

"AÑO DE LA DIVERSIFICACIÓN PRODUCTIVA Y DEL FORTALECIMIENTO DE LA EDUCACIÓN"

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE
Maytenus octogona (L' Héritier) DC."**

**Tesis para optar el Título Profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Presentado por:
Bach. Winnie Kenny, Calle Condor
Bach. Vanessa Patricia, Gutierrez Alvarado**

**Asesores:
Dra. HAYDEÉ CHAVEZ ORELLANA
Dra. CARMEN HUAYANGA GUTIÉRREZ
Dr. FELIPE SURCO LAOS**

**ICA - PERÚ
2015**

DEDICATORIA

A Dios:

Por darnos siempre las
fuerzas para continuar en lo
adverso, por guiarnos en el
sendero de lo sensato y
darnos sabiduría en las
situaciones difíciles.

A mis padres: Olga y Emiliano

Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años. Por sus consejos, su apoyo constante, a quienes debo mi formación personal y profesional con mi gratitud, cariño, respeto y admiración.

A mis hermanas: Miriam y Maggie

Por la confianza depositada en mí. Por la complicidad de muchos años. Y porque siempre serán mi ejemplo a seguir.

A mis sobrinos: Kenyiro y Kenny

Porque trajeron muchas alegrías con sus llegadas, este logro es por ustedes.

A mi abuela: Épifania (QÉPD),

Por su cariño, sus cuidados y porque desde el lugar en que esté siempre está cuidándome.

A mis familiares y amigos:

Por todo el apoyo que me brindaron desde siempre y por su compañía en momentos de dificultades.

A Vanessa Gutierrez Alvarado:

Por su amistad incondicional, en los buenos y malos momentos. Por compartir conmigo sus conocimientos, alegrías y tristezas desde el comienzo de esta carrera. Mis más lindos deseos para ti.

Winnie

A mis padres: Jesús y Patricia

Por su sacrificio y esfuerzo que me dieron a lo largo de estos años para lograr ser un profesional. Por brindarme su amor, paciencia y acompañarme en todo momento de mi vida. Son mi máximo orgullo y admiración. Este logro es para ustedes.

A Omar, Karla, Arianna y Liam

A mi hermano Omar y cuñada Karla por su apoyo, cariño y aliento que brindaron para finalizar este proyecto. A mis sobrinos Arianna y Liam por la felicidad que traen a mi vida y por ser mi motivación para concluir este trabajo y ser mejor cada día.

A mis abuelos

A mis abuelos paternos Zenón y Julia por su protección y acompañarme en cada momento. A mis abuelos maternos Guillermo y Celestina por sus consejos, preocupación y por estar pendiente de mí desde mi existencia. Les estaré eternamente agradecida.

A mis familiares y amigos

Por su apoyo y palabras de motivación que me ayudaron a concluir con este proyecto.

A Winnie Calle Condor

Por su amistad, lealtad y complicidad a lo largo de estos años. Amiga y compañera de tesis, juntas en todo y este trabajo no podía ser la excepción. Siempre te llevaré en mi corazón.

Vanessa

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de forma especial a la Dra. Haydeé Chávez, Dra. Carmen Huayanca y Dr. Felipe Surco por su paciencia, motivación, orientación y enseñarnos que solo con esfuerzo y dedicación podremos lograr nuestros objetivos. Por su disponibilidad y apoyo durante el proceso de elaboración de la presente tesis.

Agradecimientos al Q.F. Roberto Garayar, por su paciencia, amabilidad y el apoyo brindado para la finalización de este trabajo.

Agradecemos a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, por nuestra formación profesional y darnos la oportunidad de ser profesionales.

Agradecemos a la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica – ACIF, nuestro sincero y profundo agradecimiento. Fueron cinco años de aprendizaje e incentivo a la investigación, Gracias familia acifana,

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
CAPITULO I: GENERALIDADES	5
1.1 Especie: <i>Maytenus octogona</i> (L'Hér.) DC.	6
1.2 Actividad Antibacteriana	9
1.3 Actividad Antioxidante	14
CAPITULO II: ETAPA EXPERIMENTAL	28
2.1 Materiales	29
2.2 Recolección y tratamiento de la muestra vegetal	32
2.3 Screening Fitoquímico o Tamizaje Fitoquímico	34
2.4 Evaluación de la actividad antibacteriana	40
2.5 Evaluación de la actividad antioxidante	45
CAPITULO III: RESULTADOS	49
3.1 Screening Fitoquímico	50
3.2 Actividad Antibacteriana	51
3.3 Actividad Antioxidante	52
CAPITULO IV: DISCUSION	57
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	73

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo: Evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC. La especie en estudio proviene del distrito de Yauca, provincia de Ica. El extracto etanólico obtenido por el método de reflujo fue sometido a un *Screening Fitoquímico* identificándose los siguientes grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, grupos fenólicos libres, esteroides y/o triterpenos, leucoantocianidinas, catequinas y grupos amino primarios y secundarios. La actividad antioxidante fue evaluada mediante los métodos: Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP), Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS) y Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH). El extracto etanólico presentó altos valores de propiedad antioxidante en todas las técnicas realizadas resultando que un miligramo (1mg) de extracto etanólico es equivalente a: 1.678 mM de Trolox (Método de FRAP), 0.4678mM de Trolox (Método de ABTS) y el IC₅₀ es equivalente a 2.2908 mg del extracto (Método DPPH). La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar utilizando bacterias tipificadas Gram positivas y Gram negativas. El extracto etanólico de las hojas de *Maytenus octogona* presentó una leve actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y Gram negativa: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) a las concentraciones de 50 y 70%. Asimismo, no mostró actividad contra las bacterias *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhi* (ATCC 14028). Los valores del PIR a las concentraciones de 50 y 70% del extracto etanólico, mostraron una leve capacidad antibacteriana contra las cepas: *Staphylococcus aureus* (59.16 y 70.61%), *Staphylococcus epidermidis* (63.26 y 60.70%) y para *Enterobacter aerogenes* (49.64 y 50%); respectivamente frente al control positivo.

Palabras clave: *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC, antioxidante, antibacteriana, cepas bacterianas, FRAP, ABTS y DPPH.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the antioxidant and antibacterial activity of the ethanol extract of the leaves of *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC. The species studied yauca district comes from the province of Ica. The ethanol extract obtained by the method reflux was subjected to a phytochemical Screening identified the following groups of secondary metabolites: flavonoids, free phenolic groups, steroids and / or triterpenes, leucoanthocyanidins, catechins and primary and secondary amino groups. The antioxidant activity was evaluated by the methods: Method Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Method reaction with 2,2'-azino-radical bis- (3-ethylbenzthiazoline-6-ammonium sulfonate) (ABTS) and Method of free radical inhibition versus 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The ethanol extract showed high antioxidant property values in all the techniques resulting realized that one milligram (1mg) of ethanol extract is equivalent to: Trolox 1.678 mM (FRAP method), 0.4678 mM Trolox (ABTS method) and the IC₅₀ It is equivalent to 2.2908 mg of extract (DPPH method). The antibacterial activity was evaluated using the agar diffusion method using typified Gram positive and Gram negative. The ethanol extract of the leaves of *Maytenus octogona* showed a slight antibacterial activity against Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and Gram negative: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) at concentrations of 50 and 70%. He also showed no activity against bacteria *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella typhi* (ATCC 14028). PIR values at concentrations of 50 and 70% of ethanol extract showed a mild antibacterial ability against strains: *Staphylococcus aureus* (59.16 and 70.61%), *Staphylococcus epidermidis* (63.26 and 60.70%) and *Enterobacter aerogenes* (49.64 and 50 %); respectively against the positive control.

Keywords: *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC, antioxidant, antibacterial, bacterial strains, FRAP, ABTS and DPPH.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son importantes por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo.¹ El organismo dispone de sistemas de defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, proteínas, glucosa, grupos sulfidrilos, entre otros) que actúan impidiendo la formación de radicales libres, bloqueando su propagación o interaccionando directamente con ellos. También es posible que se ingiera con la dieta sustancias naturales o de origen sintético con capacidad antioxidante, como flavonoides, polifenoles, beta-caroteno, vitamina E, vitamina C, y otros más.² El uso de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha venido utilizando desde muchas décadas atrás³, para tratar una amplia gama de dolencias causadas por infecciones microbianas y las complicaciones resultantes del estrés oxidativo e inflamación.⁴

La proliferación de enfermedades causada por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud pública, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin. Por lo tanto, la búsqueda de antioxidantes naturales, compuestos antimicrobianos seguros y eficaces entre las plantas es importante.⁵

Las plantas del género *Maytenus* pertenecen a la familia Celastraceae, y es el más abundante e importante, incluye 98 géneros con aproximadamente 1.264 especies y tiene una larga historia de uso en la medicina tradicional. Estas plantas están muy extendidas en las regiones tropicales y subtropicales, incluyendo el norte de África, América del Sur y el Este de Asia, especialmente en China. Son ampliamente utilizados en la medicina popular como antitumorales, antiasmáticos, analgésicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antiulceroso y como tratamiento para problemas estomacales.⁶ Se ha demostrado la actividad biológica de varias especies de *Maytenus*: *M. ilicifolia* como antinociceptiva, antiinflamatoria y antioxidante (Jorge et al. 2004, Velloso et al. 2006); *M. krukovii* presenta actividad antioxidante,

antimutagénica y antimicrobiana (Bruni et al. 2006); *M. aquifolium*, propiedades analgésicas (Gonzales et al. 2001); *M. senegalensis* posee actividad antibacteriana, antiviral, antitumoral (Gessler et al. 1995, Otake et al. 1995, Matu & Van Staden 2003); *M. macrocarpa* actúa como citotóxico de células cancerígenas (Chavez et al. 2010) y antimicrobiano (Kloucek et al. 2007).⁷

En búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes, enfermedades crónicas degenerativas como consecuencia del estrés oxidativo y teniendo en cuenta que en nuestro país no se reportan estudios sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de las hojas de *Maytenus octogona*, iniciamos la presente investigación, con la finalidad de contribuir con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, por lo que proponemos que *Maytenus octogona* posee propiedades, tanto antioxidante como antibacteriana, vinculando ambas ya que estas actividades están estrechamente relacionadas, para lo cual se plantea el siguiente objetivo general: Evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Maytenus octogona*.

CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1. ESPECIE: *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC.

1.1.1 Antecedentes:

Hay evidencias científicas de que algunas especies del género *Maytenus* poseen actividades antimicrobianas y/o antioxidantes, y reportes referidos a otras especies del mismo género se citan a continuación:

Jorge RM et al (2004)⁸. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de las actividades antiinflamatoria, antinociceptiva y citoprotectora, y evaluar el perfil fitoquímico de los extractos de hexano y acetato de etilo de *Maytenus ilicifolia*. Por administración oral de estos extractos inhibieron la nocicepción en ratones y ratas. La gravedad de las lesiones gástricas inducidas por el estrés por frío fue también reducido en ratas considerando tanto citoprotección y aspectos curativos. La administración de los extractos llevó a un aumento del volumen gástrico y del pH. Estos resultados sugieren que los extractos de hexano y acetato de etilo de *Maytenus ilicifolia* pueden representar una importante alternativa clínica en la terapéutica antiinflamatorias y anti-ulcerogénicos, sin embargo, otros experimentos deben realizarse para confirmar esta afirmación.

Bruni et al (2006)⁹. Se investigó el extracto hidroalcohólico de la corteza de *Maytenus krukovii* para sus actividades mutágeno-protectoras in vitro por medio del ensayo de *Ames Salmonella / microsoma*. El extracto no mostró significativa actividad antibacteriana, y fue débilmente activo contra dermatofitos y hongos fitopatógenos, pero inhibió el crecimiento del fitopatógeno *Pithyum ultimum*.

Velloso et al (2006)¹⁰. En este estudio se evaluó el extracto etanólico crudo de *M. ilicifolia*, una planta con importante potencial en el tratamiento del cáncer y se ha utilizado ampliamente en Brasil y otros países, como una fuente potencial antioxidante usando un ensayo basado en la decoloración del

monocación radical 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) y capacidad de eliminar HOCl. Se utilizaron Trolox y ácido úrico como controles positivos. Los resultados indicaron a la corteza de la raíz de *M. ilicifolia* como una gran fuente de antioxidantes sobre la base de su potencial como eliminador de radicales.

Kloucek et al (2007)¹¹. En Ucayali-Perú, evaluaron la actividad antimicrobiana de seis cortezas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de condiciones que podrían estar asociados con microorganismos; entre ellas, la corteza de la raíz de *Maytenus macrocarpa* probadas contra nueve bacterias y uno de levadura utilizando el método de microdilución en caldo. Todas las plantas poseían efecto antimicrobiano significativo, sin embargo el más amplio espectro de acción se demostró por el extracto de *Maytenus macrocarpa*.

Rebuglio et al (2007)¹². Evaluaron el perfil de acción de *Maytenus aquifolium* sobre los radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Numerosos compuestos aislados de *Maytenus ilicifolia* se han probado por su actividad antitumoral, sin embargo, la infusión de las hojas se han utilizado en Brasil por la medicina popular por sus efectos antiácidos y anti-ulcerogénicos (Queiroga et al., 2000). Souza Formigoni et al. (1991) demostró la acción protectora del té preparado vertiendo agua hirviendo sobre las hojas frescas o secas ("abafado") de *Maytenus ilicifolia* y *Maytenus aquifolium* contra el desarrollo experimental de úlcera en ratas, tanto por vía oral (vo) y por vía intraperitoneal (ip). La presencia de metabolitos fenólicos podría justificar el uso de algunas especies de *Maytenus* como agentes antiinflamatorios y anti-ulcerogénicos (Jorge et al., 2004).

León et al (2009)¹³. En España, fueron investigados las propiedades anti-estafilocócicas de zylasterone y demethylzylasterone, dos triterpenoides 6-oxofenolic aisladas de *Maytenus blepharodes*. Los resultados obtenidos y las características estructurales de *zylasterone* indican que su mecanismo de

acción contra *Staphylococcus aureus* radica principalmente en su capacidad para dañar la membrana citoplasmática.

Mokoka et al (2013)⁶. Evaluaron la actividad antimicrobiana y citotóxica de triterpenos aislados de las hojas de *Maytenus undata* validando el uso tradicional de la planta como agente antimicrobiano y para el tratamiento de problemas estomacales.

Aroke et al (2013)⁴. En Pretoria-Sudáfrica, evaluaron las actividades antimicrobiana y antioxidante de cuatro especies de *Maytenus*, para tratar las infecciones gastrointestinales y enfermedades diarreicas. En este estudio se justifica el uso tradicional de la hoja de extractos crudos y fracciones de estas cuatro plantas: *Maytenus peduncularis*, *Maytenus procumbens*, *Maytenus senegalensis* y *Maytenus undata* como agentes terapéuticos y preventivos para remediar los trastornos gastrointestinales que resultan de la infección, la inflamación y complicaciones del estrés oxidativo.

1.1.2 Sinonimia vulgar:

Maytenus, maitén.¹⁴

1.1.3 Morfología de la especie:

Maytenus octogona es una especie endémica de Ecuador y Perú. Es un Árbol de hasta 10 m de altura. Tallo muy seco de color marrón-plomizo, fisurado, con ramas marrones-moradas. Hojas redondas, gruesas, lisas, de color verde oscuro. Flor pequeña de color verde-amarillenta, muy claro, en forma de disco. Fruto tipo cápsula, más grande que la flor; se abre para liberar la semilla.¹⁴

1.1.4 Hábitat:

Monte ribereño, laderas de cerros. Presencia de dípteros, hormigas (abdomen con franjas amarillas). Asociada a *Acacia*, *Armatocereus*, *Bulnesia*, *Cercidium*, *Capparis*, *Ephedra*, *Haageocereus*, *Schinus*, *Neoraimondia*, *Tecoma*.¹⁴

1.1.5 Usos tradicionales:

Medicinal. Hoy en día es poco común en Ica, probablemente por el uso de su madera y leña.¹⁴

1.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

1.2.1 Microorganismos – bacterias:

La bacteria es un microorganismo que nace, crece, se reproduce y muere con su constitución y metabolismo propio.¹⁵

Las bacterias son organismos unicelulares microscópicos que prosperan en ambientes diversos. Pueden vivir en el suelo, en el océano y en el interior del intestino humano. Las bacterias son procariontes.¹⁶

Se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas gram-positivas, sólo poseen peptidoglucano; el otro, las denominadas gram-negativas, tienen adosadas por fuera del peptidoglucano una membrana rica en lipopolisacáridos.¹⁷

1.2.2 Cepas utilizadas en el estudio:

1.2.2.1 Cepas bacterianas Gram-positivas:

A. *Bacillus cereus* (ATCC 11778):

Bacillus cereus es un microorganismo gram-positivo, posee forma de bastón alargado, es aerobio facultativo y formador de esporas, pero estas no son liberadas del esporangio. Crece en condiciones de oxígeno normales. No crece por debajo de 4,4°C y se destruye por cocinado normal, pero las esporas al ser termorresistente puede sobrevivir. Se puede encontrar en el suelo, polvo y especias. *Bacillus cereus* produce dos enterotoxinas durante su

crecimiento exponencial: la toxina diarreica y la toxina emética que dan lugar a dos formas clínicas distintas de intoxicación alimentaria.^{18,19}

B. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923):

Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos de 0,5 - 1,5 μm de diámetro,²⁰ distribuido en grupos irregulares a manera de racimos; posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Son inmóviles, facultativamente anaerobios. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis; infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales; el 40 a 50% de los seres humanos aproximadamente son portadores nasales de *Staphylococcus aureus*, estas se encuentran en las ropas personales, de cama o de ambientes humanos. En la actualidad las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes.^{18,20}

C. *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228):

El *S. epidermidis*, se caracteriza por ser coagulasa negativo y novobiacina sensible, fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fistulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardiacas protésicas e implantes de mama).²¹

1.2.2.2 Cepas bacterianas Gram-negativas:

A. *Escherichia coli* (ATCC 25922):

Escherichia coli es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.²²

Producen una potente toxina y puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico, y puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía.^{18,23}

B. *Salmonella typhi* (ATCC 14028):

Las salmonellas son bacterias gram-negativas. La *S. typhi* es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno.²⁴

Son causa importante de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo. La bacteria generalmente se transmite a los seres humanos a través del consumo de los alimentos contaminados de origen animal, principalmente carne, pollo, huevos y leche. Los síntomas de la infección por salmonella suelen aparecer de 12 a 72 horas después de la infección, e incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y a veces vómitos.²⁵

C. *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048):

Es una bacteria gram-negativa con forma de bastón. Las especies de *Enterobacter* son conocidas por su resistencia a los medicamentos, que se cree que ha sido amplificada por el uso de cefalosporinas de amplio espectro

en los hospitales (Giamarellou, 2005). Infecciones causadas por *Enterobacter* pueden incluir bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario (ITU), endocarditis, infecciones intra-abdominales, artritis séptica, osteomielitis, infecciones del sistema nervioso central, y las infecciones oftálmicas. Las infecciones por *Enterobacter* pueden requerir hospitalización prolongada, múltiples y variados estudios de imagen y pruebas de laboratorio, diversos procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos, y agentes antimicrobianos potentes y caros.²⁶

1.2.3. Antibiótico:

Los antibióticos son sustancias químicas específicas derivadas o producidas por los organismos vivos que incluso en pequeñas concentraciones son capaces de inhibir los procesos vitales de otros organismos. Los primeros antibióticos se aislaron de microorganismos, aunque en la actualidad algunos se obtienen incluso de plantas superiores y animales.²⁷

Fármaco utilizado en el ensayo:

1.2.3.1 Ciprofloxacino²⁸:

Es uno de los derivados de las fluoroquinolonas más potente. Es bactericida y tiene un amplio espectro extendido contra la mayoría de las bacterias aeróbicas gram-negativas, incluso *Pseudomonas*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus*, *Neisseria* y contra bacterias aeróbicas gram-positivas, incluso los estafilococos productores de penicilinasas y los resistentes a la meticilina. *S. pneumoniae* es susceptible a las concentraciones mayores de ciprofloxacino.

Farmacocinética: Se absorbe muy bien después de su administración oral y se distribuye de manera extensa en los tejidos del cuerpo. Su concentración

sérica máxima se alcanza en las primeras 3 horas después de una dosis oral de 400mg. Los alimentos no modifican la absorción oral pero aumentan el intervalo que transcurren hasta alcanzar la concentración sérica máxima. La semivida sérica es de 3 a 4h. El volumen de distribución es elevado y se ha detectado ciprofloxacino en leche materna humana. Se elimina a través de los riñones.

Farmacodinamia: El ciprofloxacino tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana frente a gérmenes patógenos aerobios Gram-positivos y Gram-negativos.

El ciprofloxacino inhibe la síntesis bacteriana del ácido desoxirribonucleico y es bactericida. A causa de su potente actividad, es activo frente a organismos que son resistentes al ácido nalidíxico, oxonílico y pipemídico, cinoxacina y compuestos relacionados.

Indicaciones terapéuticas: Tratamiento de las infecciones del tracto urinario superior e inferior, incluyendo cistitis, pielitis y cistopielitis, causadas por bacterias sensibles. Tratamiento de la prostatitis. Tratamiento de ETS como gonorrea y chancroide. Tratamiento de infecciones digestivas causadas por microorganismos sensibles al ciprofloxacino.

1.2.4. Pruebas de susceptibilidad in vitro^{29,30,31,32.}

La actividad antimicrobiana in vitro, se refiere a los experimentos que se hacen con inóculos de microorganismos en medios de cultivo sólidos y semisólidos como el agar o líquidos como el caldo nutritivo; estos ensayos se realizan en el laboratorio y permiten medir la susceptibilidad de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a una sustancia o la mezcla de sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano. La evaluación de la eficacia antimicrobiana se realiza determinando la inhibición del

crecimiento microbiano. Existen técnicas para evaluar los antimicrobianos como: métodos de difusión en agar, métodos de dilución, entre otros.

1.2.4.1 Método de Difusión en Agar^{29, 31 y 32}:

Se basa fundamentalmente en incorporar al medio de cultivo el antibiótico o el microorganismo en concentración conocida para que luego de solidificarse el medio se adicione la contraparte, luego incubar a temperatura y tiempo determinados, finalizado el periodo de incubación, observar la inhibición de crecimiento o halos de inhibición según la técnica utilizada. Esta técnica también abarca la llamada, método de difusión o de discos de papel y la llamada método de difusión en placa excavada. Las ventajas de los métodos de difusión son que utilizan una pequeña cantidad de la muestra a evaluar y ofrecen la posibilidad de ensayar varias sustancias o concentraciones en un mismo organismo.

1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La producción de energía a partir de los alimentos supone la transferencia de electrones, con liberación de energía en cada etapa, mediante una serie de aceptores de electrones hasta que finalmente se transforma en H₂O y CO₂. La oxidación de una molécula es la transferencia de electrones desde un átomo a otro, lo cual es una parte esencial del metabolismo normal. Las plantas capturan la energía de la luz solar a través de reacciones de transferencia de electrones que ocurren en los cloroplastos. Son numerosos los procesos bioquímicos en los que intervienen reacciones de oxidación, en los que quedan electrones sin aparear. Los átomos o moléculas que poseen electrones desapareados se denominan "radicales libres" y son especies altamente reactivas debido a que buscan capturar otro electrón para completar el par electrónico.³³ Los diferentes radicales libres se pueden clasificar en especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), según contengan en su estructura oxígeno o nitrógeno, respectivamente.

Los radicales libres se forman constantemente en el organismo y juegan un rol crucial en una variedad de funciones fisiológicas. Se estima que las mitocondrias constituyen la principal fuente subcelular de ROS, durante el proceso de obtención de energía. Estas especies también son generadas por células fagocíticas en reacciones inflamatorias controladas, que liberan oxidantes con el objetivo de destruir células infectadas por bacterias o virus, formando parte de la defensa inmunitaria del organismo. Por otra parte, el hombre está sometido permanentemente a la acción de radicales libres externos por exposición a diferentes factores ambientales, como radiaciones ionizantes, rayos UV, tabaco (genera RNS), radiación gamma, etc.³⁴

Sin embargo, la generación en exceso de estas especies reactivas puede conducir a un "estrés oxidativo", definido como un incremento en la producción de ROS, tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), etc, produciendo un desequilibrio en el estatus antioxidante/oxidante del cuerpo humano. Estas moléculas son capaces de dañar o destruir la función de otras macromoléculas, como por ejemplo lípidos de membranas celulares, proteínas, enzimas, ADN y pueden llevar incluso a la muerte celular (apoptosis). Existen evidencias que muestran que, como consecuencia del efecto dañino de los radicales libres, un desequilibrio prolongado de los mismos en el organismo contribuye a la patogénesis de diversas enfermedades crónicas y degenerativas del hombre, como afecciones del sistema nervioso, cardiovascular, endocrino, renal, etc, o en enfermedades como cáncer y procesos inflamatorios.^{33,35}

1.3.1 Antioxidante:

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por: a) Reactividad química del

antioxidante asociada a la actividad anti-radicalaria o estabilizadora de radicales libres; b) Capacidad para acceder al sitio de reacción y c) Estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres. Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño.³⁶

Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como endógenos y exógenos (Ver figura N°1).

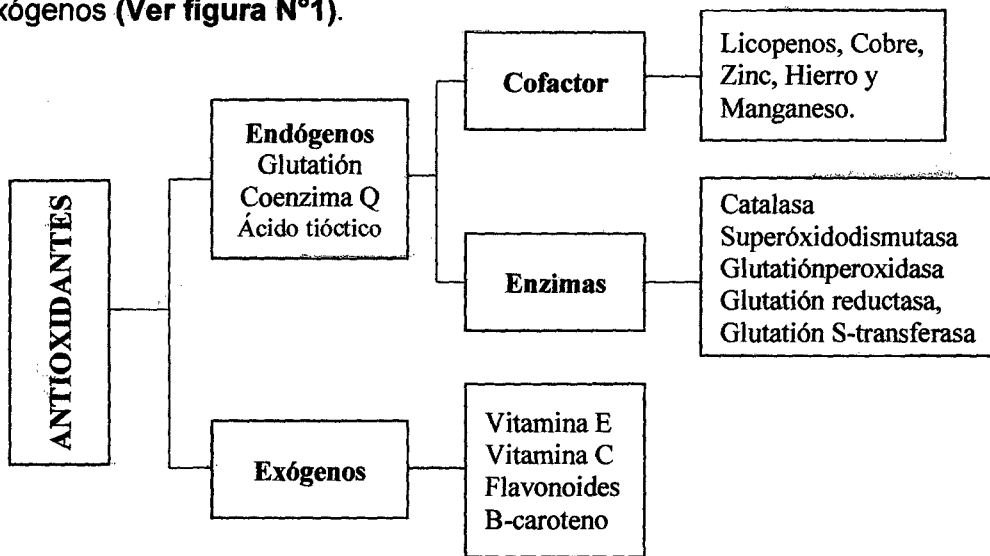


Figura N°1. Clasificación de los antioxidantes³⁶

Los sistemas de defensa antioxidante endógeno consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de radicales libres generados por funciones celulares como la respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondrial; el sistema antioxidante endógeno, a su vez, se divide en enzimático y no enzimático. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa, glutación reductasa, glutación S-transferasa, entre las más importantes. El segundo lo integran el glutación, la coenzima Q y el ácido tióctico o lipoico. El sistema de defensa antioxidante exógeno se forma por todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, etc.) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante. Entre los

más estudiados se encuentran la vitamina E, vitamina C, β -carotenos y polifenoles (flavonoides y taninos).³⁶

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas mediante los siguientes mecanismos de acción antioxidante:

a.- Antioxidantes primarios o preventivos: Previenen la formación de nuevos radicales libres (RL), convirtiendo los RL-s existente en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar y generar así una mayor tasa de RL-s. Este mecanismo de acción es el que emplean los antioxidantes de naturaleza enzimática.

b.- Antioxidantes secundarios: Capturan los RL-s evitando así que se produzcan reacciones en cadena.

c.- Antioxidantes terciarios: Reparar biomoléculas dañadas por los ataques mediados en cadena.

1.3.2 Métodos de determinación de actividad antioxidante in vitro:

Debido a que los antioxidantes actúan por diferentes mecanismos dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria u oxidante, han hecho que se desarrollen un gran número de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos.

Es difícil que se llegue a evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes, y en un mismo extracto puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis

para poder considerar las posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes.

Por otro lado, además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de vegetales, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes, etc.^{37,38,39}

Por todas estas razones, un gran número de autores han planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante in vitro.^{37,40,41}

1.3.2.1 Reacciones HAT y SET:

Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes reaccionan con los radicales libres, como en el caso de los polifenoles, que detienen el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain-breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET)⁴¹, aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar un método de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

a) Métodos Basados en Reacciones HAT:

Las reacciones HAT, miden la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres por donación de un átomo de H, la reactividad es determinada por la energía de disociación de la unión (BDE) del grupo donante del H. Estas reacciones son independientes del solvente y del pH y se basan en una cinética competitiva.⁴¹

a.1. El método ORAC (Capacidad de Captación de Radicales Oxigenados): Mide la inhibición de las oxidaciones inducidas por el radical peroxilo, por lo tanto refleja la actividad antioxidante en la cadena clásica de reacciones radicalarias. Se basa en la reacción del radical peroxilo con una proteína fluorescente (B- ficoeritrina) para formar un producto no fluorescente. El cálculo del efecto protector del antioxidante se obtiene mediante el área bajo la curva de disminución de fluorescencia, teniendo en cuenta la fase de retardo, la velocidad inicial y el porcentaje de inhibición.

La determinación ORAC tiene a ser modificada para medir los antioxidantes lipofílicos usando un derivado ciclodextrina como un mejorador de la solubilidad en agua. El ORAC se emerge actualmente como la determinación de elección para cuantificar la capacidad de Scavenging del radical peroxilo.⁴²

a.2. El método TRAP (Parámetro Antioxidante de Captación de Radicales) de Wayner et al.^{43,44} tiende a ser ampliamente usado para determinar la actividad antioxidante total basado en la medida del consumo de oxígeno durante una controlada reacción de oxidación lipídica inducida por descomposición térmica de 2,2'-azobi(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH). Los resultados TRAP se expresan como el número de μ moles de radicales peroxilos atrapado por 1 litro de plasma. La medición de suero por TRAP fue basada en la determinación del periodo de tiempo que el suero de un sujeto fue capaz de resistir la oxidación inducida artificialmente.⁴⁵

La modificación del método TRAP se basa en la reacción de oxidantes radicalarios con compuestos marcadores para producir especies en estado excitado que emiten quimioluminiscencia (CL). Como fuente de radicales peroxilo se han utilizado diferentes enzimas, como por ejemplo peroxidasa de rábano (Whitehead et al 1992). Algunos autores

han utilizado este método en la determinación de lípidos aislados y de radicales libres generados en el organismo humano (Gutteridge y Halliwell 1990). La medida por quimioluminiscencia, aunque posee la desventaja de que necesita equipamientos especiales, es un método bastante sensible, ya que puede detectar muy bajos niveles de reacción con límites de detección más bajos que la mayoría de los ensayos de actividad antioxidante.⁴¹

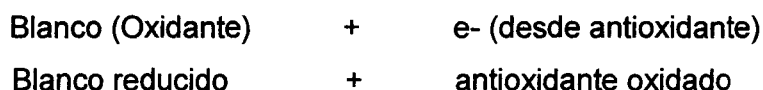
a.3. La Oxidación ex vivo de LDL (Lipoproteínas de Baja Densidad)

es un método muy utilizado y adaptado a la evaluación de la capacidad antioxidante en sistemas fisiológicos. Las LDL son aisladas de muestras sanguíneas y la oxidación es inducida por Cu(II) o AAPH y la peroxidación lipídica es seguida por la detección a 234 nm de los dienos conjugados generados en la etapa de propagación (Neudörffer et al., 2004). La medida de absorción en el UV de las soluciones de LDL puede ser directa, sin extracción previa, ya que las LDL oxidadas son completamente solubles en tampón fosfato. Asimismo, puede hacerse una medida continua de la oxidación lipídica in vitro y por lo tanto de la cinética de formación de dienos conjugados. Utilizando AAPH como fuente de radicales, este método tiene relevancia ya que éstas reacciones oxidativas podrían ocurrir in vivo.⁴¹

b) Métodos Basados en Reacciones SET:

Las reacciones SET evalúan la capacidad de un antioxidante de transferir un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. Estos métodos se basan en la desprotonación y en el potencial de ionización (IP) de los grupos funcionales reactivos, siendo estas reacciones pH-dependientes.⁴¹

Estos métodos involucran dos componentes en las mezclas de reacción, antioxidantes y oxidantes. Estos están basados en la siguiente reacción de transferencia de electrón.



El blanco por sí mismo es un oxidante que extrae un electrón desde el antioxidante, causando cambios de color en el blanco. El grado del cambio de color es proporcional a la concentración de antioxidante. El punto final de la reacción es alcanzado cuando el cambio de color se detiene.³³

b.1. Método de Fenoles Totales por Reactivo de Folin Ciocalteu.-

FCR fue inicialmente utilizado para el análisis de proteínas, teniendo la ventaja de la actividad del reactivo hacia el residuo de proteína tirosina (contiene el grupo fenol). Algunos años después Singleton y colaboradores extienden este ensayo para el análisis de fenoles totales en vinos; luego la determinación fue encontrando muchas aplicaciones. La naturaleza química exacta del reactivo FC no es conocida, pero por la presencia de un contenido de heteropolifosfotunstato-molibdato se cree que este molibdato es fácil a ser reducido en el complejo y la reacción de transferencia de electrón ocurre entre reductores y Mo^(VI):



El reactivo FC no es específico a compuestos fenólicos y este puede ser reducido por algunos componentes no fenólicos (ejm. Vitamina C, Cu (I), etc). Los compuestos azul formado entre fenolatos y FCR son independientes de la estructura del compuesto fenólico. Descartando la naturaleza química no definida del FCR, la determinación de fenoles totales por FCR es conveniente, simple y reproducible.³³

b.2. Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP):

Se trata de una reacción SET. Mide la capacidad de reducción del ión férrico. En este método determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ion férrico a ferroso en medio acuoso ácido. La reacción mide la reducción del tripiridiltriazina ferrica TPTZ a un producto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 593 nm. Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0,7 V (potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ).^{46,47} Los resultados se expresan en equivalente Trolox (μmol Trolox/g o μmol Trolox/L), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.⁴⁸

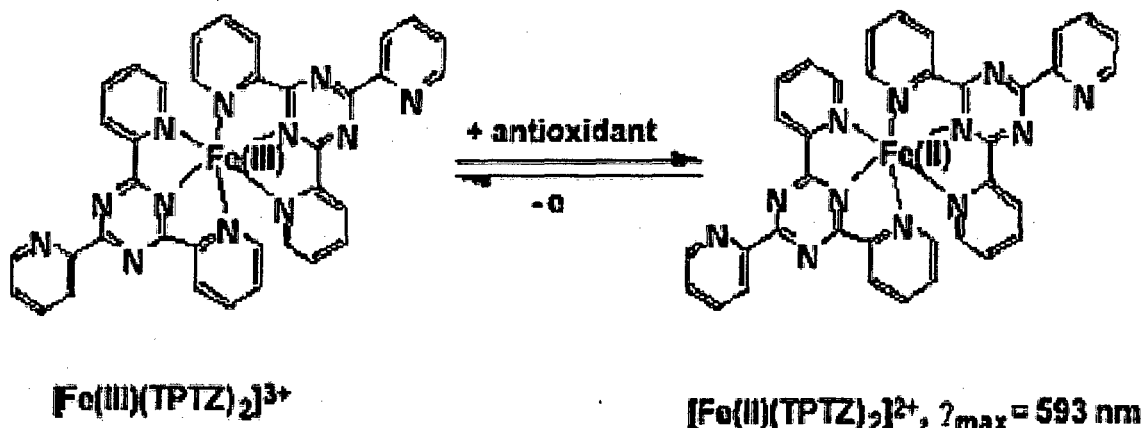


Figura N°2. Mecanismo de reacción en el método FRAP.⁴⁸

Debido a que el potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ es comparable con el del ABTS se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres, según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.⁴⁹

b.3. Método Potencial Antioxidante Total usando Cu (II) como Oxidante:

Existe poca información publicada sobre este método. El método está basado en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por reductantes (antioxidantes) presentes en la muestra. Un reactivo cromogénico Batocuproina (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina). Forma un complejo 2:1 con el Cu (I), el cual tiene un máximo de absorción a 490 nm. Fue encontrado que 1 mol de alfa-tocoferol puede reducir 2 mol de Cu (II) a Cu(I). Como estándar se utiliza una curva de ácido úrico, expresando los resultados como equivalentes de ácido úrico (Apak et al., 2004).³³

c) Métodos Basados en Reacciones HAT y SET:

A continuación, se describen tres de los principales métodos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante, indicando el tipo de reacción que se lleva a cabo en cada uno de ellas.

c.1. Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS):

Se trata de una reacción SET y HAT, en el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) el radical tiene que ser generado tras una

reacción que puede ser química (persulfato de potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) (Figura 03), o también electroquímica. Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical $ABTS^{*\cdot}$ una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a λ (414, 645, 734 y 815 nm), pero se mide a una longitud de onda λ 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical $ABTS^{*\cdot}$ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los compuestos fenólicos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria.^{36,50,51}

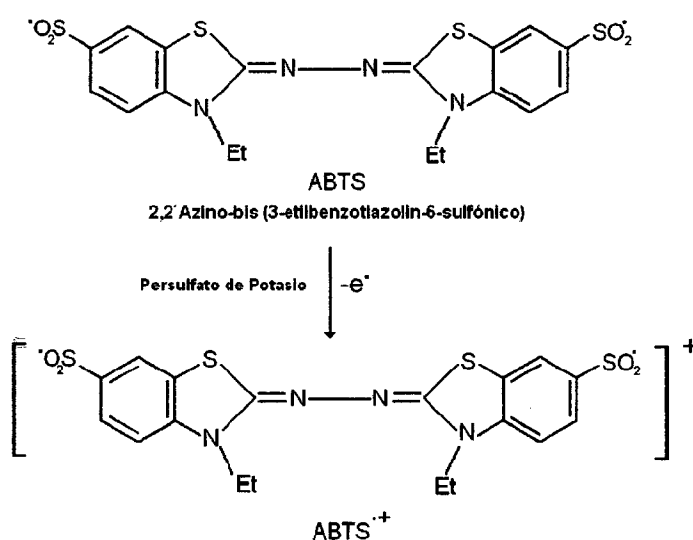


Figura N°3. Formación del radical ABTS.^{36,51}

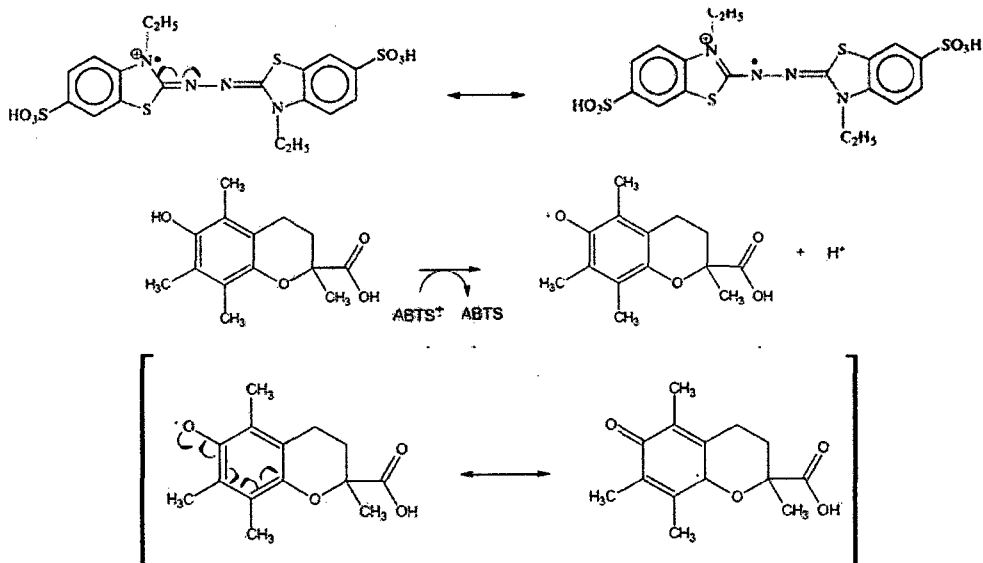


Figura N°4. Mecanismo de estabilización del catión radical ABTS* (arriba), reacción del catión radical ABTS* con el trolox (centro) y mecanismo de estabilización del radical formado en el trolox (abajo).^{36,51}

c.2. Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH):

El método del DPPH se basa en la reducción del radical DPPH* por los antioxidantes de la muestra. El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa.³⁶ El Fundamento del método desarrollado por Brand-Willams et al.⁵², DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con la presencia de una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.^{53,54}

La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio del color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de veinte a treinta minutos de reacción.^{36,54}

La reacción entre la sustancia a evaluar (HA) y el DPPH es la siguiente:

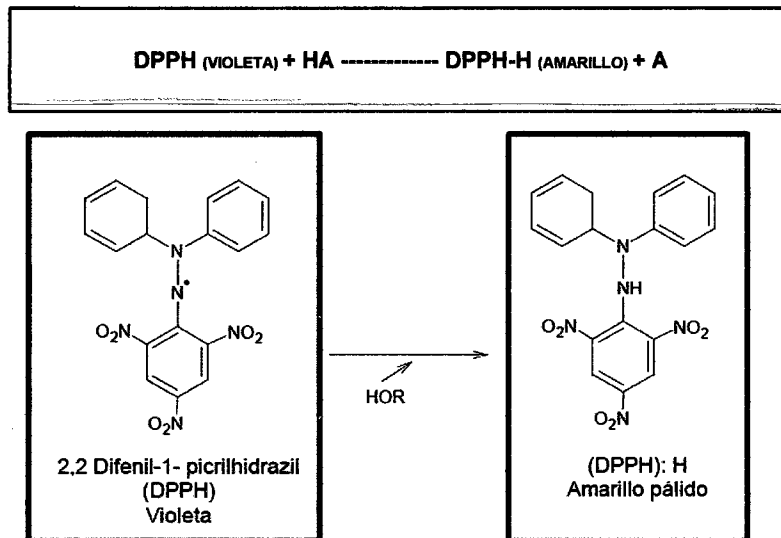


Figura N°5. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazil.^{36,52}

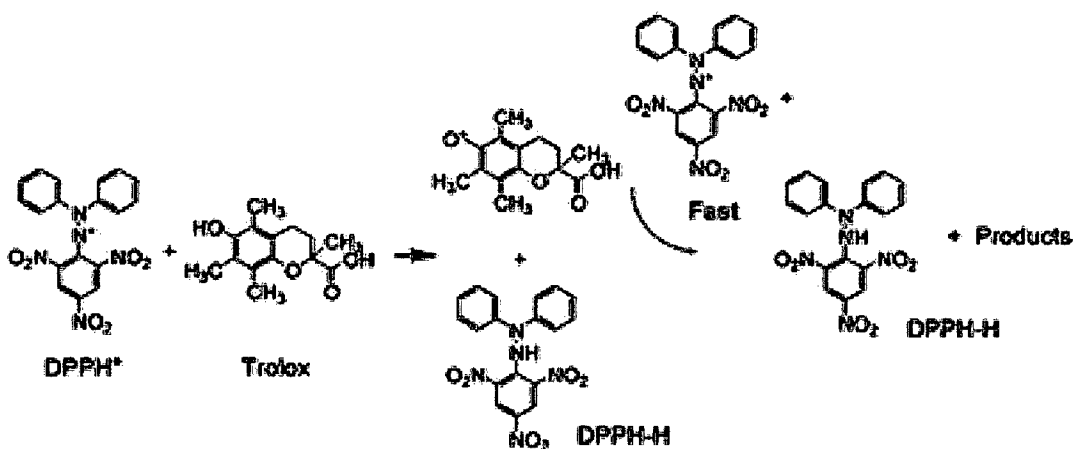


Figura N°6. Mecanismo de reacción del radical DPPH con el estándar Trolox.^{36,52}

1.3.3 Trolox:

Es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño celular.

El compuesto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- carboxílico, Trolox (Figura 07), es un análogo soluble en agua de la vitamina E, que se puede comparar con varios antioxidantes comerciales.

Las reacciones entre el Trolox y varios radicales libres oxidantes incluyendo los radicales peroxi y varios radicales hidroxilo se examinaron mediante el uso de la técnica de pulso-radiólisis, demostrando que el Trolox puede someterse a reacciones rápidas de transferencia de electrones, así como los procesos de transferencia de hidrógeno; el radical fenoxilo resultante demuestra ser relativamente estable, en común con el radical fenoxi derivado de la vitamina E. Las reacciones entre el Trolox (radical fenoxilo) y una variedad de compuestos reductores biológicamente pertinentes se examinaron mediante el uso de radiolisis pulsos. Los resultados se evidencia que el Trolox (radical fenoxilo) se repara fácilmente por el ascorbato y ciertos tioles, pero no por urato, NADH o galato de propilo. Las pruebas evidencian que el Trolox repara proteínas que se han oxidado por radicales libres.³⁶

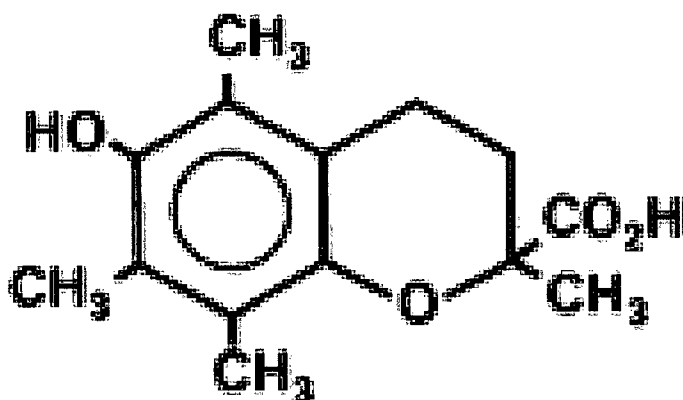


Figura N°7. Fórmula estructural del trolox.

CAPÍTULO II: ETAPA EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES.

2.1.1 Material vegetal:

- ▲ Hojas de *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC

2.1.2 Medios biológicos:

➤ Gram - positivas:

- *Bacillus cereus* (ATCC 11778)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)

➤ Gram - negativas:

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Salmonella typhi* (ATCC 14028)
- *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048)

2.1.3 Medios de cultivo:

- ▲ Agar Mueller Hinton
- ▲ Agar Soya – Trypticasa (TSA)
- ▲ Caldo BHI

2.1.4 Materiales de campo:

- ▲ Bolsas de papel kraft
- ▲ Tijeras de podar
- ▲ Papel kraft
- ▲ Hilo pabilo

2.1.5 Materiales de laboratorio:

- ▲ Los necesarios para la realización de la tesis.

2.1.6 Equipos:

- ▲ Agitador VORTEX IKA Genios 3.
- ▲ Autoclave marca GEMMY modelo SA – 232X.
- ▲ Cabina de seguridad biológica marca LABCULTURE, ESCO clase II, tipo A-II.
- ▲ Balanza analítica SARTORIUS BASIC
- ▲ Balanza de precisión BL- 600.
- ▲ Baño Maria THERMOSTATIC WATER BATH Modelo YCW-010E.
- ▲ Espectrofotómetro UV Visible UNICO.
- ▲ Estufa esterilizadora BRINDER modelo BD, ED, FD.
- ▲ Evaporador rotatorio HEIDOLPH modelo LABOROTA 4000
- ▲ Incubadora PRECISION Thelco modelo 2.
- ▲ Labculture de clase II tipo A2, Cabina de bioseguridad, modelo LA2-4A.
- ▲ Sonicador
- ▲ Sistema de producción de agua ultra pura Direct-QTM 3 de Millipore, compuesto por un módulo de pretatamiento ProgardTM2 2, cartuchos de ósmosis inversa, cartucho Quantum TM Ex y filtros Millipack® 40 (22 µm).
- ▲ Agitador magnético y calentador digital.
- ▲ Horno microondas ELECTROLUX.
- ▲ Refrigeradora ELECTROLUX R250.
- ▲ Micropipeta automática (DragonLab).

2.1.7 Reactivos y disolventes:

- ▲ Ciprofloxacino 5 ug/mL (genérico)
- ▲ Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97% (Trolox)
- ▲ 2, 4, 6 tripiridiltriazina (TPTZ)
- ▲ 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonatodiamonio) ABTS
- ▲ 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH).
- ▲ Metanol
- ▲ Ácido acético
- ▲ Acetato de sodio
- ▲ Ácido clorhídrico
- ▲ Persulfato de potasio
- ▲ Tricloruro férrico
- ▲ Agua destilada
- ▲ Agua ultra-pura
- ▲ Solución salina fisiológica

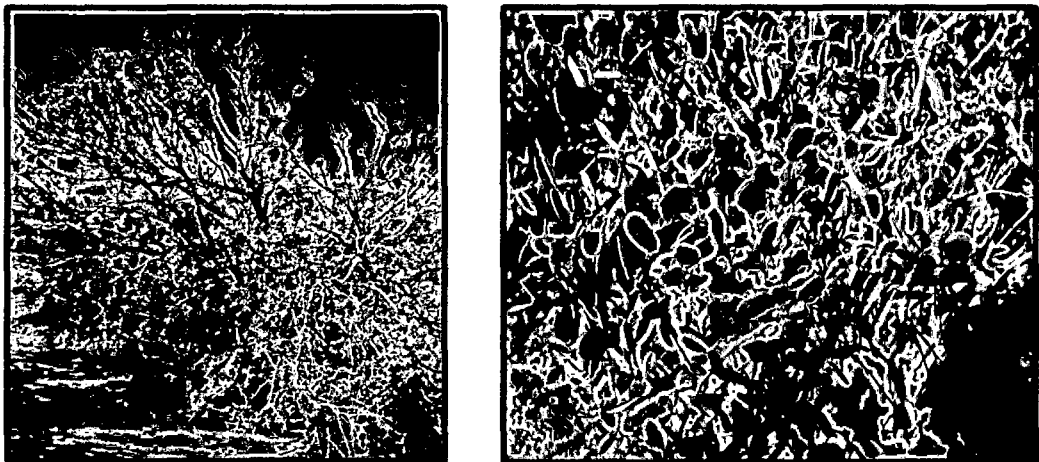
2.1.8 Otros:

- ▲ Algodón
- ▲ Guantes quirúrgicos
- ▲ Lentes protectores
- ▲ Mascarilla N 95
- ▲ Papel de aluminio
- ▲ Papel de filtro
- ▲ Papel kraft
- ▲ Papel tornasol
- ▲ Viales

2.2. RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA VEGETAL.

2.2.1 Recolección de la Muestra vegetal:

La especie vegetal *Maytenus octogona* fue recolectada en el pueblo de Huarangal que se localiza en el distrito de Yauca del Rosario, perteneciente a la provincia de Ica del departamento de Ica - Perú, en los meses de Setiembre – Octubre del 2014.



Figuras N°8 y 9. Especie vegetal *Maytenus octogona*.

2.2.2 Preparación y tratamiento de la muestra:

El material fue seleccionado retirando las hojas deterioradas por los insectos u otros contaminantes, fue secado a la sombra durante 20 días, evitando la luz solar directa sobre él.

Una vez seca la muestra fue seleccionada y molida usando un molino manual, se almacenaron en bolsas de papel kraft, para conservarlas hasta su utilización.



Figura N°10. Secado de las hojas de *Maytenus octogona*.

2.2.3 Clasificación taxonómica de la especie vegetal:

La especie vegetal fue clasificada por el Blgo. Alfonso Orellana García según el sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981), ubicándolo en la siguiente categoría taxonómica: (Ver Figura N°16)

REINO:	PLANTAE
DIVISIÓN:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE:	MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE:	ROSIDAE
SUPER-ORDEN:	ROSANAE
ORDEN:	CELASTRALES
FAMILIA:	CELASTRACEAE
GÉNERO:	Maytenus Molina
ESPECIE:	<i>Maytenus octogona</i> (L'Hér.) DC.
Nombre común:	Mayten

2.2.4 Obtención del extracto etanólico:

Para la obtención del extracto etanólico, se utilizaron 2 Kg de hojas secas y molidas, las cuales fueron maceradas durante 20 horas con etanol 96° al cabo de este tiempo se procedió a filtrar y concentrar en un evaporador rotatorio. Se renovó el disolvente y el marco fue sometido a extracción por reflujo durante 4 horas, al cabo de este tiempo se reunieron ambos extractos obteniéndose el extracto etanólico seco.

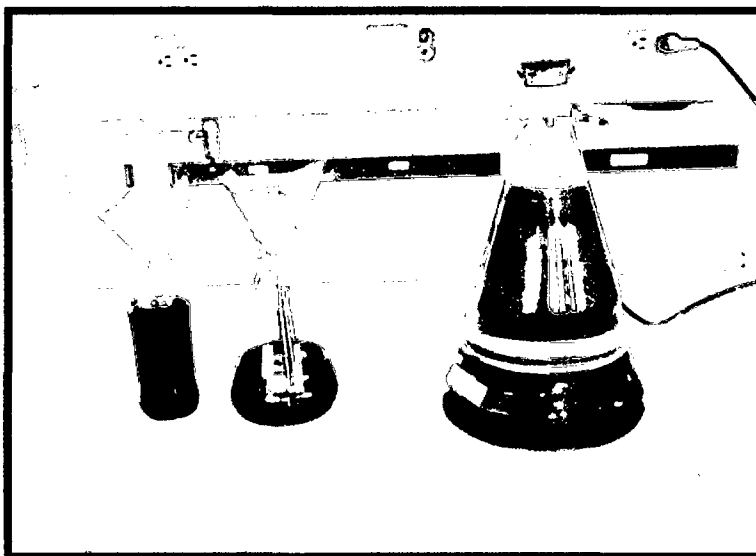


Figura N°11. Extracción por reflujo y filtración.

2.3 SCREENING FITOQUÍMICO O TAMIZAJE FITOQUÍMICO^{55,56,57}.

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas intermedias de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

2.3.1 Procedimiento para el Screening de *Maytenus octogona*:

100 g de la muestra seca y molida se maceraron, en 500 mL de etanol respectivamente durante 20 horas, al cabo de las cuales se reflujo la muestra por 4 horas, se filtró en caliente. Se separaron 10 mL, lo que constituye la **Fracción A**.

El resto se concentró a sequedad y presión reducida en un evaporador rotatorio a una temperatura menor de 40° C.

El extracto seco se trata con HCl al 1% (100 mL), se filtra, se obtienen dos partes:

A. Insoluble: Se lavó con agua destilada hasta pH neutro, seguidamente se disolvió en 10 mL de diclorometano, se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra, este filtrado constituye la **Fracción B**.

B. Solución Ácida: Se filtra y alcaliniza con amoníaco, extrayéndose con diclorometano (3x100mL) obteniéndose dos fases:

B-1. Fase Diclorometánica: Se lava con 20 ml de agua destilada, luego la fase diclorometánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra obteniéndose la **Fracción C**.

C. Fase Acuosa: Se saturó 5g de sulfato de sodio anhidro y se extrajo con diclorometano: etanol (3:2) (3x100mL). Obteniéndose dos fases:

C-1. Fase Orgánica: (Diclorometánica). Se lava con solución de sulfato de sodio anhidro (10 ml) reuniendo las fases acuosas. Seguidamente la fase orgánica se deshidrata con 1g de sulfato de sodio anhidro. Se filtra y esto constituye la **Fracción D**.

C-2. Fase Acuosa remanente: A esta se adiciona los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica esto constituye la **Fracción E. (Ver Figura N° 12)**

D. Por otro lado se mezcla 1g de droga seca con 20mL de agua y se agita. Hervir durante 15 minutos. Luego procedemos a filtrar en caliente y completar a volumen (10 mL) a través del filtro, se dejó enfriar a temperatura ambiente constituyendo la **Fracción F.**

2.3.2 Métodos de Análisis: Detección de grupos funcionales y metabolitos secundarios:

Separadas las fracciones **A, B, C, D y E** del extracto etanólico se procedió a realizar sobre estas, reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios.

❖ Detección de Taninos sobre la fracción A. Reacción de Gelatina- sal:

Se tomaron tres tubos de ensayo en cada uno se vierte 1 mL del extracto etanólico disuelto en agua, al primero se le adiciona 0,5 mL de solución de NaCl 5%, al segundo tubo 0,5 mL de gelatina 1% y al tercer tubo una mezcla de gelatina-sal, la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1° y 2° es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1°, podría ser un falso positivo.

❖ Reacción con Cloruro Férrico, en la fracción A:

En placa se colocó 0.5 mL de la fracción A disuelta en etanol, se le agregó una gota de solución acuosa de FeCl₃ 1%.

Se observó la aparición de un color verdoso que indica, reacción positiva.

❖ **Detección de grupos amino libres en la fracción A:**

Reacción de Ninhidrina.- Sobre tiras de papel de filtro se coloca con una pipeta capilar:

- a. Una gota de Fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.
- b. Blanco: Solución etanólica de ninhidrina al 2%. Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocan en la estufa a 110°C hasta la aparición de un color en el blanco. Se compara con la mancha azul violácea de la solución testigo.

❖ **Detección de Flavonoides sobre las fracciones A, D y E:**

Reacción de Shinoda.- En una placa se vertieron 0.5 mL, de la Fracción A, D y E, disueltas en etanol o agua, se adiciona 5 limaduras de Mg, y 3 gotas de HCl concentrado.

La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

❖ **Detección de Antraquinonas sobre la fracción B:**

Reacción de Bornträger.- Sobre el resto de la fracción B disuelta en hexano se agregan 5 mL de NaOH 5% y se agita suavemente.

La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

❖ **Detección de Triterpenoides y/o Esteroides sobre las fracciones B, C y D:**

Reacción de Liebermann-Burchard: Sobre 1 mL de la fracción disuelta en diclorometano se vertieron 4 gotas de anhídrido acético y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

La reacción se considera positiva si aparecen colores verde, azul verdoso (vías rojo o azul).

❖ **Detección de Cardenólidos sobre las fracciones C y D.**

Reacción de kedde.- Solución **a**: ácido 3,5-dinitrobenzoico 2% en metanol.
b: Hidróxido de potasio 5.7% en agua. Mezclar **a + b**, volúmenes iguales esto constituye el reactivo **(R)**.

Colocar en un tubo de ensayo 1mg de muestra + 2 gotas del reactivo **(R)**.

Si la reacción es positiva se formará un color púrpura o violáceo.

❖ **Detección de Alcaloides sobre las fracciones C y D.**

Las fracciones C y D, se evaporan a sequedad y luego se agrega 2 mL de HCl 1%, filtrar. Se realizan las reacciones de precipitación, con los reactivos Dragendorff, Mayer y Wagner.

❖ **Detección de Leucoantocianidinas y catequinas sobre las fracciones C y E:**

Reacción de Rosenheim.- A 1mL de las Fracciones D y E se agregó 0.5mL de HCl concentrado, se calienta en baño maría durante 10 minutos a 100°C. Enfriar, luego se adiciona 2mL de agua y 1mL de alcohol amílico, agitar y observar el color en la fase amílica. La reacción se considera positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indica presencia de antocianidinas. Si es marrón indica presencia de catequinas.

❖ **Detección de Saponinas la fracción F:**

Prueba de espuma.- En dos tubos de ensayo se agitan 2.5mL de extracto por un minuto. Dejar reposar 15 minutos y observar la formación de espuma. Se considera negativa la reacción si la altura de la espuma es menor de 5mm.

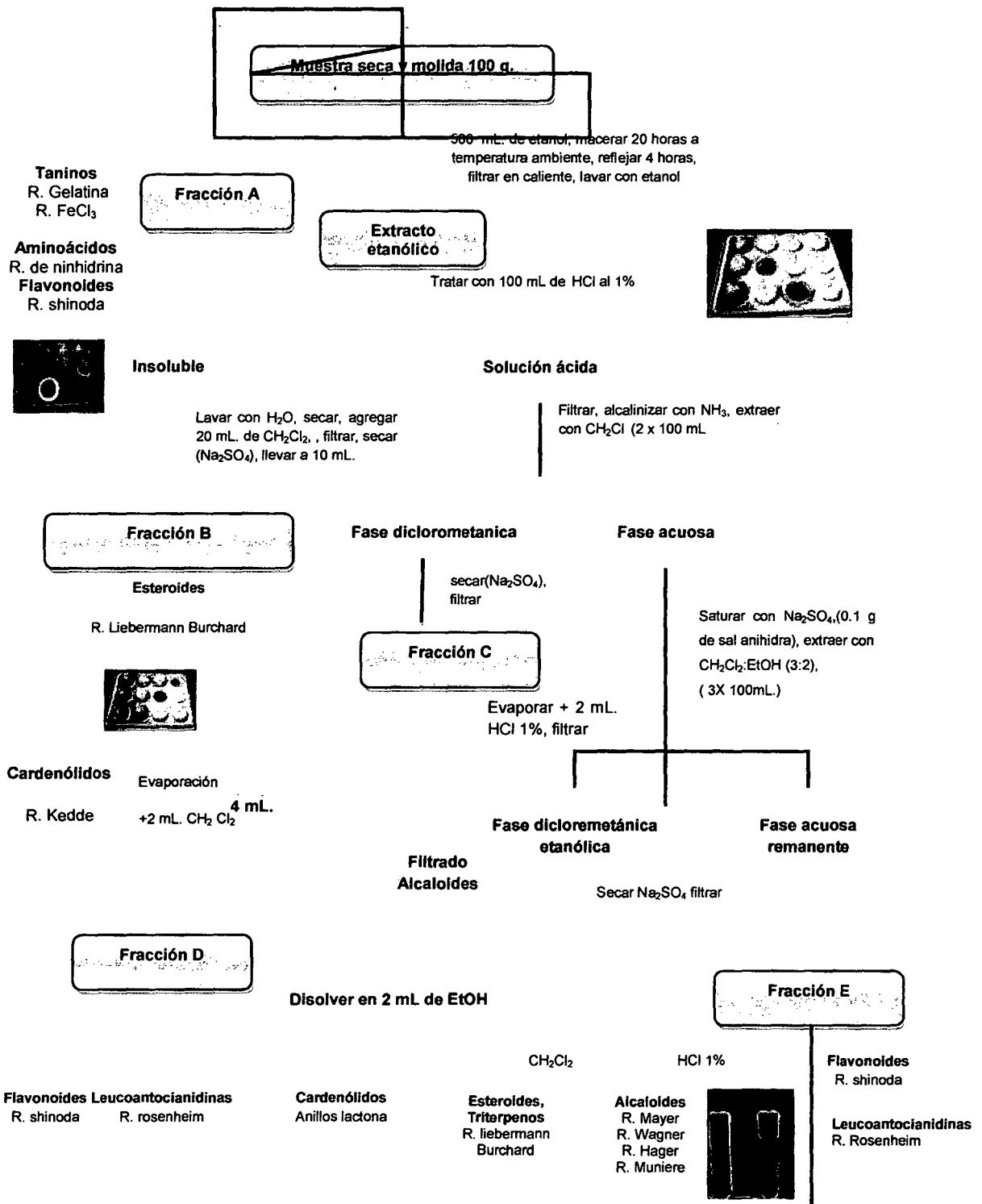


Figura N°12. Fluxograma del Screening Fitoquímico de *Maytenus octogona*.

2.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Fue realizada en el laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica. Para el presente estudio, las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud (INS):

2.4.1 Materiales y procesos previos a la evaluación:

a. Preparación del extracto a evaluar y controles⁵⁸:

Se pesó la cantidad necesaria de extracto y se disolvió con metanol para tener la concentración de: 700 mg/mL (70%), a partir de ésta diluir con metanol para obtener concentraciones de: 10%, 30%, 50% y 70%.

El control positivo Ciprofloxacino se usó a la concentración de 1µg/mL.

El control negativo fue metanol puro.

b. Preparación de medios de cultivo⁵⁹:

Todos los materiales de vidrio utilizados se envolvieron en papel kraft y fueron llevados a la estufa (esterilizadora), en donde se les dejó a la T° de 180°C durante 120 minutos; luego se utilizaron para la preparación de los medios.

Se calculó la cantidad necesaria de medio de cultivo (Agar Mueller Hinton) a utilizar y seguir las recomendaciones del fabricante para su preparación.

c. Replicación de las cepas madre^{59,60}:

Para el proceso de réplica de todas las cepas puras, se utilizó el método de siembra por "Agitación", utilizando el caldo BHI preparado previamente, se distribuyó la cantidad de 4mL aproximadamente, en tubos de ensayos esterilizados. Se incubó por 24 horas a 37°C.^{59,60}

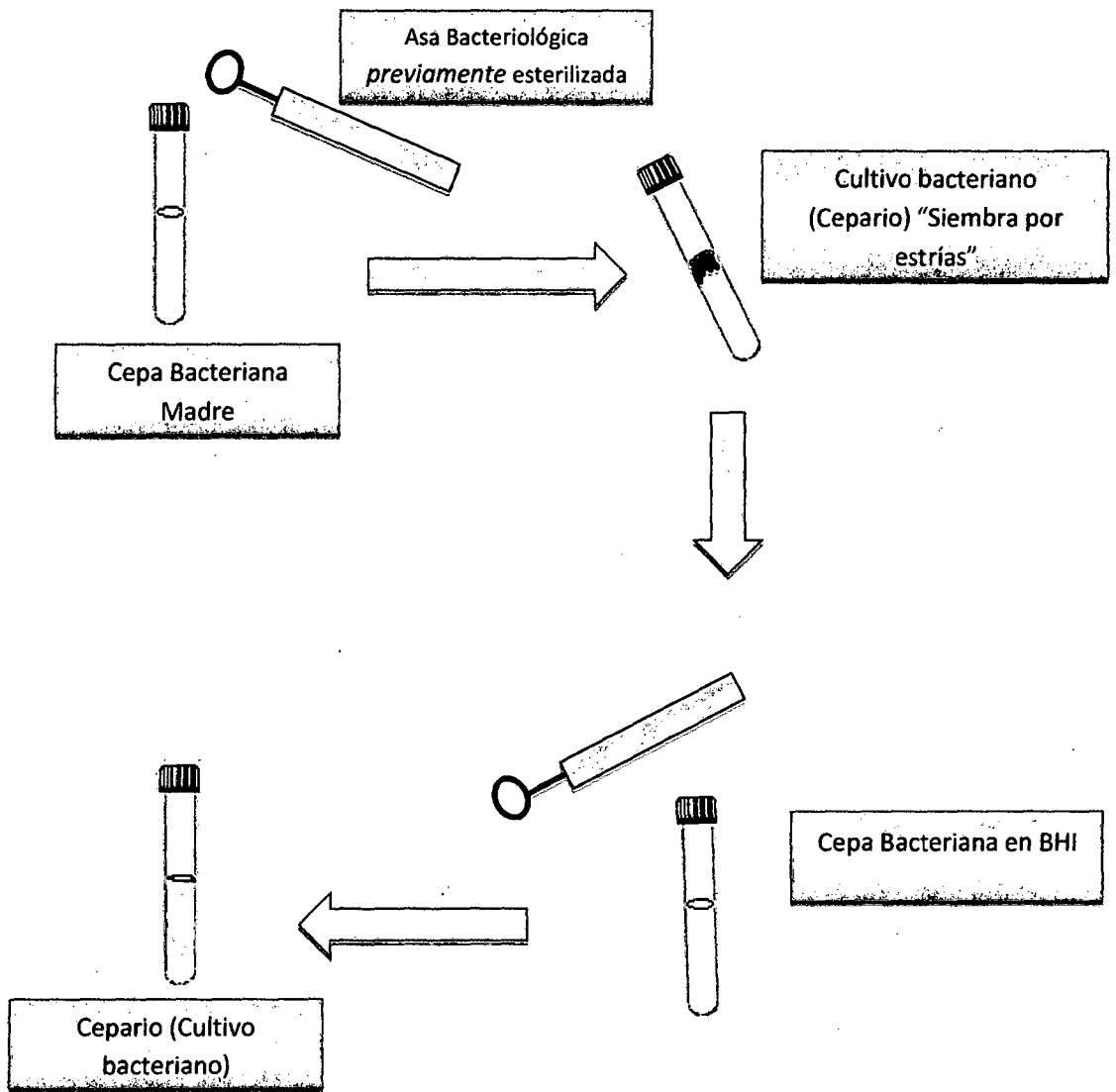


Figura N°13. Flujograma de la replicación de las cepas madres y replicación de las cepas bacterianas.

d. Preparación del inóculo:

Inocular en BHI los microorganismos, 24 horas antes de su uso, e incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.⁶¹

Preparar los inóculos de cada bacteria en tubos de ensayo que contienen 10mL de SSF estéril transfiriendo μL necesarios de BHI con microorganismos, hasta llegar a una turbidez equivalente al tubo N° 5 de Macfarland que tiene aproximadamente 1×10^8 UFC/mL.¹⁸

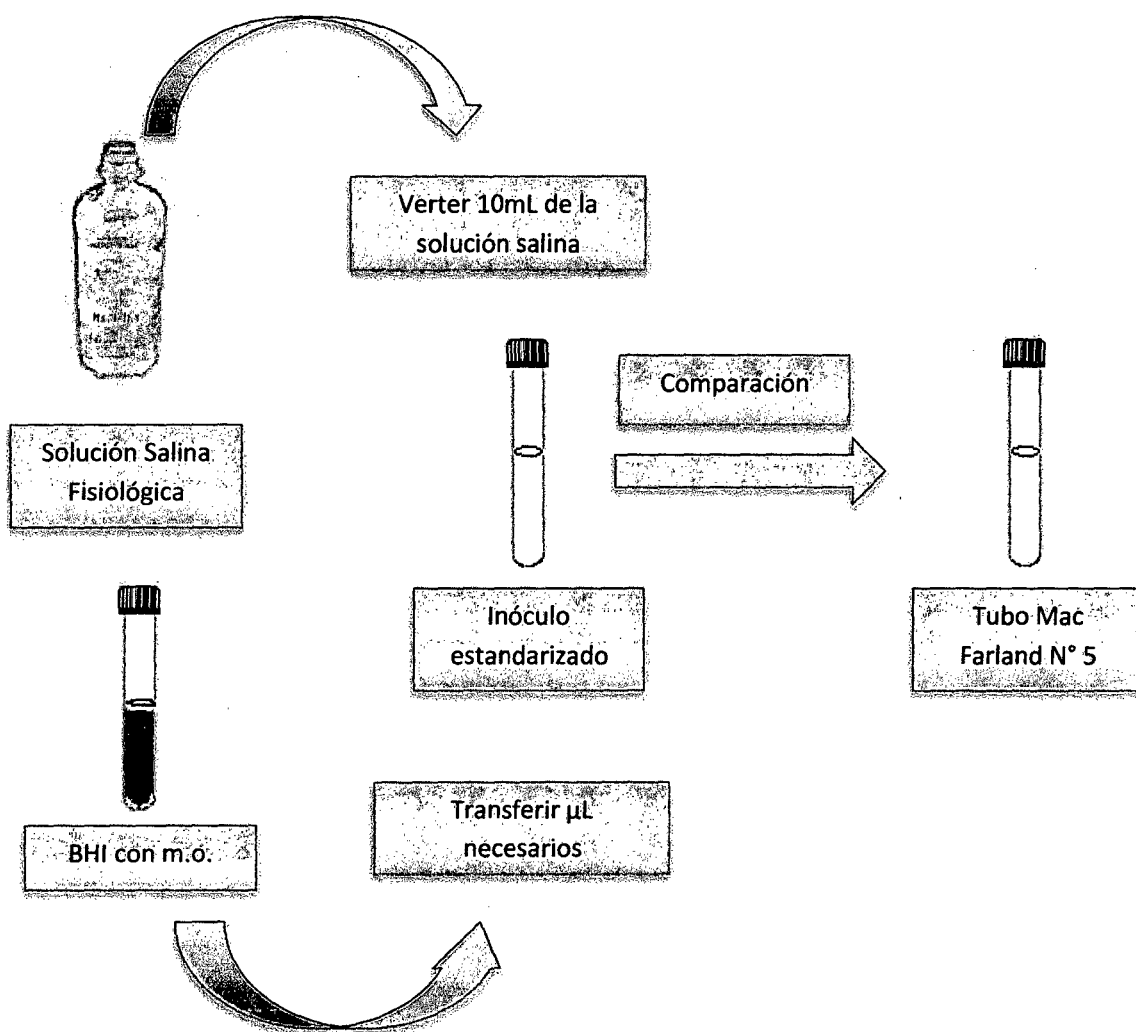


Figura N°14. Flujograma de trabajo para las cepas bacterianas.

2.4.2 Método de Difusión en Agar (excavación en placa):

a. Fundamento:

Este método se fundamenta en la difusión del extracto etanólico en medio sólido en zonas alrededor de la excavación a una extensión tal que permita inhibir el crecimiento de los organismos sensibles. El efecto antibacteriano está dado por el diámetro de la zona de inhibición.⁶²

b. Descripción de la Técnica: (Ver Figura N° 15)

Preparado el inóculo, tomar 1mL de éste y agregar conjuntamente con 20mL Agar MH dentro de un tubo de ensayo grande de tapa rosca, agitar por rotación-inversión, luego verter dentro de una placa de Petri limpia, seca y esterilizada, dejándola solidificar a temperatura ambiente.

Se realizó con un sacabocados estéril hoyos de acuerdo al número de diluciones del extracto a ensayar, el diámetro de cada hoyo fue de 9 mm, sobre dichas excavaciones adicionar 50µL de extracto y controles a concentraciones descritas con anterioridad, previamente se selló cada hoyo con una gotita de agar.

Realizar los ensayos por triplicado. Antes de incubar las placas refrigerar por 2 horas. Finalmente incubar a 37°C por 24 horas y al cabo de este tiempo evaluar los resultados mediante las lecturas en milímetros de diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos.⁶³

Tomar como resultado el valor promedio de estas mediciones para calcular el porcentaje de inhibición relativa (PIR), de la siguiente manera⁶⁴:

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

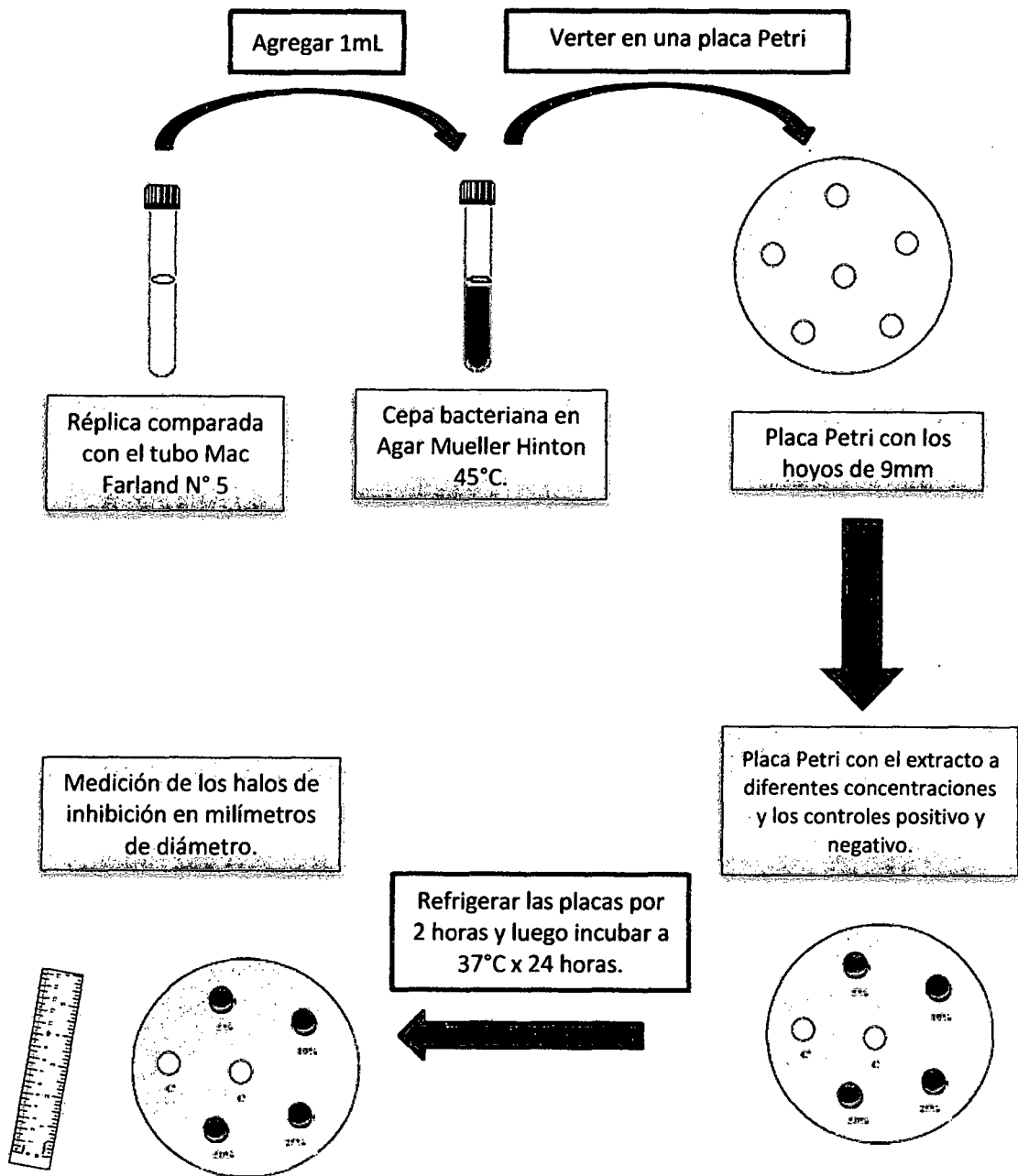


Figura N°15. Flujoograma del método de Difusión en Agar.

2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

2.5.1 Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)^{65,66}:

Se siguió el procedimiento descrito por Benzie y Strain (1999) con ligeras modificaciones. Para iniciar el análisis se preparó el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH = 3.6), TPTZ 10 mM en HCL 40 mM y tricloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM en una proporción 10:1:1 (v:v:v), una vez preparado, se añadieron 3 mL de éste reactivo en una cubeta, y se midió la absorbancia a 593 nm. Posteriormente se agregaron 100 μL de una de las diluciones del extracto etanólico de *Maytenus octogona* y se agitó en un vortex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, al que se restó el valor de la absorbancia inicial. Se procedió de la misma forma para todas las diluciones y las muestras se ensayaron por triplicado.

Los resultados se expresaron en relación al Trolox. Para ello se realizó una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 1.00 a 0.03 mM y se procedió igual que la muestras. Todos los puntos de la curva se realizaron por triplicados. Para la comparación de los resultados se extrapola los valores de la muestra en la curva estándar para expresar la actividad antioxidante en relación a los mM de Trolox.

2.5.2 Método de reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)⁶⁵:

Se realizó según el método propuesto por RE, R. et al (1999), empleando la capacidad antioxidante del ABTS* y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida.

El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable.⁶⁷

En este método, la generación del radical ABTS* se produce por medio químico mediante la adición de persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma pueda reaccionar con el reactivo, otra ventaja es que se trabaja a pH fisiológico (pH = 7.1), a una temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas.

Para comenzar el análisis es necesario preparar el reactivo de trabajo el cual debe tener una concentración de ABTS* de 30 µM y se procede de la siguiente manera:

Se pesan 0.0504g de la sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelve en 5mL de agua ultra pura, luego se adiciona 6.7 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y se deja agitando por espacio de media hora envuelta en papel aluminio protegido de la luz, pasado este tiempo se transfiere a un matraz volumétrico de 10 mL y se enrasa con agua ultra pura y se deja reaccionar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 12 a 18 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente se toma una alícuota de 1 ml y se adiciona aproximadamente 70 mL de tampón fosfato de pH 7.1 y se mide la absorbancia a 734 nm el cual debe estar entre 0.680 ± 0.2 .

Para la medida de la actividad antioxidante se tomaron 1 mL del radical ABTS* en una cubeta y se midió su absorbancia inicial a 734 nm con el equipo termostatzado a 37 °C, posteriormente se añadieron 25 µL de una de las diluciones de los extracto etanólico de *Maytenus octogona* (el cual debe haber estado en un baño maría a 37 °C), se mezcla durante 10 segundos en un vortex, después de 4 minutos de incubación se midió la absorbancia final a 734 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Los resultados se expresaron como la concentración 1g del extracto que tiene la misma actividad antioxidante que una concentración de mM de Trolox correspondiente. Para ello es necesario realizar una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox frente a las correspondientes variaciones de absorbancias del radical. Se hicieron diluciones a partir de una solución madre en un intervalo de 1,00 a 0,03 mM y se analizaron de la misma forma que el extracto etanólico.

2.5.3 Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH)^{52,65}:

El método que se empleó en este trabajo es el propuesto por Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, se midió ésta reacción en un espectrofotómetro.

2.5.3.1 Preparación de las soluciones⁶⁵:

A. Preparación del radical DPPH: Se preparó una solución a 0,1 mM de DPPH, pesando 3,9 mg de DPPH en un matraz aforado previamente tarado y se disolvió en 100 mL de metanol, la solución se colocó en un sonicador para asegurar la buena disolución y luego comprobar que a una absorbancia a 517 nm esté entre 0,9 y 1,1. El matraz se cubrió con papel de aluminio para la protección frente a la luz.

B. Preparación del Trolox: Se preparó una solución stock 1 mM disolviendo 6,25mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97% (Trolox), en 25 mL de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 0,5 y 0,03 mM, con el fin de realizar la curva de calibración. Como blanco de calibración del equipo se empleó metanol.

2.5.3.2 Preparación de la curva de calibración⁶⁵:

Se adiciono 2,9 mL de la solución de DPPH en una cubeta y se midió su absorbancia a 517 nm y luego se adicionó 0.1 mL de las diluciones de Trolox, se agitó vigorosamente y se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a

temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

2.5.3.3 Medición de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Maytenus octogona*⁶⁵:

En una celda de vidrio se agregó 2,9 mL de DPPH y se midió su absorbancia posteriormente se adicionaron 0,1 mL de una de las dilución del extracto etanólico, esta mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV/VIS.

Los resultados fueron expresados como la capacidad antioxidante de inhibir el 50% del radical libre DPPH expresado como la IC₅₀.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 SCREENING FITOQUÍMICO.

Cuadro N°1. Resultados de Screening Fitoquímico del extracto etanólico.

REACCIÓN	FRACCIÓN	RESULTADOS	COLOR O PRECIPITADO
SHINODA Flavonoides	A D E	+ + +	Rojo Rojo Rojo
TRICLORURO FÉRRICO Grupos. fenólicos libres	A	+	Verde
SOLUCIÓN DE GELATINA Taninos	A	-	-
LIEBERMAN BURCHARD Esteroides y/o Triterpenos	B C D	+ + +	Verde Verde Verde
ROSENHEIM Leucoantocianidinas y Catequinas	D E	+ +	Marrón Marrón
BORNTRAGER Naftoquinonas y/o Antraquinonas	B	-	amarillo
DRAGGENDORFF MAYER, HAGER Alcaloides	C, D C, D C, D C, D	- - - -	- - - -
ESPUMA Saponinas	F	-	-
GRIGNARD Glicósidos cianogénicos	DROGA CRUDA	-	-
NINHIDRINA Grupos. amino primarios y secundarios	A	+	color violeta

Leyenda: => Ausencia (-) => Presencia (+)

Fuente: Los Autores

3.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Tabla N°1. Promedio de los halos de inhibición del extracto a diferentes concentraciones y controles.

Concentración del extracto etanólico	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
10%	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	0
50%	0	15.5 ± 0.50	19.8 ± 0.76	0	13.6 ± 0.55	0
70%	0	18.5 ± 0.87	19 ± 0.71	0	13.7 ± 0.45	0
C+	26.4 ± 0.55	26.2 ± 0.84	31.3 ± 0.97	28.8 ± 0.84	27.4 ± 0.55	35 ± 0.71
C-	0	0	0	0	0	0

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm); valor promedio del ensayo por quintuplicado y su respectiva desviación estándar.

b. Volumen usado del extracto etanólico 50µL.

Fuente: Los Autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Tabla N°2. Valores PIR del extracto etanólico a las diferentes concentraciones.

Concentración del extracto etanólico	<i>Bacillus cereus</i> (%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (%)	<i>Salmonella typhi</i> (%)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (%)	<i>Escherichia coli</i> (%)
10%	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	0
50%	0	59.16	63.26	0	49.64	0
70%	0	70.61	60.70	0	50.00	0

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos -Microbiológicos.

3.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

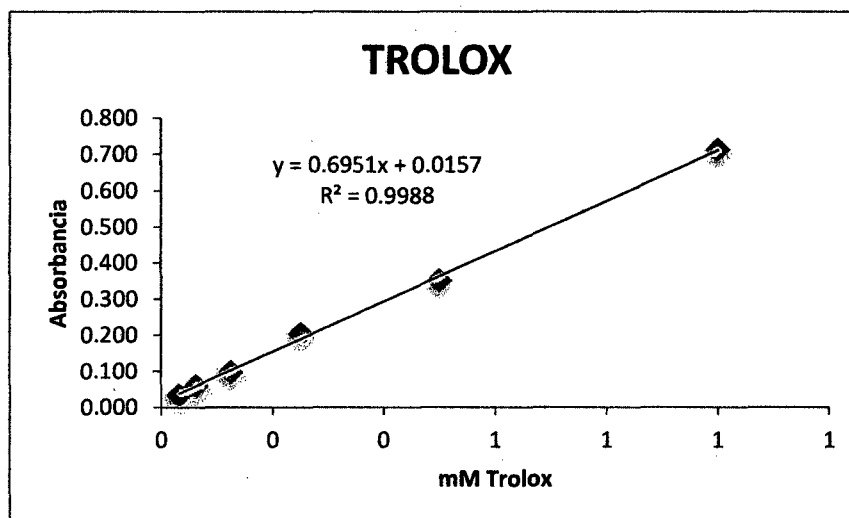
3.3.1 Método de FRAP:

Tabla N°3. Valores promedio de las lecturas de tres repeticiones de la curva de calibración de las soluciones estándares de Trolox por el método de FRAP.

CONCENTRACIÓN DE TROLOX (mM)	PROMEDIO DE ABSORBANCIA CORREGIDA	SD	CV%
1	0.713	0.015	2.066
0.5	0.352	0.007	2.014
0.25	0.205	0.004	2.028
0.125	0.098	0.005	5.119
0.0625	0.060	0.002	2.887
0.03125	0.034	0.002	5.094

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Gráfico N°1. Curva de calibración de las soluciones estándares de Trolox por el método de FRAP.



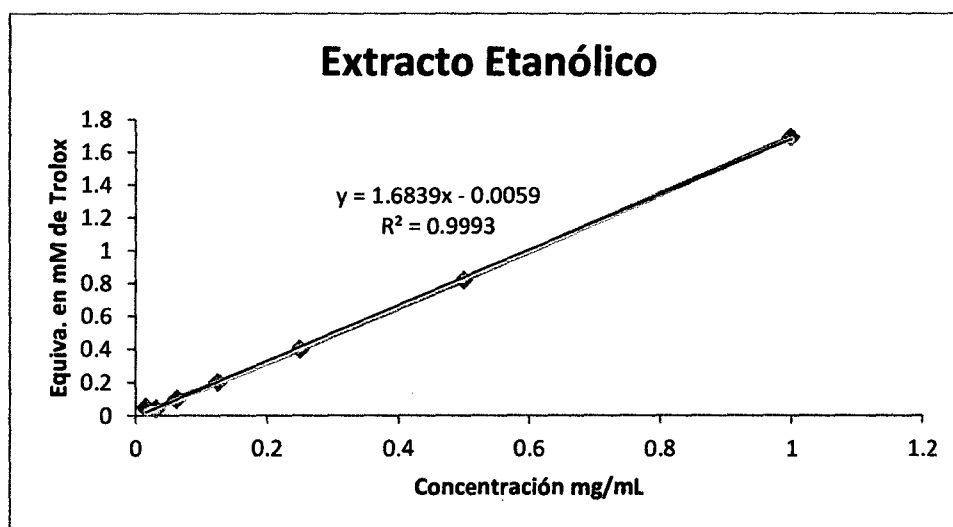
Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Tabla N°4. Valores promedio de las lecturas de tres repeticiones de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Maytenus octogona* por el método de FRAP.

CC ETOH (mg/mL)	PROMEDIO ABS CORREGIDA	PROMEDIO DE EQUIV TROLOX	SD	CV%
1	1.187	1.69	0.078	4.63
0.5	0.585	0.82	0.021	2.54
0.25	0.297	0.40	0.002	0.57
0.125	0.155	0.20	0.007	3.25
0.0625	0.085	0.10	0.003	2.88
0.03125	0.046	0.04	0.002	3.54
0.015625	0.042	0.04	0.035	93.51

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Gráfico N°2. Curva de calibración de las soluciones estándares del extracto etanólico de *Maytenus octogona* por el método de FRAP.



Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

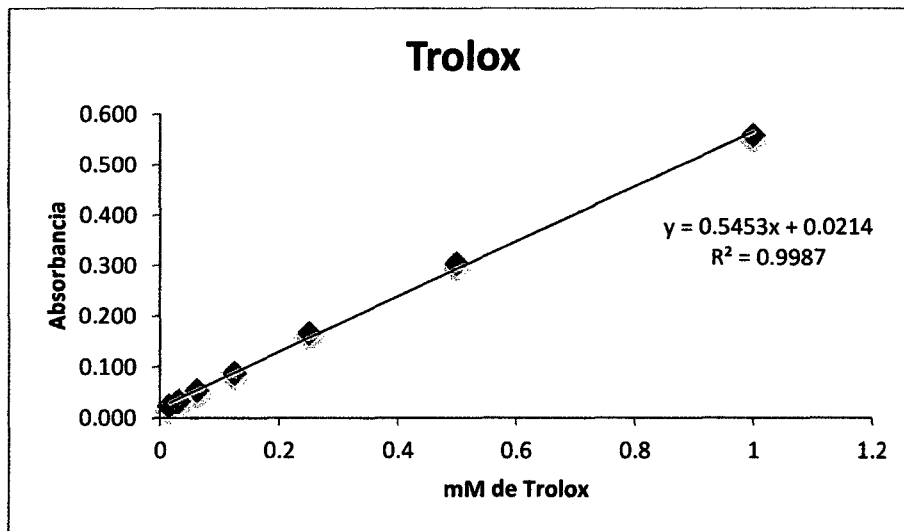
3.3.2 Método de ABTS:

Tabla N°5. Valores promedio de las lecturas de tres repeticiones de la curva de calibración de las soluciones estándares de Trolox por el método de ABTS.

CONCENTRACIÓN DE TROLOX (mM)	PROMEDIO ABS CORREGIDA	SD	CV%
1	0.560	0.002	0.379
0.5	0.305	0.004	1.161
0.25	0.167	0.008	4.672
0.125	0.089	0.004	4.767
0.0625	0.055	0.001	2.571
0.03125	0.034	0.001	2.111
0.015625	0.024	0.002	9.027

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Gráfico N°3. Curva de calibración de las soluciones estándares de Trolox por el método de ABTS.



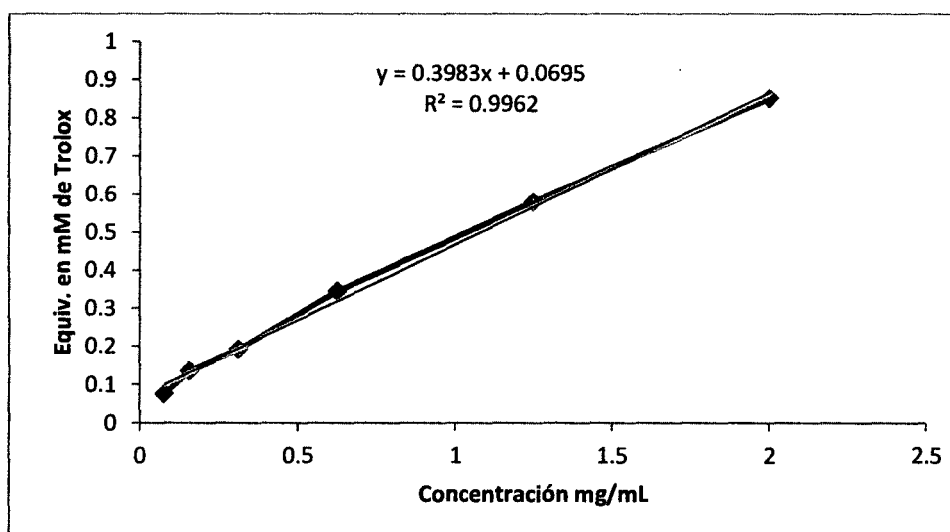
Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Tabla N°6. Valores promedio de las lecturas de tres repeticiones de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Maytenus octogona* por el método de ABTS.

CC ETOH (mg/mL)	PROMEDIO DE ABS CORREGIDA	PROMEDIO DE EQUIV TROLOX	SD	CV%
2	0.485	0.850	0.003	0.333
1.25	0.338	0.580	0.006	1.098
0.625	0.210	0.345	0.012	3.485
0.3125	0.126	0.191	0.004	1.852
0.15625	0.095	0.135	0.004	3.143
0.078125	0.063	0.076	0.003	3.708

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Gráfico N°4. Curva de calibración de las soluciones estándares del extracto etanólico de *Maytenus octogona* por el método de ABTS.



Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

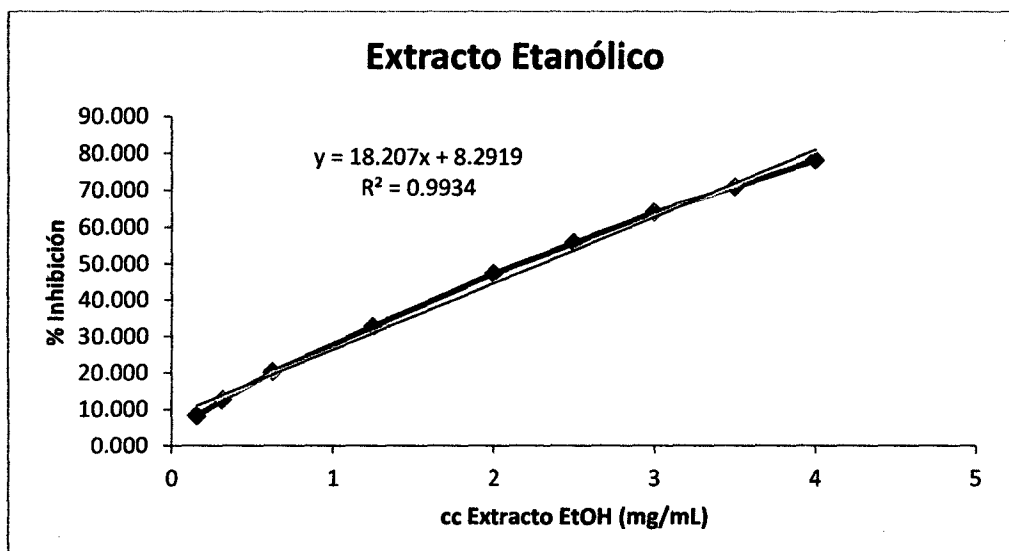
3.3.3 Método de DPPH:

Tabla N°7. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Maytenus octogona*.

CC Ext. ETOH (mg/ml)	% Inhibición
4	78.247
3.5	70.825
3	64.124
2.5	55.773
2	47.423
1.25	32.784
0.625	20.309
0.3125	12.680
0.15625	8.247

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

Gráfico N°5. Porcentaje de Inhibición del radical DPPH por el extracto etanólico.



Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Instrumental.

DISCUSIÓN

En los últimos 30 años viene desarrollándose cada día un interés mayor por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes, todo esto dado por la importancia que poseen en la bioquímica, la biología y la medicina.⁶⁸

Actualmente los antioxidantes sintéticos, entre otros factores, son cuestionados por su posible capacidad promotora de tumores, por lo que ha llevado a la búsqueda y utilización de compuestos de origen natural.⁶⁹

Las plantas y sus derivados han sido usados como alimentos y fuente importante de principios activos para el tratamiento de distintas enfermedades.⁷⁰ Éstas tienen muchos compuestos bioactivos y algunos de ellos con una predominante actividad antioxidante, principalmente polifenoles y flavonoides.

En el estudio fitoquímico se ha identificado la presencia de metabolitos secundarios, (Ver cuadro N°1) identificándose gran cantidad de flavonoides, y grupos fenólicos; también la presencia de catequinas, y abundantes triterpenos y/o esteroides.

Estos resultados son parcialmente concordantes con el estudio fitoquímico realizado por M. Jorge et al. (2004)⁸, quienes demuestran que el extracto de hexano de la especie *Maytenus ilicifolia* reveló la presencia de esteroides y triterpenos; también fue demostrado por Velloso et al (2006)¹⁰, que el extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* presenta polifenoles y flavonoides. Por otro lado, Kloucek et al (2007)¹¹, demuestra la presencia de terpenos en raíces y partes aéreas de *Maytenus macrocarpa*.

Los compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes (Chen et al, 2001); por lo tanto, es probable que contribuyan a las propiedades antioxidantes determinadas en el extracto etanólico en este trabajo.

No se evidenció la presencia de taninos en comparación a las otras especies de *Maytenus*, según lo reportado por J. Rebuglio et al (2007)¹², que demostró la presencia de taninos condensados en la especie *Maytenus aquifolium*, y por M. Jorge et al. (2004)⁸, en un estudio del extracto de acetato de etilo de *Maytenus ilicifolia* indicó la presencia de los mismos.

Entre todas las propiedades biológicas atribuidas a los flavonoides la de mayor interés ha sido su actividad antioxidante. El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen un gran número de métodos para la determinación de extractos con actividad antioxidante.³⁶ Existen diferentes métodos para evaluar dicha actividad, ya sea *in vitro* o *in vivo*, los métodos *in vitro* nos permiten tener una idea más no necesariamente indica lo que ocurre en situaciones complejas, *in vivo*. Dentro de las técnicas más empleadas para el análisis antioxidante se encuentran los ensayos de FRAP, ABTS y DPPH. Estos métodos, presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones aunque también muestran diferencias. El FRAP reduce el complejo de la tripiridiltriaina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (persulfato potásico), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Manzini-Filho & Fett, 2005), lo que los hace de gran utilidad en el estudio simultáneo diferentes metabolitos en el extracto de la planta.

Los valores en las tablas N° 4 y 6 son el resultado de la determinación por triplicado y expresado como la media \pm desviación estándar de TEAC mM Trolox/g de extracto, además se determinó el % de inhibición IC_{50} del radical DPPH (Tabla N°7).

El extracto etanólico presentó altos valores de propiedad antioxidante en todas las técnicas realizadas, resultando para los métodos FRAP y ABTS que un miligramo (1mg) de extracto etanólico es equivalente a: 1.678 mM de Trolox, 0.4678 mM de Trolox respectivamente y para el método DPPH el IC_{50} es equivalente a 2.2908 mg del extracto, por lo que podríamos mencionar que los compuestos antioxidantes de naturaleza polar tienen una alta capacidad reductora y posiblemente se deba a compuestos fenólicos como flavonoides y flavonas reportadas en otros estudios (Velioglu, Mazza, Gao & Oomah, 1998) (Javanmardi, Stushnff, Locke & Vivanco, 2003).

La actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC se debe, en parte, a la presencia y gran cantidad de compuestos fenólicos presentes en su composición fitoquímica. Se ha documentado ampliamente que la presencia de estos metabolitos se asocia con la actividad antioxidante de una amplia variedad de frutos y otras especies.^{71,72,73} La actividad antioxidante de sus polifenoles se asocia con sus características estructurales. Las estructuras que poseen grupos hidroxilos en las posiciones 3" y 4" del anillo B y OH en C-3 e insaturación del anillo C, permiten estructuras mesoméricas estables con capacidad eficiente de captura de radicales libres, requisito para una máxima capacidad antioxidante.⁷⁴

Los resultados obtenidos de la evaluación antioxidante por el método de ABTS, concuerdan con los reportados por Velloso et al (2006)¹⁰, para la especie *Maytenus ilicifolia*, mostrando un poderoso potencial antioxidante atribuido a la presencia de polifenoles y flavonoides. Rebuglio et al (2007)¹², reportó que la especie *Maytenus aquifolium* posee alta actividad antioxidante, utilizando los métodos ABTS y DPPH. Así mismo, Ahmed et al (2013)⁴, indica que cuatro especies del género *Maytenus* (*Maytenus peduncularis*, *Maytenus procumbens*, *Maytenus senegalensis* y *Maytenus undata*) poseen una buena actividad antioxidante atribuyendo la actividad a las fracciones polares presentes.

La actividad antibacteriana del extracto etanólico analizado, fue cualitativa y cuantitativamente determinado por la presencia o ausencia de zonas de inhibición, diámetro de los halos de inhibición y valores del porcentaje de inhibición relativa (PIR).

La actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Maytenus octogona*, trabajados a 4 diferentes concentraciones de 10%, 30%, 50% y 70% (p/v), son comparados con el antibiótico Ciprofloxacino para las bacterias Gram positivas y Gram negativas empleadas, siendo este antibiótico usado como control positivo, como se muestra en la tabla N°1 se evidencia que la actividad antibacteriana del extracto es nula a las concentraciones de 10% y 30% frente a todas las bacterias utilizadas; y solo dio resultados positivos para las cepas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermidis y *Enterobacter aerogenes* a las concentraciones de 50% y 70%; sin embargo los resultados son inferiores comparados con el control positivo. Los valores del PIR a las concentraciones de 50 y 70% del extracto etanólico, mostraron una leve capacidad antibacteriana contra las cepas: *Staphylococcus aureus* (59.16 y 70.61%), *Staphylococcus epidermidis* (63.26 y 60.70%) y para *Enterobacter aerogenes* (49.64 y 50%); respectivamente frente al control positivo.

Así tenemos, resultados similares con los de Bruni et al (2006)⁹, en cuanto a la actividad antibacteriana de la especie *Maytenus krukovii*, contra Gram positivos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*), y Gram negativos (*Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) resultando que era completamente inactivo.

Por otro lado, Kloucek et al (2007)¹¹, reportó en un estudio sobre la actividad antibacteriana de cortezas medicinales utilizados en la amazonía peruana, que el más amplio espectro de acción se demostró por el extracto de *Maytenus macrocarpa*, que inhibe todas las cepas probadas con los CMI que van desde 125 hasta 250 µg/ml. (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*). L. de León et al (2009)¹³, indica que Zeylasterone, un triterpenoide aislado e *Maytenus blepharodes* presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* siendo bactericida a 30 µg/ml en menos de tres horas y bacteriostática a concentraciones más bajas.

Los resultados de la prueba de difusión en agar descartaron el extracto etanólico de *Maytenus octogona* por no presentar actividad antibacteriana significativa.

Es necesario realizar más estudios a nivel químico y farmacológico del extracto etanólico de *Maytenus octogona* (L'Héritier) DC. por la buena actividad antioxidante que se demostró superando a otras especies vegetales muy populares que se desarrolla en nuestro país y por ser una especie promisoría en las diferentes patologías.

CONCLUSIONES

1. Mediante screening fitoquímico realizado a las hojas de la especie *Maytenus octogona*, se identificó gran cantidad de flavonoides, y grupos fenólicos asimismo la presencia de catequinas, y abundantes triterpenos y/o esteroides, pero no de otros metabolitos secundarios como taninos alcaloides, antraquinonas y saponinas.
2. Para la actividad antioxidante se encontró: Altos valores de propiedad antioxidante en todas las técnicas realizadas resultando que un miligramo (1mg) de extracto etanólico es equivalente a: 1.678 mM de Trolox (Método de FRAP), 0.4678 mM de Trolox (Método de ABTS) y el IC₅₀ es equivalente a 2.2908 mg del extracto (Método DPPH).
3. El extracto etanólico de *Maytenus octogona*, fue evaluada por la técnica de difusión en agar utilizando bacterias tipificadas Gram positivas y Gram negativas. El extracto etanólico de las hojas de *Maytenus octogona* presentó una leve actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y Gram negativa: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) a las concentraciones de 50 y 70%. Así mismo, no mostró actividad contra las bacterias *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhi* (ATCC 14028). Los valores del PIR a las concentraciones de 50 y 70% del extracto etanólico, mostraron una leve capacidad antibacteriana contra las cepas: *Staphylococcus aureus* (59.16 y 70.61%), *Staphylococcus epidermidis* (63.26 y 60.70%) y para *Enterobacter aerogenes* (49.64 y 50%); respectivamente frente al control positivo.

RECOMENDACIONES

1. Identificar los compuestos presentes en el extracto etanólico de la especie *Maytenus octogona* por cromatografía HPLC - DAD – MS para conocer los metabolitos responsables de la actividad antioxidante y posterior estudios en modelos in vivo, ya que las transformaciones metabólicas que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo pueden modificar su actividad.
2. Realizar estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas, ya que en estos compuestos existen un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Larson R. "Naturally occurring antioxidants". Florida: Lewis Publishers; 1997.
2. Yu BP. Cellular defenses against from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 1994; 74(1), 139-162.
3. Liu F, Ng T. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences*. 2000; 66(8): 725-735.
4. Ahmed AS, McGaw LJ, Eloff JN. Evaluation of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four *Maytenus* species used in southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13(100): 1186-1472.
5. Martínez A. Evaluación Antibacteriana y Antioxidante de extractos de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia. [Tesis]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2014.
6. Mokoka TA, McGaw LJ, Mdee LK, Bagla VP, Iwalewa EO, Eloff JN. Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13(111): 1-9.
7. Acosta LG, Vásquez J, Núñez V, Pino J, Shiga B. Efecto de *Maytenus macrocarpa* "Chuchuhuasi" en el sistema reproductor masculino del ratón (*Mus musculus*). *Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM*. 2013; 20(3): 223-226.
8. Jorge M, Leite P, Oliveira B, Tagliati A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *National Center for Biotechnology Information*. 2004; 94(1): 93-100.

9. Bruni R, Rossi D, Muzzoli M, Romagnoli C, Paganetto G, Besco E, et al. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. Science Direct Blog. 2006; 77(7-8): 538-545.
10. Velloso C, Khalil M, Formenton A, Ximenes F, Fonseca M, Furlan M, et al. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. National Center for Biotechnology Information. 2006; 77(3): 243-244.
11. Kloucek P, Svobodova B, Polesny Z, Langrova I, Smrcek S, Kokoska L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. National Center for Biotechnology Information. 2007; 111(2): 427-429.
12. Rebuglio JC, Barbosa V, Khalil N, Santos V, Furlan M, Brunetti I, et al. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. Rev Brasileira de Ciencias Farmacéuticas. 2007; 43(3): 447-453.
13. León L, López M, Moujir L. Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research. 2010; 165(8): 617-626.
14. Whaley O, Orellana A, Pérez E, Tenorio M, Quinteros F, Mendoza M, et al. Plantas y Vegetación de Ica, Perú. Lima: Darwin Initiative; 2010.
15. Mejía GA, Ramelli MA. Interpretación Clínica del Laboratorio. 7ª ed. Bogotá: Editorial Médica Internacional; 2006.
16. Vidyasagar A. What Are Bacteria? Revista Live Science. 2015. [Revista Virtual]. [Consultado el 02 de setiembre del 2015]. Disponible en <http://www.livescience.com/51641-bacteria.html>.

17. Prats G. Microbiología Clínica. 1ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2005.
18. Ramírez SM. Evaluación de la Actividad antibacteriana del extracto de acetato de etilo obtenido de tallos de la especie *Baccharis tricuneata* (L.f.) Pers "Taya" frente a bacterias patógenas [Tesis]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2013.
19. Bennett J, Dolin R, Blaser M. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ª ed. Canada: Elsevier; 2014.
20. Todar K. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. Online Textbook of Bacteriology. Madison. 2008. [on line]. [Fecha de acceso 17 de febrero del 2015]. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>
21. Garcia C, Pardo J, Seas C. Bacteriemia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. Rev. Medica Herediana. 2003; 14(4): 221-223.
22. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 2002; 44(5): 464-475.
23. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet N° 125. WHO; 2011. [Fecha de acceso 12 de febrero de 2015] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
24. Calva E. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: De la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM. [en línea]. [Fecha de acceso 28 de Julio del 2015]. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>

25. Salmonella (non-typhoidal). Fact sheet N°139. WHO; 2013. [Fecha de acceso 17 de Diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/index.html>
26. Fraser S. Enterobacter Infections. Rev. Medscape. 2014. [revista virtual]. [Fecha de acceso 19 de Mayo del 2015]. En: <http://emedicine.medscape.com/article/216845-overview>
27. Korolkovas A, Burckhalter H. Compendio esencial de química farmacéutica. España: Editorial Reverté; 1983.
28. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12a ed. México: McGraw Hill México; 2011.
29. Cocha J, Vilcapoma A, Gutierrez S, Merino R. Guía de Práctica de Microbiología I. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1984.
30. Finegold S, Baron E. Diagnóstico Microbiológico. 7a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana SA; 1992.
31. García JA, Cantón R, García J, Gómez M, Martínez L, Rodríguez C, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los Antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología clínica. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España; 2002.
32. Mendo RM. Medios de Cultivo en Microbiología. 4ª ed. Lima: Ediciones Laborales SRL; 2003.
33. Vega N. Caracterización de compuestos fenólicos en plantas medicinales tradicionales: *Cheilanthes pruinata* "cuti-cuti". Evaluación de su actividad antioxidante. [Tesis de maestría en Química Farmacéutica]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2012.

34. Baroni M.V. Influencia del procesamiento del fruto de membrillo (*Cydonia Oblonga Miller*) en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante del mismo. V Jornadas Académicas de la RedVITEC. Rev de la Universidad Nacional de Córdoba. 2014. [Fecha de Acceso 8 de Agosto, 2015] Disponible en: <http://revistas.unc.edu.ar/index.php/vjornadasredvitec/article/view/10626>
35. Lopez V, Akerreta S, Cavero RY, Calvo MI. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional Navarra. Revista de Fitoterapia. 2007; 7(1): 43-47.
36. Herrera O. Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" en línea celular de cáncer de próstata DU-145. [Tesis de Maestría en Farmacología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
37. Frankel E, Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000; 80(13): 1925-1941.
38. Mantle D, Anderton J, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry E. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. 1998; 121(4): 385-391.
39. Yu T, Ong C. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation. Analytical Biochemistry. 1999; 275(2): 217-223.

40. Aruoma O. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods" Mutation research. 2003; 523(24):9-20.
41. Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(10):4290-4302.
42. Ou B, Hampsch M, Prior R. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001; 49(10): 4619-4626
43. Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(6): 1841-1856.
44. Wayner D, Burton W, Ingold U, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The importante contribution made by plasma proteins. FEBS Letters. 1985; 187(1): 33-37
45. Justino G, Santos M, Canário S, Borges C, Florêncio H, Mira L. Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004; 432(1): 109-121.
46. Pulido R, Bravo L , Saura F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2000; 48(8): 3396-3402.
47. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciencias, Tecnología y Alimentos. 2005; 25(4): 726-732.

48. Pérez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: Efectos de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad de Madrid; 2007.
49. Agudo L. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. Rev Educación en Extremadura; 2010.
50. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice E. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999; 26(9-10): 1231-1237.
51. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. The Journal of Nutrition. 2003; 133(9): 2812–2819.
52. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology. 1995;28(1):25-30.
53. Chávez J, Chire T, Loaysa L. Curso Principios bioactivos de plantas andinas y amazónicas del Perú. Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. UNALM; 2002.
54. Caceres CG, Huayanca NH. Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Antioxidante del Extracto etanólico de las hojas de Heliotropium arborescens L. "Curutmi". [Tesis]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2014.
55. Lock O. Investigaciones Fitoquímicas. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Lima: PUCP Fondo Editorial; 1994.

56. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Bogotá: Convenio Andrés Bello; 2000.
57. Kurt H, et al. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. Convenio Andrés Bello: Bogotá; 2008.
58. Hurtado R, Gavilán P. Evaluación de la actividad antibacteriana y cicatrizante de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Senecio Canescens* Huira huiru [Tesis]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2009.
59. Aquihuati M, Pérez M. Manual de prácticas en el laboratorio de microbiología general. 1ra ed. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.
60. Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima. Instituto Nacional de Salud; 2002.
61. Ortega N, Benitez N, Cabezas F. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011; 9(1): 8-16.
62. Segovia I, Suárez L, Castro A, Suárez S, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Tagetes Elliptica* Smith "Chincho" y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica. *Rev Ciencia e Investigación UNMSM*. 2010; 13(2): 81-86.
63. Martínez M, López M, Morejón Z, Rubalcaba Y. Actividad Antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus Terebinthifolius* Raddi (Copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2000; 5(1): 23-25.

64. Martínez J, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 1997; 2(1): 12-14.
65. Alarcón R, Aybar O, Condorí K, Gutierrez V. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólico, acetato de etilo y metanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav. "Lucraco". Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2013.
66. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1): 70–76.
67. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002; 127(1): 183-198.
68. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2002; 31(2): 126-133.
69. Benites J, López J, Kusch F, Gajardo S, Jonquera G, Salazar G, et al. Actividad antioxidante, antibacteriana y analgésica de extractos de *Mangifera indica* L. variedad pica. *Rev BIOFARBO*. 2010; 18(2): 10-19.
70. Cruz S, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur P. Effects of plants and plant products on the testis. *Asian Journal of Andrology*. 2010; 12(4): 468-479.
71. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev. Cubana Cardiología*. (2000); 14(1):55-60.

72. Lonkar, P., Dedon, P.C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer*. 2011; 128:1999-2009.
73. Tan L, Yin W, Chan K. *Piper nigrum*, *Piper betel* and gnetum Gnetum - natural food sources with anti-quorum sensing. *Sensors (Basel)*. 2013; 20(13): 3975-3985.
74. Dahlawi H, Jordan-Mahy N, Clench M, Le Maitre C. Shares bioactive extracts of pomegranate fruit in leukemia cell lines in vitro are promising for new therapeutic agents for leukemia. *Nutr Cancer*. 2012; 64:100-110.

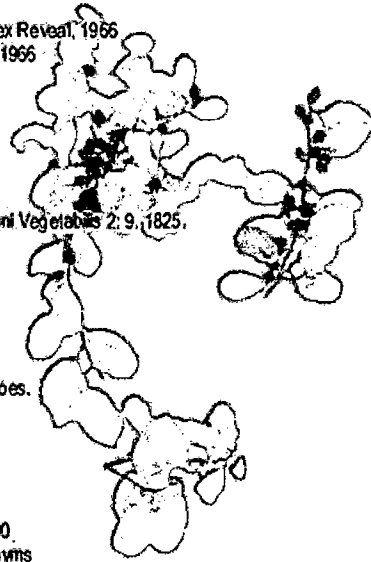
ANEXOS:

CONSTANCIA DE MUESTRA VEGETAL PARA HERBARIO

CARTA N° 005-2014-AOG

Quien suscribe deja expreso por la presente constancia que la muestra vegetal fértil y completa (03 especímenes) colectados en la Quebrada Huarangal (distrito Yauca del Rosario, provincia de Ica, departamento de Ica), recibidos de las Bachilleres y actuales Tesistas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica en la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica: WINNIE KENNY CALLE CONDOR y VANESSA PATRICIA GUTIERREZ ALVARADO, han sido procesadas, revisadas y determinada taxonómicamente como *Maytenus octogona* (L'Hér.) DC., arbusto-árbol nativo en la Costa peruana, con Nombre común brindado por la interesada de: "Maytén"; teniendo la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981):

REINO : PLANTAE Haeckel, 1866
 DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal, 1966
 CLASE : MAGNOLIOPSIDA Cronquist, Takht. & Zimmern., 1966
 SUB-CLASE : ROSIDAE Takht., 1956
 SUPER-ORDEN : ROSANAE Takht., 1957
 ORDEN : CELASTRALES Wettstein, 1907
 FAMILIA : CELASTRACEAE R. Br., 1814
 GÉNERO : *Maytenus* Molina
 ESPECIE : *Maytenus octogona* (L'Hér.) DC.
 Publicado en: Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis 2: 9, 1825.



SINÓNIMOS : *Cophelophora aromatica* (Hook.) Schrad.
Celastrus circumscissus Pavón ex Briq.
Celastrus octogonus L'Hér.
Celastrus orbicularis Willd. ex Roem. & Schult.
Maytenus obtusifolia Hook. f.
Maytenus orbicularis (Willd. ex Roem. & Schult.) Loes.
Maytenus uliginosa Kunth
Rhamnus peruviana Lam.
Sonchella octogona (L'Hér.) Lam.
Triocma octogonum (L'Hér.) Lundell
Ziziphus peruviana Lam.
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-6600190>
<http://www.tropicos.org/Name/6600190?tab=synonyms>

Determinado por: Bigo. Alfonso Orellana García

Voucher de Colecta generado : AO-113 (UNICA)

Voucher de Colecta revisado : DPP-132 (UNICA), BARCODE ("K" Kew Gardens): K000325683

Acc n° ("F" The Field Museum of Natural History): F 1764886

Se expide la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines académicos que crean conveniente.

Ica, 16 de Diciembre del 2014


 Alfonso Orellana García
 BIÓLOGO
 C.B.P. 9040

Investigador del Proyecto Kew Perú
 RPC 956-723406 / RPM# 968-655095
bio_aog@hotmail.com

Figura N°16. Constancia de la clasificación taxonómica.

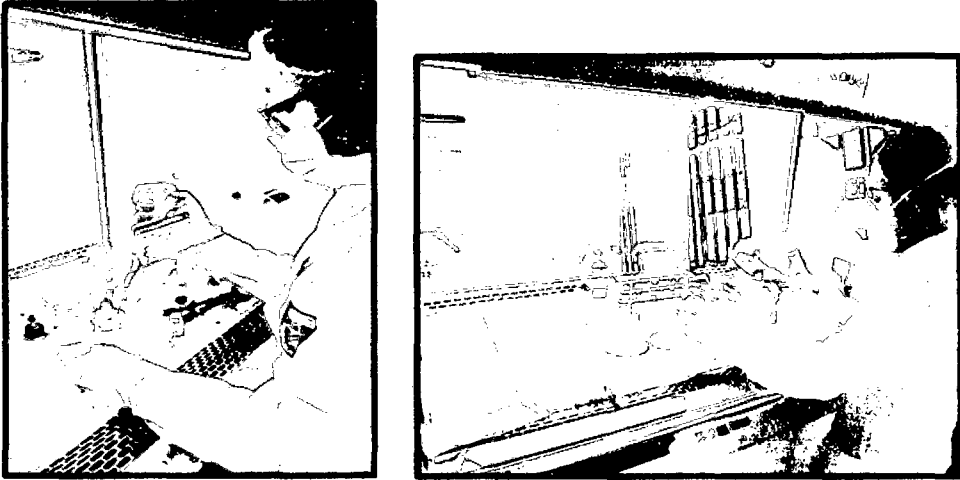
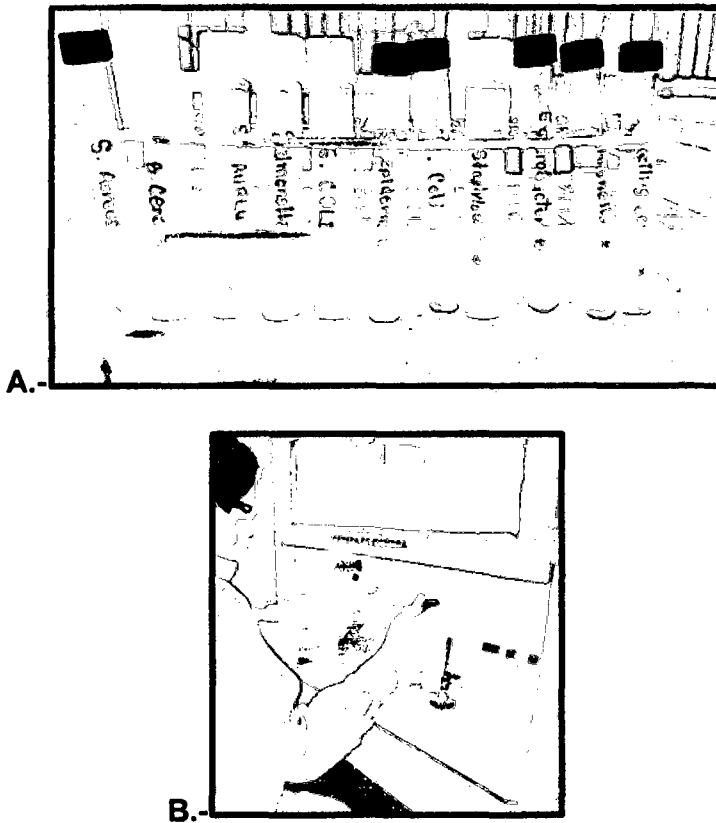


Figura N°17. Trabajo en la cabina de seguridad biológica.



**Figura N°18. A.- Cepario de bacterias estudiadas
B.- Replicación de las cepas bacterianas.**

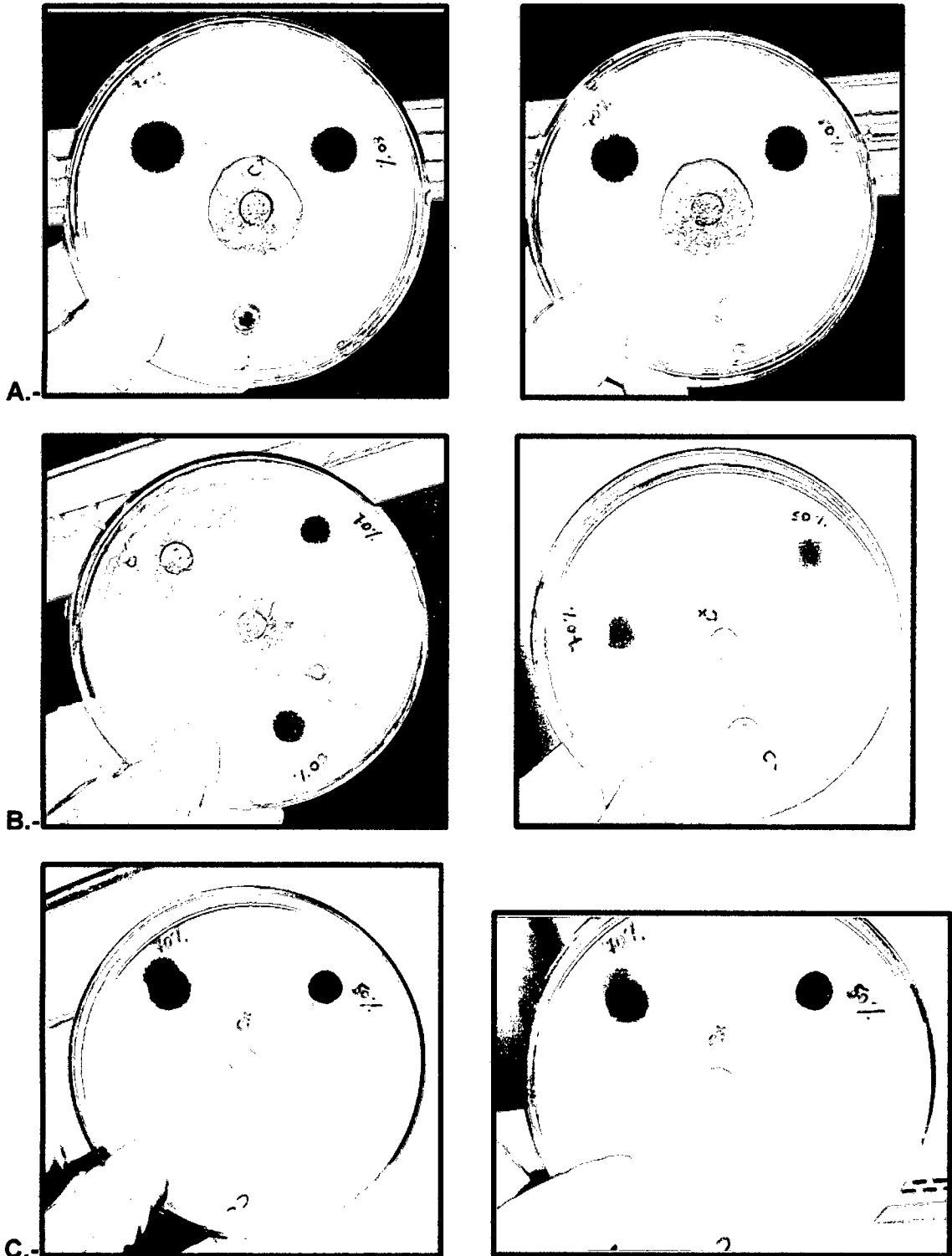


Figura N°19. Actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a: A.- *B. cereus*, B.- *S. aureus*, C.- *S. epidemidis*.

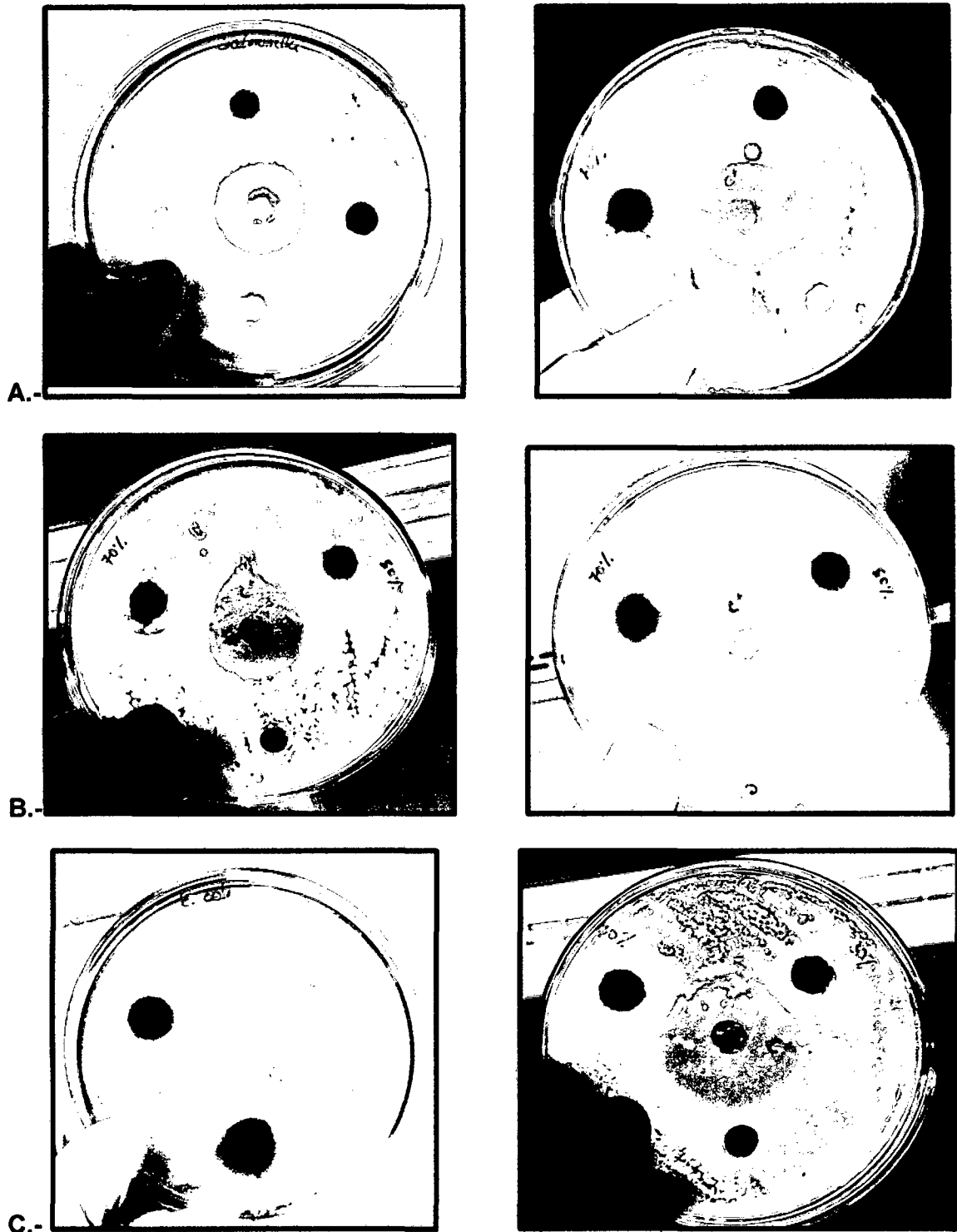


Figura N°20. Actividad antibacteriana del extracto etanólico frente a: A.- *S. typhi*, B.-*E. aerogenes*, C.- *E. coli*.

Tabla N°8: Resultados de los halos de inhibición en la evaluación de la actividad antibacteriana a concentración de 100 mg/mL (10%).

Concentración del extracto etanólico	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
10%	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm), valores de ensayos por quintuplicado.

b. Volumen usado del extracto etanólico 50µL.

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Tabla N°9: Resultados de los halos de inhibición en la evaluación de la actividad antibacteriana a concentración de 300 mg/mL (30%).

Concentración del extracto etanólico	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
30%	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm), valores de ensayos por quintuplicado.

b. Volumen usado del extracto etanólico 50µL.

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Tabla N°10: Resultados de los halos de inhibición en la evaluación de la actividad antibacteriana a concentración de 500 mg/mL (50%).

Concentración del extracto etanólico	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
50%	0	15	19	0	14	0
	0	16	20	0	14	0
	0	15	21	0	14	0
	0	15.5	19.5	0	13	0
	0	16	19.5	0	13	0

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm), valores de ensayos por quintuplicado.

b. Volumen usado del extracto etanólico 50µL.

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Tabla N°11: Resultados de los halos de inhibición en la evaluación de la actividad antibacteriana a concentración de 700 mg/mL (70%).

Concentración del extracto etanólico	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
70%	0	17	19	0	14	0
	0	19	20	0	13	0
	0	19	18	0	14	0
	0	18.5	19	0	14	0
	0	19	19	0	13.5	0

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm), valores de ensayos por quintuplicado.

b. Volumen usado del extracto etanólico 50µL.

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Tabla N°12: Resultados de los halos de inhibición en la evaluación de la actividad antibacteriana a concentración de C⁺ (ciprofloxacino).

Control positivo	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
C ⁺	26	26	30	29	28	34
	26	27	32	28	27	35
	27	26	32	30	27	35
	27	25	30.5	29	28	36
	26	27	32	28	27	35

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm), valores de ensayos por quintuplicado.

b. Volumen usado del control positivo 50µL.

Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Tabla N°13: Resultados de los halos de inhibición en la evaluación de la actividad antibacteriana a concentración de C⁻ (metanol).

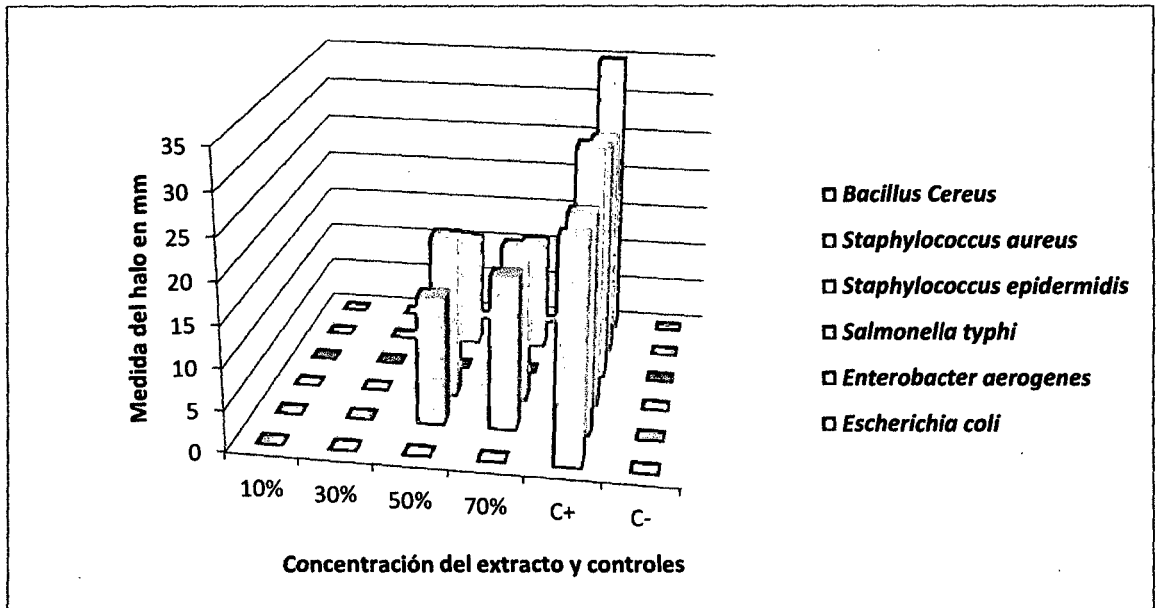
Control negativo	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
C ⁻	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

a. Zona de inhibición, incluyendo el diámetro del sacabocado (9 mm), valores de ensayos por quintuplicado.

b. Volumen usado del control negativo 50µL.

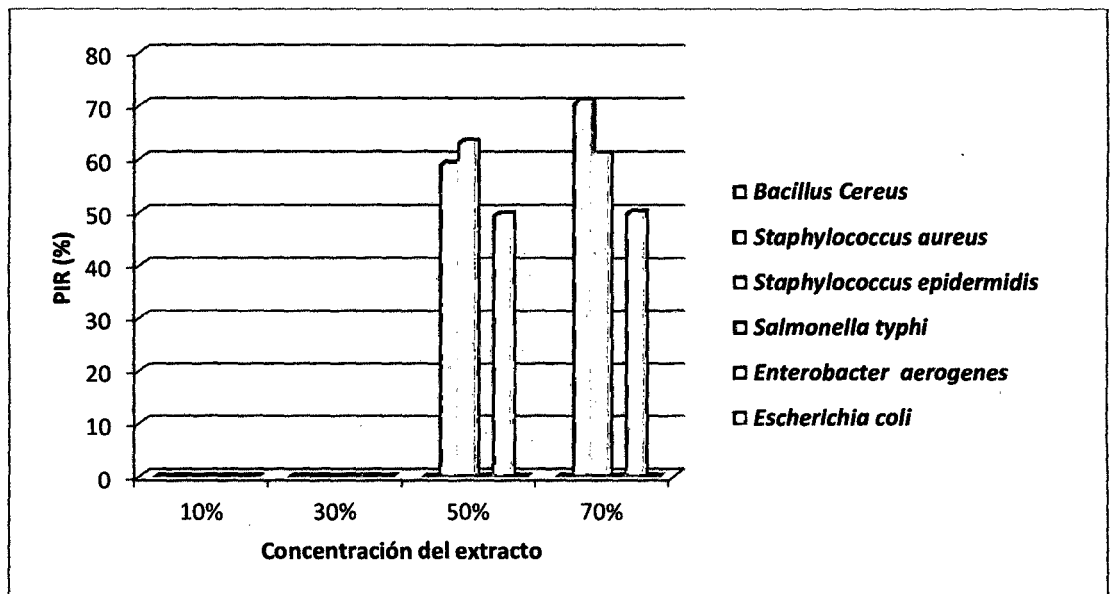
Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Gráfico N°6: Diámetro de los halos de inhibición del extracto etanólico en mm contra cepas bacterianas.



Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

Gráfico N°7: Porcentaje de Inhibición Relativa del extracto etanólico.



Fuente: Los autores. U.N.I.C.A. – Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Clínicos - Microbiológicos.

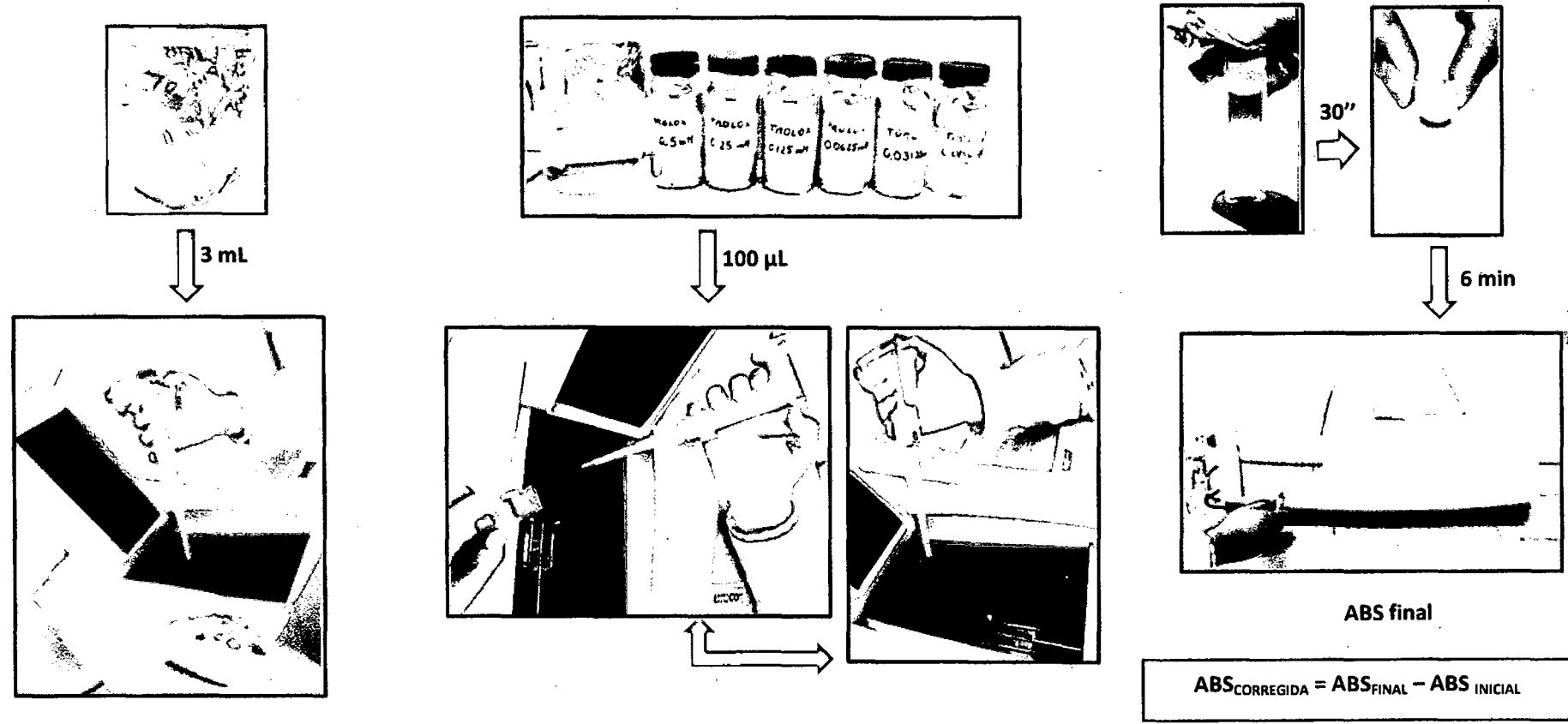
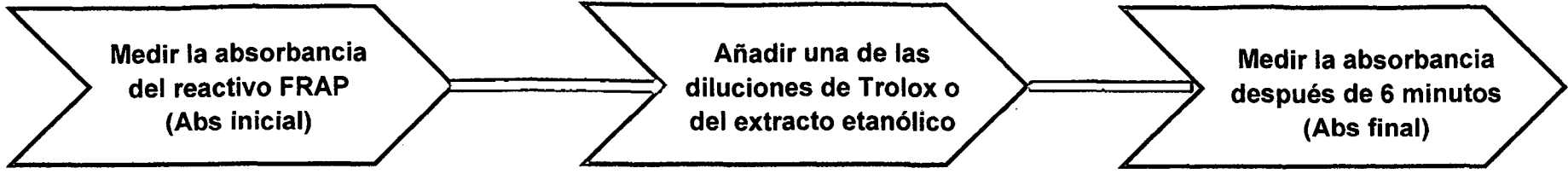


Figura N°21. Flujograma de trabajo de la Actividad Antioxidante - Método FRAP

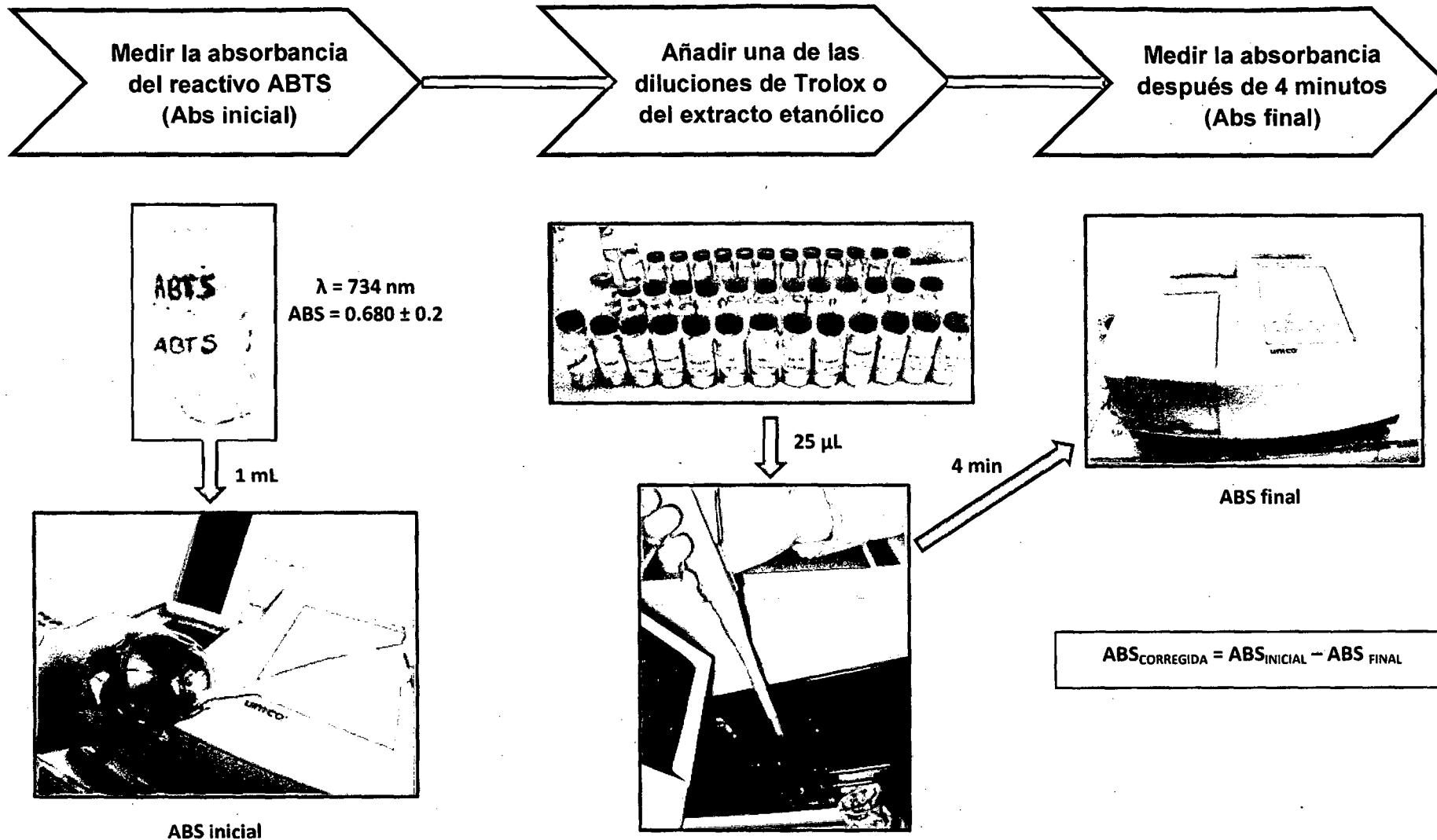


Figura N°22. Flujograma de trabajo de la Actividad Antioxidante - Método ABTS

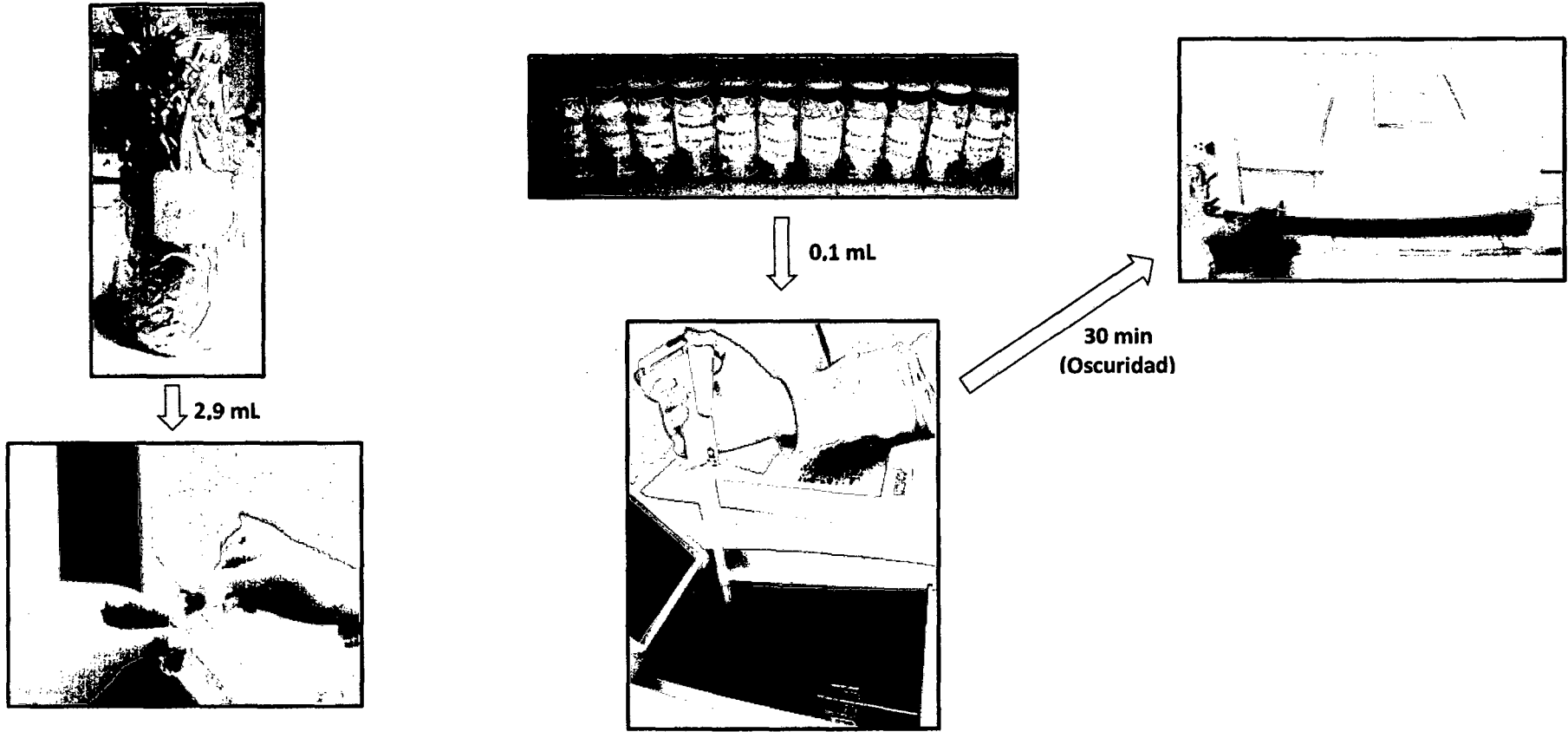
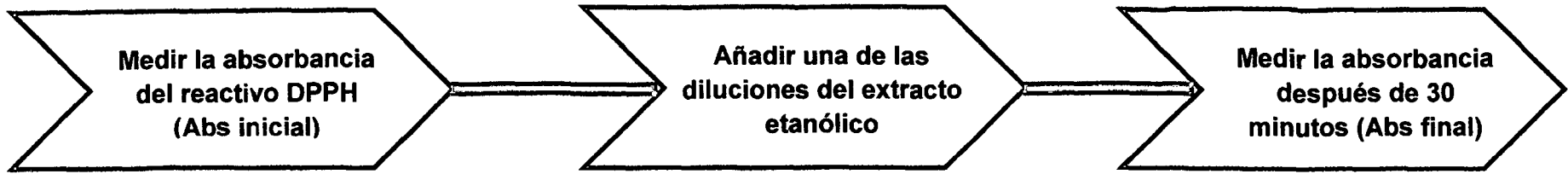


Figura N°23. Flujograma de trabajo de la Actividad Antioxidante - Método DPPH

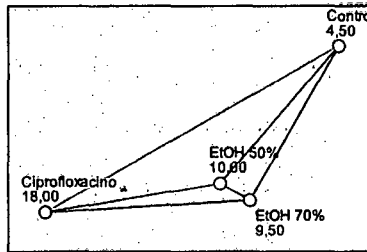
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de bacillus es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,002	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de stafilococcus aureus es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.
3	La distribución de stafilococcus epidermis es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,003	Rechazar la hipótesis nula.
4	La distribución de salmonella es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,003	Rechazar la hipótesis nula.
5	La distribución de enterobacter es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,003	Rechazar la hipótesis nula.
6	La distribución de ecoli es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,002	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura N°24: Prueba de Kruskal Wallis para los diferentes grupos experimentales.

Comparaciones por parejas de grupo



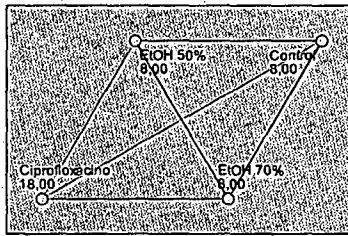
Cada nodo muestra el rango de media de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
Control-EtOH 70%	-5,000	3,608	-1,386	,166	,995
Control-EtOH 50%	-5,500	3,608	-1,524	,127	,765
Control-Ciprofloxacino	-13,500	3,608	-3,741	,000	,001
EtOH 70%-EtOH 50%	,500	3,608	,139	,890	1,000
EtOH 70%-Ciprofloxacino	-8,500	3,608	-2,356	,018	,111
EtOH 50%-Ciprofloxacino	-8,000	3,608	-2,217	,027	,160

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

Figura N°25. Test de Dunns para *Bacillus cereus*.

Comparaciones por parejas de grupo



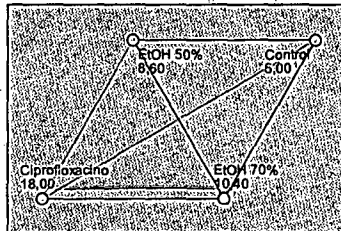
Cada nodo muestra el rango de media de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
Control-EtOH 50%	,000	2,838	,000	1,000	1,000
Control-EtOH 70%	,000	2,838	,000	1,000	1,000
Control-Ciprofloxacino	-10,000	2,838	-3,524	,000	,003
EtOH 50%-EtOH 70%	,000	2,838	,000	1,000	1,000
EtOH 50%-Ciprofloxacino	-10,000	2,838	-3,524	,000	,003
EtOH 70%-Ciprofloxacino	-10,000	2,838	-3,524	,000	,003

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es .05.

Figura N°26. Test de Dunns para *Staphylococcus aureus*

Comparaciones por parejas de grupo



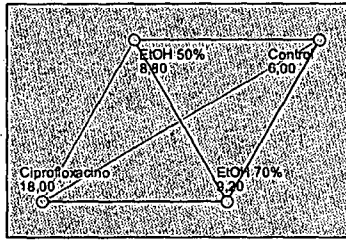
Cada nodo muestra el rango de media de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
Control-EtOH 50%	-3,600	3,551	-1,014	,311	1,000
Control-EtOH 70%	-5,400	3,551	-1,521	,128	,770
Control-Ciprofloxacino	-13,000	3,551	-3,661	,000	,002
EtOH 50%-EtOH 70%	-1,800	3,551	-,507	,612	1,000
EtOH 50%-Ciprofloxacino	-9,400	3,551	-2,647	,008	,049
EtOH 70%-Ciprofloxacino	-7,600	3,551	-2,140	,032	,194

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es .05.

Figura N°27. Test de Dunns para *Staphylococcus epidermidis*

Comparaciones por parejas de grupo



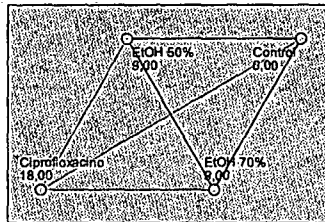
Cada nodo muestra el rango de media de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. adj.
Control-ETOH 50%	-2,800	3,404	,622	,411	1,000
Control-ETOH 70%	-3,200	3,404	-,940	,347	1,000
Control-Ciprofloxacino	-12,000	3,404	-3,525	,000	,003
ETOH 50%-ETOH 70%	-,400	3,404	-,117	,906	1,000
ETOH 50%-Ciprofloxacino	-9,200	3,404	-2,702	,007	,041
ETOH 70%-Ciprofloxacino	-8,800	3,404	-2,585	,010	,058

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

Figura N°28. Test de Dunns para *Salmonella thypi*.

Comparaciones por parejas de grupo



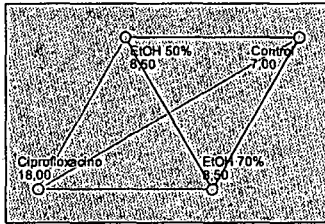
Cada nodo muestra el rango de media de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. adj.
Control-ETOH 50%	-3,000	3,411	,880	,379	1,000
Control-ETOH 70%	-3,000	3,411	-,880	,379	1,000
Control-Ciprofloxacino	-12,000	3,411	-3,519	,000	,003
ETOH 50%-ETOH 70%	,000	3,411	,000	1,000	1,000
ETOH 50%-Ciprofloxacino	-9,000	3,411	-2,639	,008	,050
ETOH 70%-Ciprofloxacino	-9,000	3,411	-2,639	,008	,050

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

Figura N°29. Test de Dunns para *Enterobacter aerogenes*.

Comparaciones por parejas de grupo



Cada nodo muestra el rango de media de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. adj.
Control-EtOH 50%	-1,500	3,181	-.472	,637	1,000
Control-EtOH 70%	-1,500	3,181	-.472	,637	1,000
Control-Ciprofloxacino	-11,000	3,181	-3,459	,001	,003
EtOH 50%-EtOH 70%	,000	3,181	,000	1,000	1,000
EtOH 50%-Ciprofloxacino	-3,500	3,181	-2,987	,003	,017
EtOH 70%-Ciprofloxacino	-9,500	3,181	-2,987	,003	,017

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

Figura N°30. Test de Dunns para *Escherichia coli*.