTMICO $V_c = \text{CONSTANTE}$

Proceso de catálisis que conlleva al aumento en forma exponencial de la masa bacteriana. Existe un equilibrio de flujo de material. Este proceso se mantiene hasta que:

- Se agoten los nutrientes (fundamentalmente oxígeno en los aerobios).
- Se acumulen muchas sustancias tóxicas que inhiban el crecimiento.
- Se pongan de manifiesto las propiedades más importantes de la célula. (50)

4. FASE IV: FASE DE DESACELERACIÓN O RETARDO $V_c = \text{DECRECIENTE}$

Estadio de deficiencia. Las células viven del metabolismo endógeno, disminuye la velocidad de crecimiento. (50)

5. FASE V: FASE ESTACIONARIA MÁXIMA $V_c = 0$

Cese completo del crecimiento por agotamiento de nutrientes y acúmulo de sustancias tóxicas. Pérdida lenta de células por muerte compensada debido a la formación de células nuevas mediante su crecimiento y división. (50)

6. FASE VI: FASE DE DECLINACIÓN O Muerte $V_c = \text{NEGATIVA (MUERTE)}$

Aumento de la tasa de mortalidad hasta un nivel sostenido. Persiste un número pequeño de sobrevivientes por meses o años a expensas de los nutrientes de las que mueren.

La célula pierde toda capacidad para los procesos degradativos. (50)

1.7. DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

1.7.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

1.7.1.1. Taxonomía

Reino	Bacteria
Phillum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Micrococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i>

1.7.1.2. Morfología

Son esféricos frecuentemente en forma de racimo, pero también pueden observarse aislados, en parejas, en cadenas cortas o en tétradas; alcanzan de 0,5 a 1 micro de diámetro, Gram-positivos e inmóviles, normalmente acapsulados, no forman esporas. (14)

Staphylococcus aureus es un microorganismo del reino de los protistas, ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales. El hombre es portador asintomático entre un 20 y un 40% de los adultos sanos y forma parte de la flora normal de muchos sitios del organismo como piel y nasofaringe y tracto gastrointestinal, causando diversas manifestaciones clínicas. Casi toda persona presenta algún tipo de infección por *S. aureus* durante la vida, que varía en gravedad desde intoxicación alimentaria o infección cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales. (28)(57)

La palabra griega “staphyle” significa racimo de uvas, y constituye la raíz del término genérico, en tanto aureus hace referencia al pigmento dorado característico de la especie. Típicamente en el aislamiento inicial el microorganismo produce su color característico amarillo dorado, pero esta facultad es variable observándose blancas o pálidas después del cultivo en el laboratorio y aun frecuentemente en material clínico. (28)

Las colonias son opacas, circulares, lisas y enteras, su consistencia es mantecosa, *S. aureus* crece en TSA o Agar nutritivo, pero en Agar sangre desarrolla colonias de 2-3 mm de diámetro en 24 horas. (14)

Se lo clasifica como Gram positivos pero la facultad de conservar el cristal violeta cambia sobre todo en cultivos viejos, observándose variabilidad con el Gram e incluso pueden parecer Gram negativos. *S. aureus* es un coco inmóvil, capaz de presentarse aislado, en pares, en cadena corta o en racimos irregulares, siendo la última disposición la más característica. (8)

Son organismos que no forman esporas, sus diámetros varían entre 0.7 y 1.2 micras; crecen en cultivos con altas concentraciones de cloruro de sodio y bilis en forma abundante. Las colonias de *S.aureus* son redondas, convexas, cuando están bien aisladas tienen de 1 a 3 mm de diámetro y de color amarillo dorado debido a un pigmento compuesto de dos caratenoides, d-caroteno y sarcinaxantina. (21)

La mayoría de cepas elaboran la enzima coagulasa, capaz de coagular el plasma también producen toxinas conocidas como estafilolisinas, donde se incluyen cuatro tipos de hemolisinas, destacando la hemolisina alfa, proteína capaz de lisar diversos tipos de células incluyendo los leucositos humanos; producen además sustancias como la hialuronidasa, estafiloquinasa, lipasa, proteinasa, nucleasa (DN-asa y RN-asa).

Existen cepas que producen penicilinas, la cual inactiva la porción beta-lactama de la penicilina, esto explica la resistencia del microorganismo a los antibióticos. La pared estafilocócica contiene una columna vertebral de péptidoglucano y ácidos teicoicos

específicos de cada especie, *S. aureus* posee un componente antifagocitario de superficie, la proteína A, unida a la pared de peptidoglucano, pero que puede ser liberado extracelularmente. (9)

La mayor parte de las cepas de *S. aureus* fermentan el manitol, soportan concentraciones del 7.5 a 10% de sal, y crecen en un medio de agar con alcohol feniletílico, y son relativamente resistentes a la polimixina. Las características anteriores favorecen su aislamiento de material fecal. (29)

Una característica importante de *S. aureus* es su facultad para desarrollar resistencia a los antibióticos, al menos el 90% de cepas de estafilococos hospitalarios son resistentes a la penicilina, gracias a la penicilinasasa, es menor frecuente la resistencia penicilinasasa resistentes, como la metilcilina, pero existen cepas metilcilina, pero existen cepas metilcilin-resistentes de *S. aureus* las cuales han alterado el sitio de ataque. (28)

1.7.1.3. Crecimiento

La familia Micrococcaceae son aerobios o anaerobios facultativos, algunas cepas necesitan de determinada atmósfera de CO₂ para su crecimiento, crecen en medios ordinarios y en presencia de una elevada concentración salina (7,5-10% de NaCl). Pueden producir pigmentos desde blanco, naranja o amarillo hasta el dorado. Algunas cepas son beta-hemolíticas en agar sangre. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C pero tienen un intervalo de temperatura 10-45°C. La temperatura óptima para el crecimiento del estafilococo es de 37°C aunque su desarrollo se produce fácilmente a temperaturas tan bajas como los 5°C y tan altas como 45°C el pH fluctúa entre 7,4 a 7,6 y los valores extremos de pH varían de 5-9. (14)

En los caldos de cultivo permanecen vivos a la temperatura de la estufa por tres semanas durante tres a cuatro meses a la temperatura del laboratorio. Las siembras en agar nutritivo mantenidas en refrigeración conservan su vitalidad durante un año. La mayoría de las cepas de estafilococos patógenos son destruidas por calentamiento a 80°C por espacio de una hora mientras que, casi todas las bacterias mueren en minutos a 60°C. El aldehído fórmico al 2%, el agua oxigenada al 1% los destruyen en algunos minutos. (14)(34)

1.7.1.4. Patogenicidad

Para fines clínicos, los estafilococos se identifican como: *S. aureus*, *S. epidermidis*, entre otros, en la mayoría de los laboratorios.

S. aureus es potencialmente patógeno, las infecciones estafilocócicas específicas son los forúnculos, el impétigo ampollar, la osteomielitis, la enteritis y la intoxicación alimentaria por enterotoxina. Se comprueba que éstos causan infecciones en muchos tejidos, órganos y tractos del cuerpo como: endocarditis, septicemia, meningitis, orzuelos, neumonía, cistitis y sepsis puerperal, etc. (14)

S. aureus puede producir una variedad de procesos infecciosos que van desde la infección cutánea relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales. Las infecciones cutáneas incluyen foliculitis simple y el impétigo (infección superficial de la piel en niños). (28)

En cuanto a infecciones profundas, se pueden desarrollar infecciones más extensas y profundas a partir de infecciones cutáneas, endógenas, o de una exposición a fuentes exógenas. Un recién nacido que es hospitalizado expuesto al estafilococo puede adquirir una neumonía o una septicemia fatal. Los ancianos que han experimentado un ataque de influenza pueden sucumbir a una neumonía estafilocócica. La osteomielitis, una infección del hueso y médula ósea que asume la forma de un absceso resulta difícil de erradicar.

También hay cepas de *S. aureus* que pueden producir intoxicaciones alimentarias debido a la elaboración de exotoxinas durante su desarrollo en alimentos contaminados. Dos a tres horas después de la ingestión de ésta causa un cuadro caracterizado por vómitos violentos, calambres, diarreas y postración, raras veces es fatal, el paciente se recupera en un lapso máximo de 24-48 horas. (14)(28)(40)

1.7.1.5. Características bioquímicas

Catalasa	positivos
Producción de ácido a partir de glucosa	Condiciones aeróbicas y anaeróbicas
Manitol	positivo
Fosfatasa	positiva
Coagulasa	positivo
Reducción Nitrito a nitrato	positivo

(14)

1.7.1.6. Características generales de cultivo de *S. aureus*

Los estafilococos en agar sangre desarrolla abundantemente en un tiempo de 18-24 horas. Las colonias tienen de 1-3 mm de diámetro, frecuentemente opacas, grandes, circulares, lisas, elevadas, de consistencia viscosa o cremosa, en un medio primario como el agar sangre son fáciles de reconocer y al colorearles los racimos de cocos Gram-positivos provenientes de cultivos líquidos son sumamente característicos. (34)(47)

Aislado inicialmente el *S. aureus* produce un pigmento amarillo dorado; sin embargo, en muchos casos las colonias son blancas o incoloras. Aunque el color blanco o incoloro de dichas colonias ha sido interpretado como criterio diferencial para identificar a *S. epidermidis* aunque esto no es seguro. La actividad hemolítica es propia de *S. aureus*. (58)

S. aureus producen catalasa, ya que poseen esta enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina. También es coagulasa positivo, la cuál es una enzima proteica de composición química desconocida con actividad semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coagulo visible. (34)

En cuanto a la fermentación en manitol las colonias de *S. aureus* se desarrollan bien en el medio formando un halo amarillo en el agar circundante, que indica la producción de ácido a

partir del manitol (el indicador de rojo de fenol es amarillo a un pH inferior a 6,8 puesto que el pH final del medio está estabilizado a pH 7,4. La producción de cantidades pequeñas de ácido hace que se produzca el color). (14)

1.7.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

1.7.2.1. Taxonomía

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria
Orden	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomona</i>
Especie	<i>P. aeruginosa</i>

1.7.2.2. Morfología

Etimológicamente, *Pseudomonas* significa falsa unidad, del griego *pseudo*, que significa falso, y *monas*, que significa unidad simple. El nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes, *aeruginosa* es el nombre latino para el cardenillo u óxido de cobre. Esto describe el pigmento azul verdoso bacteriano, visto en los cultivos de laboratorio de *P. aeruginosa*. (28)

Son bacilos Gram negativos pequeños bastoncillos delgados de 1.5 mm y 3 mm. Están unidos en pares y en cadenas cortas, posee un flagelo polar. Crece 30° a 37°, aerobio estricto y su fuente de energía: Oxidación de azúcares, no fermentadores, (no fermentan la glucosa), son oxidasa-positivos (la oxidación comprende del Transporte por citocromo “C”), es aeróbico pero facultativamente anaeróbico y la mayoría de las especies producen pigmentos:

Piocianina

azul-oscuro

Pioverdinas	Pigmentos Fluorescentes Luz UV
Piomelanina	amarillo-verdoso o amarillo parduzco marrón-negro

(28)

1.7.2.3. Patogenicidad

Este patógeno es oportunista de individuos inmunocomprometidos, *Ps. aeruginosa* infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre. *Pseudomonas* puede causar neumonías a grupos, necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes agentes aislados en muchos estudios. La piocianina es un factor de virulencia de la bacteria. Sin embargo, la investigación indica que el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina. Uno en diez hospitales se infecta con *Pseudomonas*. La fibrosis quística está también predispuesta a la infección con *Ps. aeruginosa* de los pulmones. *Ps. aeruginosa* es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua de bebida. El más común causante de altas fiebres en infecciones es *Ps. aeruginosa*. También ha estado involucrado en foliculitis de tinas de agua caliente, en especial aquellas sin un control higiénico continuo. (28)

En el hombre es el agente causal de una serie de tipos clínicos conocidos como piocianosis. Causa conjuntivitis virulenta en recién nacidos, lesiones ulcerativas de la cornea, meningitis, endocarditis y septicemia son afecciones de curso mortal. (22)

Pseudomonas aeruginosa es el pseudomonadal que con mayor frecuencia se recupera de las muestras clínicas. La infección es especialmente prevalente entre pacientes con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplantes de órganos y adicción a drogas intravenosas. Las infecciones se observan habitualmente en los sitios en los que tiende a acumularse humedad: traqueostomías, catéteres permanentes, quemaduras, oído externo (oído del nadador) y heridas cutáneas oxidativas. (28)(39)

La exudación de pus azulado, con olor a uvas producido por la piocianina, es característica de *P. aeruginosa* también produce infecciones del tracto urinario y del tracto respiratorio inferior; éstas últimas pueden ser graves e incluso amenazantes para la vida de huéspedes inmunocomprometidos. El m.o también produce infecciones oculares devastadoras. La queratitis por *Pseudomonas*, la infección de úlceras de la córnea y la endoftalmitis deben encararse como una emergencia médica que puede ser fulminante y que amenaza con la pérdida permanente de la visión. Con regular frecuencia aparecen en bibliografía casos aislados de endocarditis, meningitis, abscesos cerebrales e infecciones óseas por diseminación hemática. La mayoría de los casos de endocarditis requiere un remplazo valvular debido a que la infección es difícil de erradicar. (28)(39)

P. aeruginosa produce varias sustancias que suponen aumentan la colonización e infección de tejidos del huésped. Estas sustancias junto con una variedad de factores de virulencia, incluidos el lipopolisacárido (LPS), la exotoxina A, la leucocidina, la viscosidad extracelular, las proteasas, fosfolipasa y varias otras enzimas hacen que ésta bacteria tenga mayor importancia clínica dentro de los bacilos Gram negativos no fermentador (BNF). (28)

Con plantas, *Ps. aeruginosa* induce síntomas de "pudrición de raíces" con *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa* (lechuga). (50)

1.7.2.4. Características bioquímicas

Piocianina	positivo
Pioverdina	positivo
Desarrollo o crecimiento a 42°C	positivo
O-F glucosa oxidasa	Oxidativo o inerte
Movilidad	positivo
Arginina dehidrolasa	positivo
Hidrólisis de la gelatina	positivo (46)
Ureasa	V
Reducción de nitrato (NO ₃)	positivo (74)
Gluconato	positivo
Manitol	V
Indol	negativo
Citrato	positivo
catalasa	positiva
Kanamicina	R

Carbenicilina

S

V (11-89%): de las cepas positivas, los números entre paréntesis indican el porcentaje de cepas que dan reacción positiva. (6)(28)

1.7.2.5. Características generales de cultivo de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa requiere un medio aeróbico para su crecimiento óptimo. En caldo simple se desarrolla en exceso, forma una fuerte turbiedad, anillo y película, forma un denso agrado que parece polvo de tiza fácilmente desintegrable, es característico un olor intenso debido a la trimetil-amina, el medio se torna de color verdeazulado. (27)

En agar simple, las colonias son grandes redondas, brillantes, de borde continuo u ondulado, grisáceas con el centro opaco y periferia traslucida, pH 6.8 a 7.2, la colonia no toma color por el pigmento elaborado, este se difunde al medio proporcionándole una tonalidad verdosa fluorescente en los primeros días, que posteriormente se vuelve parda. (9)(27)

1.7.3. *Candida albicans* ATCC 10231

1.7.3.1. Taxonomía

Reino	Fungi
Filo	Deuteromiceta
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>C. albicans</i>

1.7.3.2. Morfología

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al Género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, estas son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii*. (14)

C. albicans es una levadura, cuyas células en yema son redondas, ovaladas u oblongas de 2.5 por 3-14 µm y de paredes delgadas, se presentan solas o en racimos, presentan coloración azul al Gram. (9)

Forma clamidosporas de pared gruesa sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas y blastoconidias producidas en densos racimos regularmente espaciados a lo largo de las pseudohifas. (58)

Es un hongo dimorfo capaz de producir hifas y micelios verdaderos, a menudo forma pseudomicelios compuestos de pseudohifas. Las paredes celulares de *C. albicans* contiene los constituyentes micóticos típicos y además compuestos no identificados que son tóxicos.(27)

1.7.3.3. Patogenicidad

C. albicans es un agente colonizador habitual de la piel y mucosas humanas. En promedio, el 25-30% de los individuos son portadores de *C. albicans* en la cavidad oral, con mayor incidencia en los lactantes, niños pequeños y personas con SIDA. La mala higiene bucal y las dentaduras postizas aumentan la tasa de portación oral. Alrededor del 50% de las personas poseen *C. albicans* en su tracto gastrointestinal y alrededor del 30% de las mujeres tienen colonización vaginal en algún momento. La portación vaginal es particularmente prevalente durante el embarazo. (46)(47)

La capacidad de ciertas cepas de *C. albicans* de sufrir un cambio fenotípico, es decir, la formación de tipos de colonia en apariencia diferente, en particular las que muestran formación de franjas discontinuas cuando se cultivan en medios sintéticos específicos, se asocia de manera estrecha con la videncia e invasión tisular. (28)

La candidiasis es la más frecuente de las micosis sistemáticas, causa alrededor del 25% de todas las muertes dependientes de hongos. La candidiasis es una infección aguda o subaguda provocada por *C. albicans*, éste hongo puede ser aislado de heces, vagina, garganta, uñas, bronquios y los pulmones de pacientes en quienes los mecanismos de defensa normales se hallan alterados por otra enfermedad, por ejemplo por el empleo excesivo de antibióticos o agentes inmunosupresores. También existen reportes de ciertas infecciones de la sangre como, endocarditis (en drogadictos) y meningitis ocasionada por *Candida*. (14)

1.7.3.4. Características bioquímicas

Maltosa	positivo
Sacarosa	positivo
Trehalosa	positivo
Galactosa	Positivo
Celobiosa	Negativo
Xilosa	Positivo
Rafinosa	Negativo
Lactosa	Negativo
Dulcitol	Negativo
Melibiosa	Negativo
Ureasa	Negativo
NO ₃ . NO ₂	Negativo
Pseudohifas	positivo
Actidiona	R

(6)(28)

1.7.3.5. Características generales de cultivo de *Candida albicans*

Candida albicans a temperatura ambiente existe como levadura, pero cuando se inocula dentro de un huésped susceptible o cuando son cultivadas con bajos potenciales de óxido-reducción forman filamentos denominados pseudomicelios. En cultivo se trata de una colonia de crecimiento rápido (2-5 días) p de crecimiento lento (2-3 semanas). (22)

C. albicans crece rápidamente en agar Sabouraud, agar sangre, soya tripticasa y en otros medios enriquecidos. (21)(22)

En agar glucosado de Sabouraud germina bien y produce colonias que recuerdan las bacterianas; son irregulares, cremosas, húmedas, opacas y al envejecer desarrollan hifas al interior del agar. Son capaces de desarrollarse a 37°C o a temperatura ambiente. (28)

El crecimiento es aerobio, diminutas colonias suelen ser visibles ya q las 24-36 horas y alcanza un tamaño de 1.5 a 2 mm en aproximadamente una semana en agar Sabouraud. Las colonias por lo general son de color blanco pero pueden tornarse cremas o bronce al envejecer. (47)(50)

En el cultivo en el medio de Sabouraud podemos ver colonias blancas, blandas, cremosas, con olor a levadura. A la observación de las mismas en el microscopio hallamos blastoconidias en la superficie y en la profundidad, el pseudomicelio compuesto de pseudohifas; en las uniones de estas últimas se ven blastoconidias agrupadas en racimos, y a veces hay clamidosporas en los extremos. (14)(27)(50)

1.7.4. *Escherichia coli* ATCC 9637

1.7.4.1. Taxonomía

Reino	Bacteria
Phillum	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria

Orden	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E.coli</i>

1.7.4.2. Morfología

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos que, en ocasiones, en cultivos jóvenes, se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 y 2 um de ancho, y de 2 a 4um de largo. La presencia de una cápsula puede ser observada muy rara vez en algunas cepas de *E. coli*. (43)

Las bacterias pertenecientes a esta familia no pueden clasificarse sobre la base de la coloración de Gram, puesto que todos sus miembros se presentan con la misma forma y afinidad tintoreal. (43)

E. coli son bacilos de 1 a 3 um por 0.5 um, sus formas varían desde cocos a pequeños bastoncillos, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas, agrupados, en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes móviles no flageladas. No forman esporas; generalmente son no capsulados y Gram negativos. (39)(43)

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* toleran temperaturas hasta de 42 °C. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno son aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Los requerimientos de nutrientes en el metabolismo de los miembros de esta familia no son altamente exigentes y crecen de manera muy similar, cualquiera de sus especies, en la mayoría de los medios que se utilizan, por lo general, en el laboratorio de microbiología clínica diagnóstica, desde un agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo. (50)

En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en los cultivos viejos se presentan formas de una dimensión mayor. Produce dos tipos de fibra que rigen su capacidad

patógena. Produce un tipo de enzima denominada bacteriocina que se sabe regular la flora normal según el principio de la antibiosis. (47)

1.7.4.3. Patogenicidad

E. coli es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos humanos y sistemas de órganos. *E. coli* es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis Gram negativa y shock inducido por endotoxinas. Las infecciones del tracto urinario y de las heridas, la neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infección causada por *E. coli*. (28)

Las infecciones por *E. coli* pueden ser divididas en extraintestinales e intestinales. Las extraintestinales pueden ocurrir por el contacto de persona a persona. *E. coli* es una causa común de infecciones urinarias como: cistitis, pielitis, pielonefritis, esto ocurre por la íntima asociación entre el hábitat normal de los microorganismos y el tracto urinario, estas infecciones están alrededor del 20% de todas las infecciones urinarias en Hospitales. En pacientes tratados. (29)

Las infecciones intestinales están limitadas a las producidas por las seis clases de *E. coli* que en la actualidad se consideran como patógenas entéricas, estas son:

E. coli enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* difusamente adherente (ECDA). (9)(28)

TABLA N°1. CLASES DE *ESCHERICHIA COLI* CONSIDERADAS COMO PATÓGENAS ENTÉRICAS, CON SU FENOTIPO Y PATOLOGÍA (28)

TÉRMINO	FENOTIPO PATÓGENO	PATOLOGÍA
<i>E. coli</i> enterotoxígena	Elaboración de toxinas secretorias (LT, ST) que no dañan el epitelio mucoso	“Diarrea del viajero”. El síntoma predominante es una diarrea acuosa profunda, a menudo acompañada de contracciones abdominales leves. En algunos casos ocurren deshidratación y vómitos
<i>E. coli</i> enteropatógena	Se adhieren a las células epiteliales en microcolonias localizadas y causan lesiones de adhesión y borrado.	Usualmente ocurre en infantes. Se caracteriza por fiebre de bajo grado, malestar, vómitos y diarrea, con una cantidad prominente de moco, pero sin mucha sangre.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Invaden células epiteliales	Disentería: las características sobresalientes son fiebre y colitis. Síntomas de tenesmo, sangre y moco y muchos leucocitos en materia fecal.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Elaboración de citotoxinas (SLT)	Diarrea sanguinolenta con leucocitos. A menudo sin fiebre. Es común el dolor abdominal.
<i>E. coli</i> enteroagregativa	Se adhieren a células epiteliales en un patrón que hace recordar una pila de ladrillos	Diarrea acuosa, vómitos, deshidratación y con menor frecuencia dolor abdominal.
<i>E. coli</i> difusamente adherente	Se ha descrito una fimbria superficial que media el fenotipo de adhesión difusa designada como F 1845 y que está mediada por genes que pueden ser cromosomales o estar portados por un plásmido.	Diarrea en niños de 1-5 años. Heces líquidas sin sangre ni leucocitos.

1.7.4.4. Características bioquímicas

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo
SH ₂	Negativo
Citrato	Negativo
Fenilalanina desaminasa	Negativo
Indol	Positivo
Lisina descarboxilasa	Positivo

Manitol	Positivo
Movilidad	Positivo
Ureasa	Negativo

1.7.4.5. Características generales de cultivo de *Escherichia coli*

En los medios sólidos se observan colonias relativamente grandes, de color grisáceo, en agar sangre se presentan colonias de aspecto grande con un brillo metálico de color verdoso, con olor característico y fuerte, de aspecto húmedo y de bordes definidos. En los medios líquidos, las cepas de enterobacterias enturbian el medio homogéneamente. Las diversas tribus, géneros y especies que conforman la familia *Enterobacteriaceae*, no pueden ser diferenciados en los medios universales. La diferenciación primaria de las distintas especies se fundamenta en la presencia o ausencia de enzimas codificadas por el material genético cromosomal o adquiridas por medio de plásmidos. Estas enzimas se presentan en alguno de los pasos del metabolismo bacteriano y pueden ser detectadas usando medios diferenciales o selectivos, así como medios para estudios de utilización de sustratos como son los arbohidratos y para decarboxilación o desaminación de aminoácidos, a los cuales, además del sustrato seleccionado, se les añade un indicador para poder detectar la utilización de este en el metabolismo bacteriano. (50)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO

La presente investigación se desarrolló en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. RECURSOS MATERIALES

2.2.1. MATERIA PRIMA

Carrasquilla (*Berberis hallii*), vegetal que se consiguió en el cantón San Andrés en las siguientes coordenadas S 01° 36' 16", W 078° 33' 46", a una altitud de 2728m.s.n.m. a 8 km de la ciudad de Riobamba, de lo cual se separó la raíz, parte principal para realizar el extracto.

2.2.2. EQUIPOS

N°	DESCRIPCIÓN
1	Rotavapor R110
2	Bomba de presión
3	Autoclave P – C
4	Balanza analítica
5	Refrigeradora
6	Estufa bacteriológica
7	Cámara Digital
8	Computadora
9	Microscopio
10	Vortex
11	Ultrasonido
12	Refractómetro
13	pH-metro

2.2.3. MATERIALES DE LABORATORIO

N°	MATERIAL
1	Asa de Helen
2	Guantes estériles
3	Mascarillas
4	Gorros
5	Mechero
6	Picnómetro
7	Pipetas de 15 mL

8	Pipeta Graduada de 10 μ L
9	Pipeta Graduada de 50 μ L
10	Pipeta Graduada de 100 μ L
11	Pipeta Graduada de 500 μ L
12	Pipeta Graduada de 1000 μ L
13	Probeta de 250 mL
14	Probeta de 500 mL
15	Probeta de 25 mL
16	Reverbero eléctrico
17	Paquete de algodón
18	Gasas
19	Rollo de papel aluminio
20	Papel filtro
21	Erlenmeyers 125mL
22	Erlenmeyers 1000mL
23	Vasos de precipitación 1000 mL
24	Viales con tapa
25	Tubos pirex 25x100
26	Tubos de ensayo 100x13 con tapas
27	Tubos de Ensayo 100x75
28	Tubos de Ensayo 150x15
29	Papel toalla
30	Termómetro
31	Gradillas
32	Papel filtro
33	Trípode
34	Embudo
35	Varilla de agitación
36	Viales estériles

37	Balón esmerilado
38	Balón aforado de 10Ml
39	Frascos ámbar
40	Cinta adhesiva
41	Jeringuillas
42	Cajas petri desechables
43	Aplicadores
44	Pera de succión
45	Puntas amarillas y azules
46	Filtro para urea
47	Fundas plásticas (transparentes, negras y rojas)
48	Fundas de tela
49	Parafilm
50	Placas Portaobjetos
51	Cubre objetos

2.2.4. REACTIVOS

Nº	MATERIAL
1	Agua destilada
2	Agua potable
3	Alcohol (etanol 96°)
4	Cristal violeta
5	Lugol
6	Decolorante
7	Safranina
8	Aceite de inmersión
9	Suero fisiológico 0,85% (NaCl)

10	DMSO
11	Sulfato de estreptomicina
12	Caldo de soya tripticasa MERCK
13	Agar de soya tripticasa MERCK
14	Caldo cerebro corazón MERCK
15	Agar Sauboraud MERCK
16	Agar Base sangre MERCK
17	Agar EMB MERCK
18	Agar Manitol MERCK
19	Agar SIM MERCK
20	Reactivo de Ehrlich
21	Agar KIA MERCK
22	Agar con urea de Christensen MERCK
23	Reactivo de Urea al 20%
24	Agar citratado de Simmons MERCK
25	Bacterias ATCC

2.3. FACTORES DE ESTUDIO

Los factores de estudio de esta investigación fueron:

- Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de Carrasquilla (*Berberis hallii*).
- Obtener bacterias ATCC activas y analizar la actividad que poseen frente a los alcaloides presentes en el extracto etanólico de Carrasquilla.
- Halo de inhibición frente a cepas de bacterias ATCC activas, relacionado con la concentración del vegetal utilizado.

2.4. MATERIAL BIOLÓGICO

Los microorganismos que se utilizó son los siguientes, tipificados por la ATCC:

Nº	BACTERIAS	CÓDIGO
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
2	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637
3	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

2.5. METODOLOGÍA

2.5.1. RECOLECCIÓN

La raíz de Carrasquilla (*Berberis hallii*) fue recolectada del cantón San Andrés a 2728m.s.n.m. a 8 km de la ciudad de Riobamba, el día 04 de Octubre del 2010 con el criterio que deben ser raíces de corteza color ceniza y de color café-amarillento que se encuentre en perfectas condiciones y de tamaño considerable.

2.5.2. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se tomó la raíz recolectada y se llevó al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó el ejemplar.

2.5.3. PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- Se tomó la raíz y se elimina impurezas y cuerpos extraños, sacudiéndola.
- Se lavó con abundante agua por varias pasadas o sumergiéndolas en un recipiente con agua.
- Se dejó escurrir exponiendo al sol por aproximadamente una hora, hasta secarla.
- Se procedió a triturar toda la raíz.
- Si es necesario se obtiene diámetros de medianos o puede ser en forma de polvo.
- Se almacenó la droga evitando contacto con luz y humedad en bolsas de papel si es posible estéril o de plástico.

2.5.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Para el desarrollo de esta investigación se llevo a cabo el siguiente proceso, el mismo que fue obtenido de la raíz del vegetal Carrasquilla (*Berberis hallii*).

2.5.4.1. Procedimiento

1. En un recipiente de vidrio con su respectiva tapa, se transfirió la droga cruda triturada y pesada y se humedece directamente con el etanol a 96°, procurando que no quede líquido residual. (Generalmente se emplea por cada gramo de droga, 2mL de alcohol para la humectación). Se dio golpes con la palma de la mano para que todo el material se humedezca. Se maceró por 3-5 días.
2. A los 3-5 días se transfirió a un erlenmeyer de 1000ml todo el material líquido obtenido, en un proceso de decantación, vaciando así todo el contenido líquido.

3. Con ayuda de un embudo cuyo orificio de salida se cubrió con papel filtro, se transfirió el líquido decantado a otro erlenmeyer de 1000mL. De ésta manera filtramos las impurezas que pudo contener el extracto.
4. Se colocó en un balón esmerilado (previamente pesado) el contenido obtenido por filtración e iniciamos el proceso de concentración del extracto por medio del rotavapor.
5. El restante es secado, a presión o con vacío a través de bomba de velocidad moderada, ayudados de una estufa o hielo seco, evitando lo más posible la expansión del extracto por el recipiente para evitar pérdidas del mismo.
6. Se envasó en recipiente de vidrio apto para el desarrollo del estudio microbiológico. Si es necesario se refrigera a 4°C y se mantiene fuera del alcance de la luz y humedad.

2.6. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DEL EXTRACTO

2.6.1. DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

A. DETERMINACIÓN DE OLOR

Se tomó una tira de papel filtro de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina el olor característico del producto.

B. DETERMINACIÓN DEL COLOR

Se tomó un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llenó hasta los 2cm. con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas y se informa los resultados.

C. DETERMINACIÓN DEL SABOR

Se colocó una pequeña cantidad de muestra en el borde de la palma de la mano o en el dedo índice e inmediatamente al contacto con la punta de la lengua se realiza la identificación de su sabor.

2.6.2. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

En primer lugar se pesa el picnómetro vacío y seco, posterior a ello se llena con la porción de ensayo y mantenemos a la temperatura ambiente, y se lleva el líquido al nivel empleado, si es preciso, con una tira de papel extraer el exceso y secar exteriormente el picnómetro. Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo.

En los resultados la densidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$j = \frac{P2-P1}{VP}$$

Donde:

P1: peso del picnómetro vacío (g)

P2: peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (mL)

2.6.3. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termo prisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

2.6.4. DETERMINACIÓN DEL pH DE EXTRACTOS

Ajuste el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación del valor del pH de la muestra. Se introduce directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realiza la lectura.

2.7. REACTIVACIÓN DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS ATCC

2.7.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS

A. PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO CEREBRO CORAZÓN

Se preparó una cantidad suficiente de caldo cerebro corazón y se reparten 25mL en 6 erlenmeyers individuales de 125mL previamente estériles, con tapones de gasa y algodón. Se autoclavó a 121°C por 30 minutos y se enfrió para la suspensión de bacterias.

B. PREPARACIÓN DE AGAR BASE SANGRE, AGAR CON EOSINA Y AZUL DE METILENO, AGAR SABOURAUD Y AGAR MANITOL

Se preparó una cantidad suficiente de agar base sangre, eosina, saboraud y manitol en 4 erlenmeyers de 1000mL respectivamente. Se llevaron a ebullición y se autoclavaron a 121°C durante 30 minutos. Ya preparados y esterilizados repartir en cajas petri una cantidad de 15mL. Al enfriar se invirtieron y almacenaron en refrigeración en bolsas plásticas.

En el caso de agar base sangre, una vez preparado y esterilizado el medio se dejó enfriar hasta una temperatura de 45-50°C y se le añadió en condiciones asépticas, del 15 al 10 % de sangre estéril de caballo, conejo o cardero. Seguidamente se homogeniza y se reparte en cajas petri.

C. PREPARACIÓN DE AGAR PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se preparó una cantidad suficiente de agar hierro Kligler, agar SIM, agar citratado de Simmons y Urea en 4 erlenmeyers de 1000mL respectivamente. Se llevaron a ebullición y se autoclavaron a 121°C durante 30 minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente. Se repartió 3mL de cada agar preparado en tubos de 75x100mL previamente estériles con su tapa. Se inclinaron con el pico flauta bastante largo, excepto SIM, el mismo que se dejó enfriar en posición vertical. En el caso de Urea al bajar la temperatura se colocó una cantidad suficiente de reactivo de úrea al 20% previamente estéril y filtrada y se procedió de la misma manera.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se los almacena en gradillas con fundas plásticas en refrigeración.

D. PREPARACIÓN DE REACTIVO DE EHRLICH

Se utiliza la siguiente fórmula:

- Para-dimetilaminobenzaldehído: 2g.
- Alcohol etílico de 95°: 190 mL.

- Ácido clorhídrico concentrado: 40 mL.

Disolver el aldehído con el alcohol y agregar lentamente el ácido con agitación constante. El reactivo es de color amarillo y se almacena protegido de la luz en un frasco ámbar previamente estéril a 4°C.

E. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE ÚREA

Para el estudio se realizó una solución de úrea al 20%. Pesar 20 gramos de úrea deshidratada y disolver en 100mL de agua destilada. Si es necesario esterilizar por filtración. Almacenar protegido de la luz a temperatura de 4°C.

F. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)

Se preparó una cantidad suficiente de agar Soya Trypticasa (TSA), se llevó a ebullición y se repartió 6 mL en tubos individuales 100x13 mL de capacidad. Se autoclavaron a 121°C por 30 minutos. Los tubos con TSA se colocaron a un ángulo aproximado de 45° de manera que puedan inclinarse y se solidifiquen. Se pueden mantener a temperatura ambiente hasta el momento de usar, bien tapados y envueltos en fundas plásticas.

2.7.2. SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS ATCC

Se verifica las cepas ATCC encontradas y almacenadas en el laboratorio y con ayuda de hisopos estériles se tomó una cantidad adecuada y se suspendieron a un ángulo de 45° en cada erlenmeyer (previamente codificado) que contiene los 25mL de caldo cerebro corazón. Se incubaron a 35°C durante 18-24 horas.

2.7.3. SIEMBRA DE MICROORGANISMOS ATCC

Se verifica si existe crecimiento de los microorganismos que deseamos reactivar, para ello nos fijamos en la turbidez de los erlenmeyers lo cual es el primer indicativo. Por medio de un asa estéril, y enfriándola en las paredes del erlenmeyer, se introdujeron para obtener una pequeña cantidad de muestra y se sembraron en los 3 sectores de las cajas petri (codificadas con el microorganismo a reactivar) que contienen agar sangre, EAM y Saubouraud, éste último en el caso de *Candida albicans*. Se incuban a 35°C por 24 horas.

2.7.4. LECTURA DE CAJAS INCUBADAS

Se tomaron las cajas petri sembradas del día anterior y se observó si existe crecimiento en cada una de ellas. Se observaron las características macroscópicas de cada colonia y se realizan las pruebas bioquímicas necesarias para verificar si el microorganismo obtenido es el deseado o una contaminación.

2.7.4.1. Procedimiento

1. En el caso de *Staphylococcus aureus* se debe tomar una colonia crecida en agar sangre con el asa estéril y se siembra en agar Manitol. Se deja incubar a 35°C por 24 horas.
2. En el caso de *Candida albicans* la observación macroscópica es clara en agar Sauboraud y su olor. Pero se realiza un fresco y Gram para determinar microscópicamente las colonias de hongos.
3. Las características macroscópicas en agar EMB de *Escherichia coli* son suficientes para verificar la bacteria sin embargo se realiza pruebas bioquímicas, como a todas las enterobacterias y bacterias Gram negativas.
4. Para la realización de pruebas bioquímicas se toma una colonia crecida en EMB con aguja de inoculación estéril y se siembra en cada una de las pruebas bioquímicas esto es en Kligler, Citrato y Urea, en agar pico flauta se hace picadura y estriamiento, mientras que para la prueba de Indol se inocula en picadura hasta 1cm de altura de la base del agar. Los tubos se dejan incubar a 35°C semi-tapados por 24-48 horas.

En caso de no existir crecimiento en las cajas petri, se siembra nuevamente.

2.7.5. ALMACENAMIENTO DE MICROORGANISMOS ATCC REACTIVADOS

Al obtener y comprobar la existencia de las cepas reactivadas de los microorganismos ATCC, con un asa estéril se tomó una asada directamente de agar EMB o de las pruebas bioquímicas realizadas (Manitol en el caso de *S. aureus*; Kligler en el caso de *E. coli*) y se sembraron por estriamiento en tubos codificados de TSA que se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente. Se incubaron por 18-24 horas a 35°C. Al día siguiente se almacenan en gradillas y se realiza un sellado hermético para evitar la contaminación.

2.8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE CARRASQUILLA (*Berberis hallii*)

2.8.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS. (Día 1)

A. PREPARACIÓN DE SUERO FISIOLÓGICO (0,85%)

Se preparó 100mL de suero fisiológico al 0,85% y se coloca en un envase de tapa rosca, seco y libre de impurezas que proteja al producto de la luz. Se autoclavó a 121°C por 30 minutos, semi-tapado de manera que el vapor esterilice el producto. Puede mantenerse en refrigeración a 4°C hasta el momento de usar.

B. PREPARACIÓN DE AGUA ESTÉRIL

Se colocó 200mL de agua destilada en un envase de tapa rosca, seco y libre de impurezas. Se autoclavó a 121°C por 30 minutos. Se mantiene en refrigeración hasta el momento de usar.

C. ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES

Se preparó todo el material necesario para realizar el estudio por triplicado. Estos materiales sean de vidrio o plástico se los colocan en fundas de tela etiquetadas, clasificándolos en tubos, tapas, viales, balones, puntas, etc. Se autoclavaron a 121°C durante 50-55 minutos. Se coloca en una estufa para secarlas a 90°C y se almacena en un lugar aséptico en las mismas fundas de tela sin abrirlas hasta el momento de usarlos.

2.8.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ENSAYO (Día 2)

A. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA EL ENSAYO

Se tomó el extracto seco y se colocó en viales estériles y secos, bien tapados y se mantuvo protegido de la luz y el calor.

Se tomó un vial estéril y seco y se pesó en una balanza analítica e informo resultados. Con un aplicador de punta estéril se pesó con precisión 40mg de extracto en el vial. Se añadió 400µL. de DMSO y se disolvió con ayuda de ultrasonido.

Se tapa y se deja en reposo hasta el momento de su uso. A éste vial lo codificamos con el nombre de la planta.

B. PREPARACIÓN DE CALDO SOYA TRIPTICASA (TSB)

Se preparó una cantidad suficiente de caldo de Soya Triptica (TSB) y se repartió 25 ml en 4 erlenmeyers individuales de 125 mL de capacidad, previamente esterilizados. Se autoclavaron a 121°C por 30 minutos.

C. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Candida albicans* ATCC 10231
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- Se llevó a temperatura ambiente los 4 erlenmeyer que contenían 25 mL de TSB estéril y se codificó con el nombre de los microorganismos ATCC y la fecha.
- Utilizando aplicadores estériles se tomó una cantidad de los microorganismos ATCC de los tubos inclinados (TSA) que los contienen y se transfirieron independientemente a los erlenmeyer codificados.
- Los erlenmeyer se incubaron a 35°C por 18-24 horas.

D. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)

Se preparó 630mL de agar soya triptica (TSA) y se repartió 15mL en 42 tubos 25X150 mm de pírex individuales cada uno con su tapa o tapón. Se autoclavaron a 121°C por 15 minutos. Se mantienen a 45°C hasta el momento de usarlos.

E. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI CON EL EXTRACTO

- Se inicia con el vial de la disolución del extracto en DMSO, que se codificó con el nombre del extracto de la planta. Cuya concentración final del extracto fue 10.000 µg/mL. El estudio es por triplicado por lo tanto el mismo procedimiento hacemos tres veces.
- Se codificó las cajas Petri estériles con el nombre del extracto, la concentración final y el tratamiento (tres cajas para cada concentración 10.000, 1000, 100 µg/ml).
- En un tubo con TSA estéril a 45°C, se adicionó 100µL de la disolución del extracto en DMSO, se mezcla con ayuda del vortex e inmediatamente dispensamos en una caja petri codificada y se dejó en reposo hasta solidificarla.

- Se realizó una dilución al decimo, utilizando tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 μL de DMSO y 100 μL del extracto de la concentración 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y así obtenemos una dilución 1/10, dando una concentración final de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Se pipeteó 100 μL de la disolución de concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los tubos 25x150mm pírex que contenían 15 ml de TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre del extracto y de la concentración y tratamiento. Se dejaron solidificar.
- Se realiza otra dilución 1/100 en tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 μL de DMSO y 100 μL del extracto de la concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Se pipeteó 100 μL de la dilución de concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los tubos 25x150mm pírex grandes que contenían 15 ml de TSA 45°C. Se mezclaron en el vortex e inmediatamente se dispensaron en las cajas petri previamente codificadas.
- Una vez solidificado el medio de cultivo que contienen los extractos se invirtieron las cajas y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas, dentro de una bolsa de tela.

F. PREPARACIÓN DE CAJAS CONTROL DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA

- Se colocó una pequeña cantidad de agua estéril en el balón de 10mL limpio, seco y estéril.
- Con precisión se pesaron 100 mg de sulfato de estreptomicina y se disolvieron en el agua estéril colocado en el balón de 10 mL limpio, seco y estéril y se afora con el mismo disolvente. Esta solución no se esteriliza en autoclave, si es necesario una esterilización adicional, se puede realizar por ultrafiltración. La concentración final fue de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalente a 1000ug/100uL.
- Utilizando tubos de ensayo 75 x 100 limpios, secos y estériles se realizaron 6 diluciones 1:2 $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$ (Ej. 500 μL de solución de sulfato de estreptomicina + 500 μL de agua estéril). Concentraciones finales 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.
- Se codificaron 21 cajas petri estériles con el nombre de control estreptomicina y las concentraciones finales: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el tratamiento.

- Se pipetearon separadamente 100 μ L de las diluciones de sulfato de estreptomicina a los tubos de ensayo que contienen 15 mL de TSA a 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas petri previamente codificadas.
- Una vez solidificado el medio de cultivo que contiene las diluciones de los controles de sulfato de estreptomicina se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas cubiertos por bolsas de tela.

G. PREPARACIÓN DE CAJAS BLANCO

- Se codificaron 12 cajas petri estériles con el nombre de blanco (3cajas TSA, 3DMSO, 3NaCl, 3Agua estéril).
- Se tomaron tubos de TSA 45°C e inmediatamente se colocaron en las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco TSA. Dejar solidificar.
- Se pipetearon 100 μ L de DMSO a los tubos que contenían TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se dispensaron a las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco + DMSO. Dejar solidificar.
- Se realizó la misma operación con Suero fisiológico (blanco + NaCl) y agua destilada estéril (blanco + agua estéril) por separado.
- Una vez solidificado el medio de cultivo que contenía los blancos se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente durante 18-24 horas recubiertos por bolsas de tela.

2.8.3. PREPARACIÓN DE LA SIEMBRA (Día 3)

A. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI

- Las cajas petri preparadas en el día 2 no deben tener contaminación alguna, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado.
- Todas las cajas petri se dividieron con marcador en cuatro partes iguales y se marcaron del 1 al 4, representando cada uno a los microorganismos testados.

B. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES SALINAS DE LOS MICROORGANISMOS

- Se colocó 10mL de suero fisiológico en 4 tubos de 15x150 limpios, secos y estériles. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se codificaron con el nombre de cada microorganismo.
- Sacamos los erlenmeyer incubados por 24 horas desde el día anterior a 35°C, debiendo estar visiblemente turbios, y se mezcla ligeramente para evitar sedimentos, a partir de éstos se realizaron las suspensiones de los microorganismos.
- Se pipeteó 100 µL de la suspensión, a los tubos que contenían los 10mL de suero fisiológico 0,85%. Se mezclaron con ayuda de un vortex. Siendo éstas las suspensiones:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

100 µL susp. /10 mL sol. Salina

2. *Escherichia coli* ATCC 9637

100 µL susp. /10 mL sol. Salina

3. *Candida albicans* ATCC 10231

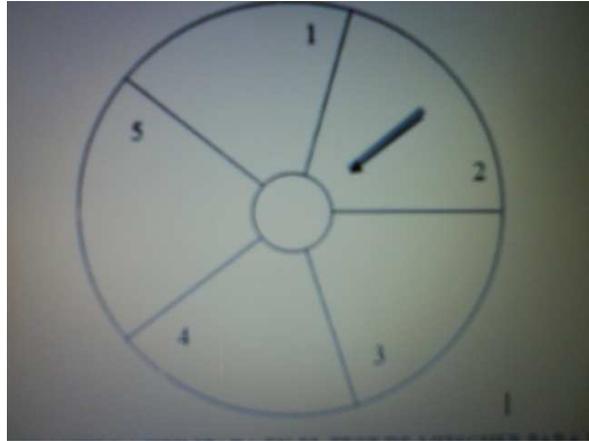
100 µL susp. /10mL sol. Salina

4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

100 µl susp. / 10 ml sol. Salina

C. ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

- A partir de las suspensiones de los microorganismos en la solución salina y utilizando varias asas de platino (4 asas microbiológicas con una capacidad de 5 µL) esterilizadas y enfriadas entre un estriado y otro, se tomó una asada de cada microorganismo en su turno y se estrió en un patrón radial en cada caja petri, a 0,5cm del borde la caja y del centro de la misma, siguiendo la plantilla.



FOTOGRAFÍA N°3. PLANTILLA DEL TEST DE MITSCHER PARA EL ESTRIADO DE MICROORGANISMOS (66)

- Las suspensiones de los microorganismos se agitaron en un tiempo determinado para evitar la sedimentación.
- Al compartir la labor del estriado se estrió todas las cajas petri con un microorganismo dado. Por ejemplo iniciamos con *Staphylococcus aureus*, estriamos todas las cajas con esa misma bacteria y finalizado iniciamos con la bacteria dos.
- Cuando todas las cajas petri fueron estriadas con todos los microorganismos se invirtieron y se incubaron a 35°C por 18-24 horas. Se incuban boca abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento. Es necesario dejar incubar por 18-24 horas más, es decir total 48 horas.

2.8.4. LECTURA DE RESULTADOS (Días 4 y 5)

- Las cajas se sacaron de la incubadora y fueron examinadas el día cuatro, contra los blancos.
- Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se debe, reincubar y leer el día cinco.
- Las cajas petri se sacan de la incubadora y se examinan, es más apropiado realizar la lectura al quinto día (especialmente por el crecimiento de *Candida albicans*).

- Existe actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima CIM es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.
- A éste estudio se lo clasifica en tres parámetros de lectura:

A = Activo (No existe crecimiento)

P= Parcialmente Activo (poco crecimiento)

I= Inactivo (existe crecimiento)

- Si el microorganismo es morfológicamente alterado, por ejemplo si *Ps. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como **P**.
- Las cajas petri de control debe tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo blanco y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así, el experimento ha fallado y debe ser repetido.
- La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja lejos de la línea rayadas, es señal de contaminación se pueden generalmente ignorar.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA

De la raíz totalmente seca y troceada de Carrasquilla se realizó el control de calidad, que fue adquirida en el cantón San Andrés en el mes de Octubre del 2010.

3.1.1. COMPROBACIÓN TAXONOMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el Ing. Jorge Caranquí, encargado del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Se confirmó que la Carrasquilla utilizada es *Berberis hallii* y pertenece a la Familia Berberidaceae.

3.1.2. ESTUDIO MACROSCÓPICO

La especie fue identificada de acuerdo a las características como son arbusto denso armado de espinos simples o triples. Tiene los tallos leñosos que alcanzan hasta los 3 m de altura, son erectos y ramificados con la corteza de color ceniza. Las hojas son ovales, alternas, con peciolo corto de unos 3 cm de longitud. Presentan una gradación desde hojas hasta espinas, de forma que las de más de un año se van transformando en espinas. Las flores aparecen entre abril y junio, son pequeñas y amarillas, agrupadas en pequeños racimos colgantes. Los

frutos son bayas de 1 cm de longitud de color rojo brillante, ácidas pero de sabor agradable. Son arbustos o pequeños árboles, espinosos, leño amarillo.

3.2. ANÁLISIS DEL EXTRACTO

Son un conjunto de pruebas que determinan los parámetros que establecen los requisitos de calidad en la elaboración de los extractos.

Estas pruebas fueron aplicadas en el extracto etanólico de la raíz en un envase color ámbar con tapa plástica estériles, almacenada a temperatura ambiente.

Los resultados observados en el cuadro N° 1 mediante el empleo de métodos físico-químicos de análisis, permiten establecer la calidad de los extractos obtenidos a partir de drogas crudas.

CUADRO N° 1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD PARA EXTRACTO ETANÓLICO DE *Berberis hallii*. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE 2010

DETERMINACIÓN	RAÍZ
Olor	Amaderado
Color	Café-amarillento
Aspecto	Espeso, pegajoso
Sabor	Amargo, algo picante
Densidad relativa (g/mL)	1,2
Índice de refracción	1.520
pH	5.06

3.3. REACTIVACIÓN BACTERIANA (CEPAS ATCC)

Para el ensayo se necesitó cepas ATCC puras y frescas, las cepas reactivadas fueron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, este ensayo tuvo como objetivo poder obtener y verificar las características de cada microorganismo para su posterior uso en el estudio investigativo.

CUADRO N°2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA NOVIEMBRE 2010

CRECIMIENTO	Agar sangre
ASPECTO EN PLACA	Colonias grandes de más 1mm, cremosas
PIGMENTACIÓN DE COLONIAS	Amarillas doradas
FERMENTACIÓN MANITOL	Positivo
COLORACIÓN GRAM	Gram positivo
MORFOLOGIA MICROSCÓPICA	Masas arracimadas y redondas
CATALASA	Positiva

CUADRO N°3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Escherichia coli* ATCC 9637. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA NOVIEMBRE 2010

CRECIMIENTO	Agar EAM
OXIDASA	Negativo

ASPECTO EN PLACA	Colonias de color verde metálico
COLORACIÓN GRAM	Gram negativos
MORFOLOGIA MICROSCÓPICA	Bacilos rectos, pequeños bastoncillos
GLUCOSA	Positivo
GAS/GLUCOSA	Positivo
LACTOSA	Positivo
SH₂	Negativo
CITRATO	Negativo
INDOL	Positivo
UREASA	Negativo

CUADRO N°4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Candida albicans* ATCC 10231. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA NOVIEMBRE 2010

CRECIMIENTO	Agar sauboraud
MORFOLOGÍA EN FRESCO	Esporas de hongo ovaladas en racimos
ASPECTO EN PLACA	Colonias de color blanco con olor a fermentado-vino
COLORACIÓN GRAM GOTA FRESCA	Esporas de color azul (violeta-morado)

CUADRO N°5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA NOVIEMBRE 2010

CRECIMIENTO	Agar EAM
OXIDASA	Positivo

ASPECTO EN PLACA	Colonias cremosas de color verdoso
MORFOLOGIA MICROSCÓPICA	Gram negativos, Bacilos rectos o de forma curvada
GLUCOSA	Negativo
GAS/GLUCOSA	Negativo
LACTOSA	Negativo
CITRATO	Positivo
INDOL	Negativo
UREASA	Positivo
MANITOL	Positivo

3.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se ensayó frente cepas ATCC de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, este ensayo tuvo como objetivo poder determinar si la Carrasquilla presenta actividad antimicrobiana.

CUADRO N°6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN SIEMBRA RADIAL EN PLACA DE PETRI DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Berberis Hallii*. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA DICIEMBRE 2010

EXTRACTO ETANÓLICO DE CARRASQUILLA (*Berberis hallii*)

BACTERIAS	Concentración 10.000 µg/ml	Concentración 1000 µg/ml	Concentración 100 µg/ml
<i>Staphylococcus</i>			

<i>aureus</i> ATCC 6538	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	I	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I

INTERPRETACIÓN: A (activo), P (parcialmente activo), I (inactivo)

Los resultados son evaluados a cabo de un día y dos días; denotándose el mismo por las siguientes abreviaturas:

A. indica actividad, es decir ningún tipo de crecimiento en las cajas sembradas al final del ensayo.

I. indica que el extracto ensayado no posee actividad, es decir que el crecimiento en la caja es comparable al del blanco.

P. indica actividad parcial, esto quiere decir un crecimiento moderado, atrofiado o la ausencia de una característica típica de la bacteria o microorganismo de prueba, como lo es la no presencia del pigmento verde característico de *Pseudomonas aeruginosa*.

CUADRO N°7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SULFATO DE ESTREPTOMICINA FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA DICIEMBRE 2010

SULFATO DE ESTEPTOMICINA CONTROL POSITIVO

BACTERIAS	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31,25 µg/ml	15,62 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	A	A	P	P	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	A	A	A	P	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	A	A	A	P	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	A	A	P	P	I	I

INTERPRETACIÓN: A (activo), P (parcialmente activo), I (inactivo)

Los resultados obtenidos no proporcionan el sustento científico al uso tradicional de *Berberis hallii* “Carrasquilla” como antimicrobiano, es decir que no combate las infecciones bacterianas. Sabiendo usarse para la diarrea de origen bacteriano, diarrea del viajero, infecciones por parásitos y candidiasis crónica. (61)

Muchos de los cuales son causados por las bacterias usadas en la prueba, obteniendo la ausencia de actividad de la raíz de extracto etanólico frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, como se observa en el **Cuadro N°6** en las concentraciones de 10.000, 1000 y 100 µg/mL, con esta inactividad se confirmaría que el uso que se le da en la medicina natural en las infecciones de origen bacteriano y candidiasis, no es válido tomemos en cuenta que estos resultados se obtuvieron aplicando el método de Mitscher y frente a éstas cepas ATCC testadas. Se debe tomar en cuenta que ésta planta es nueva y no ha sido muy estudiada en nuestro país, por lo que es importante realizar éste tipo de investigaciones y llegar a determinar las causas de la ineficiencia que presenta frente a la información que encontramos. También es necesario saber que algunos extractos vegetales pueden tener mayor actividad sobre las bacterias ya que su importancia radica en sus complejos activos.

Recientes estudios realizados en la ESPOCH demuestran que ésta planta contiene alcaloides, la berberina, factor en el que nos basamos para la realización de éste análisis. Natural estandar muestra ensayos clínicos sobre la berberina cuya evidencia apoya su uso en el tratamiento de tracomas, diarrea bacteriana y leishmaniasis y efectividad como un agente antimicrobiano contra las bacterias, virus, hongos, protozoarios, helmintos y la clamidia.

Se puede decir que los resultados obtenidos son aceptables, esto se debe a que, al ser una planta totalmente nueva, estamos descartando toda información inválida, y al poseer varios componentes químicos y al lugar de origen de la misma, puede proporcionar cierta efectividad al actuar en sinergia con otras plantas, pero por sí sola no puede dar este poder antibacteriano, así estamos brindando información sustentable para el uso en la medicina natural, considerando la comparación con el sulfato de estreptomicina, un antibiótico (Control positivo **CUADRO N°7**); los datos obtenidos en cuanto a actividad son superiores pues éstos son compuestos químicamente puros y estandarizados.

Diversos estudios en el campo de la ciencia se están proyectando a comprobar las propiedades curativas de muchas plantas en vista de la necesidad de ofrecer nuevas

alternativas de tratamiento antimicrobiano en base a los trabajos de investigación; por lo que en el presente trabajo se ha tratado de comprobar la actividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto etanólico de la raíz *Berberis hallii* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, esto basándonos en estudios realizados recientemente de la misma planta y fijándonos que en éste extracto se encuentra un principio activo que al parecer no posee la actividad antimicrobiana esperada, estudio que puede servir como base para otro tipo de investigaciones como el efecto anti-inflamatorio y aportando de ésta manera información con estudios sustentables que pueden servir en la medicina natural pues no podemos engañar a los pacientes frente a éstas enfermedades.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de la raíz de Carrasquilla (*Berberis halliii*) no presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos en prueba, considerando como negativa la hipótesis planteada.
2. El rendimiento del extracto etanólico de la raíz de *Berberis halliii* es de 3,97%, con densidad relativa 1,2 mg/mL, índice de refracción 1.520 y pH 5.06, y 0,458% de alcaloides totales fue utilizado para la determinación de la actividad antimicrobiana.
3. Utilizando el método de Mitscher, el extracto etanólico de raíz de Carrasquilla (*Berberis halliii*) a las concentraciones de 10.000, 1000 y 100 (ug/mL) no presentó actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Se debe realizar otros estudios mencionados en investigaciones bibliográficas, ya que al ser una planta recién estudiada en nuestro país es posible que presente otro tipo de actividad farmacológica, o puede que en su composición química sea otro el principio activo el que produzca el efecto.
2. Se recomienda utilizar otras partes de la planta como los frutos, para determinar el real efecto farmacológico, pues se menciona que se utilizaba a nivel de los países andinos ésta parte como uso tradicional para infecciones del tracto urinario.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la raíz de Carrasquilla (*Berberis hallii*), los estudios fueron realizados en el Laboratorio de Fitoquímica y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Para comprobar científicamente la actividad antimicrobiana de *Berberis hallii* por el método de Mitscher.

El extracto de raíz de *Berberis hallii* no presentó actividad frente a *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a concentraciones de 10.000, 1000 y 100 (ug/mL) determinando así, la actividad antimicrobiana utilizando 40mg de extracto etanólico de la raíz de la planta. Éste estudio se realizó con el propósito de demostrar si existe o no actividad para posteriormente realizar ensayos a distintas concentraciones para dosificar la cantidad de principio activo frente a la actividad mostrada, el ensayo se realizó frente a 4 cepas ATCC: *Escherichia coli* ATCC 9637, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

El extracto etanólico de la raíz de *Berberis hallii* no presentó actividad por lo tanto no pudo ser dosificada a distintas concentraciones y el estudio se dio por culminado, ya que demuestra que la información de su aplicación frente a problemas digestivos e infecciones urinarias no es verdadero y no puede ser utilizado para combatir problemas de origen bacteriano, por ello, se recomienda realizar estudios antiinflamatorios de esta planta debido a que en datos bibliográficos dice existir actividad farmacológica y proporcionar un buen uso de la misma.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PLANTAS

www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero8y96/documentos/a_.doc
2006-10-02

2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp8.pdf> 2006
2009-04-25

3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Biological_activity
2010-12-26

4. ALCALOIDES

<http://www.slideshare.net/fabiman/alcaloides>
2004-03-15

5. ALCALOIDES TIPOS Y CARACTERÍSTICAS

[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/web_alcaloides.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/web_alcaloides.htm)
2005-13-02

6. **ÁLVARES, V.** et. al. 1990. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. España. pp. 28, 70-78, 111.

7. ANTECEDENTES DE MEDICINA TRADICIONAL

<http://ocw.um.es/ciencias/etnobotanica/lectura-obligatoria/EtnobotPres008.pdf>
2009-05-18

8. ANTIMICROBIANOS

<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp8.pdf> 2006
2010-06-18

9. BACTERIAS

<http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema03.pdf>
2010-06-15

10. **BRACK, A.** 1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD-Centro Bartolomé de las Casas, Cusco. Masson. pp. 87, 96, 127

11. *Berberis hallii*

http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=103816
2008-06-26

12. BERBERIS COMO COMESTIBLE

<http://www.botanical-online.com/plantascomestibles.htm>
2006-03-04

13. BERBERIS VULGARIS

<http://www.asturnatura.com/especie/berberis-vulgaris-subsp-cantabrica.html>

2009-11-15

14. BLANCA E., BRAVO R. 1988. Texto de Microbiología. Universidad Central del Ecuador, Facultad de ciencias químicas. pp. 193, 222, 224, 245, 347.

15. BURTON, P. 1895. Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Argentina. Eva. Pp: 120-134.

16. CAMPBELL, P. et. al. 2006. Bioquímica Ilustrada. 5ª. ed. España. Elsevier Masson. pp. 199

17. CARRASQUILLA

<http://www.hierbitas.com/nombrecomun/CARRASQUILLA.htm>

2006-09-07

18. CARRASQUILLA COMO USO MEDICINAL

<http://hipernatural.net/es/pltcarrasquilla.html>

2006-09-07

19. CASTILLO, E., MARTINEZ, I. 2007. Manual de Fitoterapia. España. Elsevier Masson. pp. 214-217

20. CATEGORIAS HERBOLARIAS

[http://www.deturno.com/portal/index.php?option=com_content&view=article
&id=58:ique-son-los-fitofarmacos&catid=42:on-articulo&Itemid=75](http://www.deturno.com/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=58:ique-son-los-fitofarmacos&catid=42:on-articulo&Itemid=75)

2009-01-03

21. CEPAS

<http://ciencia.glosario.net/biotecnologia/cepa-10062.html>

2007-08-18

22. CONTERO, E. 2010. Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Antimicótica de las Tinturas en Base de Guarango (*Caesalpinia Spinosa*) para su Uso en Gargarismos. Tesis BQF. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 99-101

23. CUEVA, A. 2003. Plantas silvestres. 1ª. ed. Lima. A.F.A. pp. 128-130

24. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

<http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/28348#Descripci.C3.B3n>
2005-03-18

25. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA

<http://www.arbolesyarbustos.com/index.php?id=9>
2006-07-17

26. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA BERBERIS

<http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/28348>
2006-06-13

27. DIVO, A. 1990. Microbiología Médica. 4ª. ed. México. Interamericana. pp. 158,159.

28. ELMER W. et. al. 2001. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color. 5ª. ed. Argentina. Panamericana. pp. 171, 190, 198, 202, 209, 528-535, 818-825, 955, 1015-1017.

29. ERNEST, J. et. al. 1983. Microbiología Médica. México. Manual Moderno. pp. 312-317

30. ESTRUCTURA DE BERBERINA

http://flora.huh.harvard.edu/FloraData/060/PDF/V01/Volume1-Part1_Berberis.pdf
2006-09-14

31. EXTRACCIÓN

http://books.google.com/books?id=SgZjLFGBAAcC&pg=PA71&lpg=PA71&dq=PREPARACIONES+FITOTER%20PICAS&source=bl&ots=sYK4uat1Uw&sig=W2P7MgjUwTaLK7ovT7u6hBGTN2I&hl=es&ei=UZA4TZ_GJ4SdlgeghJCIBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6&ved=0CDEQ6AEwBQ#v=onepage&q&f=false
2009-12-10

32. EXTRACCIONES

http://musguito.net.ve/salud/preparaciones_fitoterapeuticas.htm
2010-03-26

33. EXTRACTOS VEGETALES

<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>
2010-07-31

34. FADDIN, M. 2000. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª. ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. pp. 93, 207, 223, 377.

35. FITOFÁRMACOS

http://www.detorno.com/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=8:ique-son-los-fitofarmacos&catid=42:on-articulo&Itemid=75
2010-04-19

36. FITOFÁRMACOS USOS

<http://www.schwabe.com.mx/fito/queson.html>

1996-11-25

37. FITOMEDICAMENTOS

<http://www.genommalab.com/Cidet2.php>

2010-04-19

38. FITOTERAPIA

<http://personal.redestb.es/martin/PFITO.HTM>

2010-04-19

39. FREEMAN, B. 1989. Microbiología de Burrows. 22^a. ed. México. Mac Graw Hill.
pp. 580

40. GARCÍA, J., PICAZO, J. 1999. Compendio de Microbiología Médica. Madrid.
Harcourt Brace. pp. 198-202

41. GÉNERO BERBERIS

<http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Berberis>

2010-06-24

42. GENOMMALAB FITOMEDICAMENTOS

http://www.genommalab.com/es/investigacion_cientifica/fitomedicamentos.a
spx

2010-04-19

43. GRANADOS, R. 2003. Microbiología: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general. Madrid. Thomson. pp. 235, 247

44. HARRISON, J. 2000. Farmacognosia. 14ª. ed. Buenos Aires. Panamericana. pp. 135-147.

45. JÁTIVA, C. et. al. 2000. Texto Básico de Fitoquímica. (Ecuador) (I): 26-29

46. JAWETZ, E. et. al. 1983. Microbiología Médica. México. Manual Moderno. pp. 213

47. KONEMAN, E. et. al. 2004. Diagnóstico Microbiológico. 5ª. ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. pp. 238,239, 245-256.

48. LA MEDICINA TRADICIONAL

<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/6296-La-medicina-tradicional>
2009-06-21

49. LAS PLANTAS MEDICINALES

<http://www.cfnavarra.es/BIF/boletines/14/1401.htm>
2009-03-25

50. LLOP, A. et. al. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana. Ciencias Médicas. V.1. pp. 9, 37, 38, 45-50, 73-78, 87, 143, 153, 251, 303, 459.

51. MEDICINA CHINA

http://www.femalt.com/medtradchina_fitoterapia_riesgos.shtml
2011-01-13

52. MEDICINA NATURAL

<http://www.geosalud.com/medicinatural/Medicina%20Natural.htm>
2008-05-16

53. MEDICINA NATURAL-EXTRACCIÓN

http://plantasmedicinales-jey.blogspot.com/2010_04_11_archive.html

2010-15-04

54. MEDICINA NATURAL SEGÚN OMS: LA OPCIÓN NATURAL PARA SU PADECIMIENTO

http://www.medicinanatural.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=26&Itemid=34

2008-05-18

55. MEDICINA TRADICIONAL

<http://www.who.int/topics/medicine/areas/tradicional/en/index.html>

2009-08-12

56. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA PLANTA

<http://perso.wanadoo.es/getn/terapias/plantas.htm>

2008-12-04

57. MICROBIOLOGÍA CLÍNICA *Staphylococcus*

<http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>

2010-04-25

58. MICROBIOLOGÍA CLÍNICA GENERALIDADES

<http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema03.pdf>

2005-12-27

59. MURRAY, P., ROSENTHAL, K. 2007. Microbiología Médica. 5ª. ed. España. Elsevier Masson. pp. 7, 67, 89, 221, 323, 357.

60. PLANTAS EN EL ECUADOR

<http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=350>

2008-07-10

61. PLANTAS COMO ANTIBACTERIANOS

http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%206_7.pdf

2007-06-14

62. PREPARACIONES MAGISTRALES

<http://www.buenastareas.com/ensayos/Laboratorio-De-Farmacia-Magistral-Extractos-Y/616351.html>

2010-08-21

63. PROPIEDADES DE LAS PLANTAS

<http://propiedadesplantas.jaimaalkauzar.es/sangre-de-drago-croton-lechleri.html>

2008-04-30

64. ROERSCH, C. 2004, Plantas Medicinales. 4ª. ed. Alemania. Koeltz Scientific Booke Konigstein. Pp. 234, 235, 245-249

65. SÁNCHEZ, C. et. al. 1995. Manual de Técnicas de Investigación. CYTED. (Iberoamerica) (I): 63-67

66. SEGURIDAD Y EFICACIA DELAS PLANTAS

http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol36_s_02/F%20Producciones%20PlantasProd.pdf

2009-06-14

67. SILVA, C. 2010. Extracción y Cuantificación de Alcaloides de *Berberis hallii* “CARRASQUILLA” de la Parroquia San Isidro, Cantón Guano de la Provincia de Chimborazo. Tesis BQF. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Pp. 5, 21-56

68. USOS DE BERBERIS VULGARIS

<http://www.cepvi.com/medicina/plantas/berberis2.shtml>
2006-08-24

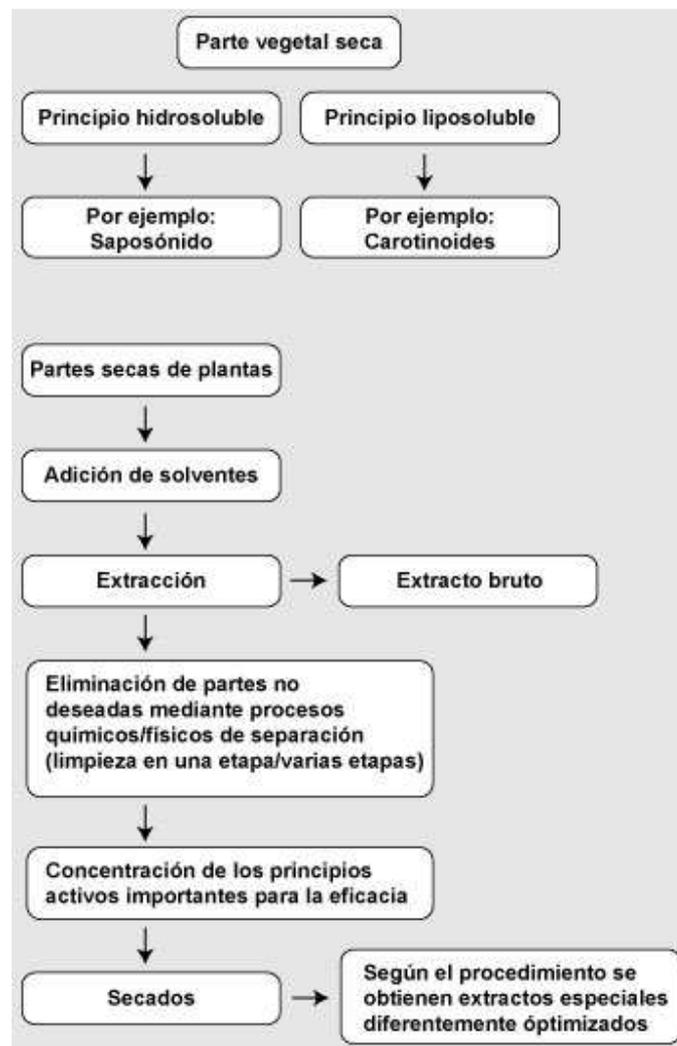
69. VANACLOCHA, B., CAÑIGUERAL, S. 2003. Fitoterapia, Vademécum de Prescripción. 4^a. ed. México. Elsevier Masson. pp.178

70. VALDIZAN, H. 1990. La Medicina Popular. 4^a. ed. Lima. Torres Aguirre. pp. 276, 278

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO N°. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE UN VEGETAL



ANEXO N°2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA R AÍZ DE CARRASQUILLA



MACERACIÓ



DECANTACIÓ Y
FILTRACIÓ



CONCENTRA



EXTRACTO

ANEXO N°3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL EXTRACTO ETANÓ LICO DE *Berberis halliii*



COLOR

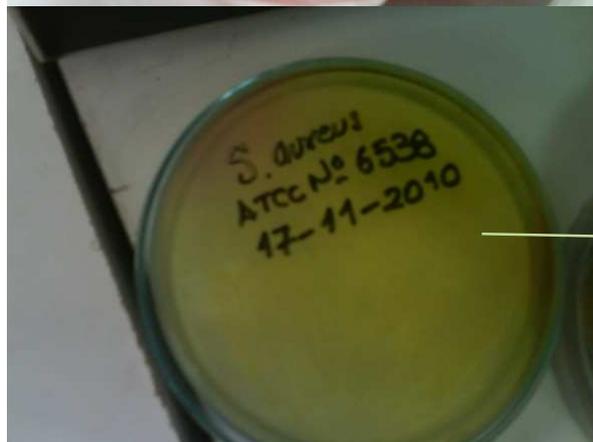


OLOR,



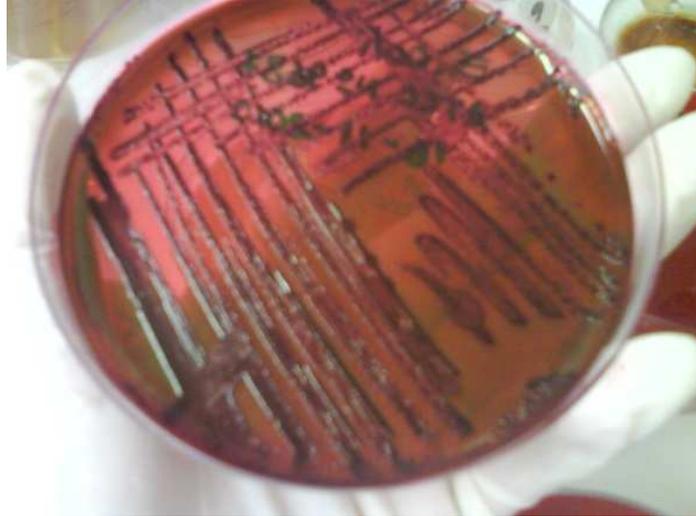
ASPECTO

ANEXO N°4. RESULTADOS DE LA REACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS ATCC

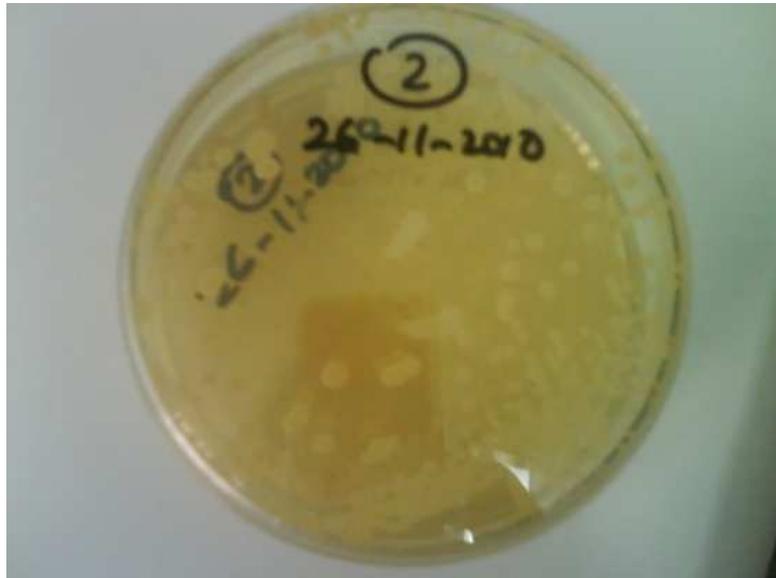


Manitol

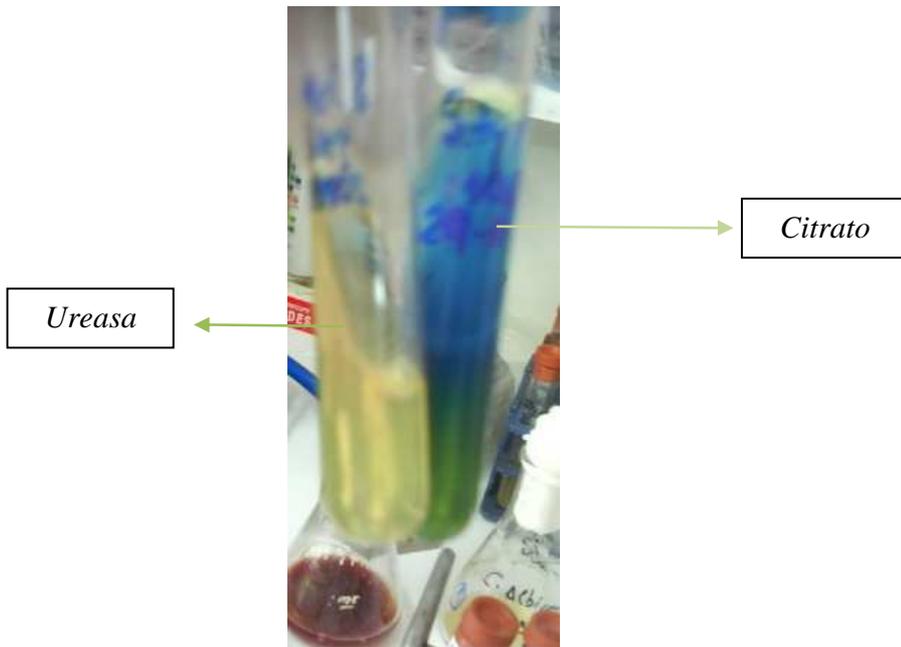
Staphylococcus aureus



Escherichia coli



Candida albicans



Pseudomonas aeruginosa

ANEXO N° 5. RESULTADOS MICROSCÓPICOS DE LA REACTIVACIÓN DE *Candida albicans* ATCC 10231

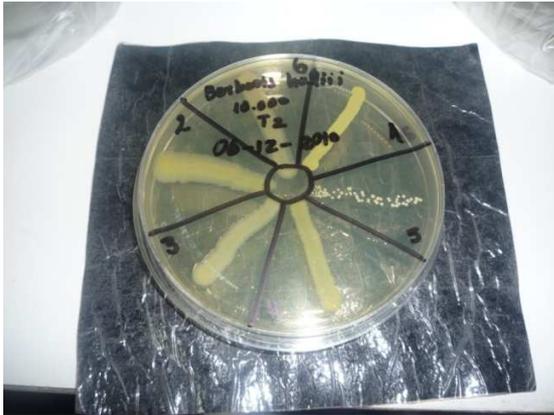


Candida albicans
COLORACIÓN

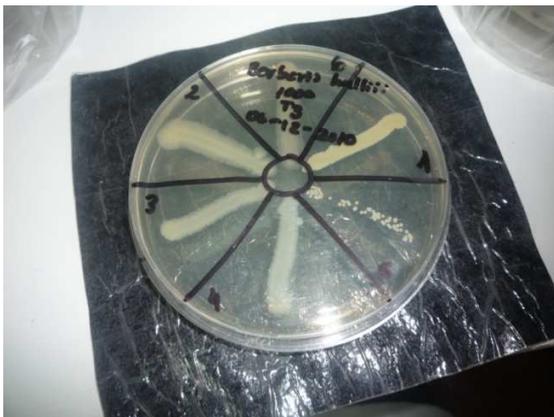


Candida albicans
FRESCO

ANEXO N°. RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACA PETRI PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ DE *Berberis hallii* "CARRASQUILLA" A DISTINTAS CONCENTRACIONES



10.000 ug/mL



1.000 ug/mL



100 ug/mL

ANEXO N°7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE RESIDUO SECO DE ALCALOIDES, TESIS BQF. SILVA CAROLINA.

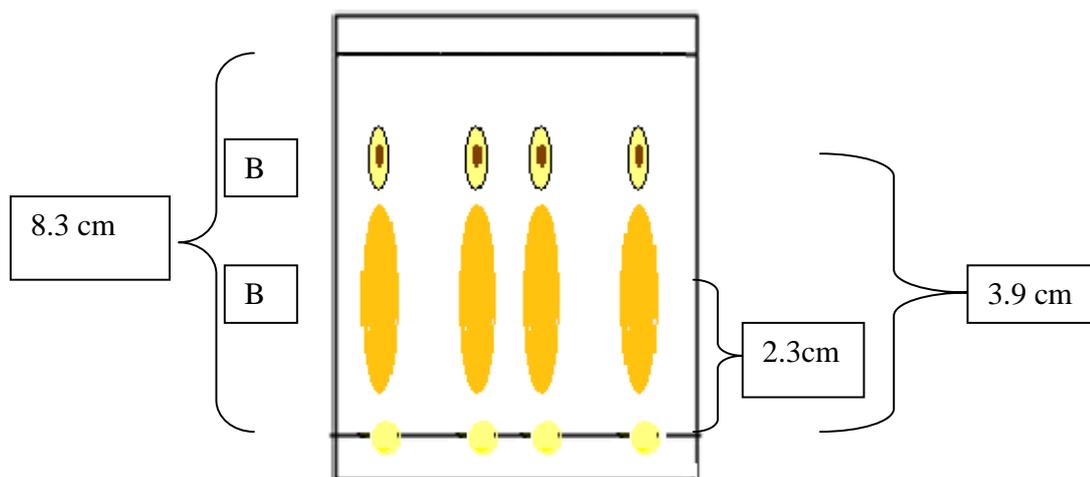
Fase Móvil: Cloroformo, Etanol, Acido acético (13: 5: 2).

Luego de haber probado todos y cada uno de los solventes se trabajó con el sistema Cloroformo – Etanol –Ácido acético; el mismo que dio mejores resultados en la cromatografía.

Revelador: Dragendorff

Soporte: Sílica Gel 60 F 254 (Merck)

Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas:



M: Extracto de raíces de *Berberis hallii*

GRÁFICO N°1. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LAS BANDAS B 1 Y B2

Banda 1 : De color anaranjado al revelar con Dragendorff se determina un $R_f = 0,28$

Banda 2 : De color amarillo al revelar con Dragendorff se determina un $R_f = 0,46$

B2: existe la aparición de una tonalidad café dentro de la mancha amarilla lo que conlleva a que se realice la separación de las bandas para determinar los alcaloides presentes. El color café – amarillo indica la presencia de alcaloides; así como también el $R_f = 0.46$ indica la presencia de Berberina en esta zona. (67)