

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *FRANSERIA*
ARTEMISIOIDES, *RUMEX PALUSTRIS*, *BACCHARIS LATIFOLIA*,
CESTRUM PARQUI Y *PIPER ASPERIFOLIUM* FRENTE A
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, *ESCHERICHIA COLI*, *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA Y *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

ELABORADO POR:

UNIV. LICET VELASQUEZ ALIAGA

TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA
2007

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *FRANSERIA*
ARTEMISIOIDES, *RUMEX PALUSTRIS*, *BACCHARIS LATIFOLIA*,
CESTRUM PARQUI Y *PIPER ASPERIFOLIUM* FRENTE A
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, *ESCHERICHIA COLI*, *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA Y *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

ELABORADO POR: UNIV. LICET VELASQUEZ ALIAGA

ASESORA: DRA. LILY SALCEDO ORTIZ

TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ – BOLIVIA
2007

DEDICATORIA

A mis maravillosos papas, Sonia y Jorge y a mi querida hermanita Christelle. A mis queridas abuelitas Roxana y Teresa Q.E.P.D.

Por su gran apoyo y su incondicional amor.

AGRADECIMIENTO

Sobre todo a Dios por haberme brindado todo lo necesario para llegar a esta etapa de mi camino

A mis padres porque siempre me dieron su apoyo.

A la Doctora Lily Salcedo Ortiz por su apoyo y orientación en la ejecución de este trabajo, ya que sin su apoyo no hubiese podido saciar mi curiosidad

A la Doctora Giovana Almanza de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales por haberme acogido y guiado.

A la Doctora Maria Elena Barriga por su colaboración

A los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por la transmisión de todos sus conocimientos.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como finalidad la determinación de actividad antimicrobiana de extractos acuoso, etanólico, etéreo y diclorometánico de las partes aéreas de *Rumex palustris* (Qentu), la *Baccharis latifolia* (Chillka), la *Franseria artemisioides* (como altamisa), el *Piper asperifolium* (Matico) y *Cestrum parqui* (Andres Huaylla), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.

Del trabajo realizado el extracto diclorometánico de *Rumex palustris* presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* siendo inactivos frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con una concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus* de 500 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 1000 µg/ml. y se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 250 µg/ml. para *Enterococcus faecalis*

El extracto etéreo de *Franseria artemisioides* presento actividad frente a *Staphylococcus aureus* y se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500µg/ml.

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1 Importancia de la Medicina Tradicional en Bolivia	2
2.2 Medicina Tradicional y Ciencia en Bolivia	5
2.3 <i>RUMEX PALUSTRIS</i>	9
2.3.1 Sinomias	9
2.3.2 Descripción botánica de <i>Rumex palustris</i>	9
2.3.3 Usos Tradicionales de <i>Rumex palustris</i>	10
a) Cocimiento	10
b) Infusión	10
c) Cataplasma	10
2.3.4 Antecedentes químicos y biológicos de <i>Rumex palustris</i>	11
2.4 <i>BACCHARIS LATIFOLIA</i>	11
2.4.1 Sinomias	12
2.4.2 Descripción Botánica de <i>Baccharis latifolia</i>	13
2.4.3 Usos tradicionales de <i>Baccharis latifolia</i>	13
a) Cocimiento	13
b) Infusión	13
c) Cataplasma	14
2.4.4 Antecedentes químicos y biológicos de <i>Baccharis latifolia</i>	14
2.5 <i>FRANSERIA ARTEMISIOIDES</i>	15
2.5.1 Sinomias	15
2.5.2 Morfología y Distribución de <i>Franseria artemisioides</i>	15
2.5.3 Usos Tradicionales de <i>Franseria artemisioides</i>	16
a) Cocimiento	16
b) Infusión	16

c) Cataplasma	17
2.5.4 Antecedentes químicos y biológicos de <i>Franseria artemisioides</i>	17
2.6 <i>PIPER ASPERIFOLIUM</i>	18
2.6.1 Sinomias	18
2.6.2 Usos tradicionales de <i>Piper asperifolium</i>	18
a) Cocimiento.	18
b) Infusión	18
c) Cataplasma	18
2.6.3 Antecedentes químicos y biológicos de <i>Piper asperifolium</i>	19
2.7 <i>CESTRUM PARQUI</i>	20
2.7.1 Sinomias	20
2.7.2 Morfología y Distribución de <i>Cestrum parqui</i>	20
2.7.3 Usos Tradicionales de <i>Cestrum parqui</i>	20
8.2.1 Cocimiento.	20
8.2.2 Infusión	21
8.2.3 Cataplasma	21
2.7.4 Antecedentes químicos y biológicos de <i>Cestrum parqui</i>	22
2.8 AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE INFECCIONES	23
2.8.1 Bacterias comunes en lesiones abiertas	24
A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
a) Patogénesis	26
b) Tratamiento	26
c) Mecanismo de Resistencia	27
B. <i>Enterococcus faecalis</i>	28
a) Patogénesis	29
b) Mecanismo de Resistencia	30
C. <i>Staphylococcus aureus</i>	30

a) Patogénesis	31
b) Tratamiento	32
c) Mecanismo de Resistencia	33
D. <i>Escherichia coli</i>	34
a) Patogénesis	36
b) Tratamiento	40
2.9 Concentración mínima inhibitoria MIC y Concentración mínima bactericida MBC	41
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo General	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 MODELO TEORICO	46
5 METODOLOGÍA	49
6 RESULTADOS	53
7 DISCUSIÓN	59
8 CONCLUSIÓN	61
9 RECOMENDACIONES	63
10 BIBLIOGRAFÍA	64

JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional y en especial el uso de las plantas medicinales, es una alternativa de curación utilizada por muchas personas. Se conocen datos bibliográficos de plantas que se usan en el tratamiento de heridas infectadas, y es de interés científico comprobar en laboratorio la eficacia de estas.

En este trabajo se estudian cinco plantas Rumex palustris denominada comúnmente Qentu, Baccharis latifolia conocida con el nombre de Chillka, Franseria artemisoides comúnmente llamada altamisa, Piper asperifolium conocida como Matico y Cestrum parqui de nombre común Andrés Huaylla, ya que todas ellas refieren un uso en la curación de heridas infectas además de que son muy fáciles de obtener en los puestos de venta de hierbas. Es por esta razón el interés de estudiarlas para lo cual se realizaron extractos de las hojas obtenidos a través de procesos químicos como ser la extracción líquido-líquido de etanol, éter y diclorometano, estos extractos serán probados frente a bacterias gram positivas y gram negativas que se encuentran frecuentemente en infecciones de heridas, para comprobar así la actividad antimicrobiana que estas puedan poseer y determinar su concentración mínima inhibitoria y su concentración mínima bactericida. Esperando que los resultados obtenidos sean útiles para la realización de posteriores trabajos de mayor profundidad.

1 INTRODUCCIÓN

Nuestro país cuenta con una riqueza abundante en especies vegetales que contrastan con la pobreza en la que muchas comunidades alejadas se encuentran y estas poblaciones no cuentan con la adecuada atención médica, los problemas de salud que se presentan son resueltos gracias a la utilización de plantas medicinales y son estas plantas las que constituyen la fuente natural de varias sustancias químicas que pueden ser beneficiosas para el hombre, especialmente en la curación de nuevas enfermedades y en la formulación de nuevos antibacterianos ya que la resistencia bacteriana a los tradicionales antibióticos va en aumento, por el uso indiscriminado de éstos.

La infección de heridas, esta dada por varios factores uno de ellos es la proliferación de bacterias, en muchos casos el tratamiento con antibióticos no tiene efecto pues éstas adquieren resistencia a ellos, además muchos antibióticos son de costo elevado y la población afectada no cuenta con los recursos económicos suficientes para adquirirlos y recurren a la utilización de plantas medicinales para su cura, además existe evidencia de que muchos casos han sido resueltos satisfactoriamente. Sin embargo para la ciencia, no es suficiente el conocimiento empírico de los beneficios de las plantas en las prácticas caseras, y por ello se realizan estudios fitoquímicos, biológicos y tóxicos que comprueban científicamente la existencia de determinadas sustancias, las cuales son responsables de la actividad biológica. Estos estudios son numerosos y amplios además de costosos, pero a través de procesos químicos sencillos se pueden dar pautas de la actividad biológica en especial de la actividad antibacteriana.

Es por esto que en el presente trabajo se presentan aspectos como la determinación de actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas, extractos que son obtenidos a través de procesos químicos que después son evaluados contra bacterias gram positivas y gram negativas y poder así determinar la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida CMB por el método de dilución en caldo.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 IMPORTANCIA DE LA MEDICINA TRADICIONAL EN BOLIVIA

La técnica curativa llamada “medicina casera” estuvo en vigencia en los pueblos del Antiguo Perú. Es más, ahora mismo, como un rezago precioso subsiste, y es casi general que en cada hogar se conozca de medicina casera ya que antiguamente se impartían conocimientos de medicina a todos sin excepción. La efectividad de estos métodos curativos está comprobada por el testimonio de las gentes de los pueblos, no hay duda que son conocimientos que nos vienen desde tiempos remotos, y por lo tanto son valiosísimos bajo muchos aspectos, son conocimientos que guardan secretos imponderables en su gran mayoría, y sin embargo, a primera vista pasan como prácticas ridículas. Para reconocer el contexto de la medicina tradicional en los Andes de Bolivia es necesario identificar al valle de Charazani (provincia Bautista Saavedra, departamento La Paz) como epicentro de la cultura Kallawayá que ha contribuido enormemente al conocimiento del uso y manejo de plantas medicinales en región. La cultura Kallawayá está conformada por curanderos itinerantes, considerados como especialistas médicos de gran renombre, por poseer un vasto conocimiento en especies herbáceas y sustancias relacionadas

con la farmacopea tradicional. Este oficio ambulante permitió un despliegue extenso de la práctica de la medicina tradicional, pues cierta fama de curanderos que curan lo incurable trascendió tanto fronteras cercanas hasta ciudades como Tokio, París, Berlín y Roma. Su relevante trayectoria ha llevado al reconocimiento de cosmovisión andina de los Kallawayas, a través de la declaración por la UNESCO, como patrimonio oral e intangible de la humanidad. [2, 11, 23, 32]

Las características ecológicas y culturales de los Andes de Bolivia ofrecen variedad de prácticas respecto a la medicina tradicional, cuyos protagonistas son las plantas medicinales. Se conocen alrededor de 3.000 especies de plantas medicinales identificadas y verificadas en los herbarios del país; sin embargo, las investigaciones no han abarcado la totalidad de las etnias, quienes son los que poseen este conocimiento. En este sentido, la cultura Kallawayas ha contribuido al conocimiento del uso y manejo de plantas medicinales de la región y con importantes medicinas para la humanidad. El conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales contiene elementos esenciales, tales como: sistemas empíricos de clasificación, reconocimiento de hábitats de cada una de las especies y técnicas tradicionales de cosecha, almacenamiento, preparación y suministro de estas plantas a la población. Actualmente, la ciencia médica refuerza el conocimiento tradicional respecto a las bondades de las plantas, logrando identificar sustancias químicas con propiedades terapéuticas, por ejemplo antimaláricas y leishmanicidas. Es así, que estos recursos genéticos representan oportunidades para impulsar el desarrollo económico, enmarcado dentro la sostenibilidad y equidad social. Estos recursos genéticos necesitan ser conservados junto

al conocimiento tradicional que se tiene sobre ellos con continuas investigaciones. [11,32]

A inicios de los años noventa, la Organización Mundial de la Salud identificó que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para asistir problemas de salud, la cual se basa principalmente en el empleo de plantas medicinales. Este alto porcentaje de la humanidad relacionado de alguna manera con la medicina tradicional, permite el mantenimiento de dichos conocimientos. Puesto que usuarios de esta medicina en países desarrollados, buscan una opción menos cara y más "segura", para aquejar dolencias leves y moderadas. Usuarios de países subdesarrollados tienen en esta medicina su principal alternativa (medicina tradicional en general, no solo herbaria). No existe una política reguladora exigentes con respectos a estos productos en la mayoría de los países. Sin embargo, muchas plantas medicinales se encuentran en peligro de extinción, lo cual incide en la pérdida de recursos genéticos. Actualmente no se dispone de información detallada al respecto y la mayoría de los países no cuentan con un inventario completo de sus plantas medicinales. [11, 17, 30,32]

Bolivia, es hoy por hoy el único país de América en que la Medicina Tradicional ha sido aceptada por el Estado, incorporada en un Plan Global de Salud y cuyo ejercicio ha sido también reglamentado por las autoridades pertinentes. Gracias a su alta diversidad cultural y biológica, se ha generado e identificado una amplia gama de prácticas de medicina tradicional, cuya forma de expresión principal es la utilización de diversas plantas. En este sentido, el conocimiento académico del número de plantas medicinales para el país ha incrementado, inicialmente se

estimaba que existían 1.500 especies de plantas medicinales reconocidas esencialmente por los grupos étnicos. Actualmente, se conocen alrededor de 3.000 especies de plantas medicinales identificadas y verificadas en distintos herbarios del país. [12,32]

2.2 MEDICINA TRADICIONAL Y CIENCIA EN BOLIVIA

Actualmente, la ciencia médica refuerza el conocimiento tradicional respecto a las bondades de las plantas medicinales, logrando identificar las sustancias químicas con propiedades terapéuticas. Hoy en día se estima que el 40% de los productos farmacéuticos deriva de productos naturales y movilizan a nivel mundial alrededor de 20 billones de dólares americanos al año; también existen estimaciones que alcanzan los 800 billones de dólares americanos con una tendencia creciente. [13]

Darle un valor agregado a los productos naturales ha generado que se desarrollen acciones relacionadas con la prospectiva de plantas medicinales potenciales en el país. La mayor parte de las acciones fueron ejecutadas desde el lado académico y muy pocas desde el Estado (gobierno central, departamentales, municipales) o de los mismo productores. Los trabajos impulsados desde el estado a través del IBTA (institución que se encuentra fuera de funcionamiento) estuvieron dirigidos al mayor rendimiento de los productos tradicionales y establecidos en el mercado. Así, esta entidad ha desarrollado estudios de elevado manejo tecnológico en muchos de los productos con los cuales actualmente se lleva adelante proyectos de "desarrollo alternativo". El trabajo de algunas ONG's (SAMA, Sol de los Andes), igualmente dirigidos a la mayor producción de productos establecidos en el mercado, y algunos con

potencial, fueron complementadas con algunas investigaciones aplicadas en el nivel de manejo de cultivos orgánicos y sostenibilidad [12,30]

Los múltiples trabajos llevados a cabo por Universidades muestran la orientación a trabajar con nuevos productos de la biodiversidad o incorporar valor agregado a las especies tradicionales. Entre ejemplos a tomar en cuenta tenemos la extracción de aceites esenciales de Paja Cedrón (*Cipponbogon citratos*) y otras plantas aromáticas por el Programa Agroquímico de la UMSS, que desarrollo y adaptó tecnología para muchos otros productos. El PROFAR (Programa de la Carrera de Farmacia y Bioquímica de la UMSS) encontró utilidad en el aceite esencial descrito, como agente contra hongos que afectan a los cítricos. También realizaron estudios en una serie de plantas del valle bajo de Cochabamba entre las que se destacan la existencia de 13 plantas antibacterianas, 21 plantas antifúngicas, 11 plantas con actividad inhibitoria de la xantina oxidasa, enzima responsable de la producción de ácido úrico en la gota (se destacan la Sewenka o *Sena birostris* con uso tradicional conocido). Asimismo trabajaron en la exploración de actividades hipoglucemiantes, encontrando efecto elevado en la *Baccharis genistelloides* (Carqueja) y otras 13 plantas que se reportan para su uso en casos de Diabetes.

La Universidad Mayor de San Andrés se destacan los trabajos de diferentes Institutos de investigación, tal es el caso de SELADIS estudios sobre los efectos inmunomoduladores de la savia de *Musa paradisiaca* y el efecto antiofidico e inhibidor de PLA2 de la Surucuina, planta amazónica usada por las etnias locales, para neutralizar el efecto de las mordeduras de serpientes, en la que se demostró, asimismo, efectos curativos en casos de pancreatitis en modelos experimentales. [6,30]

En el caso de investigaciones realizadas en el IBBA, investigadores bolivianos y franceses descubrieron varios productos antiparasitarios, entre los que se destacan el efecto de la *Galipea longiflora* o Evanta conocido por su efecto antiamebiano en la medicina tradicional y contra la *Leishmania brasilensis* según el uso dado por los Chimanes. También se ha estudiado la *Erythroxylum coca* como regulador del efecto de la altura. Por otro lado recientemente se ha planteado una línea de investigación con su Unidad Biomedicina experimental, para validaciones preclínicas y clínicas, de diversas plantas medicinales de interés en el país, entre lo que destaca *Lepidium meyenii* (maca). El Instituto de Investigaciones Químicas ha trabajado sobre el contenido de diversas plantas, sin incidir en los efectos biológicos; las plantas estudiadas son de predominio de las alturas, como la *Satureja boliviana* o Khoa la más estudiada. Actualmente el laboratorio de productos naturales de este Instituto con otra visión, viene trabajando en varias especies del genero *Baccharis* como planta andina y con especies del genero *Rheedia* de origen amazónico. Un instituto de reciente creación como es el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología en su Unidad de Vigilancia ambiental y toxicológica viene desarrollando estudios de citotoxicidad y genotoxicidad in vitro con diferentes plantas de interés en el país. El Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas ha desarrollado técnicas para valorar efectos antimicrobianos ha estudiado una planta proveniente del Chaco, el Guirakillo (*Solanum lorenzeti*), con efectos antifungicos aunque el conocimiento tradicional de la etnias del Alto Izozog le asignan usos digestivos, otros estudios sobre el Matico (*Piper elongata*) muestran efectos antiinfecciosos y antifungicos sobre otras plantas mosetenes. Dentro de los trabajos conjuntos el Instituto de Genética y SELADIS han realizado investigaciones sobre efectos antimutagenicos de la Sangre de

Drago (*Croton lechleri*) y *Musa paradisiaca* y otras plantas de interés. Destacan los estudios sobre *Stevia rebaudiana* realizados entre la facultad de Agronomía y el Instituto SELADIS en los que se aprecia la importancia de la densidad de la siembra y un efecto hipoglucemiante. [3,4,6,814,15,30,34]

Por otro lado la Facultad de Agronomía en su Instituto de Investigación ha realizado estudios en general dirigidos al rendimiento con especies tradicionales; como estudios de productos novedosos se destaca la Chima (*Bactris gasipaes Kunth*), así como la descripción de la etnobotánica de la comunidad Los Lecos, que muestra perspectivas en el uso racional de la biodiversidad. Asimismo, se realizaron estudios etnobotánicos de especies promisorias en la obtención de aceites esenciales tales como manzanilla, menta, quirquiña. La Carrera de Biología a través de sus Institutos y Unidades Asociadas, estudiaron aspectos puntuales de la flora boliviana, se destacan los estudios etnobotánicos de Los Mosevenes de Santa Ana, y los Mosevenes de los Muchanes. Otros estudios etnobotánicos por demás importantes son los de la flora Guarani Ioseña, de la Provincia O'Connor, el Lomerio en Santa Cruz y otras regiones agrícolas de ese departamento. A pesar de tan interesantes aproximaciones, debe establecerse que, en general los estudios son inconclusos en el sentido que no arribaron casi en ningún caso a proponer procesos productivos factibles. La mayor parte determinan la existencia de algún compuesto o alguna actividad, y no continúan el proceso en las fases consiguientes. Esto se debió a que hasta hace poco tiempo los estudios fueron unidisciplinarios, lo que significa que el estudio es fragmentado, para su continuación en la cadena a espera que otro Instituto o Unidad académica retome el producto y continúe, sin que este sea parte de un plan.

Actualmente se ha comenzado a trabajar en equipos multidisciplinarios que permitan alcanzar a cubrir más eslabones del complejo productivo. (Ej.: descubrimiento-procesamiento-forma de aplicación-uso experimental-validación farmacológica- estudios clínicos y de inocuidad optimización agrícola-producción preindustrial-producción industrial comercialización- etc.). [8,30]

2.3 RUMEX PALUSTRIS

Familia Poligonácea, género *Rumex* y especie *palustris*.

2.3.1 SINOMIAS.- Castellana: Romaza, Acedera, Acedilla, Agrilla, Vinagrera, hierba de la humedad, Aymara: Qentu y Qentulawra; Quechua: Qenturaya y Loq'o loq'o. [13, 27,33]

2.3.2 DESCRIPCIÓN BOTANICA DE RUMEX PALUSTRIS

Es una planta vivaz, con la cepa un poco tuberosa de la cual arrancan numerosas raíces finas. El tallo puede crecer hasta 1 metro de altura suele tomar color vinoso en la base. Las hojas inferiores están sostenidas por un largo rabillo más largo que la lámina que se acorta en las de más arriba hasta desaparecer, todas las hojas son un poco carnosas, bordes enteros, lanceoladas y pecíolo un poco más corto que la lámina. Esta planta tiene hembra y macho pero las flores para ambas forman un gran ramillete bastante flojo. Los pies femeninos echan frutos de unos 2.5 mm., de tres cantos, dentro de las tres piezas internas del cáliz, agrandadas, de bordes enteros, membranosas, con venitas salientes y un gránulo en la base. [33]

2.3.3 USOS TRADICIONALES DE *RUMEX PALUSTRIS*

a) Cocimiento.- El cocimiento de la raíz se unas contra la ictericia, fiebre, mal funcionamiento de los intestinos, estreñimiento, paludismo o malaria, el cocimiento tanto en bebida como en lavados es eficaz contra las alergias y enfermedades de la piel, tiña, sarna, rasca rasca, etc. También se usa el emplasto de las hojas molidas. Se toma diariamente el cocimiento de la raíz para el lumbago o dolor de costado.

El cocimiento de Qentu con un pedazo de Cola de Caballo es un buen remedio para regularizar la menstruación, se toma tres veces al día. Este mismo cocimiento se usa contra la nefritis o inflamación de los riñones.

El cocimiento de Qentu en que se infundona 5 a 6 flores de Manzanilla, es remedio efectivo contra los cólicos hepáticos y la colerina. Este mismo cocimiento se usa en lavajes para aliviar el escozor que produce la erisipela. El cocimiento de la raíz y tres hojas de Altea se usa con buenos resultados contra los flujos de sangre y leucorrea. El cocimiento de la raíz y una ramita de Q'owa, es eficaz contra los mareos nauseas y vómitos.

b) Infusión.- La infusión de la raíz del Qentu y 6 a 8 flores de Jamillu es un remedio que se usa con óptimos resultados contra cistitis, colecistitis, gastroenteritis, nefritis, para esta infusión se debe moler la raíz.

c) Cataplasma.- Las hojas frescas y molidas se aplican como cataplasma sobre los tumores, abscesos y forúnculos para ablandarlos y hacer que la infección salga, este cataplasma aplicado sobre heridas, llagas y úlceras, tienen la virtud de hacerlas cicatrizar.

Las raíces cocidas y ralladas se aplican como emplasto para curar las carachas. Un remedio probado para curar la infección e inflamación de los ojos es hacer gotear en ellos el líquido que se obtiene haciendo la siguiente operación: en una botella muy bien lavada con agua hirviente se pone unas 8 a 10 hojas bien lavadas se cierra el frasco o botella herméticamente y se la deja al sol durante todo el día. Al anochecer se ve que las hojas han “sudado” y que hay un líquido en la botella, este líquido es un “colirio” muy bueno para curar las enfermedades de los ojos. [27,33]

2.3.4 ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOLÓGICOS DE *RUMEX PALUSTRIS*

Esta planta es rica en oxalato de potasio y fósforo, la raíz contiene un alcaloide llamado “rumicina” que se usa como astringente. Además se observan niveles significativos de fitoestrógenos con capacidad de fijación a los receptores de estrógeno. Esta hierba también contiene varias antraquinonas, que son antioxidantes efectivos y depuradores de radicales. Los ingredientes activos glucósidos, flavonoides e hiperina se encuentran en la parte aérea seca de la hierba. [25,32]

2.4 *BACHARIS LATIFOLIA*

Pertenece a la familia Asterácea al género *Baccharis*, especie *latifolia*

2.4.1 SINOMIAS.- *Baccharis floribunda* H.B.K., *Baccharis polyantha* B.H.K., *Baccharis polyantha* H.B.K. f. *genuina* Hier., *Baccharis polyantha* H.B.K. var. *Macrophylla*, *Baccharis nipana* H.B.K., *Molina latifolia* R&P.,

Pluchea glabra Grisebach. Nombres comunes Aymara Ch'illka, Chilco, Algodoncillo, Ciro, Sanalotodo. [1, 25, 27, 33]

2.4.2 DESCRIPCIÓN BOTANICA DE *BACCHARIS LATIFOLIA*

La especie *Baccharis latifolia* es un arbusto que alcanza una altura de 1.5 a 3 metros, ramoso, con ramas delgadas, glabro y resinoso. Hojas simples alternas, herbáceas, pecioladas, con pecíolo de 10-30 mm de longitud y lámina ovado- lanceolada, atenuada y aguda en el ápice, cortamente cuneiforme en la base, uniformemente aserrada en el margen, glabra en ambas caras, de 60 a 150 mm de largo por 20 a 60 mm de ancho.

Las hojas alternas, sésiles (sin pecíolo diferenciado) y lineal lanceoladas (las hojas sirven como una de las características diferenciales por su tamaño y diámetro). Hojas punteado glandulosas. Capítulos numerosos dispuestos en los ápices de las ramas. Involucro campanado, filarias en tres o más hileras o series, de borde hialino (transparente), capítulos sin paleas. Los capítulos femeninos acampanados con involucro de 3.5 – 4 mm de altura por 4 mm. de diámetro ; filarias en 3-4 series las externas ovadas, las internas lanceoladas, con nervadura central oscura.

Flores muy numerosas con corla filiforme; aquenios oblongos, costatos, glabros, de 1.2 mm. de largo pappus blancuzco. Frutos tipo aquenios de color café y glabros. [1, 25, 27]

Posición ambiental: 2500–3600 m.s.n.m. Suelos pesados, deteriorados pero con algo de materia orgánica y humedad; pendientes suaves a moderadas; ocasional en cañadas. Frecuente riparia, ruderal, en potreros compactados y en terrazas de canteras. [1]

2.4.3 USOS TRADICIONALES DE *BACCHARIS LATIFOLIA*

a) Cocimiento.- Los baños con el cocimiento de las hojas, con sal; tienen la virtud no solamente de reducir la inflamación de las articulaciones, sino también de adormecer los nervios y tendones, facilitando de este modo la reducción del hueso o los huesos dislocados

b) Infusión.- La infusión de las hojas de Chillka se toma contra el dolor de estómago causado por el frío, esta misma infusión absorbe los gases y alivia la flatulencia, además es inmejorable contra el asma, las menstruaciones dolorosas y las enfermedades de la matriz. La infusión y cocción de las hojas, tallos e inflorescencias es un buen tónico amargo antidiabético y eupéptico, también es utilizada en las enfermedades hepáticas.

c) Cataplasma.- Las hojas molidas y aplicadas como cataplasma a las luxaciones, torceduras y hernias, son eficaces para desinflamarlas y para fortificar las partes afectadas. Las hojas frescas molidas tienen la virtud de hacer que las heridas se cierren y cicatricen sin infectarse. Las hojas secas, molidas y mezcladas con grasa de llama como pomada desinfectante de heridas Como analgésico contra dolores reumáticos y de la cintura aplicada en cataplasmas.

Las hojas frescas calentadas al sol o sobre las brasas hasta que se ponen pegajosas después de rociarlas con un poco de orina se aplican como parche a las partes afectadas para curar la ciática y los dolores de espalda causadas por el frío, después de poner este parche se envuelve con alguna prenda de lana, las hojas se desprenden del cuerpo después de tres días.

La resina de esta planta se usa para prepara parches para aliviar el dolor del reumatismo, luxaduras, golpes y hernias. El macerado de las hojas en alcohol se usa en fricciones para curar la ciática, la parálisis o aythpi, los espasmos y los encogimientos nerviosos. [1, 25, 32]

2.4.4 ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOLÓGICOS DE *BACCHARIS LATIFOLIA*

De la especie *Baccharis latifolia* existen varios trabajos fitoquímicos, reportan la extracción de cuatro compuestos de las raíces: escualenbaccharis oxido, un derivado de tymol y 3 p-hidroxiacetofenonas, germacreno D, escualeno y un hidrocarburo (sesquiterpeno). La composición del aceite esencial de *Baccharis latifolia* junto a las de otras dos especies, donde se trabajo con cuatro muestras colectadas en tres localidades de Cochabamba de las cuales el compuesto mayoritario es el limoneno, junto a otros sesquiterpenos conocidos como el cubebeno, germacreno D, y cadineno; así como sesquiterpenos monooxigenados.[25]

También se realizaron investigaciones *Baccharis latifolia*, en donde se evaluó la bioactividad de extractos metanólicos frente a diversos microorganismos responsables de patologías comunes: *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; donde se determinó actividad antimicrobiana frente a *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*; además, de presentar citotoxicidad frente a *Artemia salina* Leach. [19]

2.5. FRANSERIA ARTEMISIOIDES

Familia Asteráceae (Compositae).

2.5.1 SINOMÍAS.- Artemisa, ambrosia silvestre, marco, artemiasa, altamisa, madre hierba (Santa Cruz), ajenjo (Tiraque), uriuri (Tarata), artemisa, Aymara marckhu. [22, 25, 33]

2.5.2 MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *FRANSERIA ARTEMISIOIDES*

Sufrútices de 0.5-3.0 metros de altura, olor aromático. Hojas alternas de 10 a 20 cm. de longitud por 7-18 cm. de ancho, margen sectado, haz glabrescente, envés densamente albescente, pecíolo de 2-3 cm de largo, inflorescencia de 15 -30 cm de longitud en panícula de densos racimos de capítulos, verde rojiza, capítulos unisexuales, monoicos. Capítulos verde amarillentos, con flores tubulares. Involucro endurecido. Capítulos masculinos pequeños dispuestos en el ápice de los ramos los femeninos dispuestos en las axilas de las hojas superiores. Flores masculinas con gineceo rudimentar, estilo indiviso, dilatado en forma de pincel en el ápice. Cipselas rudimentares. Flores femeninas con estilos profundamente divididos. Cipselas ovoides, crasas, glabras.

Crece frecuentemente en terrenos abandonados de la región interandina entre 2250 -3500 m.s.n.m.. La planta ha sido utilizada ampliamente por los aborígenes, mucho tiempo antes de la conquista española. [27]

2.5.3 USOS TRADICIONALES DE *FRANSERIA ARTEMISOIDES*

a) Cocimiento.- Se recomiendan los baños con el cocimiento de las hojas y las fricciones con la tintura de Altamisa para los dolores de tipo reumático. Las hojas previamente calentadas sobre las brasas o el fuego, se usan en fricciones para aliviar dolores del reumatismo, los calambres y golpes de aire.

El cocimiento de la raíz de Altamisa actúa contra la epilepsia o “t’uku usu”, los espasmos y la hidropesía. El cocimiento de las hojas en una botella de agua se usa en baños para aliviar el escozor y el ardor que provoca la rasca rasca, la alergia, la erisipela y otras enfermedades de la piel.

b) Infusión.- Para los problemas de la menopausia femenina y para combatir el histerismo, se toma tres veces al día la infusión de una hoja de Altamisa para un jarro de agua hirviendo.

Se recomienda para la artritis, reumatismo, osteoporosis y osteoartritis, se toma por siete días, se descansa, tres y se vuelve a comenzar, así por 3 a 6 meses. La misma infusión mas dos hojas de Itapallu cura la menstruación dolorosa y la inflamación de la matriz.

La infusión de una hoja y un pedazo de Sanu Sanu en un jarro de agua hirviendo de da excelentes resultados en la curación de las disentería y la quebrazón o retención de orina.

Para curar el “Ilejti”, la enfermedad llamada corea o Baile de San Vito y escorbuto, se recomienda tomar en ayunas y durante cinco días seguidos la infusión con una hoja de altamisa y dos de hierba buena. La infusión de altamisa más Ruda se usa en los casos de retención de

placenta y problemas después del parto que se conocen con el nombre de “entuerto”.

c) Cataplasma.- Las hojas recalentadas sobre las brasas y rociadas con un poco de orín, se aplican como cataplasma para curarse de la tortícolis o “aire” y deshinchar contusiones las hojas trituradas y aplicada sobre superficies inflamadas o ulceradas ejercen efecto antiséptico y antiinflamatorio, en cataplasma es remedio para el dolor de espalda, gota, tortícolis y contusiones, además de aplicarse como cataplasma las hojas, incienso y grasa. [23,33]

2.5.4 ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOLÓGICOS DE *FRANSERIA ARTEMISOIDES*

Investigaciones recientes han demostrado cuatro lactonas sesquiterpénicas, en las hojas: la damsina, la coronofilina, la psilostaquina y la psilostaquina C. En las semillas se han encontrado la damsina y la coronofilina. El aceite esencial es rico en monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados y algunos hidrocarburos sesquiterpénicos. Los componentes más abundantes son el isoborneol, el δ -curcumeno, el δ -cadimeno, el corotol y δ -fameseno. Son muy pocos los estudios realizados. in vitro se han encontrado que la coronofilina posee actividad antibacteriana contra el *Bacillus subtilis* y el *Micrococcus oxford*, así como contra ciertos insectos dípteros. La damsina en cambio, tiene actividad moluscicida. Dosis altas en la infusión o la decocción pueden producir náusea, vómito, diarrea y efecto depresivo del sistema nervioso central. [25]

2.6 PIPER ASPERIFOLIUM

Familia Piperácea.

2.6.1 SINOMÍAS.- Piper elongatum Trelease en Castellano Matico, Moqo moqo. [33]

2.6.2 USOS TRADICIONALES DE PIPER ASPERIFOLIUM

a) Cocimiento.- El cocimiento de las hojas en lavajes es desinfectante y cicatrizante. Como remedio para la inflamación de matriz y de próstata; así como las almorranas, se toman baños de asiento con el cocimiento de las hojas de Matico, se usa también el cocimiento en lavados para detener las hemorragias y aceleración de cicatrización de heridas.

b) Infusión.- La infusión de un pedazo de la hoja de Matico para un jarro de agua hirviendo, es remedio probado para las úlceras del estómago, los desarreglos en el flujo menstrual, la hematuria y la blenorragia o gonorrea, es incomparable contra las infecciones del estómago, riñones y matriz. La infusión de las hojas mas un pedazo de la raíz de Khari khari es un poderoso remedio contra la leucorrea o flujos vaginales. Para combatir a los parásitos se toma en ayunas mas tres dientes de ajo.

c) Cataplasma.-El cataplasma de las hojas cocidas y aplicadas a los lugares dañados, son un eficaz remedio para heridas que no cicatrizan, las hojas molidas se aplican sobre heridas para contener las hemorragias y acelerar la cicatrización.

Las hojas soasadas se aplican sobre las carachas o sarna. También se espolvorea el polvo que resulta de moles las hojas secas mezcladas con una cucharilla de azufre y azúcar en polvo en llagas y heridas que no cicatrizan

Para la hinchazón de los pies o cualquier otra parte del cuerpo se hace fricciones a las partes afectadas con el alcohol en que se han macerado semillas del matico. [22,33]

2.6.3 ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOLÓGICOS DE *PIPER ASPERIFOLIUM*

Se realizaron trabajos de investigación que nos muestran una actividad de extractos acuosos del matico frente a *Pseudomonas aeruginosa* y de extractos orgánicos frente a *Staphylococcus aureus*. [26]

Unos de los componente más importante, desde el punto de vista cuantitativo, y al que se atribuye en parte sus virtudes cicatrizantes, es el tanino. Esta sustancia se encuentra en una concentración de 5,7%. Otros constituyentes importantes son varios tipos de alcaloides, a los que se les atribuye un efecto relajador de la musculatura lisa. Por último, se señala la presencia de numerosos glucósidos, especialmente de tipo flavonoides.

Sin duda, la principal propiedad medicinal de esta planta es la de ayudar en la cicatrización de todo tipo de heridas, ya sea externas o internas. De aquí deriva su utilidad en el tratamiento de la úlcera digestiva. Externamente, su efecto benéfico sobre heridas de lenta cicatrización es muy sorprendente, lo que ha contribuido en mayor medida a su gran reputación. [5]

2.7 CESTRUM PARQUI

Familia Solanáceas, Género *Cestrum*

2.7.1 SINOMÍAS.- Andrés Waylla, Hierba Santa, Wajchi o Jasq'ó [33]

2.7.2 MORFOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN DE CESTRUM PARQUI

Arbusto de 1 a 3 m. de altura, ramoso, fétido, glabro. Hojas cortamente pecioladas, herbáceas, lanceoladas u ovado-lanceoladas, generalmente agudas en el ápice y atenuadas en la base, enteras, glabras, de 4 a 14 cm. de longitud, por 1 a 4 cm. de ancho.

Flores numerosas, sésiles o cortamente pediceladas, dispuestas en glomérulos o cimas corimbiformes, racimiformes axilares y terminales; cáliz tubuloso, atenuado en la base, de 4 a 6 mm. de longitud, subbilabiado, con 5 dientes de 1 a 1.5 mm., glabros a excepción del borde de los dientes; corola de 20 a 25 mm. de longitud, con tubo interior velludo en su mitad inferior, y limbo con 5 a 6 lóbulos ovados de 3 a 6 mm. de longitud, tomentuloso en su borde externo; estambres soldados al tubo corolino desde algo más arriba de su mitad, engrosados en la zona de inserción y muy velludos hasta la base del tubo corolino; estilo filiforme con estigma capitado bilobado. Frutos bayas negras, ovoides de 7 a 10 mm. de longitud. Semillas pocas, de 2 a 5 mm. de longitud.[1,22]

2.7.3 USOS TRADICIONALES DE CESTRUM PARQUI

a) Cocimiento.- El cocimiento de las hojas se usa para el tratamiento de todo tipo de erupciones de la piel, como ser, herpes, alergias, etc. Para

las almorranas se realizan baños de asiento o fomentos. El cocimiento de las hojas se bebe para curar la pulmonía, los lavajes con este mismo cocimiento son de gran ayuda para la curación de la sífilis o “Wanthi”.

Contra la supuración de oídos se recomienda los lavados con el cocimiento de las hojas. El cocimiento de las hojas mas hojas de Orqo Itapallu se usan en baños para curar la gonorrea, para combatir sarpullido y la varicela, también para secar las ampollitas y granos del cuerpo.

b) Infusión.- La infusión de las hojas es un eficaz remedio contra la disentería y las infecciones intestinales, se toma tres veces al día durante una semana. Añadiéndole una ramita de Manzanilla sirve para las inflamaciones estomacales y las inflamaciones del hígado.

La infusión de tres hojas de Andrés Waylla y una hoja de Q’ara Llanten se toma para el cáncer de mama una vez al día por siete días, en intervalos por varios meses.

Esta infusión más un pedazo de la raíz de Qentu se toma como remedio para los forúnculos.

Un remedio para curar las sinusitis es el de sorber por la nariz durante 15 noches seguidas la infusión de Andrés Waylla, media cucharilla de Orégano, y hojas de Q’ara Llanten y un poco de sal.

c) Cataplasma.- Las hojas tiernas molidas, aplicadas como pomada curan loas carachas, la tiña, los fuegos de la boca, etc. Las hojas aplicadas como parche curan las heridas infectadas, las picaduras de insectos y los abscesos. [22,33]

2.7.4 ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOLÓGICOS DE *CESTRUM PARQUI*

Se han encontrado que contiene esterino libre y una gran cantidad de esterino y éster esteringlicósido, también se encontraron saponinas básicas. Posee un alcaloide denominado parquina y un glucósido llamado parquinósido (hepatotóxicos) los cuáles varían en concentración a lo largo del año. Toda la planta es tóxica, inclusive las hojas secas. Esto es importante ya que si se administra forraje conservado que pudiera tener hojas de duraznillo negro, la intoxicación podrá presentarse. En animales rumiantes y cerdos puede causar insuficiencia hepática grave produciendo la muerte del animal.

En Cochabamba se realizaron tratamientos de infecciones en heridas con *Sarcoptes scabiae*, se elaboraron formas farmacéuticas alternativas y a bajo costo en base a extractos de *Cestrun Parqui L'Herit*. Las pruebas in vitro evidenciaron que los extractos etanólicos de *Cestrun Parqui L'Herit* presentan actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (ATCC 96934) e inhibición contra el ácaro *Sarcoptes scabiae*. Los mejores resultados se obtuvieron con formulaciones galénicas en base a geles de Carbopol al 5% del extracto etanólico con una concentración de 12.52% en sólidos totales. También se determinó la presencia de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de *Cestrun Parqui L'Herit* mediante ensayos de identificación cualitativa de Flavonoides, Alcaloides, Saponinas y Taninos.

[35]

2.8 AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE INFECCIONES

Las heridas son lesiones físicas que se caracterizan por un desprendimiento de la piel que generalmente se produce por un accidente o traumatismo, más que de una enfermedad, por ende de cierta forma quedamos susceptibles a tener una infección. La infección es el resultado final de complejas interacciones dinámicas que ocurren entre un huésped, un patógeno potencial y el entorno. Se produce cuando los microorganismos consiguen superar con éxito las estrategias de defensa del huésped y sus resultados son un conjunto de cambios nocivos para el mismo. La infección de heridas quirúrgicas, por gérmenes oportunistas, ya sean provenientes de la comunidad o nosocomiales, es una problemática creciente, debido a la gran morbimortalidad asociada a ella. [16,21]

De ocurrir infecciones en las heridas, los gérmenes frecuentemente asociados son *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Streptococcus* y anaerobios; con una amenaza creciente de microorganismos resistentes, principalmente por el uso no racional de los antibióticos, este hecho conlleva una necesidad imperante de mejorar los sistemas de diagnóstico y la utilización correcta del esquema terapéutico y la búsqueda de nuevos principios activos para nuevos tratamientos.[17,21]

No todas las heridas ofrecen las mismas condiciones y, por tanto, las diferentes heridas permiten el crecimiento de distintas comunidades de microorganismos. La adquisición de especies bacterianas por una herida puede tener tres resultados claramente definidos:

Contaminación.-Todas las heridas pueden adquirir microorganismos. Si la especie bacteriana no dispone de las condiciones físicas y de nutrición adecuadas, o si no es capaz de superar con éxito las defensas del huésped, no se multiplicará ni sobrevivirá; por tanto, su presencia será sólo transitoria y no habrá retraso de la cicatrización.

Colonización.- Las especies microbianas logran crecer y multiplicarse, pero no producen daños al huésped ni desencadenan una infección.

Infección.- El crecimiento, la multiplicación y la invasión microbianos de los tejidos del huésped provocan lesiones celulares y reacciones inmunitarias manifiestas en el huésped. La cicatrización de la herida se interrumpe. Los factores locales pueden incrementar el riesgo de infección.

Existen una serie de patógenos que se asocian con infecciones de heridas, un patógeno que se asocia con frecuencia a secreciones purulentas es el *Staphylococcus aureus*, aunque también son habituales las enterobacterias *Pseudomonas aeruginosa* y las especies de los anaerobios, *Bacteroides* y *Clostridium*. [16, 20, 21]

2.8.1 BACTERIAS COMUNES EN LESIONES ABIERTAS

A. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Las *Pseudomonas* son bacilos rectos o ligeramente curvos Gram negativos, quimiorganotróficos aerobios que no presentan nunca un metabolismo fermentativo.

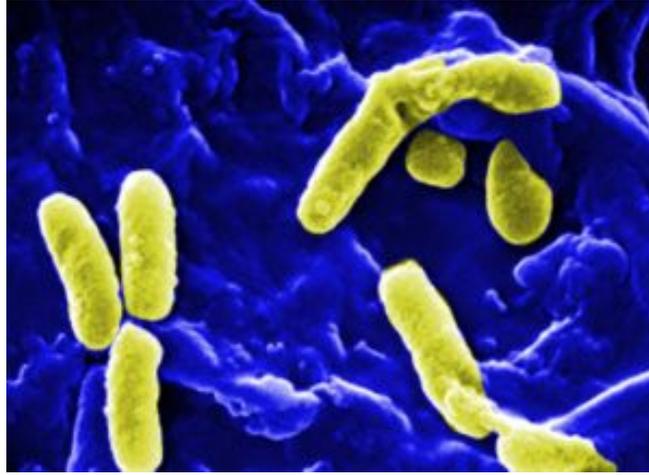
Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista para los humanos, se asocia frecuentemente a infecciones de los tractos urinario y respiratorio, también son comunes en pacientes que reciben tratamiento contra quemaduras graves u otras afecciones traumáticas de la piel.

Además de de infecciones urinarias, también puede causar infecciones sistémicas, normalmente en individuos que tiene una gran parte de la superficie corporal dañada y heridas cutáneas que exudan, las infecciones respiratorias bajas pueden ser potencialmente letales en huéspedes inmunocomprometidos, también puede causar infecciones oculares que pueden ser devastadoras.

La queratitis, la infección de úlceras corneales y la endoftalmitis pueden llevar a una pérdida permanente de la vista. Casos de endocarditis, meningitis, abscesos cerebrales e infecciones de huesos y articulaciones por diseminación hematológica aparecen con regular frecuencia.[21]

Secreta una variedad de pigmentos, como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente), y piorubina (rojo pardo), es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y olor a grapa in vitro. La identificación definitiva clínica de *Pseudomonas aeruginosa* frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína como la capacidad de crecer a 42 °C. [24]

Pseudomonas aeruginosa al microscopio de escaneo Raster



a) PATOGENESIS

Al parecer la lesión inicial provocada por la *Pseudomonas aeruginosa* al epitelio y otras mucosas está mediada por pili o fimbrios y por un exopolisacárido mucoide conocido como alginato. Existen receptores de estas adhesinas en las células epiteliales. El microorganismo produce diversas enzimas extracelulares como la proteasa alcalina, elastasa, fosfolipasa, citotoxina y exoenzimas A y S. la alteración de los tejidos del huésped por estos productos bacterianos extracelulares crea las condiciones necesarias para la proliferación e invasión bacteriana y la consiguiente destrucción del tejido. [20,24]

b) TRATAMIENTO

Pseudomonas aeruginosa es naturalmente resistente a una gran cantidad de diferentes familias de antibióticos. Es indispensable usarlos

con una guía de tratamiento acorde con los resultados de antibiogramas, más que a elegir determinado antibiótico empíricamente.

Los antibióticos que han mostrado actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* incluyen:

- aminoglicósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina)
- quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina pero no moxifloxacina)
- cefalosporinas (ceftazidima, cefepima, cefpiroma, pero no cefuroxima, ceftriaxona, cefotaxima)
- ureidopenicilinas (piperacilina, ticarcilina: *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a todas las otras penicilinas)
- carbapenemos (meropenemo, imipenemo, y noertapenema)
- polimixinas (polimixina B, colistina)
- monobactamas (aztreonama)

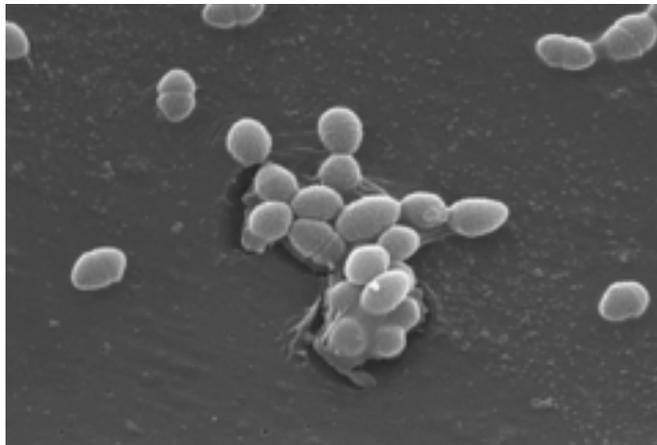
Estos antibióticos deben aplicarse siempre por inyección, con la excepción de las fluoroquinolonas. Por esta razón, en algunos hospitales, la fluoroquinolona está severamente restringida para evitar el desarrollo de razas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. [16, 20,21]

c) MECANISMOS DE RESISTENCIA

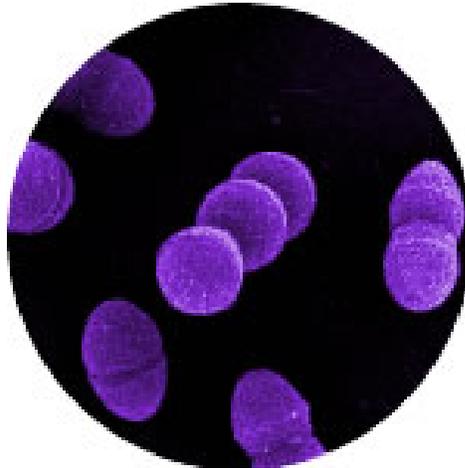
La resistencia se debe normalmente a un plásmido de transferencia de resistencia, que lleva genes que codifican la detoxificación de varios antibióticos. [24]

B. ENTEROCOCCUS FAECALIS

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram-positiva comensal, que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Como otras spp. del género *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital, actúa como patógeno oportunista en pacientes añosos con enfermedades subyacentes graves y en aquellos inmunocomprometidos que han estado hospitalizados por períodos prolongados, en los que se usaron dispositivos invasivos o que recibieron terapia antimicrobiana de amplio espectro. A pesar de su baja virulencia, pueden ser causantes de infecciones del tracto urinario, sangre, abdomen, heridas y catéteres. La existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a virtualmente todos los antibióticos en uso. Estos microorganismos se han convertido actualmente en notorios patógenos nosocomiales.[20]



Enterococcus faecalis con microscopio de barrido electrónico



Enterococcus faecalis [36]

a) PATOGÉNESIS

Existen diferentes determinantes de patogenicidad entre ellos podemos mencionar:

- Citolisinas
- Factores de agregación que permite la adherencia con otros enterococos.
- Proteasas como gelatinasa con actividad endopeptidasa
- Hialuronidasa que es un factor de difusión y actividad mucopolisacarida
- AS-48 bacteriocina activa frente a otras bacterias.

Debido a que la mayoría de los enterococos son tolerantes a la acción bactericida de los betalactámicos y glucopéptidos, es necesaria la sinergia bactericida entre alguno de estos antibióticos y un aminoglucósido para tratar las infecciones más graves. [9]

b) MECANISMOS DE RESISTENCIA

Estos organismos gram positivos son usualmente resistentes a múltiples antimicrobianos como polimixinas, lincosamidas, trimetoprima-sulfametoxazol, cefalosporinas y tienen actividad reducida frente a agentes activos contra la pared celular como los betalactámicos y la vancomicina. Las infecciones causadas por *Enterococcus faecium* altamente resistente a betalactámicos han sido tratadas exitosamente con vancomicina durante casi treinta años. La emergencia de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina en la década del '80 fue seguida por un incremento en la frecuencia de recuperación de estas especies en diversos hospitales. Subsecuentemente, los enterococos resistentes a vancomicina se diseminaron con inusitada rapidez y son hoy causa común de infecciones difíciles de tratar en diversas regiones del planeta.

La trascendencia clínica de estas bacterias se debe fundamentalmente a su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos y a su habilidad natural para adquirir, acumular y compartir elementos extracromosomales que codifican factores de virulencia o genes de resistencia a los antimicrobianos, dándoles ventaja para sobrevivir en condiciones inusuales de estrés ambiental. [28]

C. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y

también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo, es la única especie estafilocócica humana que produce coagulasa, esta enzima es también producida por *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermedius*, pero estas son cepas de animales y no están asociadas a infecciones humanas. El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. Estas bacterias también viven sin causar daño en los pasajes nasales. Pueden causar desde infecciones leves y graves e incluyen abscesos, impétigo, forúnculos, carbunco e infecciones sistémicas "graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis. Este tipo de infección se ha denominado "síndrome de la piel escaldada" estafilocócico. Puede producir enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis. [16, 20,21]

a) PATOGÉNESIS

El *Staphylococcus aureus* elabora una variedad de toxinas extracelulares, incluyendo α -, β -, y δ - hemolisinas, coagulasas, hialuronidasas, exfoliatina, leucocidina y lipasa. La coagulasa puede proteger a las células bacterianas de la fagocitosis cubriendo los neutrófilos con fibrina. La proteína A, un componente de la pared celular puede unirse a la región Fc, de las moléculas de inmunoglobulina e interferir en la opsonización y fagocitosis. Las hialuronidasas son

enzimas que hidrolizan el cemento intercelular de los tejidos, facilitando la diseminación de los microorganismos. Las exfoliatinas también tienen esta capacidad, pero su acción está limitada al estrato granuloso de la piel, produciendo ampollas y escaras en la epidermis. Las leucocidinas son exotoxinas que ejercen efectos tóxicos directos sobre los neutrófilos, granulación de los lisosomas celulares y muerte celular. Las cepas recuperadas de carbunclos y forúnculos en general producen lipasas capaces de hidrolizar los lípidos de la piel, lo que permite la diseminación del microorganismo. Las enterotoxinas estafilocócicas, un grupo de proteínas termoestables de cadena simple con un peso molecular de 28 000 a 35 000 dalton, se dividen en siete tipos: A, B, C, C2, D, E y F. Las enterotoxinas A y B habitualmente se asocian con envenenamiento estafilocócico de alimentos humanos; la enterotoxina B por lo común es producida por cepas relacionadas con infecciones hospitalarias. [21]

b) TRATAMIENTO

Cloxaciclina, o penicilina G, si no es productor de beta-lactamasas, (CIM < 0.06 mg/l). Como bacteria gram positiva su pared es rica en peptidoglicano. Sin embargo actualmente más del 90% es resistente a la penicilina ya que producen beta-lactamasa que destruye a la penicilina, los medicamentos empleados para tratar las infecciones por esta bacteria son los antibióticos resistentes a penicilasas, Vancomicina (es el antibiótico de elección en caso de resistencia a la cloxaciclina), cotrimoxazol, cefalosporina, amoxicilina asociada a ácido clavulánico, imipenem, clindamicina, ciprofloxacino o un aminoglicósido (no debe utilizarse como fármaco único).

Además que su elección, dosis, vía de administración y duración del tratamiento dependerá de la localización de la infección, de la respuesta del paciente al tratamiento y de la sensibilidad de los microorganismos aislados.

El único tratamiento necesario para una infección cutánea local por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina es drenar el absceso. Hay disponibilidad de unos cuantos antibióticos para este tipo de infecciones más serias, entre los cuales se pueden mencionar vancomicina (Vancocin, Vancoled), trimetoprim con sulfametoxazol (Bactrim, Bactrim-DS, Septra, Septra-DS) y linezolid (Zyvox).

Es importante terminar con todas las dosis de antibióticos que han sido suministradas, incluso si la persona se siente mejor antes de la dosis final, dado que las dosis incompletas pueden llevar al desarrollo de resistencia al medicamento por parte de las bacterias. [20,21,24]

c) MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los antibióticos B- lactámicos son potentes inhibidores de la síntesis de la pared celular, la síntesis de la pared es la reacción de transpeptidación que da como resultado la unión, mediante enlaces transversales, de dos cadenas de peptidoglicano. Las enzimas que cumplen esta función son las transpeptidasas que son capaces de unirse a la penicilina u otros antibióticos con anillo B-lactámico. Las B-lactamasas son enzimas que rompen el anillo B-lactámico, la base de la resistencia es plasmídica. Las B –lactamasas de los estafilococos son

inducidas por exposición a las penicilinas, son responsables de la mayor parte de las resistencias a la penicilina G y compuestos relacionados, pero no son activas contra las cefalosporinas ni contra las penicilinas penicilinasarresistentes, como la metilicina o la nafcilina. La resistencia del *Staphylococcus aureus* a las penicilinas penicilinasarresistente es difícil de detectar en el laboratorio, esta especie es heterorresistente, es decir, sólo una pequeña fracción de las bacterias en un cultivo muestran resistencia, una característica que es mediada cromosómicamente, las células resistentes crecen más lentamente que las bacterias susceptibles. [24]

D. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli es el organismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. Es una bacteria Gram negativa típica de la familia Enterobacteriaceae. El análisis de 16rRNA muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias γ . misma que se encuentra muy relacionada a las otras proteobacteria (α β δ) y a las cianobacterias. La subclase de proteobacterias γ , incluye además a organismos patógenos de humanos, como son *Shigella*, *Samonella*, *Vibrio* y *Haemophilus*. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente: anaeróbicamente en el interior del intestino y aeróbicamente en el ambiente exterior.

En particular, *Escherichia coli* utiliza azúcares sencillos como la glucosa, produce ácido y gas en presencia de lactosa y como *Escherichia coli* no

es una bacteria fijadora, requiere nitrógeno soluble como el sulfato de amonio.

Generalmente se considera que el habitat "normal" de *Escherichia coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos), y que aunque se pueden localizar estas bacterias en el medio externo, tradicionalmente se consideraba que su presencia representaba contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podía reproducir en el medio exterior. Sin embargo, resultados recientes indican que esto es falso.

Existen *E. coli* que viven en otras partes del tracto digestivo, como las *E. coli* patógenas que pueden habitar en la sangre y en el tracto urogenital. Adicionalmente, es posible encontrar poblaciones de *E. coli* en vertebrados de sangre fría. Por otro lado, también se han encontrado cepas particulares en ambientes acuáticos, especialmente los que son ricos en compuestos orgánicos como en el desagüe. La densidad de *E. coli* en intestino grueso es de uno a diez millones de células por gramo de colon. Esto hace de *E. coli* un componente menor de la flora predominantemente anaerobia de esta parte del intestino, donde la densidad bacteriana total es de unas 10^{11} células por gramo. *E. coli* es una de las primeras especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas del canal de parto y de las heces de su madre. Las colonizaciones posteriores se deben por lo general a la ingestión de alimentos contaminados. Usualmente hay una cepa dominante de *E. coli* por hospedero, sin embargo la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación o por ingestión, hace que esta

dominancia sea sólo temporal y que la dinámica este dictada por procesos tanto aleatorios (deriva génica) como adaptativos. [29]

Se distinguen varios tipos:

- E. coli enteropatogénica (EPEC)
- E. coli enterotoxigénica (ETEC)
- E. coli enteroinvasora (EIEC)
- E. coli enterohemorrágica (EHEC)
- E. coli enteroagregativa (EAEC)
- E. coli difusamente adherente (DAEC)



Escherichia Coli

a) PATOGÉNESIS

Dentro de las bacterias causantes de enfermedades gástricas importantes, se encuentra *Escherichia coli*, la cual puede ser responsable de diarreas y de enfermedades que llegan a ser muy graves, como la colitis hemorrágica y síndrome urémico. Sin embargo,

existen varias maneras de interactuar con el epitelio intestinal y de causar diarrea por *E. coli*. [20]

- Las cepas enterotoxigénicas (ETEC) son consideradas el prototipo de la cepa diarreica. El mecanismo principal de la ECET es la liberación de las enterotoxinas termolábil y termoestable, que produce una diarrea acuosa. Se parece mucho a *V. cholerae* no hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Estos organismos colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias. Estas fimbrias tienen una regulación compleja, una vez adheridas, las cepas ETEC elaboran las toxinas LT y/o ST, las cuales son transportadas al interior de la célula del hospedero causando una diarrea osmótica. Es una causa frecuente de diarrea del viajero. Las cepas de *E. coli* tipo enteropatógenicas (EPEC) causan un patrón característico de lesión localizada, donde las bacterias interactúan con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia / destrucción” o lesión A/E (attaching and effacing). La adherencia inicial está relacionada a la producción de la fimbria BFP (Bundle Forming Pilus), el cual se requiere para la producción de diarrea por EPEC. La expresión de la fimbria BFP de *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC), responde positiva o negativamente a señales ambientales que pudieran encontrarse en el hospedero y determinar la adherencia bacteriana a la superficie de las células del epitelio intestinal. La regulación coordinada de estos genes involucrados en la patogénesis es una necesidad importante para la adaptación de las bacterias patógenas a los

diferentes ambientes encontrados dentro del hospedero durante la infección.

- *E.coli enterohemorrágicas* (EHEC) es considerado como una enfermedad emergente, ya que hasta 1993 no se había reconocido como un peligro para la salud pública. En su patogenia intervienen citotoxinas codificadas por fagos que recibieron inicialmente el nombre de verotoxinas, porque actuaban a nivel de las células vero; actualmente se denominan toxinas Shiga símil I o II (shiga-like) porque se parecen a las toxinas de la *Shigella*. Como estas toxinas están codificadas por fagos, basta que este fago pueda lisogenizar, es decir, adherirse al cromosoma de algún otro tipo de coli, para conferirle la capacidad de producir esta toxina, de modo que ella no es exclusiva del O157/H7. La enfermedad causada por esta cepa es especialmente virulenta, ya que induce una toxemia generalizada con diarrea hemorrágica y en los casos más graves, la muerte, la cual se debe a un síndrome urémico hemolítico y el púrpura trombocitopénico trombótico. Las cepas EHEC tienen el mismo mecanismo de adhesión y la misma "isla de patogenicidad" que las EPEC, sin embargo, debido a la presencia de un plásmido de 60M daltones, estas cepas producen una toxina hemolítica. Las EHEC son capaces de invadir la célula eucarionte, entrar en la corriente sanguínea y secretar toxinas similares a las de *Shigella*.
- Las cepas de *E. coli enteroagregativas* (EAEC) causan diarrea persistente en niños. Al igual que las cepas ETEC, estas células

producen toxinas ST y hemolisinas y se adhieren al intestino delgado y no son invasivas. Sin embargo a diferencia de las ETEC, estas cepas están típicamente cubiertas por estructuras fibrilares delgadas que se suponen son estructuras adhesivas que les permiten agregarse en cúmulos. Estos filamentos delgados son muy similares a los observados en *Salmonella*. Sin embargo, varios estudios sugieren que las cepas EAEC son genética y fenotípicamente heterogéneas. Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *E. coli* a células heteroaploides (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros 2 mecanismos: uno llamado difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación. Estudios recientes han definido algunas características de estas cepas, como es el fenómeno de la autoagregación, que está determinado por una fimbria de adherencia, un lipopolisacárido uniforme y una nueva enterotoxina termoestable (TE) denominada toxina enteroagregativa estable (TEAE). Se han detectado algunas cepas que elaboran una segunda toxina termolábil antigénicamente relacionada con la hemolisina de *E. coli*, la cual puede causar necrosis de las microvellosidades, acortamiento de las vellosidades intestinales e infiltración mononuclear de la submucosa. La capacidad de las cepas de *E. coli* enteroagregativa para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas

- Las cepas de *E. coli* patógenas más difíciles de clasificar son las difusamente adherentes (DAEC). Estas cepas causan estructuras como dedos en las células epiteliales del intestino, las cuales embeben a la bacteria. Estas cepas son causantes de diarrea líquida, principalmente en niños.
- Las cepas de *E. coli enteroinvasivas* (EIEC) son muy similares a *Shigella spp.* en su bioquímica y patogénesis, ya que como esta especie son lactosa negativa (todas las otras cepas de *E. coli* son Lac+), no son móviles y son negativas en la prueba de lisina decarboxilasa. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Las EIEC son capaces de causar diarrea líquida, similar a la causada por ETEC y ocasionalmente (al igual que *Shigella*), pueden invadir las células del intestino del hospedero y causar disentería. Las EIEC causan epidemias relacionadas a la contaminación de agua y alimentos. La versatilidad bioquímica de *E. coli* le permite no sólo invadir el tracto digestivo, sino también el sistema urogenital, causando infecciones. Las cepas uropatogénicas (UTI) son dispersadas en las comunidades. Las infecciones causadas por estas bacterias causan normalmente cistitis, aunque en ocasiones pueden llegar a causar pielonefritis al invadir el riñón.
[20,21,29]

b) TRATAMIENTO

No se dispone de terapéutica específica única. Sulfamidas, ampicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos muestran efectos

antibacterianos notables. Para la prevención de la diarrea del viajero se ha propuesto la ingestión diaria de suspensión de subsalicilato de bismuto ya que este puede inactivar in vitro las enterotoxinas de *E. coli*. El mecanismo de resistencia esta bajo el control de plásmidos transmisibles. [29]

2.9 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MIC Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA MBC.

Un agente antimicrobiano es una sustancia química que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los agentes bactericidas son aquellas que matan a las bacterias mientras que los agentes bacteriostáticos son aquellos que inhiben el crecimiento bacteriano. Estos agentes pueden variar en cuanto a su toxicidad selectiva, teniendo algunos efectos similares sobre todos los tipos de células y otros son más selectivos y tóxicos para los microorganismos que para el tejido animal.

La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico esta determinado por la concentración mínima inhibitoria (CMI) que es la menor concentración de antibiótico que es capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana, mientras que la concentración mínima bactericida es la menor concentración de un antibiótico que reduce al 0,1% o menos el número de bacterias del inoculo original, reduciéndolo en un 99.9%. [24]

Existen diferentes métodos para la determinación del MIC uno de ellos y el empleado por nosotros es el método de diluciones en el cual se realizan diferentes diluciones del antibiótico, sin embargo este se utiliza cuando la cantidad de bacterias es poca, hay otro método que es el de la caja petri que

se puede usar mayor cantidad de bacterias, otro es de E-testa que utiliza tiras que están empapadas en un antibiótico y que tienen un gradiente de concentración que equivale a las diluciones.

Los métodos más empleados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria son los métodos de dilución, estos pueden realizarse en medio sólido, dilución en agar, o en medio líquido, dilución en caldo. Estas diluciones son seriadas y se realizan por duplicando donde un antibiótico determinado es enfrentado con una suspensión bacteriana, la menor concentración de antibiótico que es expresada en unidades/ml. o en $\mu\text{g/ml}$ que inhibe el desarrollo bacteriano es el CMI. El método de dilución en caldo puede ser de dos tipos, el macrométodo donde se utiliza 1 ml de medio de cultivo y el micrométodo donde se emplean microplacas de 96 pocillos utilizando volúmenes de 50 – 200 μl , este micrométodo permite estudiar un gran número de antibióticos de forma sencilla, rápida y económica.

En esta técnica de dilución en tubo se preparan una serie de tubos, donde cada uno contiene una concentración diferente del antibiótico, y se inocula con la cepa bacteriana, después de la incubación se observa que no hay desarrollo bacteriano es decir ausencia de turbidez, hasta llegar a una dilución a partir del cual comienza un aumento de turbidez donde hay desarrollo bacteriano, identificándose así el CMI. Después de identificar el CMI se realizan subcultivos en placas con agar de los tubos donde no hay turbidez podemos observar que si hay desarrollo de colonias de cualquier tubo por debajo del correspondiente a la CMI este es el caso de un antibiótico bacteriostático. Si por debajo del tubo correspondiente al CMI y después de realizar el subcultivo no se puedan recuperar bacterias viables y

por tanto tampoco en concentraciones superiores, entonces se ha hallado al concentración mínima bactericida.

La concentración mínima inhibitoria no es una constante de un determinado agente porque se ve afectada por aspectos como ser la naturaleza del organismo utilizado, el tamaño del inóculo, la composición del medio de cultivo, el tiempo de incubación, y las condiciones de incubación tales como la temperatura, el pH y la aireación. El medio normalmente utilizado es el de Mueller–Hinton, que puede ser suplementado con un 5 % de sangre desfibrinada de caballo, oveja u otro animal, cuando la bacteria lo requiera para su desarrollo. El pH del medio debe estar entre 7,2 y 7,4. El inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10^8 UFC/ml y se prepara en solución salina estéril o caldo de cultivo, la incubación se hace a 37 °C en atmósfera adecuada ya que la presencia de CO₂ modifica el pH del medio y esto puede afectar la actividad de algunos antibióticos. La lectura se realiza entre 18 a 24 horas, la incubación prolongada puede dar lugar a interpretaciones erróneas.

Como regla general de la terapia de antibióticos, la concentración del medicamento in vivo debe ser 2 - 4 veces la concentración in vitro. Hay otros factores muy importantes que deben tenerse en cuenta para la elección de un antibiótico: la edad; el peso; el estado general del paciente, como embarazo, anormalidades genéticas o metabólicas, la función hepática o renal; el lugar de la infección; el modo de acción del antibiótico; su potencial tóxico y su interacción con otros medicamentos. [21,24]

El Etest es un nuevo método para determinar la CMI que combina los métodos de difusión de agar y la dilución, se usan tiras de celulosa, éstas contienen un gradiente del agente antimicrobiano en la superficie inferior, el

agente antimicrobiano difunde en el agar y establece un gradiente continuo del antimicrobiano a lo largo de la tira. Después de la incubación se forma una zona elíptica de inhibición del crecimiento, y la CMI se corresponde con el punto donde el borde del área de inhibición del crecimiento intersecciona con la tira. El rango del gradiente del antimicrobiano es de 0.016 a 256 $\mu\text{g/ml}$ o de 0.002 a 32 $\mu\text{g/ml}$. Este rango corresponde con 15 diluciones dobles en los métodos convencionales de dilución pero Etest además proporciona concentraciones intermedias.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de extracto acuoso, etanólico, etéreo y diclorometánico de las partes aéreas de plantas procedentes del altiplano frente *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Obtener extractos acuosos, etanólicos, diclorometánico y etéreo de partes aéreas de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifoliun*

3.2.2 Determinar actividad antimicrobiana de extractos del *Rumex palustris* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2.3 Determinar actividad antimicrobiana de extractos de la *Baccharis latifolia* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.4 Determinar actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisioides* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2.5 Determinar actividad antimicrobiana de extractos de *Piper asperifolium* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.6 Determinar actividad antimicrobiana de extractos de *Cestrum parqui* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.7 Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de los extractos con actividad antimicrobiana.

4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la obtención de los extractos se utilizaron de todas las plantas las partes aéreas (hojas) y se procedió con la extracción etanólica durante 72 horas luego durante 48 horas ambos extractos se procedieron de la misma forma. Para asegurarnos de que los solventes utilizados se eliminen se dejaron los extractos en la estufa durante una semana a una temperatura de 30 °C.

También se realizó una infusión a partir de las hojas. Se prepararon las cepas bacterianas en un cultivo overnight y se realizó la prueba con los diferentes extractos. De los extractos con resultado positivo se procedió a determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI).

A Marcha de obtención de extractos

Figura N° 4.1 Flujoograma de primera fase de extracción

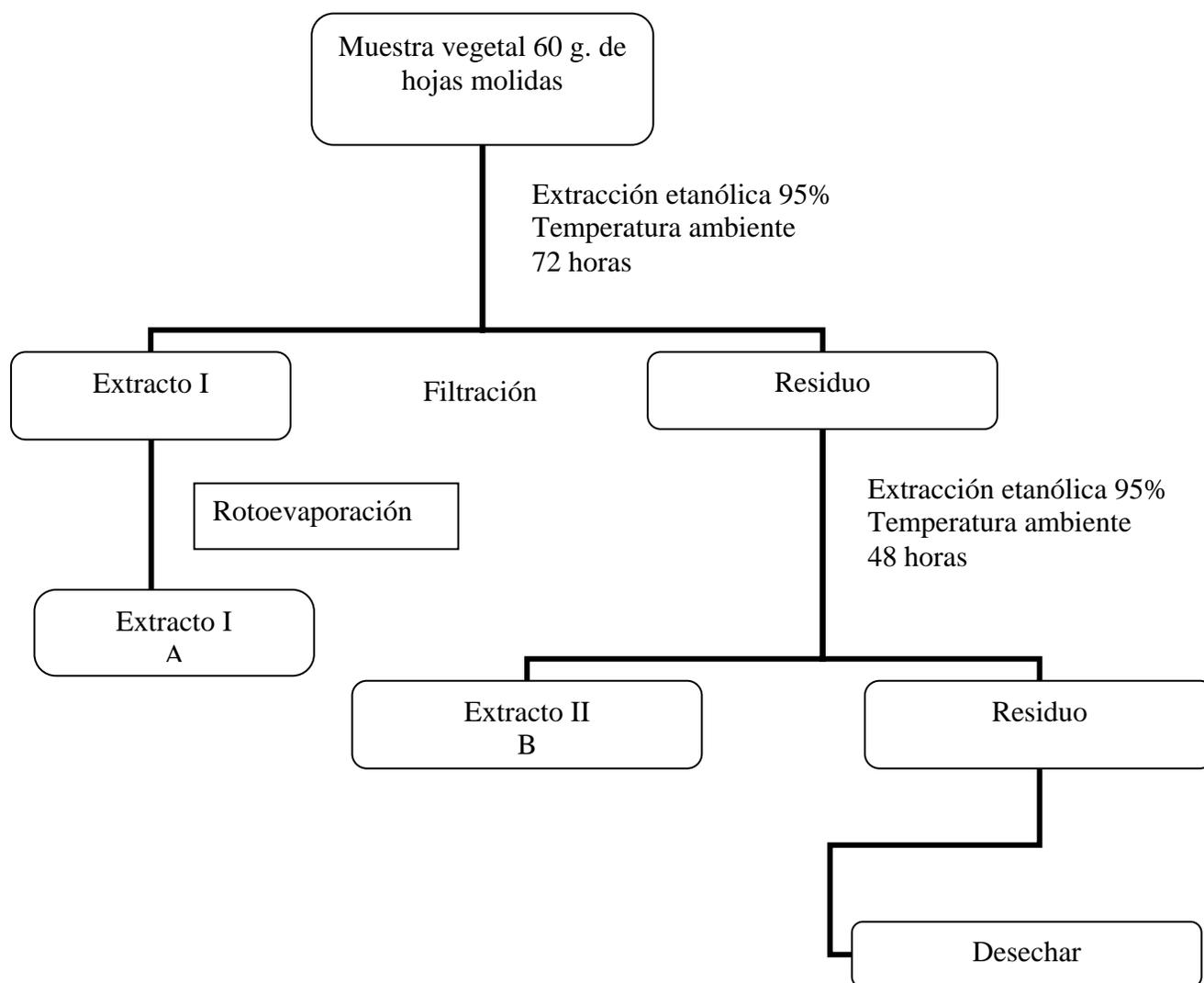


Figura N° 4.2 Flujograma de obtención de extractos eteros, diclorometanicos y etanolicos

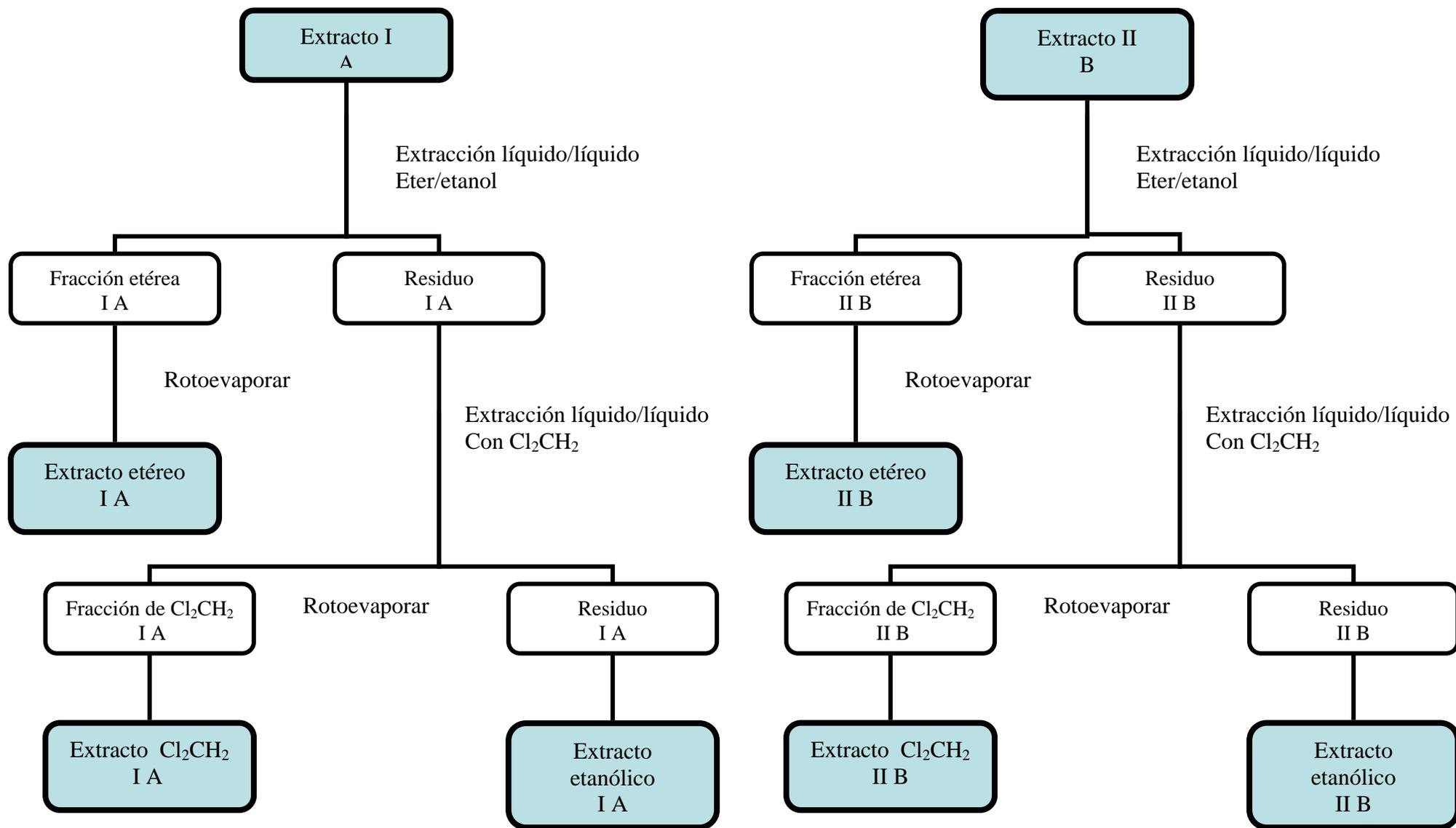
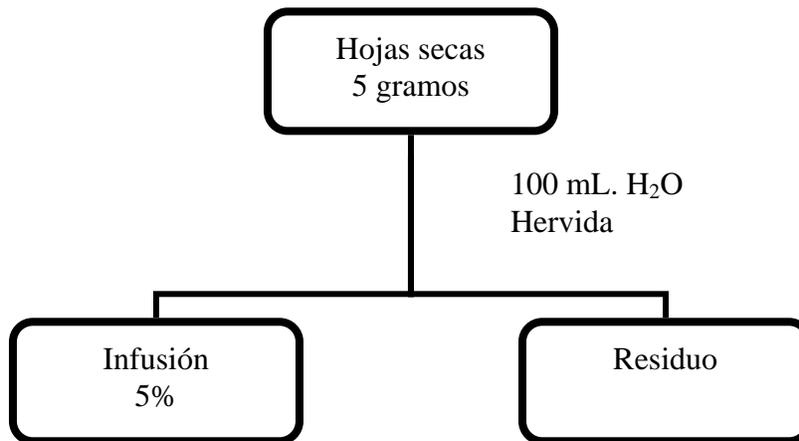


Figura 4.3 Flujograma de obtención de la infusión



V. METODOLOGÍA

1 RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS

Este trabajo esta basado en la medicina tradicional y en las experiencias populares, las plantas fueron adquiridas de puestos de ventas ubicados en la zona central de la ciudad de La Paz, conocidas por sus nombres comunes que luego fueron identificadas y comparadas en el Herbario Nacional (tabla 5.1). Se hizo un secado de las hojas de cada planta en un ambiente amplio y sin exponerlas a los rayos ultravioleta, una vez secas se procedió a moler las mismas para luego ser pesadas y proceder con la extracción.

Tabla 5.1 Nombres comunes y científicos de las plantas en estudio.

Nombre Común	Nombre Científico
Quentu	<i>Rumex palustris</i>
Altamiza	<i>Franseria artemisoides</i>
Chillka	<i>Baccharis latifolia</i>
Matico	<i>Piper asperifolium</i>
Andrés Huallya	<i>Cestrum parqui</i>

5.2 METODOS TÉCNICOS

5.2.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos se obtuvieron por diferencia de polaridad de los solventes, utilizando éter de petróleo, diclorometano y etanol 95%, para el extracto acuoso se utilizó agua destilada.(Figura 4.2)

a) Maceración

Se realizó una maceración de las plantas ya secas con alcohol etílico al 95 % para esto se procedió a pesar 60 gramos de cada planta y macerar con 200 mL. de alcohol 95% por un periodo 72 horas, posteriormente se filtro obteniendo una primera fase de extracción, al residuo vegetal se realizo una segunda extracción pero por un tiempo de 48 horas. Ambas maceraciones se realizaron a temperatura ambiente. El residuo de materia vegetal se desechó y ambos extractos etanólicos se rotoevaporaron hasta eliminar el alcohol.

b) Extracción etérea

Una vez eliminado el alcohol, los residuos que quedan en los balones son sometidos a una extracción líquido-líquido con éter de petróleo 20 – 40 se rotoevaporó eliminando de esta forma la mayor cantidad de éter obteniendo así los extractos etéreos, que fueron depositados en viales.

c) Extracción Diclorometánica

Del residuo que queda de la anterior extracción se somete a la extracción con diclorometano, se rotoevaporó hasta eliminar el diclorometano, los extractos obtenidos se depositan en viales que luego se dejan al medio ambiente para la eliminación de pequeñas cantidades que hayan quedado del solvente.

d) Extracción Alcohólica

Después de realizar la extracción etérea y diclorometánica se procede a disolver el residuo en pequeñas cantidades de etanol, para luego eliminarlos a través de calor en estufa a 35 ° C.

e) Infusión

Se realizaron infusiones con cada una de las plantas a una concentración de 5% pesando 5 gramos de hojas secas en 100 mL de agua hirviendo. (Figura 4.3)

5.2.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PARA LAS PRUEBAS

Una vez secos todos los extractos se procede a pesar 4 mg. de cada uno de ellos en viales que son disueltos con 100 µL de DMSO concentrado. Realizando esta operación cuatro veces. Para comprobar que el DMSO alteraba el crecimiento de las bacterias se realizó un control con 25 µL de DMSO en 1 mL de caldo y se realizó el inóculo de las bacterias.

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

5.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, que fueron proporcionadas por la doctora Maria Elena Barriga responsable de la unidad de Bacteriología del Hospital de Clínicas. Se realizaron las pruebas de identificación respectivas (ver anexos). De estas se realizó un cultivo por un tiempo de 18 – 24 horas en caldo Mueller-Hinton, posteriormente se realiza una comparación con el tubo número 0.5 de la escala de Mac Farland.

5.3.2 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Se prepararon tubos con 1 ml de caldo Mueller-Hinton, en una primera etapa se prueban todos los extractos frente a todas las bacterias en una concentración de 1mg de extracto en 1 ml de caldo Mueller-Hinton. se realiza esta prueba por duplicado. De los extractos que dieron resultados

positivos se realizaron las pruebas a distintas concentraciones 1mg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml y 62.5 µg/ml, a cada tubo se añadió 20 µl de la suspensión de bacterias. Se utilizó como control blanco un tubo sin inóculo y otro tubo como control del desarrollo bacteriano, en ambos tubos con volúmenes iguales de DMSO. Se incubaron todos los tubos a 37 °C por 24 horas.

5.3.3 CULTIVO EN AGAR- AGAR

De los tubos a distintas concentraciones se realizaron sembrados por duplicado en cajas de agar nutritivo para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, se uso de control un saturado de bacterias y una caja sin inóculo, sembrando 10 µl por agotamiento se dejan incubando por 24 horas a 37°C.

6 RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se llegaron a obtener todos los extractos lastimosamente en cantidades muy pequeñas pero lo suficiente para realizar las pruebas.

6.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ANTIMICROBIANA EN TUBO

6.2.1. Primera determinación antimicrobiana.

De todos los extractos probados de un total de 35 solo 6 dieron un resultado positivo en la primera prueba.

Tabla N° 1 Primera determinación de extractos con actividad antimicrobiana.

PLANTA	Tipo de extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	1ª Extracción				
R U M E X P A L U S T R I S	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(+)	(-)	(-)	(+)
	2ª Extracción				
	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(+)	(+)	(-)	(-)
	ACUOSO	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-) = desarrollo bacteriano

PLANTA	Tipo de extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	1ª Extracción				
F R A N S E M I O I D E S	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(+)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	2ª Extracción				
	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	ACUOSO	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-) = desarrollo bacteriano

Tabla N° 1 Primera determinación de extractos con actividad antimicrobiana. (Continuación)

PLANTA	Tipo de extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	1ª Extracción				
B L A C H I F O L I S A	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	2ª Extracción				
	ETANOL	(-)	(+)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	ACUOSO	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-) = desarrollo bacteriano

PLANTA	Tipo de extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	1ª Extracción				
A S P E R I P I E F O L I U M	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	2ª Extracción				
	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(+)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	ACUOSO	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-) = desarrollo bacteriano

Tabla N° 1 Primera determinación de extractos con actividad antimicrobiana. (Continuación)

PLANTA	Tipo de extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	1ª Extracción				
C E S T R U M P A R Q U I	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(+)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	2ª Extracción				
	ETANOL	(-)	(-)	(-)	(-)
	ETER	(-)	(-)	(-)	(-)
	DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)
	ACUOSO	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-)= desarrollo bacteriano

6.2.2 Segunda determinación.

De la primera prueba los extractos que nos dieron resultados positivos se sometieron a una segunda prueba a una concentración de 1mg/ml. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla N° 2 Segunda determinación de extractos con actividad antimicrobiana.

Planta	Extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Rumex palustris</i>	Diclorometano 1ª extracción	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Rumex palustris</i>	Diclorometano 2ª extracción	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Franseria artemisoides</i>	Éter 1ª extracción	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Baccharis latifolia</i>	Etanol 2ª extracción	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Piper asperifolium</i>	Éter 2ª extracción	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Cestrum parqui</i>	Etanol 1ª extracción	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-)= desarrollo bacteriano

6.2.3 Resultados a diferentes Concentraciones

De los extractos que nos dieron resultados positivos se realizaron pruebas a diferentes concentraciones obteniendo los siguientes resultados:

Tabla N° 3 Extractos con actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones

Extractos Vs. Bacterias	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml
<i>Rumex palustris</i> (Cl₂CH₂) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Rumex palustris</i> (Cl₂CH₂) Vs. <i>Enterococcus faecalis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
<i>Franseria artemisoide</i> (eter) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-)= desarrollo bacteriano

Después de obtener estos resultados en tubo se procedió a sembrar 10 µl de los tubos de corte, el de menor concentración donde no hay turbidez y el de concentración superior a este, obteniendo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/ml con el extracto diclorometanico de *Rumex palustris* frente a *Staphylococcus aureus* y una concentración mínima bactericida de 1000 µg/ml inhibiendo el crecimiento en un 99.9%.

Este mismo extracto frente a *Enterococcus faecalis* se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 250 µg/ml con actividad bactericida del 99.9%.

Con el extracto etéreo de *Franseria artemisioides* frente a *Staphylococcus aureus* se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/ml. y una inhibición de 97%, teniendo así una actividad bacteriostática, no encontrando la concentración mínima bactericida pues a 1000 µg/ml aún existía crecimiento bacteriano

Tabla Nº 4 Porcentaje de la actividad inhibitoria de los extractos frente a bacterias

Extractos Vs. Bacterias	UFC Control	UFC CMI	UFC CMB	%
<i>Rumex palustris</i> (Cl ₂ CH ₂) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	117	500 µg/ml	1000 µg/ml	99.9
		6	0	
<i>Rumex palustris</i> (Cl ₂ CH ₂) Vs. <i>Enterococcus faecalis</i>	105	125 µg/ml	250 µg/ml	99.9
		4	0	
<i>Franseria artemisoide</i> (eter) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	117	500 µg/ml	1000 µg/ml	97
		12	4	

7 DISCUSIÒN

El extracto diclorometanico de *Rumex palustris* que presentó una actividad frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, esta planta posee en su estructura flavonoides, antraquinonas, glucósidos, hiperina además de rumicina un alcaloide que se encuentra en la raíz, puede ser que este alcaloide se encuentre también en las hojas de esta especie y posea cierta actividad sin embargo el conjunto de estos compuestos podrían tener el efecto antibacteriano, por otra parte en estudios por realizados Hernández y Prieto, sobre plantas que contienen polifenoles: Antioxidantes dentro del estilo de vida, muestran que la hiperina tiene una actividad en la protección y reparación del ADN, probablemente sea este compuesto el que influya en la cicatrización de las heridas.

Franseria artemisoides, como se menciona en el libro: 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas de Mahabir P. Gupta, posee compuestos como el isoborneol, el δ -curcumeno, el δ -cadimeno, el corotol y δ -fameseno además de damsina, psilostaquina, psilostaquina C, coronofilina. El aceite esencial es rico en monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados y algunos hidrocarburos sesquiterpénicos. Con respecto a la actividad biológica estudios realizados con la coronofilina demostraron actividad antibacteriana contra el *Bacillus subtilis* y el *Micrococcus oxford*, que coinciden con los resultados hallados pues encontramos actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, que también es una bacteria Gram positiva, probablemente el sitio de acción antibacteriana sea la pared celular.

Baccharis latifolia presenta estructuras de sesquiterpenos que poseen diferentes actividades farmacológicas como antiinflamatoria, antibacteriana y antimigrañosa. Jaramillo X., Zaragoza T. y Malagón O. en el estudio de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotoxicidad de los extractos totales de *Baccharis genistelloides* (monte tres filos), *Baccharis obtusifolia* (chilca redonda), *Baccharis latifolia* (chilca larga), *Piper barbatum* (cordoncillo) y *Bidens andicola* (nachi) se determinó que los extractos metanólicos de *Baccharis latifolia* presentó actividad antibacteriana con *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*.

Piper asperifolium, en el estudio realizado por Mendivil Boggetti Maria de plantas con actividad contra bacterias frecuentes en quemados el extracto acuoso presentaba actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y el extracto orgánico frente a *Staphylococcus aureus*. En el estudio fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o leishmanicida in vitro, realizado por Giménez, A. Flores, E. Jiménez A. Ravelo, A. los extractos orgánicos de *Piper elongatum* presento actividad antifúngica contra *Trychophyton mentagrophytes*, *Trychophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Candida albicans*, además de presentar actividad antiparasitaria in vitro contra cepas de *L. braziliensis*, *L. amazaonensis* y *L. donovani* en forma promastigote.

En Cochabamba el estudio realizado por Quiroga J.C., Zabalaga S., Pinto J., Vargas R., Trujillo L. en el tratamiento de Sarcoptosis con extractos de Andrés Huaylla (*Cestrun parqui* L'herit) se evidenció que los extractos etanólicos presentaban actividad contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (ATCC 96934) e inhibición contra el ácaro *Sarcoptes scabiae*. También se determinó la presencia de

metabolitos secundarios en mediante ensayos de identificación cualitativa de Flavonoides, Alcaloides, Saponinas y Taninos.

Tanto en *Baccharis latifolia*, *Piper elongatum* y *Cestrum parqui* el resultado obtenido en este trabajo fue negativo es decir no existió actividad biológica sin embargo en otros estudios si se encontraron actividad antibacteriana y antifúngica, probablemente el resultado negativo se debió a que la recolección de las plantas no se realizó en el lugar específico de crecimiento sino fueron adquiridas de los puntos de venta en la ciudad, desconociendo de esta manera la manipulación que se haya podido dar a la planta, las condiciones ambientales son primordiales en la formación de metabolitos secundarios y éstas condicionan varían de un lugar a otro, probablemente también estas plantas hayan estado demasiado tiempo expuestas al sol pudiéndose alterar algún compuesto, tal vez las plantas obtenidas hayan estado guardadas mucho tiempo perdiendo así sus beneficios.

Otro factor importante que influyo en el resultado, es la cantidad de extractos con la que se realizaron las pruebas, ya que ha concentraciones utilizadas fueron de 62.5 µg/ml hasta 1000 µg/ml, relativamente bajas probablemente a concentraciones mas elevadas de los extractos podríamos obtener un resultado satisfactorio.

En este trabajo se deberían haber utilizado antibióticos como referencia y control, en el caso de *Staphylococcus aureus* podría sugerir Amoxicilina-ácido clavulánico, para *Enterococcus faecalis* Pencilina G, para *Escherichia coli* Ampicilina y para *Pseudomonas aeruginosa* Piperacilina

8 CONCLUSIÓN

En el trabajo realizado se llegó a obtener extractos acuoso, etanólico, etéreo y diclorometánico de las partes aéreas de plantas *Franseria artemisoides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifoliun* solo dos de ellas presentaron actividad antimicrobiana *Rumex palustris* y *Franseria artemisoide*.

El extracto diclorometanico A y B de *Rumex palustris* presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* siendo inactivos frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además de presentar una concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus* de 500 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 1000 µg/ml. Para *Enterococcus faecalis* se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 250 µg/ml.

Con el extracto etéreo de *Franseria artemisioides* frente al *Staphylococcus aureus* se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500µg/ml.

No presentaron actividad antimicrobiana las especies de *Baccharis latifolia*, *Piper elongatum* y *Cestrum parqui*.

9. RECOMENDACIONES

La actividad de los extractos diclometánicos de *Rumex palustris* contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* sugiere que el constituyente antimicrobiano posee un mecanismo de acción contra bacterias gram positivas por lo cual se deben realizar estudios sobre otras bacterias gram positivas.

Se sugiere realizar estudios fitoquímicos biodirigidos para obtener el compuesto o compuestos puros con actividad antimicrobiana. También se deben realizar pruebas de toxicidad y genotoxicidad in vitro e in vivo de los extractos y garantizar la inocuidad de estos.

Se sugiere realizar estos mismo estudios en diferentes periodos del año para ver en que época existe mayor actividad, y es mejor recolectarlas de un lugar específico desde donde se traen estas plantas.

También se podrían realizar formulaciones galénicas de bajo costo y de uso tópico especialmente con el extracto orgánico de *Rumex palustris*, en pacientes que presenten infección de heridas.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Araucaria.Desarrollo en Apolobamba. Cultura Kallawayaya. Editorial Ego & Sukini asociados, La Paz. 2004
2. Balderrama Luisa. Estudio Fitoquímico de la Satureja boliviana. Tesis Licenciatura en Química. UMSA.1983
3. Bertin E. Actividad Hipoglucemiante de Stevia rebaudiana. Tesis Lic. Química Farmacéutica .UMSA. 1998
4. Cabrera, A. L. “Flora de la provincia de Jujuy”. Tomo XIII, Parte VIII. Clethraceas a Solanaceas. Buenos Aires- Argentina 1983.
5. Cerón Martínez Carlos Eduardo, Identidad y Etnobotánica del Matico en el Ecuador, Herbario “Alfredo Paredes” QAP, Escuela de Biología Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador
6. De Villegas C. Asesores: Romero Miguel, Carvajal Roger. Estudio del efecto antigenotóxico de savia de Musa paradisiaca. Tesis Licenciatura Bioquímica y Farmacia. UMSA. 1996
7. Di Stasi Claudio. Uma Proposta de ação interdisciplinar na pesquisa de novos medicamentos a partir de plantas medicinais. En Plantas Medicinais: Arte e Ciencia. Editora UNESP. Brasil, 1995
8. Diaz Cuentas S. Etnobotanica de la Chima (Bactris gasipaes Kunth) en la zona subtropical de las provincias Caranavi y Larecaja, La Paz. Facultad de Agronomía. UMSA. 1998

9. Duran Loretta Asesores: Damiani Esther, Trigoso Christian. Identificación y Determinación de Resistencia de cepas de Enterococos aislados en muestras de infecciones intrahospitalarias del Hospital Obrero N° 1 de la ciudad de La Paz de marzo de 2003 a marzo de 2004. Tesis Licenciatura Bioquímica.2004

10. Font Quer P. Plantas medicinales. El Dioscorides renovado. 13ª edt 1992. Edt Labor. Barcelona.

11. Gemelli Marco. Mercadeo de los productos orgánicos de Bolivia. El caso de ASOPEC. Servicio de la Extensión, Educación y Comunicación. Dirección de Investigación. Departamento de Desarrollo Sostenible. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación 2000.

12. Giménez, A. & P.L. Ibsch. Uso de la biodiversidad como recurso genético. Biodiversidad: La Riqueza de Bolivia. Estado de Conocimiento y Conservación. Ministerio de Desarrollo Sostenible, Santa Cruz de la Sierra. 2003.

13. Girault, L.. Kallawaya. Curanderos Itinerantes de los Andes. La Paz. 1987

14. Giménez, A. Flores, E. Jiménez A. Ravelo, A. Estudio Fitoquímico de Catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. Revista BIOFARBO vol. 8 diciembre de 2000.

15. Gómez Lafuente, Patricia Beatriz. Actividad inmunomoduladora de la savia de *Musa paradisiaca*. Establecimiento de un Monitor Biológico en la respuesta inmune experimental. 1992.

16. Gómez P., Terrazas, Sánchez L., Carvajal R. Estudio de las plantas medicamentosas locales en la modificación de la respuesta inmune : efecto inmunomodulador de la savia de Musa spp. BIOFARBO. Año 2. N° 2. 1993.
17. Harrison. Principios de Medicina Interna. Madrid 1994.
18. Hernandez A. Situación actual de los ensayos clínicos en plantas medicinales. Errores, problema y limitaciones. Universidad Medica de la Habana. Centro Nacional de Ensayos Clínicos. Playa Ciudad. De la Habana Cuba.2005
19. Hernández Angel, Maureen y Prieto Gonzalez, Elio Antonio. Plantas que contienen polifenoles: Antioxidantes dentro del estilo de vida. Revista Cubana de Investigación Biomédica, enero-abril, vol.18, 1999.
20. Jaramillo X., Zaragoza T. y Malagón O. Descripción etnobotánica y estudio de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotoxicidad de los extractos totales de cinco especies vegetales nativas de la provincia de Loja: Baccharis genistelloides (monte tres filos), Baccharis obtusifolia (chilca redonda), Baccharis latifolia (chilca larga), Piper barbatum (cordoncillo) y Bidens andicola (nachi). Planta de Productos Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. vol.11.2005.
21. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 17ava ed. Santa Fe de Bogotá, Colombia.1999
22. Koneman, E.: Diagnóstico Microbiológico. 3 era ed Buenos Aires-Argentina.Panamerican.1994.

23. Lira Jorge A., Medicina andina, farmacopea y rituales, 1985 Cusco - Perú
24. Loza, C.B. Kallawaya. Reconocimiento mundial a una ciencia de los Andes. UNESCO, Viceministerio de Cultura de Bolivia Fundación Cultural Banco Central de Bolivia, La Paz. 2005
25. Madigan Michel T, Martinko J. M., Parker J., Brook, Biología de los Microorganismos, Octava edición revisada, Madrid 1999
26. Mahabir P. Gupta: "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas". Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Convenio Andrés Bello, Editorial Presencia Ltda. Colombia. 1995
27. Mendivil Boggetti Maria Jimena. Estudio de plantas con actividad contra bacterias frecuentes en quemados. Tesis Licenciatura Bioquímica y Farmacia 1995.
28. Quiroga J.C., Zabalaga S., Pinto J., Vargas R., Trujillo L. "Tratamiento de Sarcoptosis con extractos de Andrés Huaylla (Cestrun parqui L'herit)". Universidad Mayor de San Simón Programa de Fármacos Alimentos y Cosméticos Cochabamba Bolivia
29. Sagaseta de Ilurdoz Uranga Juan L.. Jampi Makikunanchiqpi Kasan, la medicina esta en nuestras manos. Proyecto Social Tiraque. Ediciones gráficas E.G. 1996

30. Schleifer KH; Kilpper-Balz R. "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.". *Int. J. Sys. Bacteriol.* **34**.1984.

31. Souza Valeria, Rocha Martha, Sander Luisa y Eguiarte Luis E. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli* Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

32. Terceros P. Quelca B. Solares M., Plantas Medicinales en Bolivia. Estado de Arte. Estudio de Prospectiva sobre el futuro de las plantas medicinales del Altiplano y los valles centrales de los Andes. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial. Gobierno de Bolivia. Ministerio de Planificación del Desarrollo Viceministerio de Ciencia y Tecnología 2007.

33. UICN-OMS-WWF. Directrices sobre la conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de la Salud. Unión Internacional para la conservación de la naturaleza (UICN) and World Wildlife Fund (WWF) 1993.

34. Vidaurre de la Riva P. J. Plantas medicinales en los Andes de Bolivia Editores: M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006.

35. Zalles Jaime, J. & M. De Lucca. Descripción y uso de 100 plantas medicinales del altiplano boliviano. La Paz- Bolivia.1993.

36. Zambrana, S., Terceros P., Terrazas K., Carvajal R. Estudios sobre la acción antiviral de *Opuntia soehrensii*. Biofarbo 2006.

ANEXOS

Prueba de Kligler TSI (Triple Sugar Iron)

El agar hierro triple azúcar es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de H₂S. Es un medio útil para la identificación de enterobacterias.

TSI composición

Extracto de carne	3,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	15,0 g
Proteosa peptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Glucosa	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sulfato ferroso	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Agar	12,0 g
Rojo fenol	0,024 g
Agua destilada	1 L
pH =	7,4 ± 0,2

Técnica

Inocular los tubos de TSI con punta (alambre recto). Para eso introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar el alambre del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35°C durante 24 horas.

LIA (Lysine Iron Agar)

Este ensayo permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H₂S y es más sensible que el TSI para la detección de H₂S.

LIA composición

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
L-Lisina.HCl	10 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15 g
Agua	1 L

pH = 6,7 +/- 0,2

Prueba de SIM

Es la prueba de producción de Sulfuro, indol y motilidad. El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos.

Caldo triptofano

Peptona o digerido pancreático de caseína 2,0 g
Cloruro de sodio 0,5 g
Agua destilada 100 ml

Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o isoamílico 150 ml
p-dimetilaminobenzaldehído 10,0 g
HCl conc. 50 ml

Escherichia coli: positivo

Klebsiella pneumoniae: negativo (mayoría de las cepas)

Prueba del citrato

Es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. La utilización de citrato como única fuente de carbono se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7,6.

Citrato composición

Fosfato diácido de amonio	1,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Citrato de sodio	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Agar	15,0 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

pH final= 6,9

Técnica

Se inocular el agar inclinado en una sola estría en el pico.

Interpretación

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul.

Medio de Mac Conkey

Este es un medio diferencial para la selección y recuperación de bacilos gram-negativos; las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas. Los organismos fermentadores de lactosa crecen formando colonias rojas-rosas mientras que los no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras o blancas.

Composición:

Bacto-peptona, 17g
Proteosa-peptona, 3g
Lactosa, 10g
Sales biliares, 1.5g
NaCl, 5g
Agar, 13.5g
Rojo neutro, 0.03g
Cristal violeta, 0.001g
Agua destilada, 1000ml

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
EXTRACTOS DE *FRANSERIA*
ARTEMISIOIDES, *RUMEX*
PALUSTRIS, *BACCHARIS*
LATIFOLIA, *CESTRUM PARQUI* Y
PIPER ASPERIFOLIUM FRENTE A
STAPHYLOCOCCUS AUREUS,
ESCHERICHIA COLI,
PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y
ENTEROCOCCUS FAECALIS

JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se estudian cinco plantas *Rumex palustris* (Qentu), *Baccharis* (Chillka), *Franseria artemisoides* (Altamisa), *Piper asperifolium* (Matico) y *Cestrum parqui* (Andrés Huaylla), todas refieren un uso en la curación de heridas infectas además de que son muy fáciles de obtener en los puestos de venta de hierbas.

Por esta razón el interés de estudiarlas para lo cual se realizaron extractos de las hojas obtenidos a través de procesos químicos como ser la extracción líquido-líquido de etanol, éter y diclorometano, estos extractos serán probados frente a bacterias gram positivas y gram negativas que se encuentran frecuentemente en infecciones de heridas, para comprobar así la actividad antimicrobiana

INTRODUCCIÓN

- Las plantas medicinales constituyen una alternativa de curación para muchas enfermedades, sin embargo para la ciencia, no es suficiente el conocimiento empírico de los beneficios de las plantas en las prácticas caseras, y por ello se realizan estudios fitoquímicos, biológicos y tóxicos que comprueban científicamente la existencia de determinadas sustancias, las cuales son responsables de la actividad biológica.

- En el presente trabajo se presentan aspectos como la determinación de actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas, extractos que son obtenidos a través de procesos químicos que después son evaluados contra bacterias gram positivas y gram negativas y poder así determinar la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida CMB por un método sencillo como es el método de dilución en caldo.

OBJETIVOS

- OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de extracto acuoso, etanólico, etéreo y diclorometánico de las hojas de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifolium* frente *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

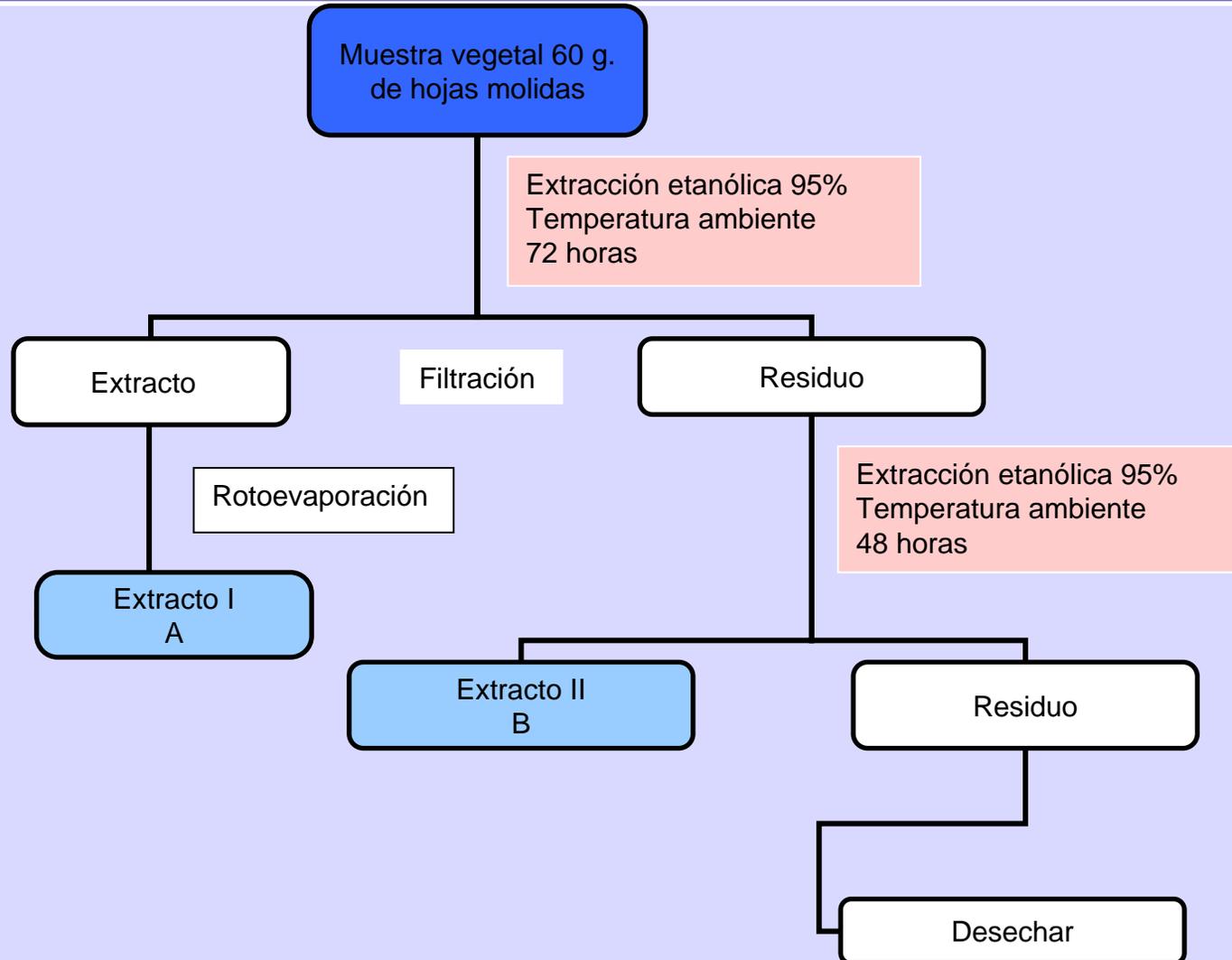
- Obtener extractos acuosos, etanólicos, diclorometánico y etéreo de partes aéreas de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifoliun*
- Determinar actividad antimicrobiana de extractos del *Rumex palustris* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- Determinar actividad antimicrobiana de extractos de la *Baccharis latifolia* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*
- Determinar actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisioides* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar actividad antimicrobiana de extractos de *Piper asperifolium* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*

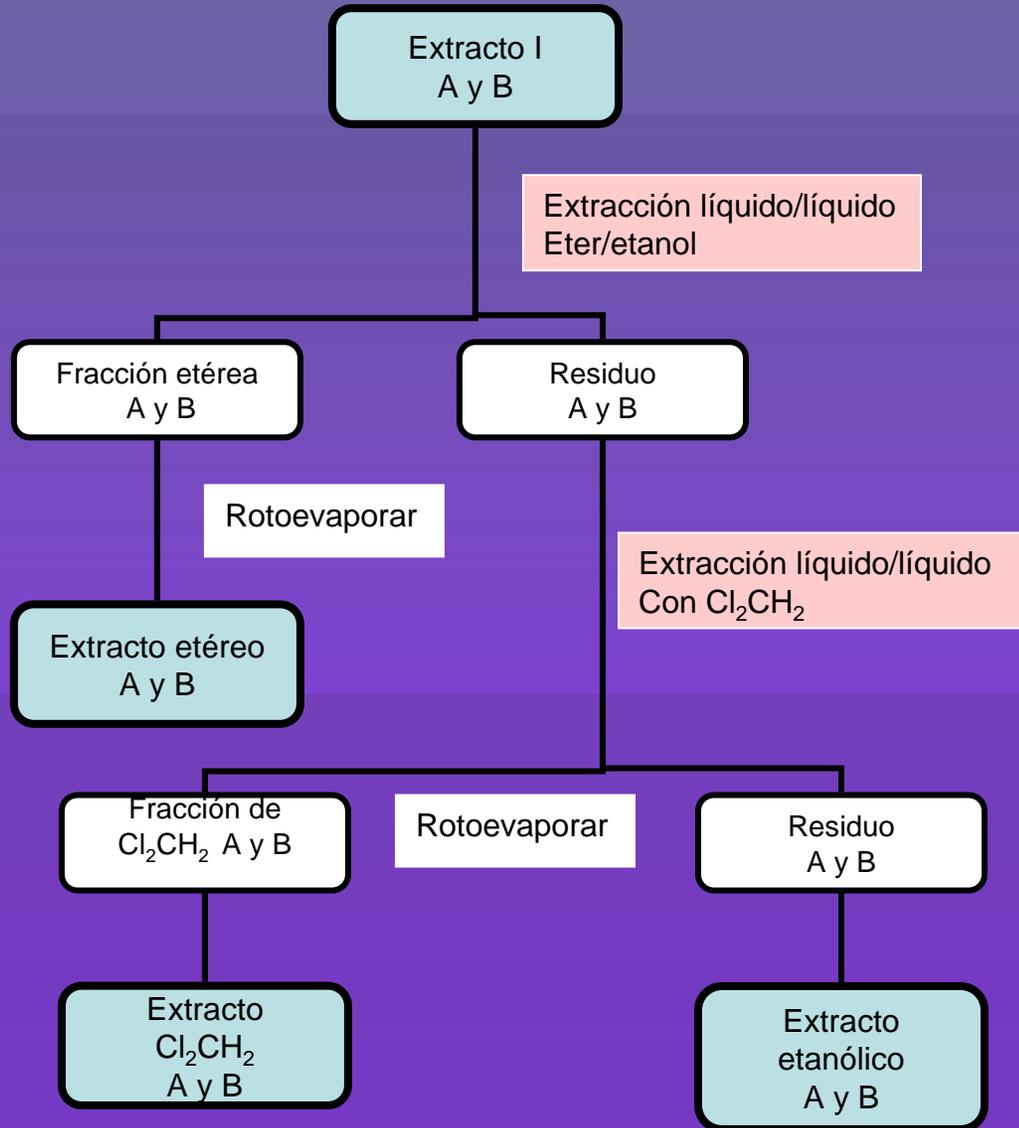
- Determinar actividad antimicrobiana de extractos de *Cestrum parqui* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de los extractos con actividad antimicrobiana

DISEÑO EXPERIMENTAL

Obtención de extractos



Obtención de extractos etéreos, diclometánicos y etanólicos



METODOLOGÍA

- **RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS**

Las plantas fueron adquiridas de puestos de ventas ubicados en la zona central de la ciudad de La Paz, se hizo un secado de las hojas de cada planta en un ambiente amplio y sin exponerlas a los rayos ultravioleta, una vez secas se procedió a moler las mismas para luego ser pesadas y proceder con la extracción.

■ OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

■ Maceración

Se pesaron 60 gramos de hojas secas se maceraron con 200 ml. alcohol etílico al 95 % por un periodo 72 horas, posteriormente se filtro obteniendo una primera fase de extracción, al residuo vegetal se realizo una segunda extracción pero por un tiempo de 48 horas. Ambas maceraciones se realizaron a temperatura ambiente. El residuo de materia vegetal se desechó y ambos extractos etanólicos se rotoevaporaron hasta eliminar el alcohol.

- **Extracción etérea**

Una vez eliminado el alcohol, el residuo se sometió a una extracción líquido - líquido con éter de petróleo 20 – 40 se rotoevaporó eliminando el solvente

- **Extracción Diclorometánica**

El residuo anterior se somete a la extracción con diclorometano, se rotoevaporó hasta eliminar el diclorometano, los extractos obtenidos se depositan en viales

- **Extracción Alcohólica**

El residuo se disolvió en pequeñas cantidades de etanol, para luego eliminarlos a través de calor en estufa a 35 ° C.

■ Infusión

Se realizaron infusiones con cada una de las plantas a una concentración de 5% pesando 5 gramos de hojas secas en 100 mL de agua hirviendo.

- Una vez secos todos los extractos se procede a pesar 4 mg. de cada uno de ellos en viales que fueron disueltos con 100 μ L de DMSO concentrado. Realizando esta operación cuatro veces. Para comprobar que el DMSO alteraba el crecimiento de las bacterias se realizó un control con 25 μ L de DMSO en 1 mL de caldo y se realizó el inóculo de las bacterias

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

- **MATERIAL BIOLÓGICO**

Las cepas utilizadas fueron:

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

- **PRUEBAS ANTIMICROBIANAS**

Se prepararon tubos con 1 ml de caldo Mueller-Hinton, se prueban todos los extractos en una concentración de 1mg/ml. De los extractos que dieron resultados positivos se realizaron las pruebas a distintas concentraciones 1mg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml y 62.5 µg/ml. Se utilizó como control blanco un tubo sin inóculo y otro tubo como control del desarrollo bacteriano, en ambos tubos con volúmenes iguales de DMSO.

■ CULTIVO EN AGAR- AGAR

De los tubos a distintas concentraciones se realizaron sembrados por duplicado en cajas de agar nutritivo para determinar la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida CMB.

RESULTADOS

Extractos con actividad antimicrobiana.

Planta	Extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Rumex palustris</i>	Diclorometano 1ª extracción	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Rumex palustris</i>	Diclorometano 2ª extracción	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Franseria artemisoides</i>	Éter 1ª extracción	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Baccharis latifolia</i>	Etanol 2ª extracción	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Piper asperifolium</i>	Éter 2ª extracción	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Cestrum parqui</i>	Etanol 1ª extracción	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-) = desarrollo bacteriano

Extractos con actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones

Extractos Vs. Bacterias	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml
<i>Rumex palustris</i> (Cl ₂ CH ₂) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>Rumex palustris</i> (Cl ₂ CH ₂) Vs. <i>Enterococcus faecalis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
<i>Franseria artemisioides</i> (eter) Vs. <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

(+) = inhibición de crecimiento bacteriano (-) = desarrollo bacteriano

Porcentaje de la actividad inhibitoria de los extractos frente a bacterias

Extractos Vs. Bacterias	UFC Control	UFC CMI	UFC CMB	%
<i>Rumex palustris</i> (Cl ₂ CH ₂) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	117	500 µg/ml	1000 µg/ml	99.9
		6	0	
<i>Rumex palustris</i> (Cl ₂ CH ₂) Vs. <i>Enterococcus faecalis</i>	105	125 µg/ml	250 µg/ml	99.9
		4	0	
<i>Franseria artemisioides</i> (eter) Vs. <i>Staphylococcus aureus</i>	117	500 µg/ml	1000 µg/ml	97
		12	4	

DISCUSIÓN

- El extracto diclorometánico de *Rumex palustris* que presentó una actividad frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, esta planta posee en su estructura flavonoides, antraquinonas, glucósidos, hiperina además de rumicina un alcaloide que se encuentra en la raíz, puede ser que este alcaloide se encuentre también en las hojas. Estudios por realizados Hernández y Prieto, sobre plantas que contienen polifenoles muestran que la hiperina tiene una actividad en la protección y reparación del ADN, probablemente sea este compuesto el que influya en la cicatrización de las heridas.

- *Franseria artemisioides*, posee compuestos como el isoborneol, el δ -curcumeno, el δ -cadimeno, el corotol y δ -fameseno además de damsina, psilostaquina, psilostaquina C, coronofilina. Con respecto a la actividad biológica estudios realizados con la coronofilina demostraron actividad antibacteriana contra el *Bacillus subtilis* y el *Micrococcus oxford*, que coinciden con los resultados hallados pues encontramos actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, que también es una bacteria Gram positiva, probablemente el sitio de acción antibacteriana sea la pared celular

- *Baccharis latifolia* presenta estructuras de sesquiterpenos que poseen diferentes actividades farmacológicas como antiinflamatoria, antibacteriana y antimigrañosa. Jaramillo X. en el estudio de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotoxicidad de los extractos totales de *Baccharis* determinó que los extractos metanólicos de *Baccharis latifolia* presentó actividad antibacteriana con *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*.
- *Piper asperifolium*, en el estudio realizado por Mendivil Boggetti Maria de plantas con actividad contra bacterias frecuentes en quemados el extracto acuoso presentaba actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y el extracto orgánico frente a *Staphylococcus aureus*.

- En Cochabamba el estudio realizado por Quiroga J. en el tratamiento de Sarcoptosis con extractos de Andrés Huaylla (*Cestrum parqui*) se evidenció que los extractos etanólicos presentaban actividad contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (ATCC 96934) e inhibición contra el ácaro *Sarcoptes scabiae*. También se determinó la presencia de metabolitos secundarios en mediante ensayos de identificación cualitativa de Flavonoides, Alcaloides, Saponinas y Taninos.

- Tanto en *Baccharis latifolia*, *Piper elongatum* y *Cestrum parqui* el resultado obtenido en este trabajo probablemente se debió a que la recolección de las plantas no se realizó en el lugar específico de crecimiento sino fueron adquiridas de los puntos de venta en la ciudad, desconociendo de esta manera la manipulación que se haya podido dar a la planta.
- Otro factor importante que influyo en el resultado, es la cantidad de extractos con la que se realizaron las pruebas, ya que las concentraciones utilizadas fueron de 62.5 µg /ml hasta 1000 µg/ml, relativamente bajas probablemente a concentraciones mas elevadas de los extractos podríamos obtener un resultado satisfactorio.

CONCLUSIÓN

- Se llegó a obtener extractos acuoso, etanólico, etéreo y diclorometánico de las hojas de *Franseria artemisoides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifoliun* solo dos de ellas presentaron actividad antimicrobiana *Rumex palustris* y *Franseria artemisoide*.

- *El extracto diclorometánico A y B de Rumex palustris presenta actividad antimicrobiana contra Staphylococcus aureus y Enterococcus faecalis siendo inactivos frente a Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa. Además de presentar una concentración mínima inhibitoria para Staphylococcus aureus de 500 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 1000 µg/ml. para Enterococcus faecalis se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/ml y una concentración mínima bactericida de 250 µg/ml*

- Con el extracto etéreo de *Franseria artemisioides* frente al *Staphylococcus aureus* se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/ml.
- No presentaron actividad antimicrobiana las especies de *Baccharis latifolia*, *Piper elongatum* y *Cestrum parqui*.

RECOMENDACIONES

- La actividad de los extractos diclometánico de *Rumex palustris* contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* sugiere que el constituyente antimicrobiano posee un mecanismo de acción contra bacterias gram positivas por lo cual se deben realizar estudios sobre otras bacterias gram positivas.
- Se sugiere realizar estudios fitoquímicos biodirigidos para obtener el compuesto o compuestos puros con actividad antimicrobiana. También se deben realizar pruebas de toxicidad y genotoxicidad in vitro e in vivo de los extractos y garantizar la inocuidad de estos.

- Se sugiere realizar estos mismo estudios en diferentes periodos del año para ver en que época existe mayor actividad, y es mejor recolectarlas de un lugar específico desde donde se traen estas plantas.
- También se podrían realizar formulaciones galénicas de bajo costo y de uso tópico especialmente con el extracto orgánico de *Rumex palustris*, en pacientes que presenten infección de heridas

GRACIAS