

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROECOLOGIA
MENCIÓN: GESTIÓN DE BOSQUES TROPICALES**



**ACTIVIDAD BACTERICIDA Y FUNGICIDA DE TRES TIPOS DE
EXTRACTOS DE HOJA Y CORTEZA DE CAPIRONA
(*Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook f. ex Schumann)**

Tesis

Para optar el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROECOLOGÍA
MENCIÓN: GESTIÓN DE BOSQUES TROPICALES**

MARIBEL FLORA ROCA CAPCHA

Tingo María – Perú

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
ESCUELA DE POSGRADO
DIRECCIÓN



"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Nro. 011-2019-EPG-UNAS

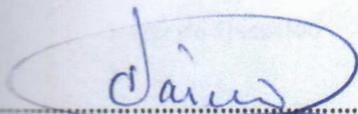
En la ciudad universitaria, siendo las 4:00 pm, del día sábado 27 de marzo del 2019, reunidos en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, se instaló el Jurado Calificador a fin de proceder a la sustentación de la tesis titulada:

-ACTIVIDAD BACTERICIDA Y FUNGICIDA DE TRES TIPOS DE EXTRACTOS DE HOJA Y CORTEZA DE CAPIRONA (*Calycophyllum spruceanum* (Benth)Hook f. ex Schumam"

A cargo del candidato al Grado de Maestro en Ciencias en AGROECOLOGIA, mención Gestión de Bosques Tropicales, Maribel Flora ROCA CAPCHA.

Luego de la exposición y absueltas las preguntas de rigor, el Jurado Calificador procedió a emitir su fallo declarando **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO**.

Acto seguido, a horas 5:35 pm. el presidente dio por culminada la sustentación; procediéndose a la suscripción de la presente acta por parte de los miembros del jurado, quienes dejan constancia de su firma en señal de conformidad.


.....
Dr. CASIANO AGUIRRE ESCALANTE
Presidente del Jurado


.....
MSc EDILBERTO DIAZ QUINTANA
Miembro del Jurado




.....
Dr. LADISLAO RUIZ RENGIFO
Miembro del Jurado


.....
Dr. CESAR S. LÓPEZ LÓPEZ
Asesor

DEDICATORIA

A la memoria de mi querida madre

MARÍA CAPCHA CONDOR

a quien debo mi formación en los más altos valores,
que me enseñó a vencer los obstáculos
con la buena disposición de hacer el bien y vencer las injusticias,
siendo generosa con todos y avanzar hacia los
grandes logros que me depara el futuro.

Gracias Mamá.

A mi Padre

JESÚS INOCENTE ROCA CUSIPUMA

Por darme la vida y mostrarme que con el esfuerzo,
confianza y entereza es posible lograr grandes metas respetando
el derecho de los demás y siendo tolerante en todo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por permitirme la vida, darme salud y fuerzas y confianza al prometerme que siempre me sustentará con la diestra de su justicia, es un Dios de Pactos que cumple sus promesas.

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Maestría en Gestión de Bosques Tropicales, por la contribución especializada de mi formación profesional.

Al Dr. Btclnlg Mclbgo. César Samuel López López, asesor; por su paciencia, exigencia, enseñanzas, orientación y amistad que me brindó en este tiempo de investigación, así como también durante el proceso de mi especialización y formación profesional y el constante apoyo en todos los proyectos emprendidos y en los éxitos logrados.

A la Dra. Tania Guerrero Vejarano, por el apoyo en la formulación y realización del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Casiano Aguirre Escalante, por la colaboración con sus sabios consejos en la ejecución de la investigación y por su amistad demostrada continuamente.

Al Dr. Ladislao Ruiz Rengifo, por su amistad y acertada cooperación con sus competentes consejos en la realización de la investigación.

Al M.Sc. Edilberto Díaz Quintana por la colaboración con sus sabios consejos y su apoyo en la realización del proyecto de investigación.

Al Crnel.PNP Manuel Marcelo Centeno Rosales, por los consejos aportados en el presente trabajo de investigación y su desinteresada amistad.

Al Ing.RNR-For Richard Sias Rodríguez, por su apoyo, orientación, amistad y colaboración para poder realizar la parte experimental de la presente investigación.

A todos mis compañeros y colegas de la Maestría que con su amistad contribuyeron e hicieron más satisfactoria y significativa mi permanencia en la Escuela de Posgrado de la UNAS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Resumen	xi
I. Introducción	1
Objetivos	6
II. REVISIÓN LITERATURA	8
2.1. Descripción especie forestal	8
2.2. Distribución de <i>Calycophyllum spruceanum</i> (capirona)	8
2.3. Análisis químicos	9
2.4. Características de durabilidad e impregnabilidad de capirona	10
2.5. Medicina tradicional y su empleo en el tiempo	10
2.6. Vegetales usados con efecto medicinal antifúngico y antibactericida	12
2.7. Composición de especies medicinales	19
2.8. Extractos Vegetales	25
2.9. Métodos de extracción	30
2.10. Microorganismos indicadores de sensibilidad	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Lugar de ejecución	35

3.2. Unidades experimentales	35
3.2.1. Especie vegetal	35
3.2.2. Solventes y antimicrobianos químicos	35
3.2.2. Microorganismos indicadores	36
3.3. Reactivación de cepas indicadoras	36
3.4. Preparación de extractos crudos	38
3.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	43
3.6. Controles	45
3.7. Variables en estudio	46
3.8. Diseño experimental	46
3.9. Diseño estadístico	47
IV. RESULTADOS	48
4.1. Extractos crudos vegetales preparados	48
4.2. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de <i>C. spruceanum</i>	49
4.2.1. Extractos de hoja	50
4.2.2. Extractos de corteza	52
4.3. Actividad mínima bactericida de los extractos	55
4.3.1. Ajuste e interpretación estadística para <i>Staphylococcus</i>	58
4.3.2. Ajuste e interpretación estadística para <i>Pseudomonas</i>	62
4.4. Actividad mínima fungicida de los extractos	65
4.4.1. Ajuste e interpretación estadística para <i>Cándida albicans</i>	68
4.4.2. Ajuste e interpretación estadística para <i>Sporothrix</i>	72

4.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	76
V. DISCUSIÓN	77
VI. CONCLUSIONES	84
VII. RECOMENDACIONES	86
VIII. ABSTRACT	87
IX. BIBLIOGRAFÍA	88
X. ANEXOS	104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Página
1. Microorganismos para la prueba de susceptibilidad y/o resistencia frente a extractos crudos.	36
2. Variables en estudio.	46
3. Análisis de varianza de la actividad de los extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	58
4. Análisis de varianza de la actividad de los extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	59
5. Pruebas de múltiple rangos de Tukey-HSD para <i>Staphylococcus aureus</i> por DROGA (Mét.: 95.0 %).	60
6. Pruebas de múltiple rangos de Tukey-HSD para <i>Staphylococcus aureus</i> por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).	61
7. Análisis de varianza de la actividad de los extractos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	62
8. Pruebas de múltiple rangos de Tukey-HSD para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).	63
9. Pruebas de múltiple rangos de Tukey-HSD para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por DROGA (Mét.: 95.0 %).	64
10. Pruebas de múltiple rangos de Tukey-HSD para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).	65

11. Análisis de varianza de la actividad de los extractos frente a <i>Candida albicans</i> .	68
12. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para <i>Candida Albicans</i> por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).	69
13. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por DROGA (Mét.: 95.0 %).	70
14. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para <i>Candida albicans</i> por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).	71
15. Análisis de Varianza de la actividad de los extractos frente a <i>Sporothrix sckenki</i> .	72
16. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para <i>Sporothrix sckenki</i> por por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).	73
17. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para <i>Sporothrix sckenki</i> por DROGA (Mét.: 95.0 %).	74
18. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para <i>Sporothrix sckenki</i> por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).	75
19. Patrones de susceptibilidad determinados por la CIM.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Página
1. Molienda y pulverizado de las drogas hojas y corteza en molino Thomas Wiley 4, posterior pesaje	39
2. Marcha analítica simplificada del procesamiento de los pulverizados de las drogas hasta la obtención de extractos secos acuosos.	40
3. Plantillas de cuadrículas enumeradas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.	45
4. Extractos crudos de cortezas y hojas en diferentes disolventes (agua, etanol y metanol).en refrigeración.	48
5. Tubos con sobrenadantes de los extractos crudos de capirona (<i>Calycophyllum spruceanum</i>).	49
6. Actividad antimicrobiana de extractos crudos acuosos de Hoja de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre las cepas indicadoras.	50
7. Actividad antimicrobiana de extractos crudos etanólicos de hoja de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre las cepas indicadoras.	51
8. Actividad antimicrobiana de extractos crudos metanólicos de hoja de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre las cepas indicadoras.	52
9. Actividad antimicrobiana de extractos crudos acuosos de corteza de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre las cepas indicadoras.	53
10. Actividad antimicrobiana de extractos crudos etanólicos de corteza de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre las cepas indicadoras.	54
11. Actividad antimicrobiana de extractos crudos metanólicos de corteza de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre las cepas indicadoras.	54

12. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* y controles sobre *Staphylococcus aureus*. 56
13. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*. 56
14. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Staphylococcus aureus*. 57
15. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*. 57
16. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Candida albicans*. 66
17. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Sporothrix schenkii*. 66
18. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Candida albicans*. 67
19. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Sporothrix schenkii*. 67



RESUMEN

Se determinó la actividad bactericida y fungicida de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de hoja y corteza de capirona (*Calycophyllum spruceanum*).

Las hojas y corteza se pulverizaron en molino de martillos, obteniéndose extractos por decocción y maceración en solventes (agua, etanol y metanol), se desecaron y esterilizaron. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante técnica de difusión en placa (adaptada del *Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*) para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) probando seis concentraciones de cada uno de los extractos (10, 25, 50, 100, 200 y 250 mg/mL). Se utilizaron cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Sporothrix schenckii*.

Los extractos de corteza tuvieron mayor efectividad que los de hoja. Los tres tipos de extractos de corteza mostraron actividad antibacteriana entre las concentraciones 50 y 100 mg/mL con excepción de los metanólicos que inhibieron a los fungi a partir de 250 mg/mL. Los extractos metanólicos de hoja y corteza mostraron poca actividad antifúngico.

No hubo efecto tóxico de los solventes sobre los microorganismos indicadores utilizados.

Palabras claves: Extractos crudos, antimicrobianos, antibacteriano, antimicótico, efecto tóxico, solventes, microorganismos indicadores.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas siguen representando riesgos críticos para la salud humana con altas tasas de morbilidad y mortalidad alrededor del orbe, a pesar del enorme arsenal terapéutico con se dispone (antimicrobianos), causa inquietud el incremento de la resistencia microbiana y la fácil transmisión de esta resistencia entre cepas diferentes debido a la presión selectiva que representa la utilización indiscriminada de antibióticos en la práctica médica, sobre todo en hospitales, que ha permitido la emergencia de cepas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones, dejan prácticamente sin alternativas para el tratamiento de las infecciones, por la multirresistencia en un gran número de microorganismos. La resistencia a los antimicrobianos reduce las posibilidades de tratamiento eficaz de enfermedades, prolonga el tiempo de agonía de los enfermos y los obliga a utilizar medicamentos costosos, además de alargar el tiempo de hospitalización y aumentar el riesgo de mortalidad (SERRA, 2017). Incluso la decisión de recurrir a antibióticos considerados como de “última línea” o de “reserva”, generalmente más tóxicos, no garantiza que una infección bacteriana pueda ser curada. Cada vez son más las cepas bacterianas que también son resistentes a los antibióticos de reserva, lo cual no solo impide el tratamiento de las infecciones correspondientes, haciéndolas potencialmente mortales; en este sentido, se estima que la tasa de mortalidad en pacientes

afectados por este tipo de infecciones oscila entre un 26% y un 44% (BOTPLUS, 2017; O'NEILL, 2016; RENWICK *et al.*, 2016).

Por otro lado, la perspectiva empeora si consideramos que a pesar de contar con un formidable conjunto de antimicrobianos, este es reducido y de limitada eficacia cuando se trata de agentes específicamente antimicóticos. Actualmente las micosis constituyen la cuarta causa de procesos infecciosos en las Unidades de Cuidados Intensivos o Críticos (UCI), y representan aproximadamente de 10 - 30 % de todas las infecciones, con una mortalidad de hasta 50 %. Un número considerable de afectados por fungi no son diagnosticados, lo cual empeora de forma ostensible su pronóstico, y eleva los índices de mortalidad por sepsis grave. El protagonismo en las infecciones micóticas lo ocupa el género *Candida*, con 15 especies patógenas al hombre, siendo las más frecuentes *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermonndi*, *C. tropicalis*; de estas, la primera ha sido la más aislada. No obstante, en los últimos años se ha observado un incremento de otras especies de fungi, algunas de las cuales presentan sensibilidad diferente a los antimicóticos existentes, lo que complica aún más el cuadro clínico de quienes presenten este tipo de sepsis. Existe una creciente preocupación entre investigadores y clínicos de que el uso creciente de drogas antimicóticas lleve rápidamente a la aparición de cepas resistentes (MOREJON, 2014).

Esta situación plantea la desconcertante posibilidad de que llegará un momento en que los antimicrobianos, como sistema terapéutico, tendrán interés

desde un punto de vista histórico. Esto ha estimulado la búsqueda de agentes antimicrobianos en fuentes naturales diferentes de las habituales (microorganismos) dirigiéndose la atención a organismos superiores como los vegetales, reforzándose esta idea aún más con los antecedentes del uso popular que se tienen para ciertas especies (MATHEWS, 2007).

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos sintéticos a la par con la toxicidad surgida durante un tratamiento prolongado, hace indispensable continuar con la búsqueda de nuevos compuestos o sustancias antimicrobianas, tanto antibacterianos en particular contra *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, especies bacterianas con alto índice de resistencia a los antibióticos actuales, así como antimicóticos dirigidos en particular contra fungi patógenos, mayormente especies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* y similares, frecuentemente implicados en las infecciones que amenazan la vida de seres humanos particularmente de pacientes con sistemas inmunes comprometidos (WEN *et al.*, 2011; MIRANDA-CRUZ *et al.*, 2012; PÉREZ-MORALES *et al.*, 2014).

Por ello, es prioritario explorar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas y micosis sistémicas graves, considerando entre ellas a las especies vegetales medicinales ampliamente utilizados por los practicantes de la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades y sin problemas de toxicidad que se observan al aplicar terapias químicas; es decir hay

creciente aceptación de la medicina tradicional como una forma alternativa de atención de la salud y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.

Los extractos de los vegetales son conocidos desde hace siglos por sus efectos antimicrobianos y se utilizan en medicina humana en tratamientos de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituyen un desafío en la medicina, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado (ELIKA, 2015). La selva y sus productos naturales están en la mira de la industria farmacéutica mundial y especialmente en la del mercado de productos naturales de los países del norte, por lo que consiguientemente la demanda se incrementará cada vez más, lo que ejercerá una mayor presión sobre las especies selváticas (BALTAZAR-VELA, 2011), que traería efectos negativos sobre la biodiversidad de la flora forestal si es que no se toman desde ya, las medidas de control y exhaustiva planificación para su aprovechamiento y frenar la biopiratería dirigida por compañías extranjeras.

En las investigaciones de nuevos productos terapéuticos podría considerarse a las especies forestales, entre ellas la capirona (*Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook f. ex Schumann) reconocida por su resistencia a plagas y de la que se conoce tiene práctico uso etnobotánico en la zona de selva del Perú, por lo que, su potencial terapéutico le otorga muchas posibilidades de desarrollo en la industria médica y farmacéutica haciéndose necesario inquirir las propiedades de esta especie promisorio de la Amazonía (WEN *et al.*, 2011). Dentro del conocimiento empírico tradicional la capirona (*Calycophyllum*

spruceanum) tiene múltiples propiedades etnomedicinales: su corteza en infusión es útil para infecciones oculares, la diabetes y males ováricos, en emplastos es muy buen cicatrizante y antimicótico. La savia de este árbol tiene propiedades cosméticas, borra las manchas y cicatrices en la piel y previene las arrugas (PAUTRAT *et al.*, 2011).

Sin embargo, se recomienda un uso prudente del conocimiento tradicional sobre los efectos terapéuticos de las especies forestales, pues no se ha comprobado su seguridad y eficacia en humanos, aun cuando nos muestra que estas especies pudieran usarse en afecciones potencialmente serias; por lo tanto, su utilización deberá ser preferentemente indicada por un profesional de la salud con formación en el tema o por un miembro de la comunidad con experiencia en el manejo de estas plantas medicinales. Es un error frecuente asumir que los vegetales, por el hecho de ser “naturales”, son totalmente inocuos, por lo que es necesario contar con una fuente referencial para emprender estudios que validen dicha información y, en otros casos, para iniciar los estudios clínicos correspondientes (SANTIVANEZ Y CABRERA, 2013).

En ese sentido, y de acuerdo a la problemática observada si hizo necesario determinar si extractos crudos de hoja y corteza de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) manifiestan actividad letal sobre microorganismos considerados propiamente como patógenos de humanos planteándose la siguiente interrogante: ¿A qué concentración los extractos acuosos, metanólicos y

etanólicos hoja y corteza de capirona mostrarán actividad bactericida y fungicida contra cepas indicadoras de bacterias y fungi?

Se formuló la hipótesis: Los extractos crudos acuosos, metanólicos y etanólicos de corteza y de hoja de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) presentan una actividad mínima bactericida y fungicida a partir de una concentración de 50 mg/mL.

Se trazó como objetivo general el determinar la actividad mínima bactericida y fungicida de extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de hoja y corteza de capirona (*Calycophyllum spruceanum*).

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Obtener extractos crudos de hoja y corteza de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) a partir de tres solventes diferentes.
- Reactivar y repicar cepas de microorganismos indicadores (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Sporothrix shenckii*) y mantenerlos en viales.
- Determinar la actividad mínima bactericida y fungicida de diferentes concentraciones de los extractos crudos de hoja y corteza de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) sobre las cepas de microorganismos indicadores.

- Encontrar el patrón de sensibilidad/resistencia y la concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos crudos de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) frente a microorganismos indicadores.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción de la especie forestal

Especie: *Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook f. ex Schumann.

Familia: Rubiaceae

Sinonimia: *Eukylista spruceana* Benth

Nombres Comunes: Capirona Negra, Palo Mulato.

2.2. Distribución de *Calycophyllum spruceanum* (capirona)

La capirona se encuentra distribuida en los bosques primarios y secundarios de la amazonía del Perú y Brasil, en terrenos periódicamente inundados o no y en las formaciones ecológicas de bosque seco tropical (bs-T), bosque húmedo tropical (bh-T) y bosque muy húmedo tropical (bmh-T), por debajo de los 1 200 metros sobre el nivel del mar. Es común en bosques secundarios, pioneros y tardíos en los departamentos de Amazonas, San Martín, Huánuco, Madre de Dios, Loreto y Ucayali. La especie es heliofita “amiga del sol” y vive asociada a otras especies tales como Quinilla, Shihuahuaco, Quina Quina, entre otras. Crece en comunidades denominadas “capironales”, en suelos pedregosos, mayormente limosos o arenosos, aluviales y fértiles, en bosques ribereños, temporalmente inundados (WWF *et al.*, 2014).

Existe en regulares cantidades en la amazonía del Perú, según los resultados de los inventarios forestales disponibles y de acuerdo a las zonas. El volumen bruto estimado de la Capirona asciende a 4,5 m³/ha. (WWF *et al.*, 2014).

2.3. Análisis Químicos

2.3.1. Generales

El valor obtenido de extractivos AB (alcohol-benceno) de la Capirona es bajo, si lo comparamos con otras maderas como el Cachimbo, la Quinilla o el Estoraque. Los valores de sílice para la Capirona son muy bajos. Generalmente se considera que una madera puede ser abrasiva cuando sus valores de sílice superan el 0,5% (caso de la Manchinga o el Cachimbo). Presenta poder calorífico muy alto, arde muy fresca, por ello es apreciada como leña. (WWF, *et al* 2014).

Tiene la siguiente composición:

- Extractivos AB (alcohol-benceno): 2,2%.
- Hemicelulosa: 18,6%.
- Celulosa: 59,71%.
- Sílice: 0,14%.

2.3.2. Fitoquímicos

PRADO (2009) reporta que con las muestras pulverizadas de la corteza de capirona realizó una extracción hidroalcohólica por percolación. Mediante una marcha fitoquímica detectó compuestos lactónicos, antraquinonas,

flavonoides, azúcares reductores y libres, iridoides, taninos condensados y saponinas. No fue detectada la presencia de alcaloides en el extracto estudiado.

2.4. Características de durabilidad e impregnabilidad de capirona

La capirona es moderadamente resistente al ataque biológico, no requiere preservación. Es una madera durable, especialmente en elementos fuera del contacto con el suelo, se recomienda apilarla utilizando separadores para evitar la aparición de hongos cromógenos. Luego de secarla en horno adquiere una gran durabilidad. Para disminuir el riesgo de colapso y rajaduras esta especie requiere de un tratamiento de desflamado o lavado contra corriente de agua, para eliminar sustancias que pueden causar tensiones en la madera (WWF *et al.*, 2014).

2.5. Medicina tradicional y su empleo en el tiempo

En la medicina tradicional, drogas a base de hierbas, se han usado desde la antigüedad como remedios para el tratamiento de una variedad de enfermedades (ZAMBRANO *et al.*, 2015). Numerosos estudios clínicos han demostrado que el uso adecuado y controlado de los vegetales medicinales en el tratamiento de las infecciones, ya sean de origen vírico, bacteriano o fúngico, no solo puede tratar los síntomas de una infección, sino además prevenirla y acortar su duración (ORTEGA, 2005). La medicina tradicional utiliza alrededor de 20,000 especies de vegetales superiores y se calculó que unos 3 300 millones de

personas en el mundo utilizan regularmente este tipo de medicina (BALTAZAR-VELA, 2011; TAGBOTO y TOWNSON, 2001; ELOFF, 1998); lo que incluye tanto la población de países en desarrollo como desarrollados; por ejemplo, ya en 1997 un 12,1% de los estadounidenses se auto medicó con productos vegetales, lo que significó en ese entonces un monto en ventas de 4 a 5 mil millones de dólares (PITTLER, 2002).

Las plantas medicinales han jugado un papel clave en la salud mundial. Un número creciente de trabajos de investigación y los exámenes indican claramente que las plantas medicinales exhiben una variedad de propiedades terapéuticas (ANKLI *et al.*, 2002) y proporcionar seguridad sanitaria para la población rural en la atención primaria de salud.

Desde ya hace varios años atrás se conoce que aproximadamente un 80 % de la población de nuestro país, mayormente en la zona de sierra y selva, utiliza plantas medicinales en la atención primaria de la salud, y de la flora amazónica solo se conoce el 5 % de las especies de la región y menos aún de especies forestales, a pesar de ello se estima que el poblador amazónico ha logrado identificar y manejar entre 2 000 a 3 000 especies de uso medicinal (ESTRELLA, 1995; SCHULTES y RAFFAUF, 1992; SCHULTES, 1991).

2.6. Vegetales usados con efecto medicinal antifúngico y antibactericida

Los reportes de RODRIGUEZ-PAVA *et al.* (2017) mencionan que evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos de las vegetales falsa caoba (*Bauhinia sp.*), sauco (*Sambucus nigra*), jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) y diente de león (*Taraxacum officinale*) frente a patógenos de importancia clínica. Las pruebas antimicrobianas se realizaron con diferentes concentraciones de los extractos según las indicaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Los microorganismos utilizados fueron *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* con presencia de KPC (KPC: Carbapenemasas son enzimas de la familia de las Betalactamasas que, al ser producidas por las bacterias, confieren resistencia clínicamente significativa a antibióticos carbapenémicos como Imipenem, Meropenem, Doripenem, Ertapenem), *Providencia rettgeri* con presencia de ESBLs (Extended-Spectrum-Beta-Lactamases = Extendido Espectro de BetaLactamasas), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* β -lisina y *Candida albicans*. En los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se encontró que los extractos presentaban diversos grados de inhibición frente a los microorganismos de estudio, siendo el más eficaz los tallos de *Taraxacum officinale*. Asimismo, por cromatografías comprobaron la presencia de flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles, quinonas y alcaloides que han sido reportados con actividad antimicrobiana.

Especies de vegetales como el *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil), han sido reconocidas por la actividad biológica de sus extractos etanólicos y acuosos contra infecciones de origen alimentario especialmente contra diarreas originadas por *Vibrio cholerae*, inhibiendo la producción de enterotoxina y la adhesión de la bacteria (VENEGAS *et al.*, 2016).

Asimismo, TERAN *et al.* (2015) determinaron el efecto inhibitorio de aceite esencial de tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes (conocidos con las siglas en inglés como SARM) con diluciones de 0,039, 0,312 y 0,156 % del aceite en la determinación de la CIM.

MERCADO-MARTINEZ *et al.* (2014) encontraron que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron mayor sensibilidad a las concentraciones 60, 80 y 100 % de aceite de mandarina (*Citrus reticulata* var. Satsuma). También se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* es más sensible a Ciprofloxacina que a las concentraciones del aceite mientras que *Staphylococcus aureus* presentó mayor sensibilidad a la concentración del 100% de aceite que al control positivo (Vancomicina) ya que formó un halo de sensibilidad de mayor tamaño que al antibiótico, concluyendo que las bacterias en estudio son sensibles al aceite esencial de *Citrus reticulata* variedad Satsuma.

En ese mismo sentido RAMÍREZ-RUEDA y MOJICA (2014) estudiaron la actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx, contra tres cepas bacterianas de importancia clínica (*Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*); los extractos los obtuvieron de las hojas de la planta mediante extracción con metanol y diclorometano y secados en rotaevaporador al vacío. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de microdilución (adaptada del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) probando cinco diluciones (1 000, 500, 250, 125 y 62,5 µg/mL). Todos los ensayos se hicieron por duplicado y se incubaron 24 horas a 37 °C. Ambos extractos mostraron efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* hasta la segunda dilución, pero no actuaron sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Estos autores afirman que la obtención de un efecto inhibitorio en concentraciones por debajo de 1 000 µg/ml de cualquier extracto, se convierte en una característica promisorio para seguir investigando los efectos biológicos de *Gnaphalium polycephalum* Michx sobre las bacterias.

OCHOA *et al.* (2012) ejecutaron una investigación para evaluar la actividad antifúngica in vitro de los extractos de pirul (*Shinus molle*), chirimoya (*Annona cherimola*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tabaquillo (*Nicotiana glauca*) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*. Para determinar la inhibición del crecimiento micelial, dosis efectiva media (ED50) y número de conidios, se utilizó la metodología de medio envenenado, donde se evaluaron diversas concentraciones de los extractos. Los resultados mostraron que los extractos de chirimoya y canela presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial y esporulación. En contraste, los extractos de tabaquillo y pirul no mostraron efecto

inhibitorio sobre el crecimiento micelial. Sin embargo, el primero de ellos incrementó la producción de conidios al incrementarse la concentración del extracto. En relación a la ED50 el extracto de canela controló las tres especies en estudio a dosis de 330,34 a 538,63 mg/L. Por otro lado, el extracto de chirimoya presentó el mejor control a 593 mg/L contra *F. culmorum*, mientras que para *F. oxysporum* y *F. solani* se requirieron dosis de 2 060 a 2 571 mg/L, respectivamente. Los extractos de canela y chirimoya presentaron efecto en la inhibición micelial y esporulación de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*.

En Ecuador, los estudios de plantas medicinales y etnobotánica se han desarrollado principalmente en la región central andina y en la amazonía y consisten mayormente en la enumeración de las plantas que conoce y usa la gente local y/o la descripción de los sistemas de salud tradicional en comunidades indígenas, las plantas medicinales más importantes para la población local fueron: La hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), el orégano (*Origanum vulgare*) y la hierba buena (*Mentha sativa*) (ZAMBRANO-INTRIAGO *et al.*, 2015).

Asimismo, PRADO (2009) menciona que la corteza de *Calycophyllum spruceanum* Benth. (Rubiaceae) es un árbol conocido como "capirona", es utilizada tradicionalmente por los pobladores de la amazonia peruana y otras partes de América del Sur como antiinflamatorio, antimicrobiano, cicatrizante, emoliente, antidiabético, antioxidante, antiséptico, anti-trypanosomico, astringente, bactericida, cicatrizante, anticonceptivo, hemostato, insecticida, parasiticida y repelente. Sin embargo, hasta ahora pocos estudios químicos y farmacológicos han sido descritos para esta especie.

En investigaciones llevadas por AÑANCA (2009) con el extracto acuoso de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) en concentraciones que corresponden a 17,5, 16,25, 15, 13,75, 12,5, 11,25, 10, 8,75, 7,5, 6,25 µg/mL, se determinó el efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, y, asimismo, en estudios realizadas por SAMPAIO (2009), determinó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la *Caesalpinia ferrea* contra los microorganismos patógenos orales más comunes (*Candida albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S.oralis* y *Lactobacillus casei*). Por otro lado, investigaciones realizadas por ESCOBAR (2008) determinaron que el extracto alcohólico de la tara (*Caesalpinia spinosa*) a diferentes concentraciones posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Corynebacterium diphtheriae*.

En México, GARCIA-LUJAN (2009) evaluó la susceptibilidad de dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una hospitalaria y la otra de referencia (ATCC 25923), a 10 extractos vegetales y dos aceites esenciales. Se evaluaron extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante el método de macrodilución. Los resultados mostraron que no existió diferencia en las CMI (2,77 mg/mL) en los extractos vegetales, tanto alcohólicos como hidroalcohólicos en las dos cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a CMI inferiores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de clavo (1,38 mg/mL) y orégano (0,17 mg/mL)

para la cepa hospitalaria, y clavo (0,34 mg/mL) y orégano (0,17 mg/mL) para la cepa de referencia. Los compuestos estudiados tienen una aplicación potencial como antibacterianos por lo que se sugiere medir sus propiedades farmacéuticas para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Otra investigación llevada a cabo por PEREZ *et al.* (2007) evaluó la actividad antibacteriana de extractos metanólicos, clorofórmicos y de éter de petróleo de las hojas de ortiga blanca (*Phenax rugosus*) y guayacán (*Tabebuia chrysantha*) frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa*; en los resultados obtenidos se observa muy leve actividad antibacteriana con los extractos metanólicos de ambas plantas; los extractos clorofórmicos y los etéreos no presentaron actividad antimicrobiana, por lo tanto los autores recalcan que estos hallazgos indican que posiblemente el uso empírico de estas plantas no se deba a un efecto antibacteriano, pues las concentraciones de los extractos que inhiben el crecimiento bacteriano son demasiado altas para considerarlas antibacterianas.

Se han estudiado plantas de las familias Myrtaceae (*Syzygium aromaticum*, *Eucaliptus camaldulensis* y *Psidium guajava*) y Lauraceae (*Cinnamomum zeylanicum*) de las cuales se obtuvieron extractos con tres solventes de distinta polaridad obteniéndose actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherihcia coli* y *Shigella flexneri* con los extractos hexánicos obtenidos por maceración a temperatura ambiente (ORANDAY *et al.*, 2004).

Diversas plantas que han demostrado su actividad antimicrobiana en el aparato respiratorio son el eucalipto (indicado para el asma, bronquitis, rinitis, faringitis, amigdalitis, traqueitis y gripe), el tomillo (para la tos irritativa y antiespasmódica, laringitis, bronquitis, asma enfisema y gripe), el marrubio (tos improductiva, catarros), el llantén (bronquitis), el gordolobo (afecciones respiratorias de vías altas y bajas), las yemas de pino o el romero (ORTEGA, 2005). En el mismo sentido ALARCON *et al.* (2004) mostraron que extractos etanólicos de *Haemotoxylon brasiletto* (palo de Brasil) es más efectivo para inhibir a *Vibrio cholerae* una bacteria gramnegativa, y SILVA *et al.* (2004) quienes indican que extractos etanólicos de hojas de *Ricinus communis* fueron activos contra *S. aureus*, *Escherichia coli* y *C. albicans*.

En la búsqueda de metabolitos secundarios que actúan sobre bacterias SILVA *et al.* (2004) determinaron que extractos hexánicos de raíces de *Jatropha dioica* presentaban mayor actividad sobre *Staphylococcus aureus* y actividad moderada sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

LAPENNA *et al.* (2003) reportan la evaluación de la actividad bactericida y fungicida de extractos acuosos y etanólicos de llantén (*Plantago australis*), mapurite (*Petiveria alliacea*), mango (*Mangifera indica*), esponjilla (*Luffa cilíndrica*), guayabo agrio (*Psidium guíñense*) y pajarito (*Phthirusa sp.*) sobre cepas de *Escherichia coli* enteropatogénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei* y *C. albicans*.

Asimismo, se han obtenido extractos bioactivos con actividad antifúngica a partir de la corteza de *Pinus caribea* var. *hondurensis* procedentes de plantaciones forestales del oriente venezolano los cuales presentaron además actividad atrapadora de radicales libres (VARGA, 2002). De *Ibicella lutea*, se aisló el principio activo antibacteriano, que posee una buena potencia y espectro y una estructura química novedosa (VÁZQUEZ, 2001).

FERRO y CANELA DE ALVARENGA (2000), indican que extractos crudos obtenidos de la especie *Aristolochia giberti* efectuados por percolación con etanol son más activos frente a los microorganismos grampositivos como *Staphylococcus* y *Bacillus* y con cierta selectividad para *P. aeruginosa* que estos extractos mantienen una estabilidad relativa de sus componentes por más de cuatro años

2.7. Composición de especies medicinales

NYCHAS *et al.* (2003), NYCHAS (1995), afirman que el aprovechamiento de las especies forestales no sólo es en el sentido económico maderero, sino que se pueden aprovechar productos forestales no maderables (PFNM) que incluyen diversos tipos entre ellos vegetales medicinales, aceites esenciales y extractos vegetales. La actividad antimicrobiana es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en extractos o aceites esenciales de órganos vegetales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

Como podemos observar las investigaciones realizadas han llevado a considerar a la medicina tradicional como fuente de posibles vías de análisis; así, inicialmente se investiga el posible efecto antimicrobiano mediante pruebas de inhibición *in vitro* empleando extractos crudos de las plantas y en una segunda etapa las investigaciones conducen al estudio de fracciones del extracto en búsqueda de los principios activos. Posteriormente, se plantea la evaluación *in vivo*, ya sea en animales de experimentación o con voluntarios (MIRANDA-CRUZ, 2012).

En Chile se estudiaron extractos de plantas para detectar actividad antibacteriana frente a uno o más microorganismos. Dentro de este grupo de plantas la que se estudió con mayor énfasis fue *Haploppapus multifolius*, especie de la cual se aislaron cumarinas con actividad antibacteriana y en los últimos años se han investigado más plantas chilenas, con actividad antimicrobiana, entre otras propiedades, aislándose un importante número de compuestos, muchos de ellos de estructura nueva y actividad biológica interesante (AVELLO *et al.*, 2012; BITTNER, 2002).

Las propiedades curativas de los vegetales se atribuyen a la presencia de un principio activo, el cual produce un efecto fisiológico. Un gran porcentaje de estos principios activos están comprendidos dentro de los productos naturales o metabolitos que son compuestos de estructura compleja y de distribución restringida, entre ellos alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, aceites esenciales, gomas, resinas y taninos, que pueden

encontrarse distribuidos por toda la planta o en alguna de sus partes (ESCOBAR y CHÁVEZ, 2008).

De igual manera se determinó que los extractos de las hojas y raíces de la leguminosa *Dalea elegans*, planta autóctona de la provincia de Córdoba, Argentina, contienen un compuesto flavonoide denominado 6-prenilpinocembrina activo contra la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente al antibiótico oxacilina y contra los hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Trichopyton mentagrophytes* (CABRERA *et al.*, 2004).

Algunas especies empleadas tanto en medicina como en condimentos de cocina han mostrado también efectos anti-*Helicobacter*, entre ellas canela (NIR *et al.*, 2000; O'GARA *et al.*, 2000; OHTA *et al.*, 1999; CHUNG *et al.*, 1998), el ajo (CELLINI *et al.*, 1996), y tomillo (TABAK *et al.*, 1996).

La evaluación de *Pteleopsis suberos*, una especie empleada en África en el tratamiento de las úlceras, mostró que eliminaba a la bacteria *Helicobacter pylori* (GERMANÓ *et al.*, 1998). Otros estudios han señalado el efecto antibacteriano de las catepsinas aisladas de *Camellia sinensis* "té", que en las concentraciones usuales de una taza inhiben a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (YAM *et al.*, 1997) y en el caso de *Helicobacter* la CIM fue de 8 mg/mL, resultando en un descenso significativo en las alteraciones histopatológicas inducidas experimentalmente en animales de laboratorio inoculados experimentalmente (MABE *et al.*, 1999), además, en un estudio se

comparó el consumo de té en dos grupos de individuos, infectados y no infectados con *H. pylori*, encontrándose que en los primeros había un menor consumo de té que en los segundos; lo que plantea la posibilidad de que el consumo de té podría interferir con la infección por *H. pylori* (YEE *et al.*, 2002).

Hace algunos años muchos extractivos vegetales, como los taninos, se consideraron compuestos con actividad biológica dudosa, y sin beneficios farmacológicos de relevancia reportados, ya que parte importante de su estructura aún era desconocida para la ciencia. La definición de la misma hizo posible el estudio y prescripción de nuevas propiedades para estos compuestos, así como la posibilidad de su uso en humanos (ALVAREZ, 2003).

Las sustancias extraíbles vegetales se extraen de diferentes partes de los árboles mediante agua, disolventes orgánicos, vapor de agua y mediante un exprimido mecánico (ALVAREZ, 2003).

Entre las sustancias extraíbles de la corteza se encuentran los más diversos compuestos orgánicos e inorgánicos y su presencia en diferentes especies es relativa. Se dividen en lipofílicos e hidrofílicos, aunque no existen fronteras que los delimiten. El contenido es superior que en la madera propiamente dicha. Varía entre 20 - 40 % de masa de corteza seca. Incluye a un grupo heterogéneo de sustancias. La fracción lipofílica, comprende sustancias extraíbles con disolventes apolares (éter etílico, diclorometano, etc.). Consisten en grasas, ceras, terpenos y terpenoides y alcoholes alifáticos

superiores. Los terpenos, ácidos resinosos y esteroides están localizados en los canales resiníferos. Abundan los triterpenoides: B-sitosterol encontrados en ceras, betulino (ALVAREZ, 2003).

La fracción hidrofílica, constituida por los extraíbles en agua sola o con disolventes polares (acetona, alcohol etílico, etc.). Contienen grandes cantidades de constituyentes fenólicos, muchos de ellos, especialmente taninos condensados (ácidos fenólicos) pueden ser extraídos sólo como sales con disolución diluida de álcali. Por ejemplo, una cantidad considerable de flavonoides pertenece al grupo de taninos condensados están presentes en la corteza de abeto, roble, secoya. Flavonoides monoméricos que incluyen quercetina y dihidroquercetina están también presentes en la corteza. Se encuentran también pequeña cantidad de lignanos y estilbenos. En menor cantidad se encuentran carbohidratos, proteínas y vitaminas (ALVAREZ, 2003).

Es conocido que los componentes fenólicos y terpenoides presentan propiedades antifúngicas, antibióticas, antioxidantes, alelopáticas y otras (ALVAREZ, 2003). Estos compuestos tienen ganada reputación por su actividad en las plantas como el control al ataque de insectos y a enfermedades microbianas. Hace algunos años muchos extractivos vegetales, como los taninos, se consideraron compuestos con actividad biológica dudosa, y sin beneficios farmacológicos de relevancia reportados, ya que parte importante de su estructura aún era desconocida para la ciencia. La definición de la misma hizo posible el

estudio y prescripción de nuevas propiedades para estos compuestos, así como la posibilidad de su uso en humanos (ALVAREZ, 2003).

Es por ello que, a la luz de los modernos avances en botánica, fotoquímica, farmacología, farmacocinética, farmacodinamia y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser constatado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con la menor incidencia de ocasionar riesgos al paciente (DOMINGO y LOPEZ, 2003).

El número de estructuras químicas descritas en vegetales superiores llega a los cientos de miles y está aumentando continuamente. Aproximadamente 1 500 estructuras químicas nuevas de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un buen número tiene actividad biológica. Desafortunadamente los conocimientos rudimentarios de la química y bioquímica de los vegetales restringe todavía nuestra capacidad de explotar completamente los productos químicos naturales (BITTNER, 2002).

En una fase más avanzada del estudio de especies medicinales, la identificación de las moléculas activas conduce a su modificación para incrementar el efecto antimicrobiano, como es el caso de flavonoides (BAE *et al.*, 1999) y rotenoides aislados de leguminosas (TAKASHIMA *et al.*, 2002), lo que llevó a la descripción de un rotenoide, conocido como derrisin, cuya CIM es de 85

mg/mL y a la evaluación de otros conocidos como el teflosin y el toxicarol cuyas CIM son de 0,3 mg/mL.

COSSIO *et al.* (2002) en Perú, han encontrado un compuesto antifúngico en *Tropaeolum tuberosum* "mashua", el cual se purificó, caracterizó y cuantificó su actividad biológica, el compuesto hallado fue el 4-metoxibencilsotiocinato.

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de un compuesto vegetal, en muchos casos se recurrirá a procedimientos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible (GARCIA, 2003).

2.8. Extractos Vegetales

Se definen como los concentrados que contienen principios activos y sustancias útiles del vegetal que se consiguen por el tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol, éter, etc. para que se puedan utilizar con mucha más facilidad y precisión tanto en la industria farmacéutica como alimentaria (OCARES, 2012).

Cuando la materia vegetal seca se pone en contacto con el solvente se inicia un proceso opuesto al del secado, es decir, se reconstituye el estado original de la célula. El proceso extractivo empieza cuando el solvente penetra en la célula, logrando sacar el aire contenido en el citoplasma. Para el aislamiento de metabolitos secundarios los solventes más empleados son: agua, alcohol etílico, glicerina, propilenglicol y sus mezclas (SULCA, 2010).

Un extracto vegetal puede ser líquido, semisólido o en polvo y se puede obtener por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos, a partir de una fuente vegetal y puede ser utilizado en cualquier campo de la tecnología (LIZCANO y VERGARA, 2008). Los extractos vegetales se pueden obtener de diferentes partes de los vegetales como: las hojas, las raíces, corteza, pericarpio del fruto, tallo, flores, frutos, etc. A los órganos o partes vegetales que proporcionan la materia prima de los extractos se les conoce como drogas.

Hay que resaltar que se define como metabolismo primario al conjunto de procesos metabólicos que desempeñan una función esencial en el vegetal, tal como la fotosíntesis, la respiración y el transporte de solutos. Los compuestos involucrados en el metabolismo primario poseen una distribución universal en las plantas. Ese es el caso de los aminoácidos, de los nucleótidos, de los lípidos, carbohidratos y de la clorofila. En contrapartida el metabolismo secundario origina compuestos que no poseen una distribución universal, pues no son necesarios para todas las plantas. Más allá que el metabolismo secundario no siempre sea necesario para que una planta complete su ciclo de vida, el desempeña un papel importante en la interacción de las plantas con el medio ambiente. En este contexto, los metabolitos secundarios vegetales presentan un gran valor desde el punto de vista social y económico. Adicionalmente, los metabolitos

secundarios son utilizados en escala industrial para la producción de insecticidas, colorantes, saborizantes, aromatizantes y medicamentos (GONZALES, 2011).

Los extractos vegetales, así como los aceites esenciales, son mezclas complejas de metabolitos secundarios, aislados de los vegetales por diversos métodos como la destilación por arrastre de vapor, por expresión de los frutos o por medio de soxtlet, etc. Los principales componentes químicos de estas mezclas son: mono y sesquiterpenos incluyendo carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetonas, los cuales son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales. Los extractos vegetales y aceites esenciales cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios insectos y vegetales (GARCIA-LUJAN, 2010).

Por un vasto número de investigaciones se ha detectado que las especies vegetales poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de su metabolismo dirigido principalmente hacia sus sistemas de defensa en contra de agentes biológicos dañinos. Aunque se han identificado algunas sustancias simples como fenoles y sus derivados (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, pectinas y polipéptidos, hay pocos datos de composición química para muchos otros compuestos (ÓCARES, 2012).

Algunos de estos grupos de compuestos generados por los vegetales son los siguientes:

Compuestos fenólicos simples: Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol, el ácido cinámico y el ácido cafeico. Muchos fenoles se encuentran en estado oxidado en esencias entre ellos el estragol, el apiol y el atenol. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo (*Thymus vulgaris*) y la manzanilla (*Matriarca chamomilla*). El mecanismo de acción antimicrobiana parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados. Dentro de este grupo cabe destacar también los aceites esenciales, compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano, como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la capsaicina de la planta conocida como pimiento rojo o chile (*Capsicumm annuum*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

Quinonas: Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

Taninos: El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Los taninos por su poder astringente y las quinonas que son muy reactivas, tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana, ya que actúan sobre las adhesinas que se encuentran sobre la superficie de las bacterias inhibiendo así su colonización. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (JIMENEZ-HARO, 2015; DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

Cumarinas: Son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias Umbeliferae y Rutaceae. Se encuentran en todas las partes de la planta desde la raíz hasta los frutos siendo más abundante en estos últimos. Se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos. En los últimos años han despertado gran interés por el amplio rango de actividad biológica que muchas cumarinas han demostrado como por ejemplo la acción antibacterial del dicumarol (ARANGO, 2010).

Flavonas: Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo y constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, además de presentar actividad

sobre la pared celular de forma similar a las quinonas. Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde (*Camellia sinensis*), las cuales ejercen actividad frente a *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otros microorganismos. Otros flavonoides tienen en general actividad antiviral, como la glicirricina, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

Alcaloides: Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. Un ejemplo son los derivados de la corteza de *la Cinchona officinalis* (quinina y quinidina), utilizados en el tratamiento de la malaria. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

2.9. Métodos de extracción

El proceso extractivo se inicia con la interacción droga-solvente. Dependiendo del tipo de principios a aislar se elegirá un método u otro. Las soluciones extractivas son aquellas que resultan de la acción de un solvente o menstuo sobre una droga (estructura orgánica vegetal). Una parte de la sustancia puesta en contacto con el solvente pasará a la solución, la parte insoluble se denomina residuo o marco.

2.9.1. Extracción mecánica, se obtiene directamente en los fluidos propios del vegetal. Puede ser por expresión, por calor o con incisiones.

2.9.2. Destilación, para principios activos termoestables. Por arrastre de vapor e hidrodestilación.

2.9.3. Extracción con gases, a presión y temperatura superiores a las críticas. Los gases más usados son butano y dióxido de carbono. Es muy selectiva y el gas es fácil de eliminar. Es económicamente caro y difícil de aplicar las condiciones requeridas.

2.9.4. Extracción con disolventes: Método más empleado. El principio activo debe pasar de la droga al disolvente obteniendo un extracto líquido. El extracto se puede concentrar.

Se requiere considerar diferentes factores como la desecación y pulverización de las drogas, la naturaleza del disolvente (agua, éter, etanol, hexano, etc.), la temperatura que favorece la extracción por aumento de la solubilidad pero puede ayudar a la degradación. Puede ser a su vez:

A. Extracción discontinua o simultánea

A.1.- Maceración y doble maceración. Se realiza a temperatura ambiente (15 a 20 °C). La droga seca y triturada se pone en contacto con el

solvente en un recipiente tapado y se agita periódicamente. Tiempo de maceración 2 a 14 días. Se decanta, se exprime el residuo y se filtra. Generalmente se usa agua, glicerina o mezclas hidroalcohólicas. Se emplea con principios activos muy solubles y cuando la estructura de la droga es muy permeable al disolvente. Ideal para principios activos termolábiles.

A.2.- Infusión. Se trabaja con agua a T° próxima a ebullición, pero retirado de los efectos directos del calor. Se introduce la droga en cantidad variable, fresca o seca y se deja enfriar a T° ambiente. Se debe humectar por 15 minutos con agua a temperatura ambiente y luego se agregar agua caliente a ebullición. Se deja reposar por 30 minutos y se usa inmediatamente (poco estable, no guardar). Solvente: agua (no para principios activos hidrolizables).

A.3.- Digestión. Se realiza a una temperatura entre 40 y 60 °C. La droga se pone en contacto con el solvente, si es volátil se hace reflujo. La temperatura aplicada debe ser menor a la temperatura de ebullición del solvente. Tiempo de digestión 15 - 30 minutos.

A.4.- Decocción o Cocimiento. Método en el cual la droga vegetal se cuece junto con el disolvente, generalmente agua, bajo los efectos directos del calor. Tiempo de realización del decocto 15 a 20 minutos. Se enfría y se lleva a volumen. Se requiere más tiempo para partes duras (corteza y semillas) Para drogas resistentes a las temperaturas altas y no hidrolizables. Es para uso inmediato.

B. Extracción continua o progresiva

B.1.- Percolación o Lixiviación. Se realiza a temperatura ambiente (15 a 20 °C). La droga está en contacto permanente con el disolvente. Se requiere gran cantidad de disolvente, el mismo que se deja descender a través de la droga en polvo, en un percolador. Para la lixiviación tener en cuenta la humectación de la droga en polvo 40 : 100 (solvente: droga), el tiempo de humectación (15 min), la carga del percolador, la maceración o agregado del solvente, la velocidad de la percolación en mL/min.

B2.- Soxhlet. El disolvente orgánico se recicla y los principios activos se concentran. Combina la maceración con la percolación.

2.10. Microorganismos indicadores de sensibilidad

Staphylococcus aureus. Bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa, productora de catalasa y coagulasa, se encuentra ampliamente distribuida en el mundo entero, ya que de cada tres personas una la posee, aunque no muestren síntomas de infección. Pueden producir diferentes enfermedades como infecciones respiratorias, faringitis, conjuntivitis, neumonía entre otras.

Pseudomonas aeruginosa. Bacteria Gram-negativa, aerobia perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, produce catalasa, oxidasa y aminoácidos a partir de la arginina. Producen infecciones muy graves en el ser humano, colonizan

generalmente órganos dañados, como heridas quirúrgicas, quemaduras, aparato respiratorio, produce septicemias muy letales.

Candida albicans. Fungi (hongo) unicelular también llamado levadura. Es la más significativa por su importancia clínica. Comensal de la piel y mucosas humanas, sobre todo de la mucosa oral, digestiva y genital. Indemne pero causan infección especialmente en pacientes con inmunosupresión, cuando su crecimiento aumenta drásticamente es demoledor para la salud. Excretan toxinas en la sangre con un efecto devastador en el sistema nervioso e inmune.

Sporothrix schenckii. Fungi dimórfico, que crece de forma filamentosa a temperaturas inferiores a 37 °C y en forma de levadura a 37 °C en medios enriquecidos y en los tejidos parasitados. Las cepas aisladas en la naturaleza varían en su capacidad de crecer a 37 °C, por lo que la infección podría ser un proceso de selección de aquellas cepas que crecen a mayores temperaturas y adaptarse al tejido animal. Produce la esporotricosis que se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos o subcutáneos ulcerados, eritematosos y/o verrucosos, con frecuencia asociada a afectación linfática nodular. Aunque la vía de entrada del hongo es generalmente por inoculación cutánea, en ocasiones es por vía inhalatoria causando una neumonitis granulomatosa con frecuencia cavitada, que recuerda a la tuberculosis. También puede haber diseminación hematogena con posterior localización osteoarticular, en el sistema nervioso central, aparato genitourinario y ojos en el huésped inmunocompetente o enfermedad multifocal en el huésped inmunodeprimido.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología General, de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicado en la provincia de Leoncio Prado, distrito de Rupa Rupa, región Huánuco, a una altitud de 660 m.s.n.m. con condiciones de temperatura promedio anual de 24.85 °C con precipitación anual de 3,200 mm y humedad relativa de 82 %.

3.2. Unidades experimentales

3.2.1. Especie vegetal

Se utilizó *Calycophyllum spruceanum* (Benth.), una Rubiaceae, recolectada de la plantación de la Unidad Experimental Tulumayo de la UNAS, de la que se aprovechó hojas y corteza para la obtención de extractos crudos.

3.2.2. Solventes y antimicrobianos químicos

Etanol al 70 % , Metanol al 99 %, Agua destilada.

Ceftriaxona, antibiótico tipo cefalosporina de cuarta generación

Fluconazol, antimicótico tipo triazólico de última generación.

3.2.3. Microorganismos indicadores

Para este propósito se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Sporothrix schenckii*, contenidas en viales, donadas por el laboratorio de Microbiología General de la facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Microorganismos para la prueba de susceptibilidad y/o resistencia frente a extractos crudos.

Microorganismo Indicador	Especie	Procedencia
Bacteria grampositiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lab.Microbiología UNAS
Bacteria gramnegativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lab.Microbiología UNAS
Fungi levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	Lab.Microbiología UNAS
Fungi dimórfico	<i>Sporothrix schenckii</i>	Lab.Microbiología UNAS

3.3. Reactivación de cepas indicadoras

3.3.1. Reactivación de bacterias

Se aplicó la metodología ya conocida y recomendada por HEYMANN (2011) de la Asociación Estadounidense de Salud Pública (American Public Health Association – APHA), utilizándose el medio Infusión Cerebro Corazón

(BHI) distribuido en tubos de ensayo de 15 x 125 mm; los viales conteniendo las cepas se repicaron en el medio BHI y se llevaron a incubación por 24 horas a 37 °C.

Al término de la incubación se repicaron las cepas sobre medio sólido Agar CLED (AC) o Agar Nutritivo Común (AN) contenidos en placas petri y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Se procedió a la verificación de su identificación y actividad por medios de los medios de diferenciación bioquímica diferencial. Se las mantuvo en refrigeración (4 – 8°C) en viales hasta su utilización.

3.3.2. Reactivación de fúngi

Se adecuó el procedimiento a lo descrito por MANZANO-GAYOSSO *et al.* (2015) y por la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica-Formulario Nacional (USP-NF, 2016). Se utilizó el medio Caldo Sabouraud Glucosado (CS) distribuidos en tubos de prueba de 15 x 125 mm.

El vial conteniendo la cepa fungi se repicó sobre el medio de cultivo y se llevó a incubación por 3 días a temperatura ambiente. Al término de la incubación se repicaron sobre medio sólido de Agar Sabouraud Glucosado (AS), las placas se incubaron a temperatura ambiente por espacio de 3 días.

Se verificó su identificación y actividad metabólica por medios de los medios de diferenciación específica para fungi. Se los mantuvo en viables en refrigeración hasta su utilización.

3.3.3. Obtención de Inóculos Microbianos

De las placas de repique tanto de bacterias como de fungi, se tomaron 5 colonias en estado puro y se sembraron en medios BHI contenido en tubos y se incubaron a 37°C de 12 a 18 horas hasta que la suspensión alcanzó una concentración celular de 10^5 a 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro), cuantificados por cuenta en placa vertida previa diluciones decimales hasta 10^{-3} con medio Mueller Hinton como indicador de desarrollo.

Se realizaron controles de crecimiento, esterilidad y de susceptibilidad antimicrobiana con antibióticos comerciales específicos para cada microorganismos ensayado.

3.4. Preparación de Extractos Crudos

3.4.1. Procesamiento del material vegetal

Se dispuso de material vegetal fresco y seco constituido por hojas y cortezas (drogas) de la especie forestal *Calycophyllum spruceanum*. Para este fin se procesaron por el método descrito por MIRANDA-CRUZ *et al.* (2012) y ESPINDOLA (2015).

Se recolectaron y separaron 1500 g de hoja y corteza de la especie forestal, se lavaron con agua corriente y enjuagaron con agua destilada, luego se secaron en la estufa a 40 °C por 72 horas para eliminar el exceso de agua.

Posteriormente se cortaron en trozos pequeños y se trituraron en molino de martillos THOMAS WILEY 4, para pulverizarlos hasta su homogenización. Se tamizaron en mallas 40/60 (Meh N° 8) (Figura 1).

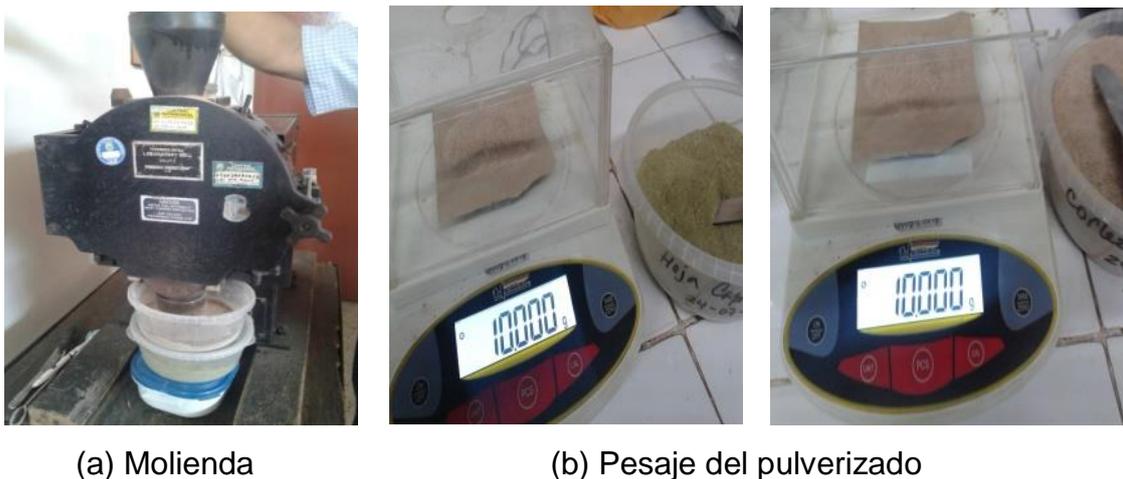


Figura 1. Molienda y pulverizado de las drogas hojas y corteza (a) en molino Thomas Wiley 4, posterior pesaje (b) para el procesamiento de cocción y maceración (Fotos: Maribel Roca, 2017).

Con los pulverizados se prepararon los extractos crudos empleando disolventes polares: agua, etanol y metanol. Se dispuso de 10 a 50 g de pulverizado de material vegetal seco por cada solvente utilizado en la extracción.

3.4.2. Extractos crudos acuosos

La extracción acuosa se fundamentó en el método descrito por VERDEGUER-SANCHO (2011) adaptándolo de acuerdo a nuestro requerimiento, para tal efecto se tomaron 50 g de pulverizado vegetal y se llevaron a 500 mL de agua destilada, se sometió a ebullición (100°C) por 20 minutos, se dejaron que enfríen a temperatura ambiente por lo menos 60 minutos, posteriormente se filtraron sobre papel Whatman N° 1, el filtrado se sometió a 80 °C por 15 minutos y se filtró nuevamente. Se centrifugó a 3 000 rpm por 10 minutos y se descartó el sedimento.

El sobrenadante se esterilizó por tindalización a 60°C por 2 horas y períodos de descanso de 24 horas, por tres días seguidos. Se depositaron en viales estériles y se los llevó a 60° C x 12 horas en horno de aire seco y se almacenaron en refrigeración (4° a 8°C) hasta su utilización.

Para la determinación de la CIM se reconstituyeron agregando 1 mL de agua destilada estéril por 0.1 mg de extracto en polvo.

En la Figura 2 se muestra los pasos de la marcha analítica para la obtención de extractos acuosos secos.



Figura 2. Marcha analítica simplificada del procesamiento de los pulverizados de las drogas hasta la obtención de extractos secos acuosos
(Fotos: Maribel Roca, 2017)

3.4.3. Extractos crudos etanólicos

Se procedió a la extracción con etanol en base al método descrito por MIRANDA-CRUZ *et al.* (2012) modificado según nuestra exigencia. Para ello a 10 g del pulverizado vegetal se agregó 100 mL de etanol al 70 % y se dejó macerar en agitación lenta (40 rpm) por espacio de 24 horas, en agitador mecánico.

Al término de la maceración se filtró en papel Whatman N° 1 y al filtrado se le agregó unos mililitros de agua destilada hirviendo con la finalidad de precipitar compuestos resinosos existentes y se procedió a eliminar el solvente en baño maría a 45°C por 6 horas según lo recomendado por Claussen (2009) citado por OCARES (2012).

Posteriormente se llevó a rotavapor BUCHI R200, a presión reducida a 45 °C hasta desecación. Un método alternativo puede ser el llevar los viales al horno de aire seco a 60 °C por 4 horas hasta su completa sequedad, según Claussen (2009), citado por OCARES (2012), luego se conserva el polvo en refrigeración (4 a 8 °C) hasta su reconstitución con Dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez reconstituidos se esterilizaron por tindalización a 60 °C por 2 horas con descansos de 24 horas por tres días seguidos. Se los almacenó en refrigeración hasta la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

La resuspensión en DMSO se realizó debido a las características que posee este diluyente de conservar principios activos en los medicamentos y facilitar su difusión en medios polares.

3.4.4. Extractos crudos metanólicos

Se procedió según el método descrito por OCARES (2012) adaptado de acuerdo a nuestra realidad. Se maceró 10 g del pulverizado en 500 mL de metanol al 99 % por 24 horas, al término de la maceración se filtró en papel Whatman N° 1.

Posteriormente del filtrado se eliminó el solvente a baño maría (temperatura no mayor a 45 °C) y se llevó a rotavapor BUCHI R200, a presión reducida a 45 °C hasta desecación. Un método alternativo puede ser el llevar los viales al horno de aire seco a 60 °C por 4 horas hasta su completa sequedad, según Claussen (2009), citado por OCARES (2012) y reconstituyéndolos con Dimetilsulfóxido (DMSO). Se esterilizaron los reconstituidos por tindalización a 60 °C por 2 horas y descansos de 24 horas con tres repeticiones del proceso. Se conservaron en refrigeración entre 4° a 8 °C hasta su uso en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Para la evaluación se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, se tomaron los sobrenadantes para realizar la prueba de sensibilidad y/o resistencia antimicrobiana

En la Figura 3 se muestra los pasos de la marcha analítica para la obtención de extractos en solventes orgánicos (etanol y metanol).



Figura 3. Marcha analítica simplificada del procesamiento de los pulverizados de las drogas hasta la obtención de extractos secos en solventes orgánicos (etanol y metanol) (Fotos: Maribel Roca, 2017)

3.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se adaptó la metodología del CLSI (2017) y la mencionada por DEL AGUILA *et al.* (2013) la cual está basada en la tradicional de KIRBY y BAUER (1966). Se probaron seis concentraciones del extracto crudo vegetal: 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL y 250 mg/mL, para determinar la CIM de los extractos tanto a partir de hojas como de corteza. La CIM es la concentración más baja que requiere el extracto crudo vegetal para inhibir el crecimiento del microorganismo. Se realizaron tres repeticiones.

Los inóculos bacterianos reactivados en medio BHI, se sembraron por diseminación sobre placas conteniendo Medio Mueller Hinton (MH) adicionado con antimicótico (100 µg/mL de Fluconazol) como presión selectiva. Los inóculos de fungi, se sembraron a partir del medio BHI en placas petri conteniendo Medio Sabouraud Glucosado (AS) o Agar Papa Glucosa (PDA), adicionado de antibiótico (50 µg/mL de Ceftriaxona) como presión selectiva. Se utilizó una placa por cada tipo de extracto, a las concentraciones establecidas.

Se utilizaron placas con microorganismos reactivados y utilizando una plantilla (Plantilla A) de cuadrículas de siembra (Figura 4, a) colocada debajo de cada placa, se depositó una dosis de 25 µL, con ayuda de una micropipeta automática, de cada una de las concentraciones ya mencionadas de los extractos preparados

El extracto crudo según su solvente y concentración se depositó sobre las cuadrículas 1 al 12. Las placas se trasladaron a incubación a 37 °C por 24 horas en caso de las bacterias y a temperatura ambiente por 3 días en el caso de fungi. Al término de la incubación se procedió a la lectura de los resultados, evidenciando el efecto tóxico por la aparición de halos de inhibición del crecimiento de las cepas en estudio, medidos en milímetros (mm) de diámetro, y se compararon con los halos producidos por sus respectivas placas controles (Plantilla B).

El efecto tóxico se evidenció por la aparición de halos de inhibición del crecimiento de las cepas en estudio, que se comparó con los halos producidos por sus respectivos controles. Al retirar las placas de incubación se observaron halos de inhibición que se midieron en milímetros (mm).

Los halos de inhibición se catalogaron según la escala de Duraffourff : igual o mayores de 20 mm se consideraron como positivos (posee actividad antimicrobiana), diámetros de halos que estuvieron entre 16 - 19 mm denotó una actividad intermedia o moderada, halos con diámetros igual o menores a 15 mm se tomaron como de no tener actividad antimicrobiana significativa (CLSI, 2017; DURAFFOURD *et al*, 1987; KIRBY *et al.*, 1966).

3.6. Controles

Se utilizaron como controles los solventes que intervienen en el proceso: agua, etanol, metanol, así como ceftriaxona 50 µg/mL y fluconazol 100

$\mu\text{g/mL}$, se depositaron en una dosis de $25\ \mu\text{L}$ en las cuadrículas de la plantilla B (Figura 4, b) en cada placa sembrada con los diferentes microorganismos indicadores.

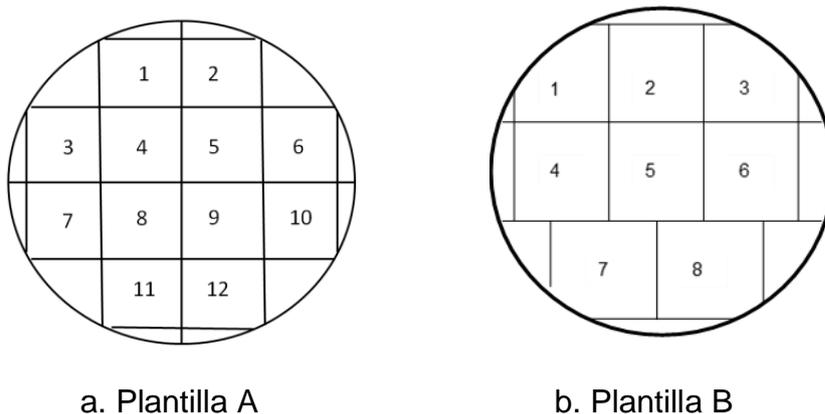


Figura 4. Plantillas de cuadrículas enumeradas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

3.7. Variables en estudio

3.7.1. Variable Dependiente

Actividad Bactericida y Fungicida.

3.7.2. Variable independiente

Extractos de hoja y corteza *Calycophyllum spruceanum* (Capirona).

Cuadro 2. Variables en estudio

Variable	Tipo	Parámetro	Indicador
Variable dependiente: Actividad Bactericida y Fungicida.	Inhibición fúngica y bacteriana	Diámetro de inhibición (halo)	mm
Variable independiente: Extractos de hoja y corteza <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Capirona).	Origen del extracto de hoja o corteza (acuoso, etanólico, metanólico)	Concentración extracto Hoja	mg/mL
		Concentración extracto Corteza	mg/mL
	Dosis	Concentración de aplicación	µL

* : Unidades formadoras de colonias

3.8. Diseño Experimental

En la presente investigación se adoptó un diseño experimental de estímulo creciente aplicando diferentes seis concentraciones de extractos crudos vegetales (10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL y 250 mg/mL), obtenidos con tres tipos de solventes (agua, etanol y metanol), a partir de dos estructuras vegetales (hojas y corteza), sobre cuatro cultivos de microorganismos indicadores (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Sporothrix*) con una dosis de prueba (25 µL) y teniendo como controles testigos dosis similares de los solventes (agua, etanol y metanol) y de los antimicrobianos de presión selectiva (ceftriaxona y fluconazol). Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento.

Se tuvieron en total 164 tratamientos incluyendo 20 de los controles respectivos (ver ANEXO A).

3.9. Diseño Estadístico

Los datos obtenidos se procesaron para su análisis y ajuste estadístico como para la respectiva interpretación mediante el modelo de un diseño completo al azar con arreglo factorial (6 x 3 x 2 x 4) con tres repeticiones. Se manejó el paquete computacional de estadística Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06.

IV. RESULTADOS

4.1. EXTRACTOS CRUDOS VEGETALES PREPARADOS

Se obtuvieron seis (6) extractos crudos a partir de hoja y corteza de la especie forestal en estudio, con tres tipos de solventes, dos extractos acuosos (hoja y corteza) dos extractos etanólicos (de hoja y corteza) y dos metanólicos (hoja y de corteza) conservándose entre 4 °C – 8 °C, los que se procesaron para aplicarlos en la determinación de la CIM (Figuras 5 y 6).



Foto: Maribel Roca (2017)

Figura 5. Extractos crudos de cortezas y hojas en diferentes disolventes (agua, etanol y metanol).en refrigeración



Foto: Maribel Roca (2017)

Figura 6. Tubos con sobrenadantes de los extractos crudos de capirona (*Calycophyllum spruceanum*).

4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Calycophyllum spruceanum*

Con respecto a la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), los extractos mostraron variada actividad frente a las cepas microbianas seleccionadas para la prueba de susceptibilidad y resistencia.

De la actividad de los extractos crudos de hojas y corteza obtenidas de *C. spruceanum* se aprecia que los extractos crudos de corteza tienen mucha

más actividad antibacteriana que los obtenidos a partir de hojas y que además los acuosos y etanólicos son mucho más eficaces que los metanólicos en lo que se refiere a inhibir el crecimiento de las cepas de microorganismos ensayadas, y los acuosos muestran similar dinamismo frente a las cepas bacterianas y fúngicas.

4.2.1. Extractos de Hoja

Los extractos acuosos a partir de hoja demostraron tener actividad contra *S. aureus* a concentraciones de 100 mg/mL, y contra *P. aeruginosa* en concentraciones de 250 mg/mL. Frente a los fungi la actividad inhibitoria es a partir de los 100 mg/mL (ver Figura 7).

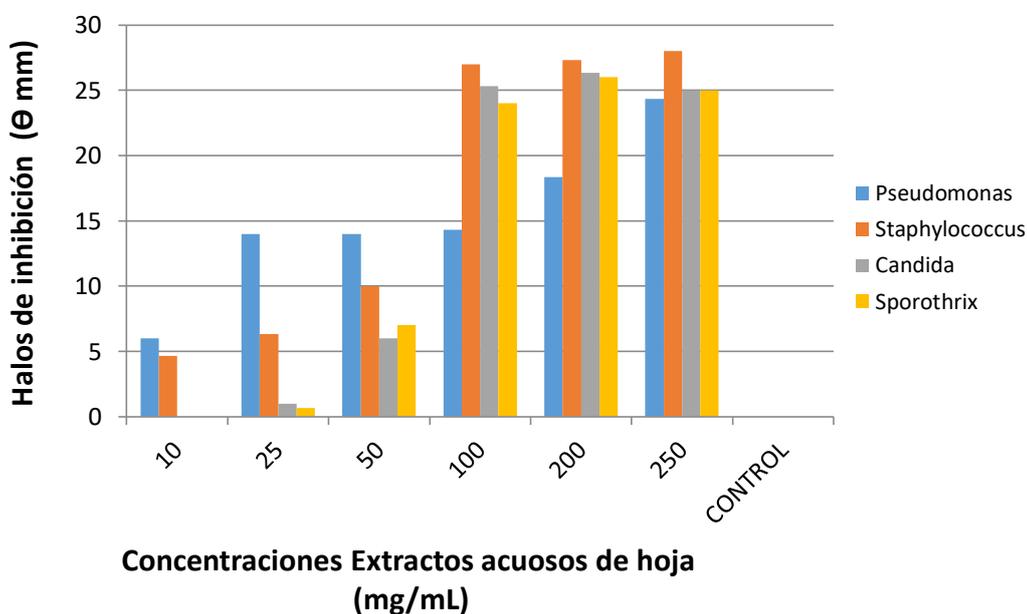


Figura 7. Actividad antimicrobiana de extractos crudos acuosos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre las cepas indicadoras

Asimismo, en la Figura 8 puede apreciarse que los extractos etanólicos de hoja ostentan actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* a concentración de 100 mg/mL; en tanto que frente a *C. albicans* y *S. sckenkii* a partir de la concentración 200 mg/mL..

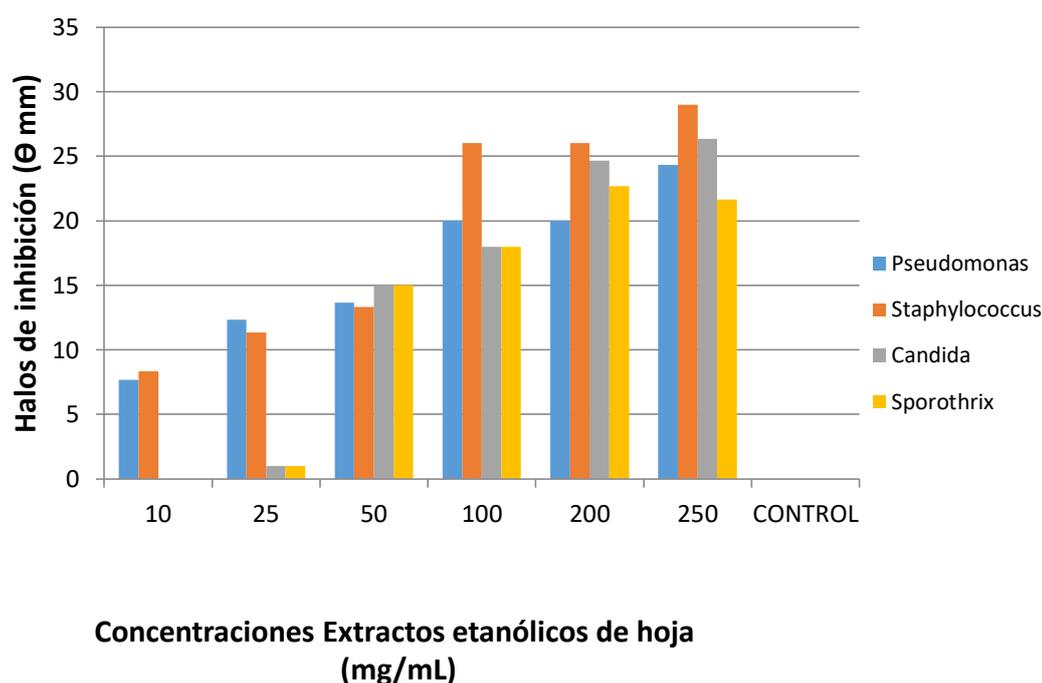


Figura 8. Actividad antimicrobiana de extractos crudos etanólicos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre las cepas indicadoras

Del mismo modo, se evidenció que los extractos metanólicos de hoja inhiben a *Staphylococcus* a partir de 100 mg/mL y *Pseudomonas* con 250 mg/mL (ver Figura 9), en tanto que para las cepas de fungi las inhibe con una concentración de 250 mg/mL. El solvente metanol como control mostró mínima actividad antimicrobiana que no llegó a ser tóxico para las cepas probadas

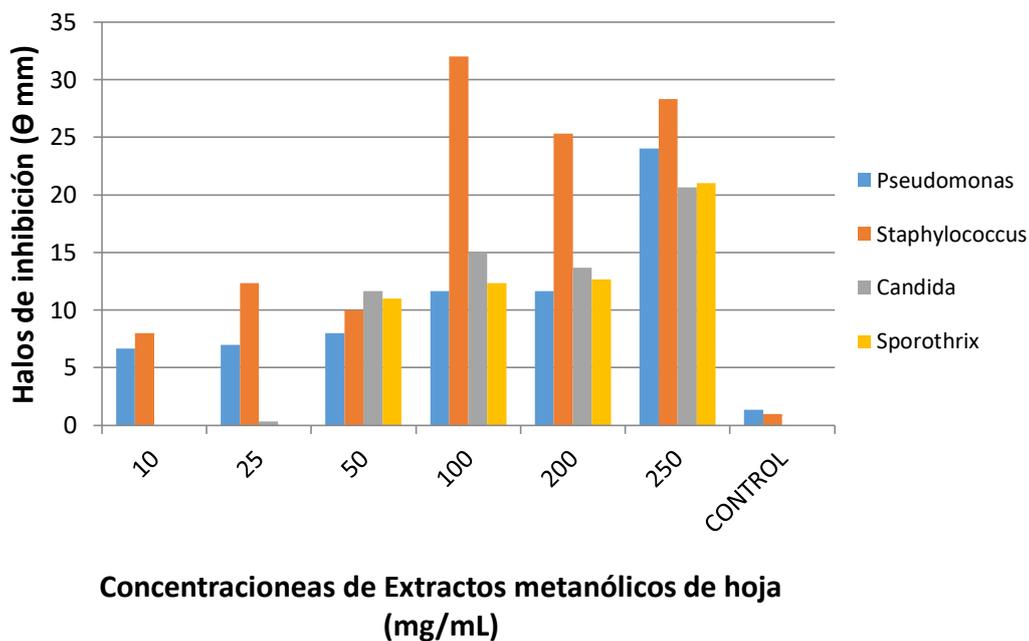


Figura 9. Actividad antimicrobiana de extractos crudos metanólicos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre las cepas indicadoras

4.2.2. Extractos de Corteza

En la Figura 10 se puede apreciar que los extractos acuosos de corteza tuvieron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus* y *Pseudomonas* a 50 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente; y a concentración de 50 mg/mL frente a las cepas fúngicas (*Candida* y *Sporothrix*).

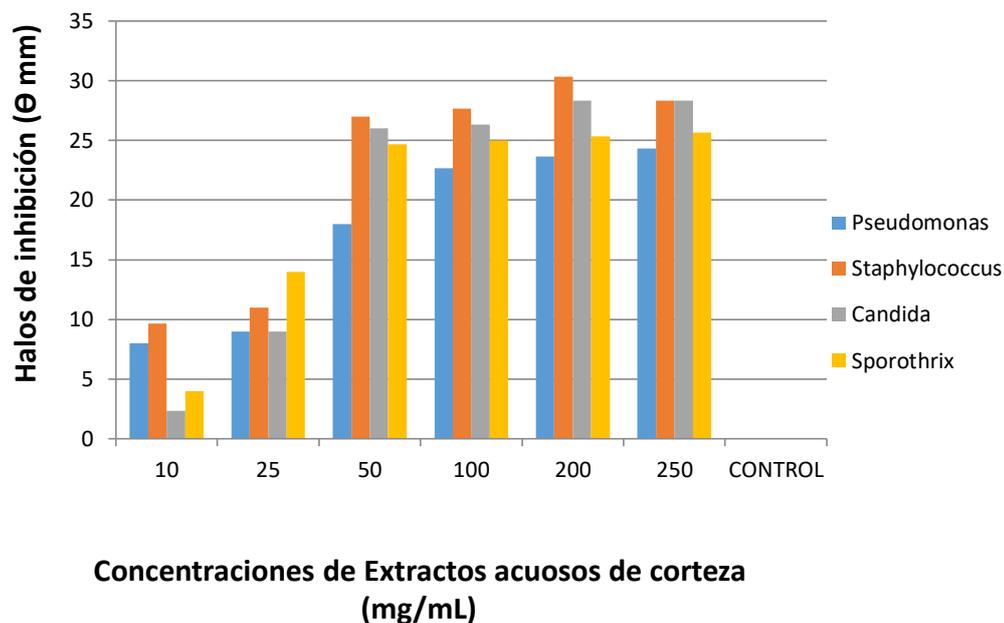


Figura 10. Actividad antimicrobiana de extractos crudos acuosos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre las cepas indicadoras

Los extractos etanólicos de corteza en cuanto a bacterias mostraron inhibirlas a concentración de 50 mg/mL y en el caso de cepas fúngicas las inhibe a partir de 100 mg/mL (ver Figura 11). En la Figura 12 se puede verificar que los extractos metanólicos de corteza variaron en su actividad tanto frente a bacterias como a fungi, es así, que a una concentración de 50 mg/mL inhibe el desarrollo de *Staphylococcus* en tanto que se requiere de concentración de 100 mg/mL para impedir el desarrollo de *Pseudomonas*, teniendo actividad en la inhibición de las cepas de fungi probadas a partir de 250 mg/mL.

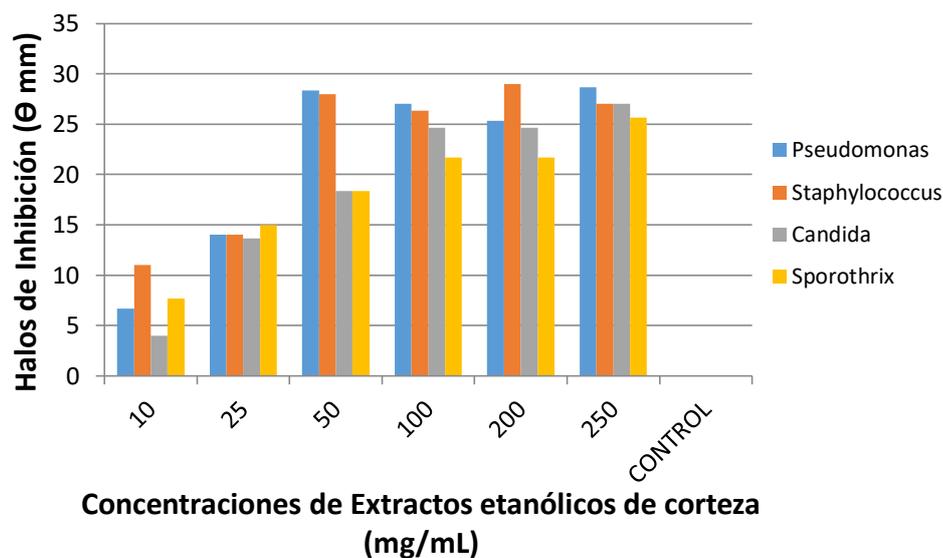


Figura 11. Actividad antimicrobiana de extractos crudos etanólicos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre las cepas indicadoras

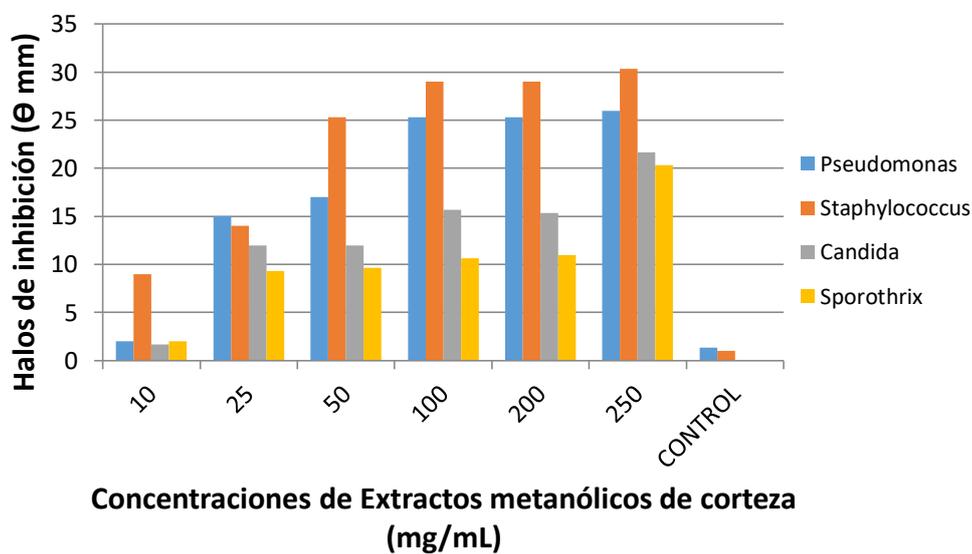


Figura 12. Actividad antimicrobiana de extractos crudos metanólicos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre las cepas indicadoras

4.3. ACTIVIDAD MINIMA BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS

En la comprobación de la eficacia de la actividad mínima antibacteriana de los extractos obtenidos de hoja y corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas como indicadores de sensibilidad y/o resistencia así como en la demostración de la exposición de las cepas a los solventes puros utilizados en la extracción y frente a Ceftriaxona (antibiótico sintético) y Fluconazol (antimicótico).

En las Figuras 13, 14, 15 y 16, se pormenorizan los resultados respecto a la actividad de los extractos de hoja y corteza preparados, contra las bacterias evidenciándose que los tres solventes (metanol, etanol y agua) así como Fluconazol (antimicótico) no presentan ningún efecto inhibitorio, en tanto que, como era de esperar, Ceftriaxona reveló alta actividad, con formación de halos de inhibición de 35,3 mm y 24,7 mm de diámetro para ambas cepas respectivamente, actividad antibiótica que al compararla con la actividad evidenciada por los extractos de hoja y corteza éstos expresaron acción antibacteriana similar a partir de la concentración 50 mg/mL los extractos de corteza y de 100 mg/mL los de hoja, evidenciando que podrían ser utilizados como una alternativa natural a los antimicrobianos sintéticos químicos.

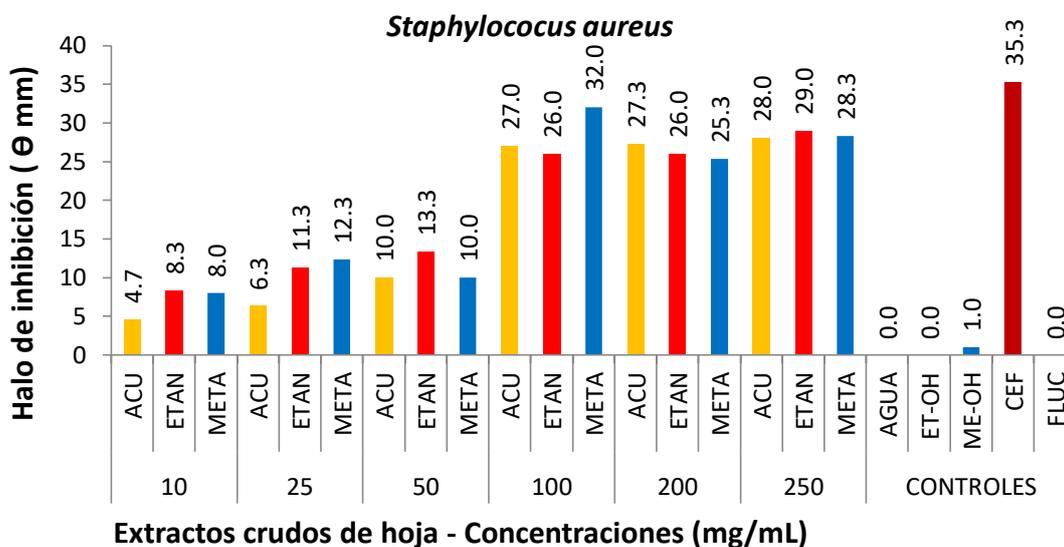


Figura 13. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* y controles sobre *Staphylococcus aureus*

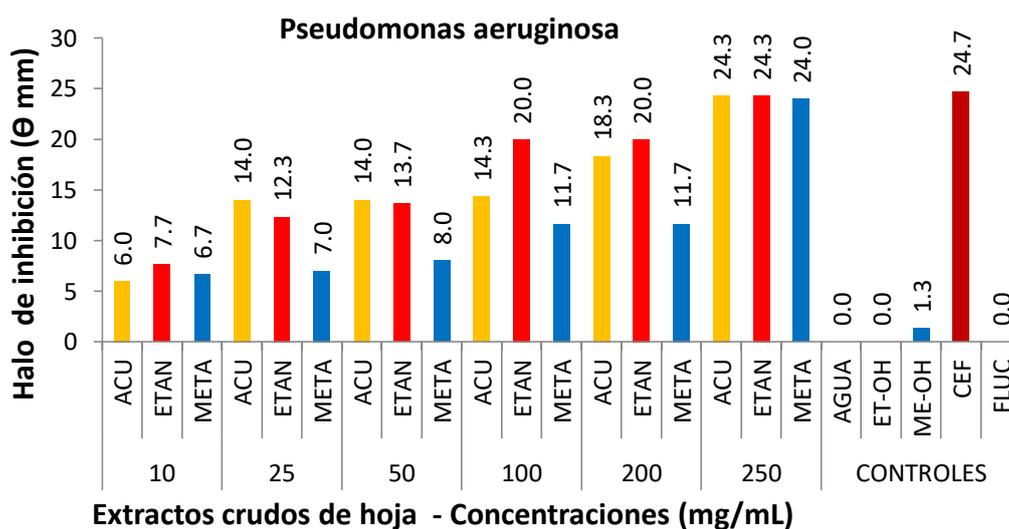


Figura 14. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*

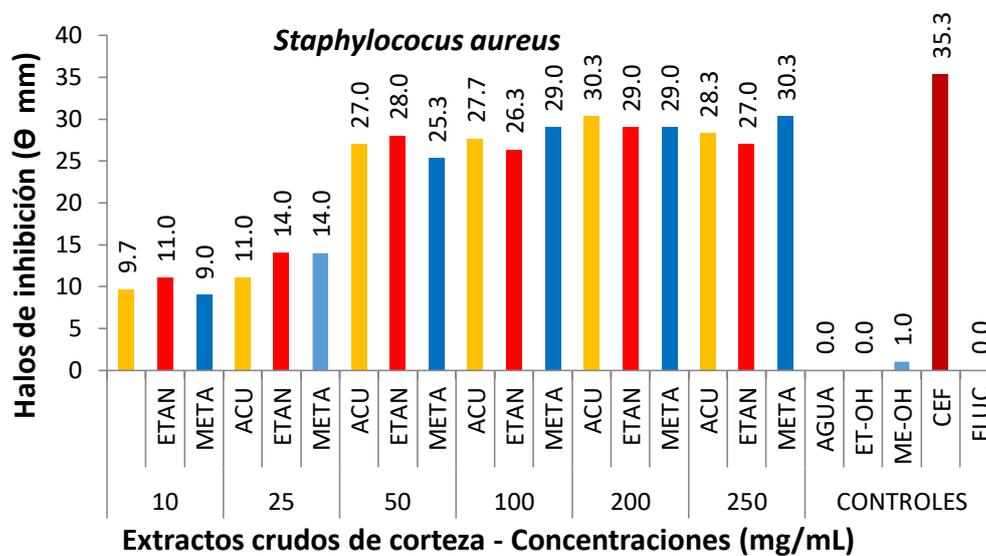


Figura 15. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Staphylococcus aureus*

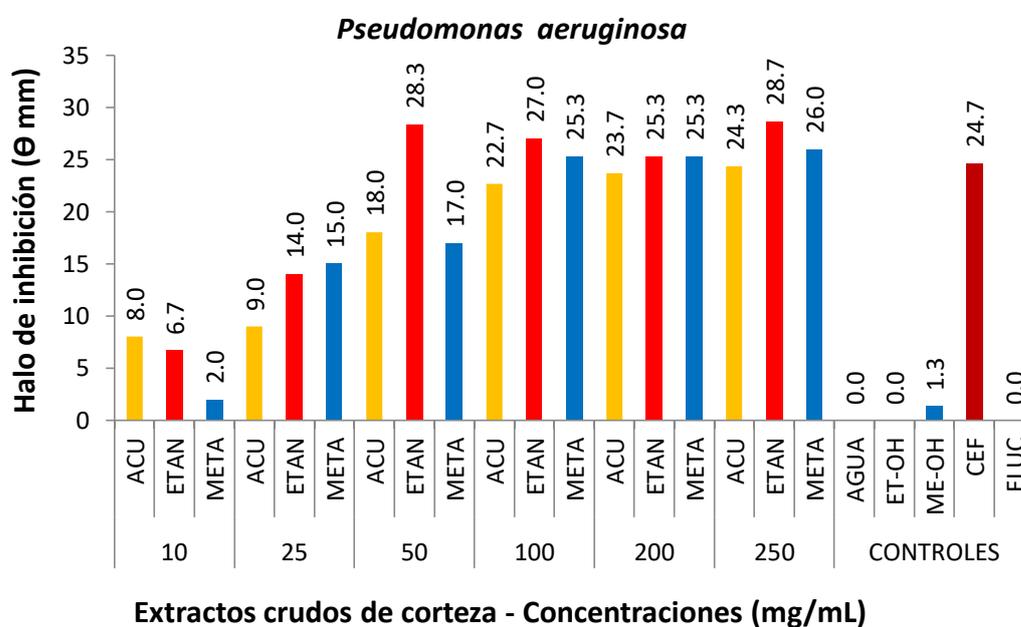


Figura 16. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.1. Ajuste e interpretación estadística para *Staphylococcus*

En el cuadro 3 se presenta la ANOVA de la variabilidad de *Staphylococcus aureus* muestra que los valores P obtenidos prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Tanto el tipo de extracto, la estructura vegetal de donde se obtuvo el extracto (droga) como la concentración del extracto tienen valores-P menores que 0.05, tienen un efecto estadísticamente altamente significativo sobre *Staphylococcus* con un 95.0% de nivel de confianza.

Cuadro 3. Análisis de Varianza de la actividad de los extractos frente a *Staphylococcus aureus*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: CONCENTRACIÓN	2718.74	5	543.747	24.37	0.0000
B: DROGA	156.056	1	156.056	7.00	0.0086
C: TIPO EXTRACTO	47530.4	7	6790.06	304.37	0.0000
RESIDUOS	6112.54	274	22.3085		
TOTAL (CORREGIDO)	56517.8	287			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En el Cuadro 4 se observa los resultados de la aplicación de la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey para los pares de medias de las concentraciones (mg/mL) manejadas de los tres tipos de extractos preparados e indican cuáles medias son significativamente diferentes de otras con un nivel del 95.0% de confianza. Se han identificado 3 grupos homogéneos identificados con una letra diferente. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0 (Ver Anexo). Podemos enfatizar que la concentración 50 mg/mL de todos los extractos es significativamente diferente que los otros grupos probados (Ver Anexo).

Cuadro 4. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Staphylococcus aureus* por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	7.6875	0.681734	a
25	48	8.83333	0.681734	a
50	48	11.625	0.681734	b
200	48	14.9583	0.681734	c
100	48	15.0208	0.681734	c
250	48	15.2083	0.681734	c

Utilizando la misma prueba de múltiple rangos de Tukey-HSD para discriminar la significancia del uso del tipo de estructura vegetal (droga) a partir de la cual se prepara el extracto, en el Cuadro 5 se anotan los resultados hallados que evidencian una diferencia significativa entre el uso de hoja o corteza siendo esta última la de mayor actividad (Ver en Anexo las diferencias entre pares de medias).

Cuadro 5. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Staphylococcus aureus* por DROGA (Mét.: 95.0 %).

DROGA (Estructura vegetal)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	11.4861	0.393599	a
CORTEZA	144	12.9583*	0.393599	b

* Indica diferencia significativa 1.47222, +/- límites 1.09582

En el mismo sentido en el siguiente Cuadro 6, se puede apreciar que existen diferencias de la actividad entre los tres tipos de extractos probados en comparación con los controles (solventes y antimicrobianos), resaltando que cualquiera de los tres extractos, acuoso, etanólico o metanólico, probados tienen similar actividad contra *Staphylococcus*.

El antibiótico sintético ceftriaxona, como lógico por su naturaleza química tiene actividad toxica muy diferenciada. Las diferencias entre pares de medias probadas con esta prueba de HSD-Tukey se señalan específicamente en el Anexo.

Cuadro 6. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Staphylococcus aureus* por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).

EXTRACTO y/o CONTROL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Agua	36	0.0	0.787199	a
Fluconazol	36	0.0	0.787199	a
Etanol	36	0.0	0.787199	a
Metanol	36	0.833333	0.787199	a
ACUOSO	36	19.7778	0.787199	b
ETANOLICO	36	20.7778	0.787199	b
METANOLICO	36	21.0556	0.787199	b
Ceftriaxona	36	35.3333	0.787199	c

4.3.2. Ajuste e interpretación estadística para *Pseudomonas*

En el cuadro 7 se presenta la ANOVA de la variabilidad de *Pseudomonas* que muestra que los efectos principales (concentración, droga y tipo de extracto) presentan significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que los valores-P son menores que 0.05, tienen un efecto estadísticamente altamente significativo sobre *Pseudomonas* con un 95.0% de nivel de confianza.

Cuadro 7. Análisis de Varianza de la actividad de los extractos frente a *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: CONCENTRACIÓN	1592.1	5	318.42	20.94	0.0000
B: DROGA	232.92	1	232.92	15.31	0.0001
C: TIPO EXTRACTO	26563.3	7	3794.76	249.49	0.0000
RESIDUOS	4167.51	274	15.2099		
TOTAL (CORREGIDO)	32555.8	287			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. Se utiliza Suma de Cuadrados tipo III (por omisión)

Los resultados de la discriminación entre medias de las concentraciones utilizadas de los extractos, mediante el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, se presentan en el Cuadro 8, no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0. Podemos destacar que la concentración 250 mg/mL de todos los extractos es significativamente diferente que los otros concentraciones probados (Ver Anexo).

Cuadro 8. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Pseudomonas aeruginosa* por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	5.54167	0.562914	a
25	48	7.6875	0.562914	ab
50	48	9.41667	0.562914	bc
100	48	10.7917	0.562914	bc
200	48	11.0	0.562914	bc
250	48	12.7083	0.562914	d

Utilizando la misma prueba de múltiple rangos de Tukey-HSD para discriminar la significancia del uso del tipo de estructura vegetal (droga) a partir de la cual se prepara el extracto, en el Cuadro 9 se anotan los resultados hallados que evidencian una diferencia entre el uso de hoja o corteza siendo esta última la de mayor actividad (Ver Anexo las diferencias entre pares de medias).

Cuadro 9. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Pseudomonas aeruginosa* por DROGA (Mét.: 95.0 %).

DROGA (Estructura vegetal)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	8.625	0.324999	a
CORTEZA	144	10.4236	0.324999	b

En el mismo sentido en el siguiente Cuadro 10, se puede apreciar las diferencias de la actividad entre los tres tipos de extractos probados en comparación entre sí y con los controles (solventes y antimicrobianos), resaltando que el extracto acuoso (de corteza) frente a *Pseudomonas* tiene actividad tóxica mayor o igual a lo observado para metanol, y mucho mayor que los otros dos extractos. El antibiótico sintético ceftriaxona, tiene actividad tóxica muy diferenciada por su naturaleza química ya demostrada con mucha anterioridad, a la que se está buscando una alternativa no química sintética. Las diferencias entre pares de medias probadas con esta prueba de HSD-Tukey se señalan específicamente en el Anexo.

Cuadro 10. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Pseudomonas aeruginosa* por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).

EXTRACTO y/o CONTROL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Fluconazol	36	0.0	0.649997	a
ETANOLICO	36	0.0	0.649997	a
Agua	36	0.0	0.649997	a
METANOLICO	36	1.16667	0.649997	a
Metanol	36	14.9722	0.649997	b
ACUOSO	36	16.3889	0.649997	bc
Etanol	36	19.0	0.649997	c
Ceftriaxona	36	24.6667	0.649997	d

4.4. ACTIVIDAD MINIMA FUNGICIDA DE LOS EXTRACTOS

En las Figuras 17, 18, 19 y 20, se señalan los resultados de la actividad de los extractos de hoja y corteza de *Calycophyllum spruceanum* contra las cepas fungi indicadoras y la comprobación de la actividad de los controles (solventes y antimicrobianos químicos) que indican que los solventes no expresaron actividad antifúngica, y como era lógico de esperar el Fluconazol evidenció una alta inhibición de las cepas (halos de inhibición de 30 mm). La comparación con la actividad antifúngica exhibida por los extractos preparados de hoja y corteza evidencia que la potencia de inhibición es equivalente al del fluconazol a partir de la concentración 100 mg/mL.

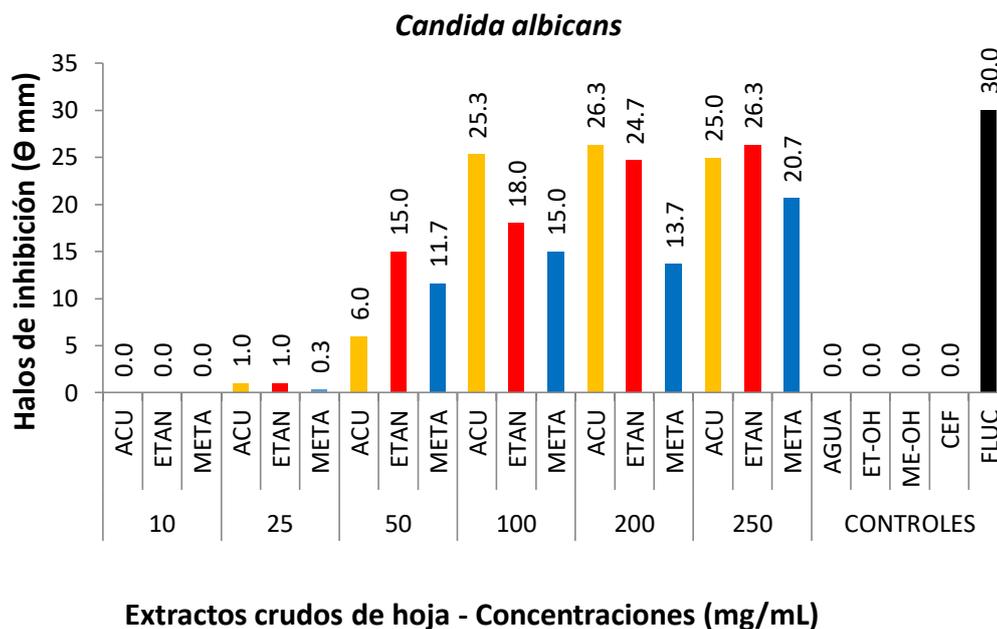


Figura 17. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Candida albicans*

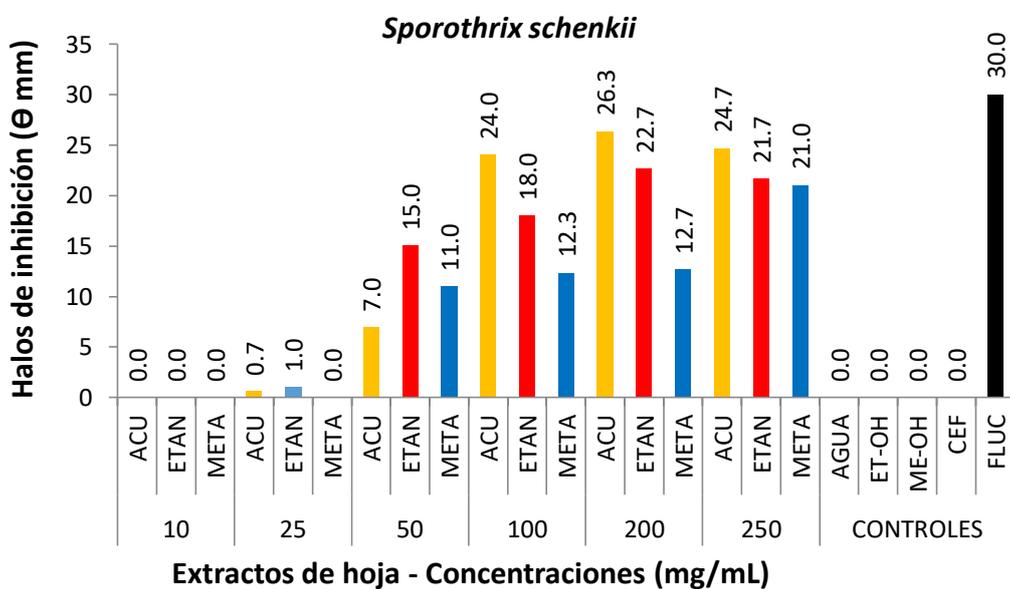


Figura 18. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Sporothrix schenckii*

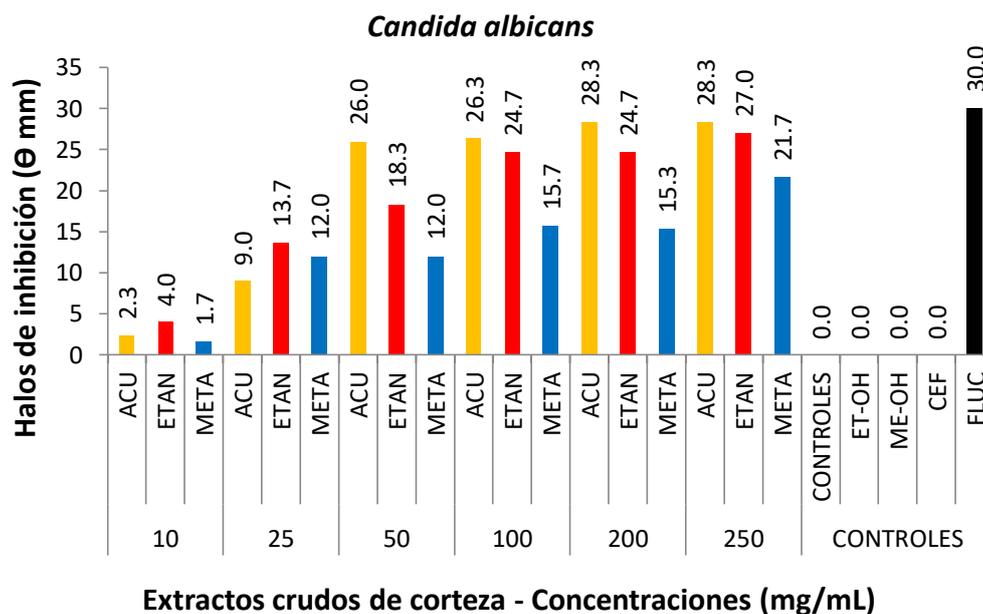


Figura 19. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Candida albicans*

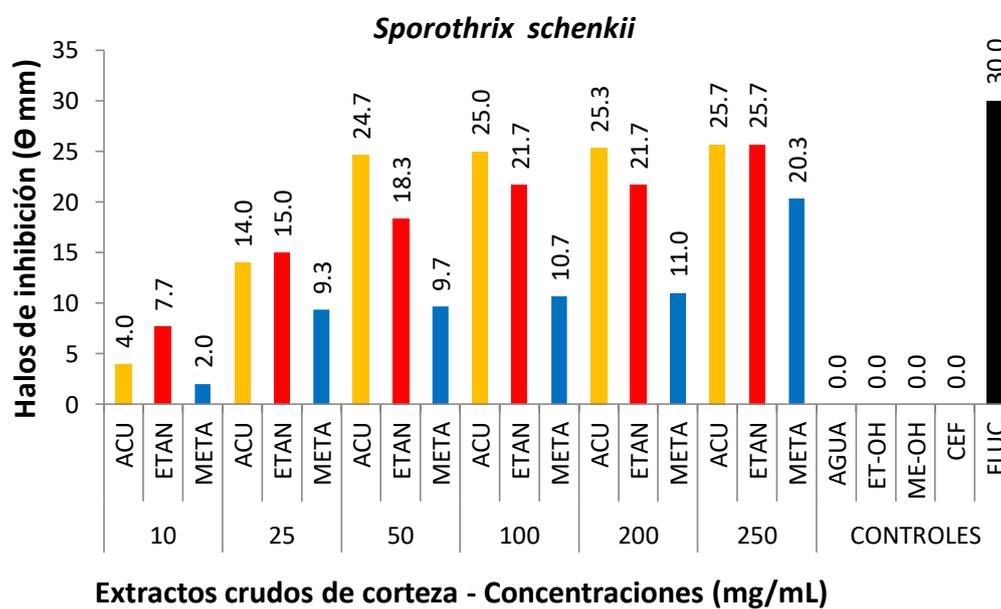


Figura 20. Actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum* sobre *Sporothrix schenckii*

4.4.1. Ajuste e interpretación estadística para *Cándida albicans*

En el cuadro 11 se presenta la ANOVA de la variabilidad de *Candida albicans* y muestra que los valores P obtenidos prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que los 3 efectos principales: concentración, tipo de extracto y droga (estructura vegetal) son menores que 0.05, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre *Candida albicans* con un 95.0% de nivel de confianza.

Cuadro 11. Análisis de Varianza de la actividad de los extractos frente a *Candida albicans*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: CONCENTRACIÓN	3016.66	5	603.331	24.59	0.0000
B: DROGA	205.031	1	205.031	8.36	0.0042
C: TIPO EXTRACTO	32047.0	7	4578.15	186.57	0.0000
RESIDUOS	6723.51	274	24.5383		
TOTAL (CORREGIDO)	41992.2	287			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los resultados de la discriminación entre las medias de las concentraciones utilizadas de los extractos, mediante el procedimiento de la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey se muestran en el Cuadro 12, se han identificado 4 grupos homogéneos.

Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0. Podemos destacar que la concentración 250 mg/mL de todos los extractos es significativamente diferente que los otros grupos probados (Ver Anexo).

Cuadro 12. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Candida albicans* por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	4.25	0.714993	a
25	48	6.0625	0.714993	a
50	48	9.3125	0.714993	b
100	48	11.5625	0.714993	bc
200	48	12.0625	0.714993	bc
250	48	13.0625	0.714993	d

Utilizando la misma prueba de múltiple rangos de Tukey-HSD para discriminar la significancia del uso del tipo de estructura vegetal (droga) a partir de la cual se prepara el extracto, en el Cuadro 13 se anotan los resultados hallados que evidencian una diferencia entre el uso de hoja o corteza, siendo la de corteza la de mayor actividad o rendimiento antimicrobiano (Ver Anexo las diferencias entre pares de medias).

Cuadro 13. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Pseudomonas aeruginosa* por DROGA (Mét.: 95.0 %).

DROGA (Estructura vegetal)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	8.54167	0.412802	a
CORTEZA	144	10.2292	0.412802	b

De igual modo, en el siguiente Cuadro 14, se puede apreciar las diferencias de la actividad entre los tres tipos de extractos probados en comparación entre sí y con los controles (solventes y antimicrobianos), se observa que entre los extractos acuoso y etanólico no existe diferencia y son de mayor rendimiento que el metanólico frente a *Candida*, además tienen actividad toxica semejante al fluconazol, y mucho mayor que los solventes. Hay que destacar que el antimicótico sintético fluconazol, tiene actividad toxica muy diferenciada por su naturaleza química. Existen diferencias significativas entre varios pares de

medias con esta prueba de HSD-Tukey las que se señalan específicamente en el Anexo.

Cuadro 14. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Candida albicans* por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).

EXTRACTO y/o CONTROL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Metanol	36	0.0	0.825603	a
Agua	36	0.0	0.825603	a
Ceftriaxona	36	0.0	0.825603	a
Etanol	36	0.0	0.825603	a
METANOLICO	36	11.6389	0.825603	b
ETANOLICO	36	16.4444	0.825603	c
ACUOSO	36	17.0	0.825603	c
Fluconazol	36	30.0	0.825603	d

4.4.2. Ajuste e interpretación estadística para *Sporothrix*

En el cuadro 15 se presenta la ANOVA de la variabilidad de *Sporothrix skenchii* frente a los extractos probados, se muestra que los valores P obtenidos prueban la significancia estadística de cada uno de los factores, puesto

que son menores que 0.05, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre *Sporothrix skenchii* con un 95.0% de nivel de confianza, en este sentido se interpreta que el tipo de extracto tiene mayor significancia seguido de la concentración de los extractos y por último la estructura vegetal o droga de donde se obtuvo el extracto.

Cuadro 15. Análisis de Varianza de la actividad de los extractos frente a *Sporothrix sckenki*

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: CONCENTRACIÓN	2239.27	5	447.853	22.53	0.0000
B: DROGA	169.587	1	169.587	8.53	0.0038
C: TIPO EXTRACTO	31366.1	7	4480.88	225.40	0.0000
RESIDUOS	5447.01	274	19.8796		
TOTAL (CORREGIDO)	39222.0	287			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los resultados de la discriminación entre las medias de las concentraciones utilizadas de los extractos, mediante el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, se exponen en el Cuadro 16, se han identificado 4 grupos homogéneos. No existen diferencias

estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma letra. Podemos destacar que la concentración 250 mg/mL de todos los extractos es significativamente diferente que otras concentraciones probadas, seguida en actividad indistintamente por las concentraciones 100 y 200 mg/mL (Ver Anexo).

Cuadro 16. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Sporothrix sckenki* por CONCENTRACIÓN del extracto (Mét.: 95.0 %).

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	4.60417	0.643551	a
25	48	6.25	0.643551	a
50	48	9.10417	0.643551	b
100	48	10.7292	0.643551	bc
200	48	11.2292	0.643551	bc
250	48	12.4375	0.643551	d

Utilizando la prueba de múltiple rangos de Tukey-HSD para discriminar la significancia del uso del tipo de estructura vegetal (droga) a partir de la cual se prepara el extracto, en el Cuadro 17 se anotan los resultados hallados que evidencian una diferencia entre el uso de hoja o corteza, siempre esta última resulta la de mayor actividad antimicrobiana (Ver en Anexo las diferencias entre pares de medias).

Cuadro 17. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Sporothrix sckenki* por DROGA (Mét.: 95.0 %).

DROGA (Estructura vegeta)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	8.29167	0.371554	a
CORTEZA	144	9.82639	0.371554	b

De igual manera, en el siguiente Cuadro 18, se puede apreciar las diferencias de la actividad entre los tres tipos de extractos probados en comparación entre sí y con los controles (solventes y antimicrobianos), resaltando que los extractos acuoso y etanólico tienen actividad toxica mayor semejante a lo observado para el fluconazol y mucho mayor que el metanólico.

Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0. El antimicótico sintético fluconazol, tiene actividad toxica muy diferenciada por su naturaleza química. Existen diferencias significativas entre varios pares de medias con esta prueba de HSD-Tukey las que se señalan específicamente en el Anexo.

Cuadro 18. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey-HSD para *Sporothrix sckenki* por tipo de EXTRACTO (al 95.0 %).

EXTRACTO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Ceftriaxona	36	0.0	0.743109	a
Etanol	36	0.0	0.743109	a
Metanol	36	0.0	0.743109	a
Agua	36	0.0	0.743109	a
METANOLICO	36	10.0	0.743109	b
ETANOLICO	36	15.6944	0.743109	b
ACUOSO	36	16.7778	0.743109	b
Fluconazol	36	30.0	0.743109	c

El procesamiento de los datos, mediante el Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06, demostró que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos con los extractos etanólicos y acuosos, ya sea a partir de corteza o de hoja de *C. spruceanum*, asimismo el ajuste estadístico señaló una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la acción antimicótica de los extractos acuosos y etanólicos de corteza de *C. spruceanum*, con la actividad de los extractos metanólicos. Según este ajuste es preferible el uso de extracto acuoso de corteza de *C. spruceanum*, para lograr inhibición del desarrollo de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Candida* y *Sporothrix*; seguido del uso del extracto etanólico y metanólico pero a concentraciones más altas.

4.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Según lo observado en el comportamiento de la actividad antimicrobiana de los extractos se ha determinado los patrones de susceptibilidad de acuerdo a la CIM encontrada, estos patrones se anotan en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Patrones de susceptibilidad determinados por la CIM

Pseudomonas

A11²⁵⁰ A12²⁵⁰ A13²⁵⁰ A21¹⁰⁰ A22¹⁰⁰ A23¹⁰⁰ E11¹⁰⁰ E12¹⁰⁰ E13¹⁰⁰ E21⁵⁰ E22⁵⁰

E23⁵⁰ M11²⁵⁰ M12²⁵⁰ M13²⁵⁰ M21¹⁰⁰ M22¹⁰⁰ M23¹⁰⁰

Staphylococcus

A11¹⁰⁰ A12¹⁰⁰ A13¹⁰⁰ A21⁵⁰ A22⁵⁰ A23⁵⁰ E11¹⁰⁰ E12¹⁰⁰ E13¹⁰⁰ E21⁵⁰ E22⁵⁰

E23⁵⁰ M11¹⁰⁰ M12¹⁰⁰ M13¹⁰⁰ M21⁵⁰ M22⁵⁰ M23⁵⁰

Candida

A11¹⁰⁰ A12¹⁰⁰ A13¹⁰⁰ A21⁵⁰ A22⁵⁰ A23⁵⁰ E11²⁰⁰ E12²⁰⁰ E13²⁰⁰ E21¹⁰⁰ E22¹⁰⁰

E23¹⁰⁰ M11^{≥250} M12^{≥250} M13^{≥250} M21^{≥250} M22^{≥250} M23^{≥250}

Sporothrix

A11¹⁰⁰ A12¹⁰⁰ A13¹⁰⁰ A21⁵⁰ A22⁵⁰ A23⁵⁰ E11²⁰⁰ E12²⁰⁰ E13²⁰⁰ E21¹⁰⁰ E22¹⁰⁰

E23¹⁰⁰ M11^{≥250} M12^{≥250} M13^{≥250} M21^{≥250} M22^{≥250} M23^{≥250}

Interpretación:

A: Extracto acuoso de *Calycophyllum spruceanum*

E: Extracto etanólico de *Calycophyllum spruceanum*

M: Extracto metanólico de *Calycophyllum spruceanum*

Primer dígito: 1, Hoja, 2, Corteza; Segundo dígito: 1, 2, 3 repeticiones

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos han demostrado actividad antimicrobiana variada, observándose diferencias importantes entre los extractos obtenidos de la especie forestal estudiada. Comparando la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de hojas y de corteza en los distintos solventes polares, se puede comprobar que los extractos acuosos a partir de hojas y corteza de *Calycophyllum spruceanum* (Capirona) muestran actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los extractos etanólicos y metanólicos de hojas y corteza de *C. spruceanum*, mostraron fuerte acción bactericida y moderada actividad fungicida, siendo los de corteza ligeramente más eficaces que los de hoja. Los extractos etanólicos de hojas exhibieron actividad contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, a concentraciones moderadas (100 mg/mL), en tanto que presentaron ligera actividad contra *Candida albicans* y *Sporothrix schenkii* (en concentración relativamente alta). En cuanto a los extractos etanólicos obtenidos a partir de corteza estos manifiestan actividad antifúngica a partir de concentraciones menores acompañada de actividad antipseudomonadacea, se hace evidente que a concentraciones mayores la actividad abarca a las tres cepas microbianas ensayadas. Los extractos metanólicos de hojas y corteza obtenidos de *C.*

spruceanum demostraron tener actividad sólo contra microorganismos bacterianos (*S. aureus* y *P. aeruginosa*).

Desde el punto de vista de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos crudos de *Calycophyllum sprucanum*, los resultados obtenidos coinciden en su comportamiento de manera general con lo reportado por ZAMBRANO (2015) y ORTEGA (2005) en que extractos de vegetales son eficaces para tratamiento de infecciones bacteriana y fúngicas. Del mismo modo podemos mencionar que los datos reportados por RODRIGUEZ-PAVA (2017) refuerzan lo antes anotado en el sentido que de vegetales tanto arbóreas y herbáceos se logran obtener extractos que eliminan bacterias y levaduras (entre ellas *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Candida*) patógenas y multirresistentes por llevar enzimas carbapenemasas y betalactamasas activas contra una variedad de antimicrobianos químicos de última generación.

También tratándose de extractos de especies arbóreas como el *Haemotoxylon brasiletto* el reporte de VENEGAS (2016) es coincidente con el presente estudio en el sentido de que los extractos acuosos y etanólicos poseen actividad contra *Vibrio cholerae* una bacteria gramnegativa y muy patógena semejante a *Pseudomonas aeruginosa*. Siguiendo el mismo orden de opiniones TERAN (2015) informa resultado similar a lo nuestro en su estudio del efecto inhibitorio de aceites esenciales de la Tara (*Caesalpinia spinosa*) frente a *Staphylococcus aureus* SARM, aunque refiere sus hallazgos del CIM en porcentaje en cantidades relativamente bajas.

También la presente investigación guarda aproximación con los resultados reportados por MERCADO-RAMIREZ *et al.* (2014) respecto a que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* eran sensibles a concentraciones de 60, 80 y 100 % de aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata* var. *Satsuma*) una mayor sensibilidad que lo demostrada por su antibiótico de control (Vancomicina) pero el antibiótico control para *Pseudomonas aeruginosa* (Ciprofloxacina) era más inhibitor que el aceite esencial de mandarina. Nuestros hallazgos demuestran también el mismo proceder de actividad antimicrobiana es decir que si bien los extractos crudos de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) mayormente a partir de corteza inhiben a las bacterias indicadoras a concentraciones bajas (50 mg/mL) y a los fungi a concentraciones moderadas (100 mg/mL), son las *Pseudomonas* que presentan mejor sensibilidad a los antibióticos sintéticos.

Refiriendo la actividad antibacteriana de la jabatera (*Gnaphalium polycephalum*) RAMÍREZ-RUEDA Y MOJICA (2014) verifican la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y diclorometánicos contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a concentraciones de 125 mg/mL a menos de 1,000 mg/mL, sin embargo, estos extractos a dichas concentraciones no actuaron sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Este reporte coincide en gran parte con lo encontrado en nuestro trabajo, puesto que los extractos metanólicos hicieron presión selectiva negativa sobre *Pseudomonas aeruginosa* a partir de 100 mg/mL a 250 mg/mL, quizás el accionar a concentraciones moderadas del efecto inhibitor se deba a la composición química fisiológica de las hojas de una y otra especie vegetal,

considerando que una es un arbusto y capirona un árbol con mayor cantidad de metabolitos que actuarían principios activos con actividad antipseudomonásica.

Por otro lado las concentraciones alcanzadas en la CIM para cepas fúngicas son más bajas (100 a 250 mg/mL) de las reportadas por OCHOA (2012) quién manifiesta valores mayores de 330 mg/L hasta 2 571 mg/L de extractos de varios vegetales sobre especies de *Fusarium*. Si consideramos lo anteriormente mencionado, se conoce que *Fusarium* es un patógeno de vegetales pero asimismo es un agente oportunista de los humanos mayormente de los que tienen alguna inmunosupresión, por lo que los extractos de capirona obtenidos tendrían mayor potencia antimicótica puesto que *Candida* y *Sporothrix* son géneros fúngicos de alta patogenicidad y virulencia.

Frente a los reportes de AÑANCA (2009) de estudios de extractos acuosos de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) que indica que a concentraciones bajas (6,25 a 17,5 µg/mL) se logra efecto contra *Staphylococcus aureus*, de la misma manera el de ESCOBAR (2008) que refiere la eliminación de *Corynebacterium diphtheriae* (potente patógeno que causa la difteria) con extracto alcohólico de corteza de tara y por último de SAMPIAO (2009) quién reporta la inhibición de patógenos orales con extractos acuosos de tara; nuestro resultado de la acción antibacteriana y antifúngica también ha sido efectiva, a concentraciones relativamente moderadas (igual o mayor a 50 mg/mL) y esto debido a que de semejante manera a la especie reportada por los autores indicados, que está probado contiene taninos, polifenoles de acción astringente, antiinflamatoria y antiséptica frente a bacterias, hongos y virus, que aglutina las

proteínas de superficie de dichos microorganismos, nuestra especie debe contener los mismos componentes tánicos.

Nuestros resultados son coincidentes con los reportados en los últimos 10 años por varios autores entre ellos GARCIA-LUJAN (2009), ORTEGA (2005), ORANDAY *et al* (2004), SILVA *et al* (2004), LAPENNA *et al* (2003), VARGA (2002), VÁSQUEZ (2001), en el sentido que los extractos crudos de diferentes especies vegetales arbustivas y arbóreas obtenidos con distintos solventes (agua, etanol, metanol, benceno, cloroformo, hexano) manifiestan potente actividad antibacteriana y antifúngica.

En lo que se refiere al tipo de extracto según el diluyente utilizado, los extractos crudos de corteza obtenidos por cocción han demostrado tener mayor actividad antibacteriana y antimicótica seguidos por los etanólicos mayormente de los preparados a partir de corteza. Hace ya varios años FERRO y CANELA DE ALVARENGA (2000), indicaron que extractos crudos obtenidos de la especie *Aristolochia giberti* efectuados por percolación con etanol, son más activos frente a los microorganismos grampositivos como *Staphylococcus* y *Bacillus* y con cierta selectividad para *P. aeruginosa* pues estos extractos mantenían una estabilidad relativa de sus componentes por más de cuatro años. En el mismo sentido ALARCON *et al.* (2004) mostraron que extractos etanólicos de *Haemotoxylon brasiletto* (palo de Brasil) es más efectivo para inhibir a *Vibrio cholerae* una bacteria gramnegativa, y SILVA *et al.* (2004) indican que extractos etanólicos de hojas de *Ricinus communis* fueron activos contra *S. aureus*, *Escherichia coli* y *C.*

albicans. Esto es comparativamente similar a nuestro hallazgo, por lo que la explicación anotada sí es siendo vigente en relación al extracto crudo etanólico, sin obviar que las especies vegetales estudiadas son muy distintas entre sí.

Es interesante recalcar que los extractos crudos acuosos de capirona (*Calicophyllum spruceanum*) han brindado un rendimiento antimicrobiano aceptable y una selectiva acción frente a las cepas indicadoras bacterianas (gramnegativa y grampositiva), demostrando que éstos se podrían utilizar para evitar infecciones mediados por estos microorganismos.

Los extractos metanólicos manifestaron actividad antimicrobiana muy variada frente a las bacterias siendo los más eficaces en la inhibición los extraídos de corteza, sin embargo no fueron efectivos contra *C. albicans* y *Sporothrix schenckii*. Este resultado es contrario a lo reportado por LAPENNA *et al.* (2003) quienes argumentan que los extractos metanólicos obtenidos de las especies *Manihota indica* y *Psidium guineense*, presentan mayor actividad antimicrobiana. Es posible que esto se deba a lo muy variado de las especies que ellos utilizaron con referencia a nuestra especie forestal y que sus extractos fueron concentrados y resuspendidos en un volumen de hasta 100 veces de lo que se ha realizado en nuestra investigación.

Refiriéndonos a la eficacia de la actividad antimicrobiana exhibida por los extractos preparados de *Calycophyllum spruceanum* se puede afirmar que los componentes de las drogas originales (hojas y corteza) se han mantenido sin

alteración y se consiguieron en el proceso de extracción, éstos compuestos serían taninos y flavonoides, mucílagos, sustancias reductoras, aminoácidos, que se encuentran en el material seco y fresco, que no se alteran con el secado, en cambio ocurriría lo contrario si los compuestos fueran antocianidinas, según lo fundamenta ÓCARES (2012). Es así que por la efectividad evidenciada en la actividad antimicótica se podría asumir la coexistencia de flavonoides y de ácidos fenólicos que además de ser tóxicos para las levaduras inhibirían la actividad enzimática de la hialuronidasa y la actividad de la dihidrofolatoreductasa podrían dar explicación a los efectos antimicrobianos mostrados. Además la posible presencia de componentes taninos y cinámicos, sustenytaría el accionar antibacteriano puesto que estas sustancias alteran las membranas y motilidad bacterianas.

Los métodos de obtención de los extractos, cocción y maceración, han permitido que los extractos resultantes conserven sus propiedades fitoquímicas intactas acreditadas por la actividad antimicrobiana demostrada *in vitro*, y que comparándolos con los utilizados por otros autores, han funcionado óptimamente.

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron extractos crudos acuosos, etanólicos y metanólicos preparados a partir de hojas y corteza de *C. spruceanum*
2. Se reactivaron y repicaron las cepas de microorganismos indicadoras de sensibilidad verificando su viabilidad y funcionabilidad metabólica.
3. Los extractos crudos acuosos a partir de corteza de *C. spruceanum* a concentraciones de 50 mg/mL mostraron efectiva actividad bactericida y fungicida frente a las cepas indicadoras.
4. Extractos crudos etanólicos de corteza y hoja *C. spruceanum*, demostraron tener actividad inhibitoria para *Pseudomonas aeruginosa* a partir de 50 y 100 mg/mL de concentración respectivamente.
5. Los extractos crudos etanólicos de hojas y corteza de *C. spruceanum* tienen similar potencial de inhibición frente a las cepas de los fungi *Candida albicans* y *Sporothrix schenkii*.

6. Los extractos metanólicos de corteza manifestaron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* a partir de concentraciones de 50 mg/mL.

7. Los extractos crudos obtenidos de corteza de la especie en estudio revelaron mejor comportamiento inhibitorio antimicrobiano que los obtenidos de hojas.

8. Los extractos metanólicos de hoja y corteza de *C. spruceanum* no tuvieron aceptable rendimiento antifúngico.

9. El patrón de resistencia según las CIM encontrados responden a $A1^{250} A2^{100} E1^{100} E2^{50} M1^{250} M2^{100}$ para *Pseudomonas*, $A1^{100} A2^{50} E1^{100} E2^{50} M1^{100} M2^{50}$ para *Staphylococcus*, $A1^{100} A2^{50} E1^{200} E2^{100} M1^{\geq 250} M2^{\geq 250}$ para *Candida* y $A1^{100} A2^{50} E1^{200} E2^{100} M1^{\geq 250} M2^{\geq 250}$ para *Sporothrix*

10. No se encontró efecto tóxico de los solventes sobre los microorganismos indicadores utilizados.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos a partir de drogas naturales.
2. Incrementar en número de microorganismos de prueba a grupos más específicos de patógenos.
3. Realizar ensayos de biotoxicidad de los extractos crudos que se obtengan de diferentes especies forestales.
4. Complementar el estudio con la determinación e identificación fitoquímica correspondiente de los principios activos presentes en los extractos por cromatografía en capa fina delgada y líquida de alto rendimiento.
5. Determinación de: Fracciones por absorción-desorción en silicagel G60, del punto de fusión, de los espectros UV, espectros IR y espectros RMN (resonancia magnética nuclear).

VIII. ABSTRACT

BACTERICIDAL AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF THREE TYPES OF EXTRACTS FROM CAPIRONA LEAVES AND BARK (*Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook F. ex Schumann).

The bactericidal and fungicidal activity of aqueous, ethanolic and methanolic leaf and bark extracts of capirona (*Calycophyllum spruceanum*) was determined.

The leaves and bark were pulverized in a hammer mill, the extracts were obtained by decoction and maceration in the solvents (water, ethanol and methanol) they were dried and sterilized. The antimicrobial activity was evaluated through the plaque diffusion technique (adapted from the *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) in order to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) testing six concentrations of each of the extracts (10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/mL). Indicator strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Sporothrix schenckii* were used.

The extracts from the bark had greater effectivity than those from the leaves. The three types of extracts from the bark show bactericidal activity between the concentrations of 50 and 100 mg/mL with the exception of the methanolic which inhibited fungi starting at 250 mg/mL. The methanolic extracts from leaves and bark showed little fungicidal activity.

There were no toxic effects of the solvents on the indicator microorganisms use.

Key words: Crude extracts, antimicrobial, bactericide, fungicide, toxic effect, solvents, indicator microorganisms.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- ALARCÓN, G. 2002. Efecto de extractos de plantas en el crecimiento, producción de toxina y la unión de *V. cholerae* a líneas celulares. Tesis de M.C. Microbiología, San Nicolás de los Garza N.L. 98 pp.
- ALVAREZ, G.E. 2003. Extractivos del árbol. [En línea]: Eco Portal, (<http://www.ecoportel.net/content/view>, Contenidos, 7 Mar. 2005).
- ANKLI, A., HEINRICH, M. and BORK, P. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: Evaluation based on indigenous uses. *J Ethnopharmacol* 79: 43-52.
- AÑANCA, E. R. 2009. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis para optar el título de Químico-Farmacéutico, Universidad Nacional Jorge Basadre, Tacna, Perú.
- ARANGO, G. J. 2010. Introducción al metabolismo secundario compuestos derivados del ácido shikímico Universidad de Antioquia. Facultad de química farmacéutica. Medellín. 42p. [En línea] : farmacia (<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>, documentos, 28 diciembre 2017)

AVELLO LORCA, M., LÓPEZ CANALES, C., GATICA VALENZUELA, C., BUSTOS CONCHA, E., BRIEVA CHAIT, A., PASTENE NAVARRETE, E., BITTNER BERNER, M. 2012. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae, Universidad de Concepción. Concepción, Chile. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17 (1) 73 -83.

BALTAZAR-VELA, O. 2011. Estudio etnobotánico y de mercado de productos forestales no maderables extraídos del bosque y áreas afines en la ciudad de Pucallpa-Perú, Tesis Profesional de Ingeniero Forestal, Escuela Profesional de Ingeniería Forestal, Facultad De Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad Nacional de Ucayali, Pucallpa, Perú.

BITTNER B., M. 2002. FAO: Compuestos de acción biológica, Laboratorio Químico de Productos Naturales de la Universidad de Concepción, Chile. [En línea]: FAO, (<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/forestry>, Información, 26 Feb. 2005).

BOTPLUS, 2017. El estado actual de la lucha contra la resistencia bacteriana a los antibióticos, Portalfarma.com del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, [En línea]: Botplus (<https://botplusweb.Portalfarma.com/documentos/2017/2/2/106327.pdf>), 25 enero 2018)

- CABRERA, J.L., PEREZ, C., TIRABOSCHI, I.N., ORTEGA, M.G. and AGNESE, A.M. 2004. Further Antimicrobial Studies of 2'4'-dihidroxy-5'-(1-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin from *Dalea elegans*. *Pharmaceutical Biology*, May. 2003, 41: 3, 171 – 174.
- CACERES, A., MORALES, C., GIRON, L. y NAVARRO, M., 2001. Demostración de la actividad antimicrobiana de algunas especies vegetales y usadas popularmente como medicinales en la cuenca del Caribe. *Rev. Ciencia y Tecnología*, 2001 (1): 81-87.
- CELLINI L., CAMPLI E.D., MASULLI M., DI BARTOLOMEO S., and ALLOCATI N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13: 273-277.
- CHUNG, J.G., CHEN, G.W., WU, L.T., CHANG, H.L., UN, J.G., YEH, C.C. and WANG, T.F. 1998. Effects of garlic compounds diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Am. J. Clin. Med.* 26: 353-364.
- CLAUSSEN, B. 2009. Actividad biológica de extractos crudos de flora nativa del bosque valdiviano sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Tesis Agronomía, Santiago. Universidad Católica de Chile. Facultad de agronomía e ingeniería Forestal. 60p.

COSSIO, C., VALER, K. y GONZALES, N. 2002. Identificación de compuestos antifúngicos en raíces y tubérculos andinos como herramienta biotecnológica para el incremento de la resistencia a patógenos en papa. Instituto de Estudios Ambientales. [En línea]: PUCP, (<http://www.pucp.edu.pe/invest/idea/bioq.htm>, Investigación, 26 Feb. 2005).

CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; January 2017.

DEL ÁGUILA, R., MACEDO, P., GUTIÉRREZ, W., VÁSQUEZ, J., Y ALVA, A. 2013. In vitro determination of antibacterial activity of ethanolic and aqueous extract *Brosimum rubescens* (palisangre) by agar diffusion method. Conocimiento amazónico 4(2): **97-106** [2013].

DOMINGO, D. y LOPEZ-BREA, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioterap, 16 (4) : 385 – 393.

DURAFFOURD C, D'HERVICOURT L., LLAPRAZ JC. 1987. Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Barcelona: Masson.

ELOFF, J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. J. Ethnopharmacol 60: 1-8.

- ELIKA, 2015. Extractos de plantas alternativa a antibióticos, Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria, Berezi@ 52, País Vasco, España
- ESTRELLA, E. 1995. Biodiversidad y Salud en las Poblaciones Indígenas de la Amazonia, Secretaria *Pro Tempore* del Tratado de Cooperación Amazónica (TCA), Lima, Perú, Agosto 1995.
- ESCOBAR B.L. 2008. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Med. Vallejana. 2008; 5(1):28-37.
- ESCOBAR B., L. E.; CHÁVEZ C., M. 2008. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Med. Vallejana, 5(1), 28-37.
- FABRY, W., OKEMO, P. y ANSORG, R. 1996. Activity of East African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. J. Microbiology 42: 315-317.
- FERRO, E. y CANELA DE ALVERANGA, N. 2000. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Aristo/ochia giberti* (patito). Dirección de InvestigacionesUNA- Rev. Ciencia y Tecnología, Vol.1 No 2, 2000, 71-77.

- GARCIA, F. I. 2003. Técnicas de comprobación de actividad terapéutica. [En Línea] : Plantas Medicinales, (<http://www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/mayo2003/tecnicas.htm>, documentos, Febrero 2005).
- GARCÍA-LUJÁN, C., ALONSO-ROJO, S.E., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R., MARTÍNEZ-ROMERO, A., RAMÍREZ-BACA, P., MORENO-RESÉNDEZ, A. 2009. Susceptibilidad in vitro de una Cepa de *Staphylococcus aureus* Resistente a Diferentes Extractos Vegetales. Revista Agraria - Nueva Epoca- Año VI · Vol. 6 · No. 1, 2, 3 · Enero - Diciembre 2009.
- GARCÍA-LUJAN, C., MARTINEZ, A., ORTEGA, J.L., CASTRO, F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales Revista QuímicaViva - Número 2, año 9, agosto 2010.
- GERMANÓ, M.P., SANOGO, R., GUGLIELMO, M., DE PASCUALE R., CRISAFI G. and BISIGNANO G. 1998. Effect of *Pteliopsis suberosa* extracts on experimental gastric ulcers and *Helicobacter pylori* growth. J Ethnopharmacol 59: 167-172.
- GONZALES, M. 2011. Metabolitos secundarios de las plantas. La Guía Química, 5 julio 2011. [En línea] : La Guía Química, (<https://quimica.Laguia2000.com/reacciones-quimicas/metabolitos-secundarios-de-las-plantas>, enero 2018).

- HEYMANN, D. 2011. El control de las enfermedades transmisibles. Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA), 19ª Edición, Editorial Organización Panamericana de La Salud (OPS), 976 págs.
- JENKINS, R.D., STEVENS, S.L., CRAYTHORN, J.M., THOMAS, T.W., GUINAN M.E. and MATSEN, J.M. 1985. False susceptibility of enterococci to aminoglycosides with blood-enriched Muelle-Hinton agar for disk susceptibility testing. J. Clin. Microbiol., 22: 369 – 374.
- JIMENEZ-HARO, A. 2015. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antidermatófica *in vitro* del látex de *Brosimum utile* (Kunth C.S.)(leche de sandi) Tesis Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- KIRBY, W.M.M., BAUER, A.W., SHERRIS, J.C. and TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amr.J.Clin.Pathol. 45: 493 – 496.
- LAPENNA, E.A., MEDINA, G., DIAZ, L., AGUILÓN, K. y MARÍN, H. 2003. Actividad bactericida y funguicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. Rev. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, ISSN 0798-0477, Vol. 34, N° 1, Enero 2003.

LIZCANO, A. J. y VERGARA, J. L. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Memoria de título Microbiología Industrial. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial. 131p.

MANZANO-GAYOSSO, P., JAMIE ZABICKY-LÓPEZ, J., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F., MÉNDEZ-TOVAR, L.J., ELVA BAZÁN-MORA, E., CÓRDOVA-MARTÍNEZ, E., LÓPEZ-MARTÍNEZ, E. 2015. Reactivación morfológica de algunas especies de dermatofitos y su sensibilidad a antifúngicos, Revista Mexicana de Micología, Vol. 41: 47-53, 2015.

MATHEWS FERNANDEZ, JACKELINE. 2007. Actividad Bactericida y Fungicida de Extractos Crudos de Cuatro Especies Forestales; Tesis Título Profesional Ingeniero en Recursos Naturales Renovables-Forestales, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú.

MIRANDA-CRUZ, E.; ESPINOSA-MORENO, J.; CENTURIÓN-HIDALGO, D.; VELÁZQUEZ MARTÍNEZ, J. R.; ALOR-CHÁVEZ, M.. 2012. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Vol. 11,

núm. 4, julio-agosto, 2012, pp. 354-361. Universidad de Santiago de Chile.
Santiago, Chile

MOREJÓN GARCÍA, M. 2014. Indicación de nuevos antimicóticos en pacientes con candidiasis invasiva Hospital Universitario Clínicoquirúrgico "Comandante Manuel Fajardo", La Habana, Cuba. MEDISAN Vol.18 N° 9, set. 2014.

NYCHAS, G.J.E., P.N., SKANDAMIS, C.C., TASSOU. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Roller S. (Ed.). CRC Press. Washington, D.C. Chap. 9: 177-199.

NYCHAS, G.J.E. 1995. Natural Antimicrobials from plants. En: New Methods of food preservation. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. p. 1-21. Citado en: Welti-Chanes, J., Vergara-Balderas, F., y López-Malo, A. 1997.

NIR, Y., POTASMAN, I., STERMER, E., TABAK, M. and NEEMAN, I. 2000. Controlled trial of the effect of cinnamon extracts on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2000, 5: 94-97.

ÓCARES C., M.A. 2012. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Tesis de Ingeniero en Alimentos. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

O'GARA, E.A, HILL, D.J., MASLIN, D.J. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol 66: 2269-2273.

OHTA, R., YAMADA, N. and KANEDO, H. 1999. In vitro inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. Antimicrob Agents Chemother 43: 1811-1812.

O'NEILL J, 2016. Tackling drug-resistant Infections globally: Final report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance [En línea] : <https://amrreview.org/sites/default/files/160525Final%20paperwith%20cover.pdf>, documentos, 25 enero 2018).

ORANDAY, C.,A., RIVAS, C., CRUZ, D., CARRANZA, P., PADRÓN, B. y VERDE, M.J. 2004. Actividad antimicrobiana y citotoxicidad de *Syzygiun aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Psidium guajava*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Rev. Fac. de Salud Pública y Nutrición. Edición Especial, N° 3 – 2004.

OCHOA-FUENTES, Y.M., CERNA-CHÁVEZ, E., LANDEROS-FLORES, J., HERNÁNDEZ-CAMACHO, S., DELGADO-ORTIZ, J.C. 2012. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp*. Revista Internacional de

Botánica (Experimental International Journal Of Experimental Botany),
ΦYTON (2012) 81: 69-73.

ORTEGA, T. 2005. Plantas Medicinales. Medico Directo. [En línea]: Médico directo, (<http://www.medicodirecto.com/~temassalud/indexnot.html>, Mar. 2005).

PAUTRAT, L., ÁNGULO I., GERMANA C., UCHIMA, C., CASTILLO, R., CANDELA, M. 2002. Manual De Identificación De Especies Peruanas De Flora Y Fauna Silvestre Susceptibles Al Comercio Ilegal, Modulo III. Asociación Peruana para la Conservación de la Naturaleza – APECO, Instituto Nacional de Recursos Naturales – INRENA, WWF - Oficina del Programa Perú, Impreso en Taller Visual, Lima.

PÉREZ-MORALES L, IGLESIAS-LÓPEZ M, QUIÑONES-CHERTA O, REYES-RODRÍGUEZ I. 2014. Aislamiento microbiológico de *Sporothrix Schenckii* en un paciente inmunodeprimido. Presentación de un caso. Hospital General Universitario Dr. Gustavo Aldereguía Lima, Cienfuegos, Cuba. Revista Medisur 2014;12 (4), 7 p.

PEREZ C., J.E; ISAZA M., G.; ACOSTA, S.M. 2007. Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. Biosalud, Vol. 6, Enero-Diciembre 2007, págs. 59 – 68

- PRADO L., M. R. 2009. Estudio fitoquímico de la corteza de capirona *Calycophyllum spruceanum* en la zona de Pucallpa, Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Departamento Académico de Industrias Forestales [En línea] : Repositorio, (<http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/500>)
- RAMÍREZ-RUEDA R.Y., MOJICA D.N. 2014. Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Revista Investig. Salud Univ. Boyacá. 2014; 1(1): 63 – 71.
- RENWICK MJ, BROGAN DM, MOSSIALOS E., 2016. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. J Antibiot (Tokyo). 2016; 69(2): 73-88. doi: 10.1038/ja.2015.98.
- RODRÍGUEZ-PAVA,C.N.,ZARATE-SANABRIA,A.G., SÁNCHEZ-LEAL, L.C. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. NOVA, 2017, 15 (27): 119-129.
- ROSALES, C.M, y GONZÁLEZ R. 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. Rev. Madera y Bosques 9 (2) :41-49.

- SAMPAIO C. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. J. Ethnopharmacology. 2009; 124(2):289-294.
- SANTIVAÑEZ ACOSTA, ROCIO; CABRERA MELENDEZ JORGE, 2013. Catálogo Florístico de Especies Medicinales Peruanas, Centro Nacional de Salud Intercultural, Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Lima, Perú.
- SCHULTES, R.E. 1991. Conservación y Diversidad de plantas en el Noreste Amazónico. Diversity 7 (1-2):75-78.
- SCHULTES, R.E. and RAFFAUF R.F. 1992. The Healing Forest, Medicinal and Toxic Plants in Northwest Amazonia. Portland (Oregon): Dioscorides Press, 1992.
- SERRA V. M.A., 2017. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana, Revista Habanera de Ciencias Médicas, Vol. 16 N° 3, junio 2017.
- SILVA, S.Y., RIVAS, C., ORANDAY, A., VERDE, M.J., CRUZ, D. y CARRANZA, P. 2004. Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de las fracciones obtenidas de extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Rev. Fac. de Salud Publica y Nutrición. Edición Especial, N° 3 – 2004.

- STAUFFER, B.A., ORREGO A. y AQUINO, A. 2003. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida, Fac. Cs. Agrarias, Div. Fitopatología, UNA. [En línea], NEWTON, (www.newton.cnc.una.py/id47.htm 25 Mar. 2005).
- SUÁREZ-JIMÉNEZ, G. M, CORTEZ-ROCHA, M.O., ROSAS-BURGOS, E. C., BURGOS-HERNÁNDEZ, A., PLASCENCIA-JATOMEA, M., CINCO-MOROYOQUI F.J. ANTIFUNGAL 2007. Activity of Plant Methanolic Extracts Against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and Fumonisin B1 Production. Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 25, núm. 2, julio-diciembre, 2007, pp. 134-142, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C., México
- SULCA, T. 2010. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens* (Botoncillo), *Urtica dioica* (Ortiga negra) y *Sonchus oleraceus* (Kana yuyo), Plantas registradas en la parroquia La esperanza- Imbabura, sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, causantes de enfermedades bucofaríngeas. Tesis Ingeniera en biotecnología. Escuela politécnica del ejército. Departamento de Ciencias de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. 167p. [En línea] : Repositorio, (<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2648/1/T-ESPE-030037>)

- TABAK, M., ARMON R., PATASMAN I. and NEEMAN I. 1996. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 667-672.
- TAGBOTO, S. and TOWNSON, S. 2001. Antiparasitic properties of medicinal plants and other natural occurring products. *Adv Parasitol* 2001, 50: 199-295.
- USP-NF. 2016. United States Pharmacopeial Convention. and National Formulary Farmacopea de Estados Unidos (USP) y el Formulario Nacional (NF). The United States Pharmacopeial Convention, USA. <http://www.usp.org/es/usp-nf> Copyright 2016.
- VARGA, J. 2002. Comportamiento de algunos extrados de la corteza del pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) sobre el crecimiento de hongos xilófagos y su acción antioxidante. Tesis presentada en opción al grado de Dotor en Ciencias Forestales. Universidad de Pinar del Rro. Cuba.
- VÁZQUEZ, A. 2001. Desarrollo de nuevos antimicrobianos. Estrategias y expectativas. [En línea]: AGFU, (<http://www.agfu.Org.uy/>, Farmacognosia, 6 Mar. 2005).
- WEN, L., HADDAD, M., FERNÁNDEZ, I., ESPINOZA, G., RUIZ, C., NEYRA, E., BUSTAMANTE, B., ROJAS, R. 2011. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana, aislamiento de 3'-Formil – 2',4',6'

– trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. Rev Soc Quím Perú. 77 (3) 2011, 199-204.

WWF. 2014. Guia de Procesamiento Industrial, Fabricación de muebles con maderas poco conocidas – LKS, Capirona *Calycophyllum spruceanum*, Editora Argentina S.R.L., Lima. 20 p.

YAM, T.S., SHAH, S. and HAMILTON-MILLER, K.M.T. 1997. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. Fems Microbiol Lett 152: 169-174.

YEE Y.K., KOO, M.W. and SZETO, M.L. 2002. Chinese tea consumption and lower risk of Helicobacter infection. J Gastroenterol Hepato 17: 552-555.

ZAMBRANO-INTRIAGO, L.F., BUENAÑO M.P., MANCERA N.J., JIMÉNEZ E. 2015. Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. Rev Univ. Salud. 2015:17(1): 97-111

ANEXOS

ANEXO A. Tratamientos en la determinación de la actividad bactericida y fungicida de extractos acuosos de Capirona (*Calycophyllum spruceanum*).

Trat	Extracto	Proced	Concent (mg/mL)	Dosis μ L	Microorganismo Indicador	Rep.
1	Acuoso	Hoja	10	25	Staphylococcus	3
2	Acuoso	Hoja	25	25	Staphylococcus	3
3	Acuoso	Hoja	50	25	Staphylococcus	3
4	Acuoso	Hoja	100	25	Staphylococcus	3
5	Acuoso	Hoja	200	25	Staphylococcus	3
6	Acuoso	Hoja	250	25	Staphylococcus	3
7	Acuoso	Corteza	10	25	Staphylococcus	3
8	Acuoso	Corteza	25	25	Staphylococcus	3
9	Acuoso	Corteza	50	25	Staphylococcus	3
10	Acuoso	Corteza	100	25	Staphylococcus	3
11	Acuoso	Corteza	200	25	Staphylococcus	3
12	Acuoso	Corteza	250	25	Staphylococcus	3
13	Acuoso	Hoja	10	25	Pseudomonas	3
14	Acuoso	Hoja	25	25	Pseudomonas	3
15	Acuoso	Hoja	50	25	Pseudomonas	3
16	Acuoso	Hoja	100	25	Pseudomonas	3
17	Acuoso	Hoja	200	25	Pseudomonas	3
18	Acuoso	Hoja	250	25	Pseudomonas	3
19	Acuoso	Corteza	10	25	Pseudomonas	3
20	Acuoso	Corteza	25	25	Pseudomonas	3
21	Acuoso	Corteza	50	25	Pseudomonas	3
22	Acuoso	Corteza	100	25	Pseudomonas	3
23	Acuoso	Corteza	200	25	Pseudomonas	3
24	Acuoso	Corteza	250	25	Pseudomonas	3
25	Etanólico	Hoja	10	25	Staphylococcus	3
26	Etanólico	Hoja	25	25	Staphylococcus	3
27	Etanólico	Hoja	50	25	Staphylococcus	3
28	Etanólico	Hoja	100	25	Staphylococcus	3
29	Etanólico	Hoja	200	25	Staphylococcus	3
30	Etanólico	Hoja	250	25	Staphylococcus	3
31	Etanólico	Corteza	10	25	Staphylococcus	3
32	Etanólico	Corteza	25	25	Staphylococcus	3
33	Etanólico	Corteza	50	25	Staphylococcus	3
34	Etanólico	Corteza	100	25	Staphylococcus	3
35	Etanólico	Corteza	200	25	Staphylococcus	3
36	Etanólico	Corteza	250	25	Staphylococcus	3
37	Etanólico	Hoja	10	25	Pseudomonas	3
38	Etanólico	Hoja	25	25	Pseudomonas	3
39	Etanólico	Hoja	50	25	Pseudomonas	3
40	Etanólico	Hoja	100	25	Pseudomonas	3
41	Etanólico	Hoja	200	25	Pseudomonas	3
42	Etanólico	Hoja	250	25	Pseudomonas	3
43	Etanólico	Corteza	10	25	Pseudomonas	3
44	Etanólico	Corteza	25	25	Pseudomonas	3
45	Etanólico	Corteza	50	25	Pseudomonas	3
46	Etanólico	Corteza	100	25	Pseudomonas	3
47	Etanólico	Corteza	200	25	Pseudomonas	3
48	Etanólico	Corteza	250	25	Pseudomonas	3
49	Metanólico	Hoja	10	25	Staphylococcus	3
50	Metanólico	Hoja	25	25	Staphylococcus	3
51	Metanólico	Hoja	50	25	Staphylococcus	3

52	Metanólico	Hoja	100	25	Staphylococcus	3
53	Metanólico	Hoja	200	25	Staphylococcus	3
54	Metanólico	Hoja	250	25	Staphylococcus	3
55	Metanólico	Corteza	10	25	Staphylococcus	3
56	Metanólico	Corteza	25	25	Staphylococcus	3
57	Metanólico	Corteza	50	25	Staphylococcus	3
58	Metanólico	Corteza	100	25	Staphylococcus	3
59	Metanólico	Corteza	200	25	Staphylococcus	3
60	Metanólico	Corteza	250	25	Staphylococcus	3
61	Metanólico	Hoja	10	25	Pseudomonas	3
62	Metanólico	Hoja	25	25	Pseudomonas	3
63	Metanólico	Hoja	50	25	Pseudomonas	3
64	Metanólico	Hoja	100	25	Pseudomonas	3
65	Metanólico	Hoja	200	25	Pseudomonas	3
66	Metanólico	Hoja	250	25	Pseudomonas	3
67	Metanólico	Corteza	10	25	Pseudomonas	3
68	Metanólico	Corteza	25	25	Pseudomonas	3
69	Metanólico	Corteza	50	25	Pseudomonas	3
70	Metanólico	Corteza	100	25	Pseudomonas	3
71	Metanólico	Corteza	200	25	Pseudomonas	3
72	Metanólico	Corteza	250	25	Pseudomonas	3
73	Acuoso	Hoja	10	25	Candida	3
74	Acuoso	Hoja	25	25	Candida	3
75	Acuoso	Hoja	50	25	Candida	3
76	Acuoso	Hoja	100	25	Candida	3
77	Acuoso	Hoja	200	25	Candida	3
78	Acuoso	Hoja	250	25	Candida	3
79	Acuoso	Corteza	10	25	Candida	3
80	Acuoso	Corteza	25	25	Candida	3
81	Acuoso	Corteza	50	25	Candida	3
82	Acuoso	Corteza	100	25	Candida	3
83	Acuoso	Corteza	200	25	Candida	3
84	Acuoso	Corteza	250	25	Candida	3
85	Acuoso	Hoja	10	25	Sporothrix	3
86	Acuoso	Hoja	25	25	Sporothrix	3
87	Acuoso	Hoja	50	25	Sporothrix	3
88	Acuoso	Hoja	100	25	Sporothrix	3
89	Acuoso	Hoja	200	25	Sporothrix	3
90	Acuoso	Hoja	250	25	Sporothrix	3
91	Acuoso	Corteza	10	25	Sporothrix	3
92	Acuoso	Corteza	25	25	Sporothrix	3
93	Acuoso	Corteza	50	25	Sporothrix	3
94	Acuoso	Corteza	100	25	Sporothrix	3
95	Acuoso	Corteza	200	25	Sporothrix	3
96	Acuoso	Corteza	250	25	Sporothrix	3
97	Etanólico	Hoja	10	25	Candida	3
98	Etanólico	Hoja	25	25	Candida	3
99	Etanólico	Hoja	50	25	Candida	3
100	Etanólico	Hoja	100	25	Candida	3
101	Etanólico	Hoja	200	25	Candida	3
102	Etanólico	Hoja	250	25	Candida	3
103	Etanólico	Corteza	10	25	Candida	3
104	Etanólico	Corteza	25	25	Candida	3
105	Etanólico	Corteza	50	25	Candida	3
106	Etanólico	Corteza	100	25	Candida	3
107	Etanólico	Corteza	200	25	Candida	3
108	Etanólico	Corteza	250	25	Candida	3
109	Etanólico	Hoja	10	25	Sporothrix	3

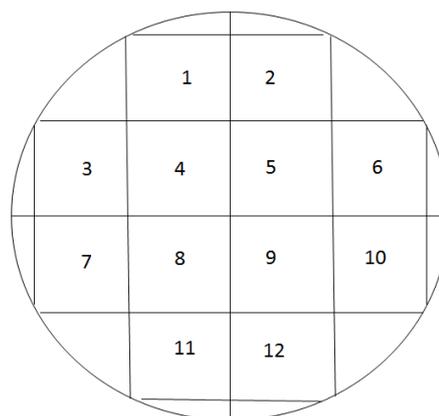
110	Etanólico	Hoja	25	25	Sporothrix	3
111	Etanólico	Hoja	50	25	Sporothrix	3
112	Etanólico	Hoja	100	25	Sporothrix	3
113	Etanólico	Hoja	200	25	Sporothrix	3
114	Etanólico	Hoja	250	25	Sporothrix	3
115	Etanólico	Corteza	10	25	Sporothrix	3
116	Etanólico	Corteza	25	25	Sporothrix	3
117	Etanólico	Corteza	50	25	Sporothrix	3
118	Etanólico	Corteza	100	25	Sporothrix	3
119	Etanólico	Corteza	200	25	Sporothrix	3
120	Etanólico	Corteza	250	25	Sporothrix	3
121	Metanólico	Hoja	10	25	Candida	3
122	Metanólico	Hoja	25	25	Candida	3
123	Metanólico	Hoja	50	25	Candida	3
124	Metanólico	Hoja	100	25	Candida	3
125	Metanólico	Hoja	200	25	Candida	3
126	Metanólico	Hoja	250	25	Candida	3
127	Metanólico	Corteza	10	25	Candida	3
128	Metanólico	Corteza	25	25	Candida	3
129	Metanólico	Corteza	50	25	Candida	3
130	Metanólico	Corteza	100	25	Candida	3
131	Metanólico	Corteza	200	25	Candida	3
132	Metanólico	Corteza	250	25	Candida	3
133	Metanólico	Hoja	10	25	Sporothrix	3
134	Metanólico	Hoja	25	25	Sporothrix	3
135	Metanólico	Hoja	50	25	Sporothrix	3
136	Metanólico	Hoja	100	25	Sporothrix	3
137	Metanólico	Hoja	200	25	Sporothrix	3
138	Metanólico	Hoja	250	25	Sporothrix	3
139	Metanólico	Corteza	10	25	Sporothrix	3
140	Metanólico	Corteza	25	25	Sporothrix	3
141	Metanólico	Corteza	50	25	Sporothrix	3
142	Metanólico	Corteza	100	25	Sporothrix	3
143	Metanólico	Corteza	200	25	Sporothrix	3
144	Metanólico	Corteza	250	25	Sporothrix	3
CONTROLES						
145	Agua	Solvente	Pura	25	Staphylococcus	
146	Etanol	Solvente	70 %	25	Staphylococcus	
147	Metanol	Solvente	99 %	25	Staphylococcus	
148	Ceftriaxona	Antibiótico	50 µg	25	Staphylococcus	
149	Fluconazol	Antimicótico	40 µg	25	Staphylococcus	
150	Agua	Solvente	Pura	25	Pseudomonas	
151	Etanol	Solvente	70 %	25	Pseudomonas	
152	Metanol	Solvente	99 %	25	Pseudomonas	
153	Ceftriaxona	Antibiótico	50 µg	25	Pseudomonas	
154	Fluconazol	Antimicótico	40 µg	25	Pseudomonas	
155	Agua	Solvente	Pura	25	Candida	
156	Etanol	Solvente	70 %	25	Candida	
157	Metanol	Solvente	99 %	25	Candida	
158	Ceftriaxona	Antibiótico	50 µg	25	Candida	
159	Fluconazol	Antimicótico	40 µg	25	Candida	
160	Agua	Solvente	Pura	25	Sporothrix	
161	Etanol	Solvente	70 %	25	Sporothrix	
162	Metanol	Solvente	99 %	25	Sporothrix	
163	Ceftriaxona	Antibiótico	50 µg	25	Sporothrix	
164	Fluconazol	Antimicótico	40 µg	25	Sporothrix	

**ANEXO B: FORMATO DE LECTURA DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE
SENSIBILIDAD y/o RESISTENCIA**

CORRIDA N°		HALO
N°	TIPO EXTRACTO – CONCENTRACION Dosis 25 µl	mm
1	ACUOSO HOJA – 10 mg/mL	
2	ACUOSO HOJA – 25 mg/mL	
3	ACUOSO HOJA – 50 mg/mL	
4	ACUOSO HOJA – 100 mg/mL	
5	ACUOSO HOJA – 200 mg/mL	
6	ACUOSO HOJA – 250 mg/mL	
7	ACUOSO CORTEZA – 10 mg/mL	
8	ACUOSO CORTEZA – 25 mg/mL	
9	ACUOSO CORTEZA – 50 mg/mL	
10	ACUOSO CORTEZA – 100 mg/mL	
11	ACUOSO CORTEZA – 200 mg/mL	
12	ACUOSO CORTEZA – 250 mg/mL	

CORRIDA N°		HALO
N°	TIPO EXTRACTO – CONCENTRACION Dosis 25 µl	mm
1	ETANÓLICO HOJA – 10 mg/mL	
2	ETANÓLICO HOJA – 25 mg/mL	
3	ETANÓLICO HOJA – 50 mg/mL	
4	ETANÓLICO HOJA – 100 mg/mL	
5	ETANÓLICO HOJA – 200 mg/mL	
6	ETANÓLICO HOJA – 250 mg/mL	
7	ETANÓLICO CORTEZA – 10 mg/mL	
8	ETANÓLICO CORTEZA – 25 mg/mL	
9	ETANÓLICO CORTEZA – 50 mg/mL	
10	ETANÓLICO CORTEZA – 100 mg/mL	
11	ETANÓLICO CORTEZA – 200 mg/mL	
12	ETANÓLICO CORTEZA – 250 mg/mL	

CORRIDA N°		HALO
N°	TIPO EXTRACTO – CONCENTRACION Dosis 25 µl	mm
1	METANÓLICO HOJA – 10 mg/mL	
2	METANÓLICO HOJA – 25 mg/mL	
3	METANÓLICO HOJA – 50 mg/mL	
4	METANÓLICO HOJA – 100 mg/mL	
5	METANÓLICO HOJA – 200 mg/mL	
6	METANÓLICO HOJA – 250 mg/mL	
7	METANÓLICO CORTEZA – 10 mg/mL	
8	METANÓLICO CORTEZA – 25 mg/mL	
9	METANÓLICO CORTEZA – 50 mg/mL	
10	METANÓLICO CORTEZA – 100 mg/mL	
11	METANÓLICO CORTEZA – 200 mg/mL	
12	METANÓLICO CORTEZA – 250 mg/mL	

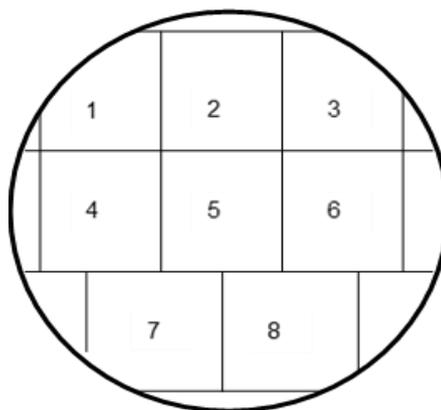


ANEXO C: FORMATO DE LECTURA DE ACTIVIDAD DE LOS CONTROLES

FORMATO DE LECTURA DE ACTIVIDAD DE LOS CONTROLES

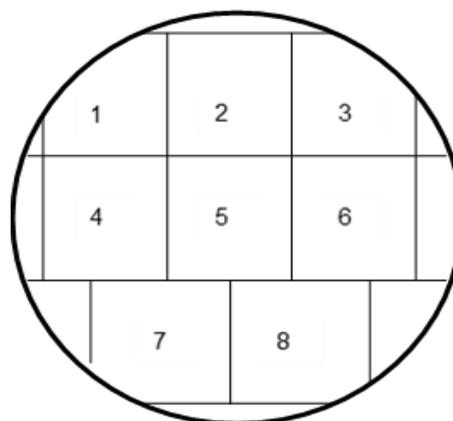
CEPA INDICADORA:

N°	CONTROLES	HALOS (mm)
1		
2	AGUA CALIENTE	
3		
4	ETANOL	
5		
6	METANOL	
7	CEFTRIAXONA	
8	FLUCONAZOL	



CEPA INDICADORA :

N°	CONTROLES	HALOS (mm)
1		
2	AGUA CALIENTE	
3		
4	ETANOL	
5		
6	METANOL	
7	CEFTRIAXONA	
8	FLUCONAZOL	



ANEXO D. RESULTADOS PRUEBA DE SENSIBILIDAD/RESISTENCIA DE LOS EXTRACTOS DE CAPIRONA

EXTRACTOS CRUDOS DE <i>Calycophyllum spruceanum</i> (capirona)																									
CONC. mg/mL	Tipos Extrac o Solven	EXTRACTOS DE HOJA - Halos de inhibición (mm)											EXTRACTOS DE CORTEZA - Halos de inhibición (mm)												
		Pseudomonas			Staphylococcus			Candida			Sporothrix		Pseudomonas			Staphylococcus			Candida			Sporothrix			
		Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones					
10	ACU	6	6	6	5	5	4	0	0	0	0	0	0	8	8	8	10	9	10	2	2	3	4	4	4
	ETAN	8	7	8	9	7	9	0	0	0	0	0	0	4	7	9	10	11	12	4	4	4	7	7	9
	META	6	8	6	8	8	8	0	0	0	0	0	0	2	2	2	8	9	10	1	0	4	2	2	2
	AGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ME-OH	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	CEF	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0
	FLUC	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30
25	ACU	14	14	14	5	7	7	1	1	1	1	1	0	7	9	11	11	11	11	9	9	9	14	16	12
	ETAN	14	12	11	9	11	14	1	1	1	1	1	1	11	15	16	14	14	14	13	12	16	15	15	15
	META	8	7	6	10	14	13	0	1	0	0	0	0	15	15	15	14	14	14	10	16	10	10	10	8
	AGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ME-OH	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	7	0	0	0	0	0	0
	CEF	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0
	FLUC	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30
50	ACU	15	13	14	10	10	10	6	7	5	8	9	4	18	18	18	27	27	27	26	26	26	24	25	25
	ETAN	16	14	11	14	14	12	15	16	14	15	16	14	27	30	28	26	30	28	18	19	18	18	19	18
	META	8	8	8	10	10	10	13	11	11	11	11	11	17	19	15	25	26	25	10	14	12	10	10	9
	AGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ME-OH	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0

	CEF	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0
	FLUC	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30
100	ACU	15	14	14	27	28	26	25	25	26	24	24	24	23	23	22	27	27	29	27	26	26	25	25	25
	ETAN	20	20	20	26	26	26	18	18	18	18	18	18	27	28	26	26	28	25	24	24	26	22	22	21
	META	13	12	10	35	35	26	15	14	16	12	12	13	25	26	25	29	29	29	18	14	15	11	11	10
	AGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ME-OH	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	CEF	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0
	FLUC	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30
200	ACU	18	20	17	27	28	27	24	28	27	26	26	27	23	24	24	29	30	32	28	28	29	25	25	26
	ETAN	20	20	20	26	26	26	25	25	24	23	22	23	25	26	25	29	29	29	24	24	26	22	21	22
	META	13	12	10	25	25	26	15	14	12	13	12	13	25	26	25	29	29	29	17	14	15	11	11	11
	AGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ME-OH	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	CEF	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0
	FLUC	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30
250	ACU	25	23	25	28	28	28	24	28	23	24	25	25	23	25	25	28	28	29	27	28	30	25	26	26
	ETAN	24	25	24	28	28	31	27	27	25	23	22	20	28	29	29	26	26	29	27	27	27	23	26	28
	META	24	24	24	28	28	29	20	20	22	20	23	20	26	26	26	29	29	33	21	24	20	20	21	20
	AGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ME-OH	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	CEF	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0	24	25	25	33	35	38	0	0	0	0	0	0
	FLUC	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	30	30	30

ANEXO E. PROMEDIOS DE RESULTADOS DE SENSIBILIDAD/RESISTENCIA DE LOS EXTRACTOS DE CAPIRONA

EXTRACTOS DE HOJA Halos de Inhibicion (mm)					
CONC mg/mL	Tipo Extrac	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Candida</i>	<i>Sporothrix</i>
10	ACU	6	4,67	0	0
	ETAN	7,7	8,33	0	0
	META	6,7	8	0	0
25	ACU	14	6,33	1	0,7
	ETAN	12	11,3	1	1
	META	7	12,3	0,33	0
50	ACU	14	10	6	7
	ETAN	14	13,3	15	15
	META	8	10	11,7	11
100	ACU	14	27	25,3	24
	ETAN	20	26	18	18
	META	12	32	15	12
200	ACU	18	27,3	26,3	26
	ETAN	20	26	24,7	23
	META	12	25,3	13,7	13
250	ACU	24	28	25	25
	ETAN	24	29	26,3	22
	META	24	28,3	20,7	21
CONTROL	AGUA	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0
	ME-OH	1,3	1	0	0
	CEF	25	35,3	0	0
	FLUC	0	0	30	30

EXTRACTOS DE CORTEZA Halos de inhibicion (mm)					
CONC mg/mL	Tipo Extrac	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Candida</i>	<i>Sporothrix</i>
10	ACU	8	9,67	2,33	4
	ETAN	6,7	11	4	7,67
	META	2	9	1,67	2
25	ACU	9	11	9	14
	ETAN	14	14	13,7	15
	META	15	14	12	9,33
50	ACU	18	27	26	24,7
	ETAN	28	28	18,3	18,3
	META	17	25,3	12	9,67
100	ACU	23	27,7	26,3	25
	ETAN	27	26,3	24,7	21,7
	META	25	29	15,7	10,7
200	ACU	24	30,3	28,3	25,3
	ETAN	25	29	24,7	21,7
	META	25	29	15,3	11
250	ACU	24	28,3	28,3	25,7
	ETAN	29	27	27	25,7
	META	26	30,3	21,7	20,3
CONTROL	AGUA	0	0	0	0
	ET-OH	0	0	0	0
	ME-OH	1,3	1	0	0
	CEF	25	35,3	0	0
	FLUC	0	0	30	30

ANEXO F. ANALISIS ESTADISTICO MULTIFACTORIAL

F-1.- Pruebas de Múltiple Rangos para Staphylococcus por CONCENTRACION

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	7.6875	0.681734	X
25	48	8.83333	0.681734	X
50	48	11.625	0.681734	X
200	48	14.9583	0.681734	X
100	48	15.0208	0.681734	X
250	48	15.2083	0.681734	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10 - 25		-1.14583	2.76687
10 - 50	*	-3.9375	2.76687
10 - 100	*	-7.33333	2.76687
10 - 200	*	-7.27083	2.76687
10 - 250	*	-7.52083	2.76687
25 - 50	*	-2.79167	2.76687
25 - 100	*	-6.1875	2.76687
25 - 200	*	-6.125	2.76687
25 - 250	*	-6.375	2.76687
50 - 100	*	-3.39583	2.76687
50 - 200	*	-3.33333	2.76687
50 - 250	*	-3.58333	2.76687
100 - 200		0.0625	2.76687
100 - 250		-0.1875	2.76687
200 - 250		-0.25	2.76687

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 11 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F.2.- Pruebas de Múltiple Rangos para *Staphylococcus* por ESTRUCTURA VEGETAL

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

ESTRUCTURA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	11.4861	0.393599	X
CORTEZA	144	12.9583	0.393599	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CORTEZA - HOJA	*	1.47222	1.09582

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad

inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-3.- Pruebas de Múltiple Rangos para Staphylococcus por EXTRACTO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

EXTRACTO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
AGUA	36	0.0	0.787199	X
FLUC	36	0.0	0.787199	X
ET-OH	36	0.0	0.787199	X
ME-OH	36	0.833333	0.787199	X
ACU	36	19.7778	0.787199	X
ETAN	36	20.7778	0.787199	X
META	36	21.0556	0.787199	X
CEF	36	35.3333	0.787199	X

Leyenda:

ME-OH=metanol; ET-OH=etanol; Agua=Agua destilada; FLUC=Fluconazol;
META=extracto metanólico; ETAN=Extracto etanólico; ACU= Extracto acuoso

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ACU - AGUA	*	19.7778	3.40025
ACU - CEF	*	-15.5556	3.40025
ACU - ET-OH	*	19.7778	3.40025
ACU - ETAN		-1.0	3.40025
ACU - FLUC	*	19.7778	3.40025
ACU - ME-OH	*	18.9444	3.40025
ACU - META		-1.27778	3.40025
AGUA - CEF	*	-35.3333	3.40025
AGUA - ET-OH		0.0	3.40025
AGUA - ETAN	*	-20.7778	3.40025
AGUA - FLUC		0.0	3.40025
AGUA - ME-OH		-0.833333	3.40025
AGUA - META	*	-21.0556	3.40025
CEF - ET-OH	*	35.3333	3.40025
CEF - ETAN	*	14.5556	3.40025
CEF - FLUC	*	35.3333	3.40025
CEF - ME-OH	*	34.5	3.40025
CEF - META	*	14.2778	3.40025
ET-OH - ETAN	*	-20.7778	3.40025
ET-OH - FLUC		0.0	3.40025
ET-OH - ME-OH		-0.833333	3.40025
ET-OH - META	*	-21.0556	3.40025
ETAN - FLUC	*	20.7778	3.40025
ETAN - ME-OH	*	19.9444	3.40025
ETAN - META		-0.277778	3.40025
FLUC - ME-OH		-0.833333	3.40025
FLUC - META	*	-21.0556	3.40025
ME-OH - META	*	-20.2222	3.40025

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 19 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-4.- Pruebas de Múltiple Rangos para Pseudomonas por CONCENTRACIÓN

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	5.54167	0.562914	X
25	48	7.6875	0.562914	XX
50	48	9.41667	0.562914	XX
100	48	10.7917	0.562914	XX
200	48	11.0	0.562914	XX
250	48	12.7083	0.562914	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10 - 25		-2.14583	2.28463
10 - 50	*	-3.875	2.28463
10 - 100	*	-5.25	2.28463
10 - 200	*	-5.45833	2.28463
10 - 250	*	-7.16667	2.28463
25 - 50		-1.72917	2.28463
25 - 100	*	-3.10417	2.28463
25 - 200	*	-3.3125	2.28463
25 - 250	*	-5.02083	2.28463
50 - 100		-1.375	2.28463
50 - 200		-1.58333	2.28463
50 - 250	*	-3.29167	2.28463
100 - 200		-0.208333	2.28463
100 - 250		-1.91667	2.28463
200 - 250		-1.70833	2.28463

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 8 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos

homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-5.- Pruebas de Múltiple Rangos para Pseudomonas por ESTRUCTURA VEGETAL

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

ESTRUCTURA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	8.625	0.324999	X
CORTEZA	144	10.4236	0.324999	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CORTEZA - HOJA	*	1.79861	0.904832

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente

significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-6.- Pruebas de Múltiple Rangos para Pseudomonas por TIPO EXTRACTO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

EXTRACTO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
FLUC	36	0.0	0.649997	X
ET-OH	36	0.0	0.649997	X
AGUA	36	0.0	0.649997	X
ME-OH	36	1.16667	0.649997	X
META	36	14.9722	0.649997	X
ACU	36	16.3889	0.649997	XX
ETAN	36	19.0	0.649997	X
CEF	36	24.6667	0.649997	X

Leyenda:

ME-OH=metanol; ET-OH=etanol; Agua=Agua destilada; FLUC=Fluconazol; META=extracto metanólico; ETAN=Extracto etanólico; ACU= Extracto acuoso

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ACU - AGUA	*	16.3889	2.80762
ACU - CEF	*	-8.27778	2.80762
ACU - ET-OH	*	16.3889	2.80762
ACU - ETAN		-2.61111	2.80762

ACU - FLUC	*	16.3889	2.80762
ACU - ME-OH	*	15.2222	2.80762
ACU - META		1.41667	2.80762
AGUA - CEF	*	-24.6667	2.80762
AGUA - ET-OH		0.0	2.80762
AGUA - ETAN	*	-19.0	2.80762
AGUA - FLUC		0.0	2.80762
AGUA - ME-OH		-1.16667	2.80762
AGUA - META	*	-14.9722	2.80762
CEF - ET-OH	*	24.6667	2.80762
CEF - ETAN	*	5.66667	2.80762
CEF - FLUC	*	24.6667	2.80762
CEF - ME-OH	*	23.5	2.80762
CEF - META	*	9.69444	2.80762
ET-OH - ETAN	*	-19.0	2.80762
ET-OH - FLUC		0.0	2.80762
ET-OH - ME-OH		-1.16667	2.80762
ET-OH - META	*	-14.9722	2.80762
ETAN - FLUC	*	19.0	2.80762
ETAN - ME-OH	*	17.8333	2.80762
ETAN - META	*	4.02778	2.80762
FLUC - ME-OH		-1.16667	2.80762
FLUC - META	*	-14.9722	2.80762
ME-OH - META	*	-13.8056	2.80762

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad

inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 20 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-7.- Pruebas de Múltiple Rangos para Candida por CONCENTRACION

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	4.25	0.714993	X
25	48	6.0625	0.714993	X
50	48	9.3125	0.714993	X
100	48	11.5625	0.714993	XX
200	48	12.0625	0.714993	XX
250	48	13.0625	0.714993	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
10 - 25		-1.8125	2.90186
10 - 50	*	-5.0625	2.90186

10 - 100	*	-7.3125	2.90186
10 - 200	*	-7.8125	2.90186
10 - 250	*	-8.8125	2.90186
25 - 50	*	-3.25	2.90186
25 - 100	*	-5.5	2.90186
25 - 200	*	-6.0	2.90186
25 - 250	*	-7.0	2.90186
50 - 100		-2.25	2.90186
50 - 200		-2.75	2.90186
50 - 250	*	-3.75	2.90186
100 - 200		-0.5	2.90186
100 - 250		-1.5	2.90186
200 - 250		-1.0	2.90186

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las

medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-8.- Pruebas de Múltiple Rangos para Candida por ESTRUCTURA VEGETAL

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

ESTRUCTURA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	8.54167	0.412802	X
CORTEZA	144	10.2292	0.412802	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CORTEZA - HOJA	*	1.6875	1.14929

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-9.- Pruebas de Múltiple Rangos para Candida por TIPO DE EXTRACTO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

EXTRACTO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ME-OH	36	0.0	0.825603	X
AGUA	36	0.0	0.825603	X
CEF	36	0.0	0.825603	X
ET-OH	36	0.0	0.825603	X
META	36	11.6389	0.825603	X
ETAN	36	16.4444	0.825603	X
ACU	36	17.0	0.825603	X
FLUC	36	30.0	0.825603	X

Leyenda:

ME-OH=metanol; ET-OH=etanol; Agua=Agua destilada; FLUC=Fluconazol;
META=extracto metanólico; ETAN=Extracto etanólico; ACU= Extracto acuoso

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ACU - AGUA	*	17.0	3.56614
ACU - CEF	*	17.0	3.56614
ACU - ET-OH	*	17.0	3.56614
ACU - ETAN		0.555556	3.56614
ACU - FLUC	*	-13.0	3.56614
ACU - ME-OH	*	17.0	3.56614
ACU - META	*	5.36111	3.56614
AGUA - CEF		0.0	3.56614
AGUA - ET-OH		0.0	3.56614
AGUA - ETAN	*	-16.4444	3.56614
AGUA - FLUC	*	-30.0	3.56614

AGUA - ME-OH		0.0	3.56614
AGUA - META	*	-11.6389	3.56614
CEF - ET-OH		0.0	3.56614
CEF - ETAN	*	-16.4444	3.56614
CEF - FLUC	*	-30.0	3.56614
CEF - ME-OH		0.0	3.56614
CEF - META	*	-11.6389	3.56614
ET-OH - ETAN	*	-16.4444	3.56614
ET-OH - FLUC	*	-30.0	3.56614
ET-OH - ME-OH		0.0	3.56614
ET-OH - META	*	-11.6389	3.56614
ETAN - FLUC	*	-13.5556	3.56614
ETAN - ME-OH	*	16.4444	3.56614
ETAN - META	*	4.80556	3.56614
FLUC - ME-OH	*	30.0	3.56614
FLUC - META	*	18.3611	3.56614
ME-OH - META	*	-11.6389	3.56614

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 21 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las

medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-10.- Pruebas de Múltiple Rangos para *Sporothrix* por CONCENTRACION

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

CONCENTRACIÓN	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	48	4.60417	0.643551	X
25	48	6.25	0.643551	X
50	48	9.10417	0.643551	X
100	48	10.7292	0.643551	XX
200	48	11.2292	0.643551	XX
250	48	12.4375	0.643551	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10 - 25		-1.64583	2.6119
10 - 50	*	-4.5	2.6119
10 - 100	*	-6.125	2.6119
10 - 200	*	-6.625	2.6119
10 - 250	*	-7.83333	2.6119
25 - 50	*	-2.85417	2.6119
25 - 100	*	-4.47917	2.6119
25 - 200	*	-4.97917	2.6119
25 - 250	*	-6.1875	2.6119
50 - 100		-1.625	2.6119
50 - 200		-2.125	2.6119

50 - 250	*	-3.33333	2.6119
100 - 200		-0.5	2.6119
100 - 250		-1.70833	2.6119
200 - 250		-1.20833	2.6119

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-11.- Pruebas de Múltiple Rangos para *Sporothrix* por ESTRUCTURA

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

ESTRUCTURA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
HOJA	144	8.29167	0.371554	X
CORTEZA	144	9.82639	0.371554	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CORTEZA - HOJA	*	1.53472	1.03445

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

F-12.- Pruebas de Múltiple Rangos para *Sporothrix* por TIPO DE EXTRACTO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

EXTRACTO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
CEF	36	0.0	0.743109	X
ET-OH	36	0.0	0.743109	X
ME-OH	36	0.0	0.743109	X
AGUA	36	0.0	0.743109	X
META	36	10.0	0.743109	X
ETAN	36	15.6944	0.743109	X
ACU	36	16.7778	0.743109	X
FLUC	36	30.0	0.743109	X

Leyenda:

ME-OH=metanol; ET-OH=etanol; Agua=Agua destilada; FLUC=Fluconazol; META=extracto metanólico; ETAN=Extracto etanólico; ACU= Extracto acuoso

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ACU - AGUA	*	16.7778	3.20981
ACU - CEF	*	16.7778	3.20981
ACU - ET-OH	*	16.7778	3.20981
ACU - ETAN		1.08333	3.20981
ACU - FLUC	*	-13.2222	3.20981
ACU - ME-OH	*	16.7778	3.20981
ACU - META	*	6.77778	3.20981
AGUA - CEF		0.0	3.20981
AGUA - ET-OH		0.0	3.20981
AGUA - ETAN	*	-15.6944	3.20981
AGUA - FLUC	*	-30.0	3.20981
AGUA - ME-OH		0.0	3.20981
AGUA - META	*	-10.0	3.20981
CEF - ET-OH		0.0	3.20981
CEF - ETAN	*	-15.6944	3.20981
CEF - FLUC	*	-30.0	3.20981
CEF - ME-OH		0.0	3.20981
CEF - META	*	-10.0	3.20981
ET-OH - ETAN	*	-15.6944	3.20981
ET-OH - FLUC	*	-30.0	3.20981
ET-OH - ME-OH		0.0	3.20981
ET-OH - META	*	-10.0	3.20981
ETAN - FLUC	*	-14.3056	3.20981
ETAN - ME-OH	*	15.6944	3.20981
ETAN - META	*	5.69444	3.20981
FLUC - ME-OH	*	30.0	3.20981

FLUC - META	*	20.0	3.20981
ME-OH - META	*	-10.0	3.20981

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 21 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANEXO G. PANEL FOTOGRAFICO



Foto 1. Molienda de hojas y corteza



Foto 2. Pesaje de los pulverizados de hoja



Foto 3. Pesaje de pulverizados de corteza



Foto 4. Pulverizados para extracción



Foto 5. Cocción para extractos acuosos



Foto 6. Filtración de los extractos



Foto 7. Filtración en proceso



Foto 8. Filtrados de los extractos crudos

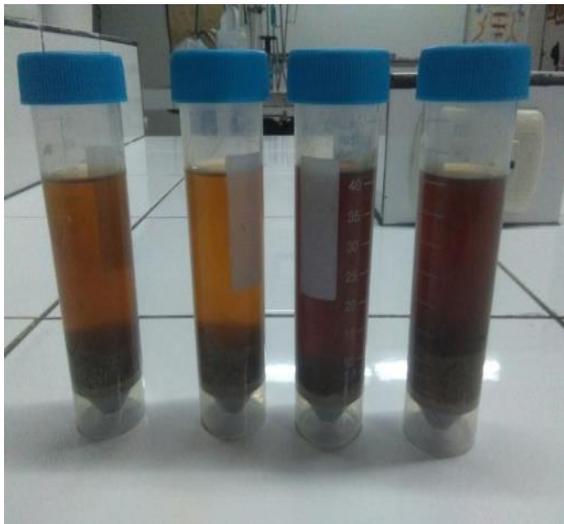


Foto 9. Filtrados listos para centrifugación



Foto 10. Sobrenadantes del centrifugado



Foto 11. Desechado de sobrenadantes



Foto 12. Desechado de los extractos



Foto 13. Extractos desecados



Foto 14. Preparación de las concentraciones



Foto 15. Distribución de la CIM

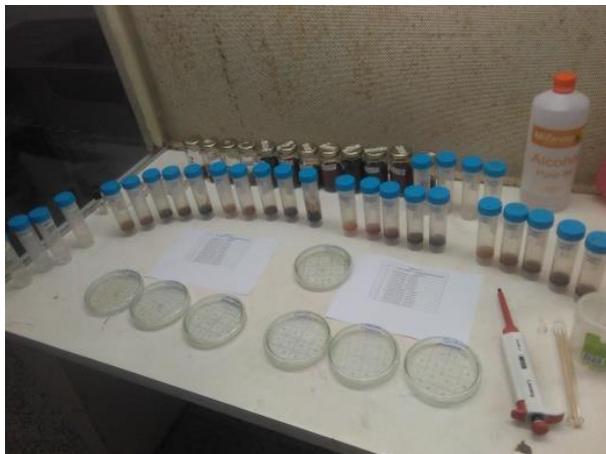


Foto 16. Inicio de la determinación de la CIM



Foto 17. Placas de prueba de la CIM



Foto 18. Siembra de las cepas indicadoras

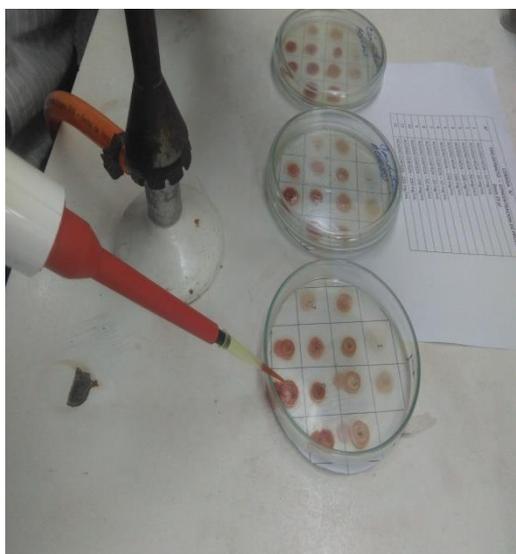


Foto 20. Depósito de los extractos en las placas con las cepas indicadoras

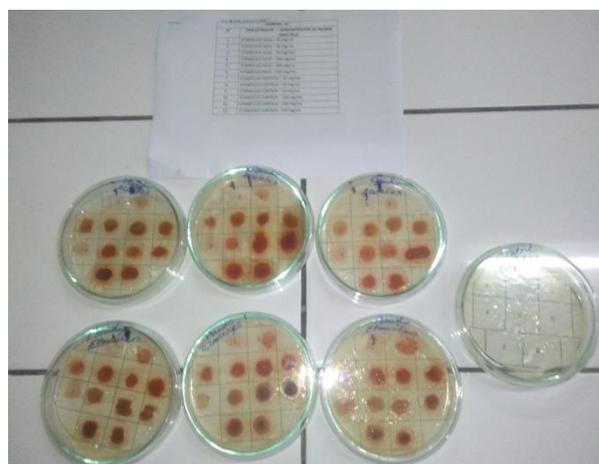


Foto 21. Placas con cepas indicadoras añadidas de los extractos crudos



Foto 21. Halos de inhibición controles



Foto 22. Halo de inhibición de extractos