EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ANÍS ESTRELLADO (*Illicium verum*) CONTRA *Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis* Y *Escherichia coli*

JEIMMY JULIETH PINZÓN SÁNCHEZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de

MICROBIOLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA, D.C.
MAYO DE 2010

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ANÍS ESTRELLADO (*Illicium verum*) CONTRA *Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis* Y *Escherichia coli*

JEIMMY JULIETH PINZÓN SÁNCHEZ

APROBADO

_____	_____
Dra. Ingrid Schuler Ph.D. **Decana Académica** **Facultad de Ciencias**	**Dra. Janeth Arias Palacios M.Sc.** **Directora Carrera** **Microbiología Industrial**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ANÍS ESTRELLADO (*Illicium verum*) CONTRA *Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis* Y *Escherichia coli*

JEIMMY JULIETH PINZÓN SÁNCHEZ

APROBADO

_____

Adriana Páez Morales
Directora
Pontificia Universidad Javeriana

_____

Jorge Robles, PhD
Codirector
Pontificia Universidad Javeriana

_____

Dra. Janeth Arias Palacios M.Sc
Evaluadora
Pontificia Universidad Javeriana

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia"

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo, A quienes han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por esto y más... Gracias, A mi madre que es el ser más maravilloso de todo el mundo. Gracias por el apoyo moral, su cariño y comprensión que desde niña me ha brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles.

A mi padre porque desde pequeña ha sido para mí un gran hombre maravilloso al que siempre he admirado y al que le Agradezco humildemente todos los esfuerzos que realizo en los momentos más difíciles y más felices a lo largo de mi carrera, para que yo pudiera alcanzar la más preciada meta... ¡Ser Profesional!

Hoy finalizó una etapa más en mi vida, y Agradezco a Dios que me haya dado vida y salud, así como la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia las etapas más felices de mi vida.

Gracias a mi hermano, porque directa e indirectamente ha contribuido al cumplimiento de mis más importantes metas, y porque ha sido también una fuente de estimulo y dedicación a esta mi Carrera Profesional. Porque se ha ganado mi cariño, admiración y respeto, porque ya es también todo un profesional.

Gracias a Ustedes por la lucha, sacrificio y esfuerzo que tuvieron para que yo fuera lo que hoy soy. ¡Toda una Profesional!

AGRADECIMIENTOS

A la profesora **Adriana Páez** por su colaboración, apoyo, asesoría, conocimiento y confianza que deposito en mí para la realización de este proyecto.

Al profesor **Jorge Robles**, por su disposición y conocimientos, para llevar a cabo la investigación.

A toda mi familia y mis amigos que me han brindado una voz de aliento y su mano durante la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

1. RESUMEN..... **1**

2. INTRODUCCION..... **3**

3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... **4**

4. MARCO TEORICO..... **6**

5. OBJETIVOS..... **8**

5.1 OBJETIVO GENERAL..... **8**

5.2 OBJETIVO ESPECIFICO..... **8**

6. METODOLOGIA..... **9**

6.1. Métodos..... **9**

6.1.1. Preparación del material vegetal..... **9**

6.1.2. Microorganismos de ensayo..... **10**

6.1.2.1. Preparación de los inoculos..... **11**

6.1.3. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto por el método de perforación y difusión en Agar..... **11**

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... **12**

7.1. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto por el método de perforación y difusión en agar..... **12**

8. CONCLUSIONES..... **24**

9. RECOMENDACIONES..... **25**

10. BIBLIOGRAFIA..... **26**

11. ANEXOS..... **29**

11.1 Anexo 1:..... **29**

11.1.1. Certificado de las cepas evaluadas..... **29**

11.2 Anexo 2:..... **33**

11.2.1. Recolección de datos..... **33**

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Organismos utilizados para la evaluación de la actividad antibacteriana de plantas superiores…… **10**

Tabla 2. Concentración de los extractos…… **12**

Tabla 3. Tratamientos empleados en el estudio…… **13**

Tabla 4. Composición química del aceite esencial expresada en % de *I.verum*…… **14**

Tabla 5. Valor de inhibición a la concentración inicial del extracto etanólico y sus facciones…. **15**

Tabla 6. Valor de inhibición a la concentración de 10 mg/mL para el extracto etanólico y sus fracciones…… **15**

Tabla 7. Interpretación de halos de inhibición en test de difusión en agar (Kiby Bauer) para *Staphylococcus* NCCLS – 2001…… **21**

Tabla 8. Susceptibilidad de *E.coli* y *B.subtilis* frente agentes antimicrobianos…… **22**

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Distribución de los extractos al realizar la prueba antimicrobiana…….…….…….. **16**

Figura 2. Inhibición de los microorganismos evaluados por el extracto total, y las fracciones de cloroformo y acetato de etilo a su concentración inicial…….…….…….…….…….…….…. **16**

Figura 3. Inhibición de los microorganismos evaluados por el extracto total, y las fracciones de cloroformo y acetato de etilo a la concentración de 10 mg/mL…….…….…….…….…….…… **17**

Figura 4. Control de viabilidad y microscopia de los microorganismos…… …….…….... **17**

Figura 5. Valor de inhibición del extracto etanólico, fracción acetato de etilo y cloroformo a la concentración inicial…….…….…….…….…….…….

1. RESUMEN

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de las instalaciones de la Universidad Javeriana, con el fin de observar y determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico del Anís estrellado (*Illicium verum)* y sus fracciones de cloroformo y acetato de etilo, frente a microorganismos patógenos *Escherichia coli* (NCIMB 8545)*, Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8853)

Para la obtención del extracto, el material vegetal seco y molido se trato por reflujo con etanol y posteriormente se concentró a presión reducida en un rotaevaporador. Una vez concentrado el extracto, fue sometido a un fraccionamiento líquido/ líquido por método discontinuo, utilizando como solventes el cloroformo y el acetato de etilo en orden ascendente de polaridad. Finalmente sus concentraciones iniciales se obtuvieron mediante peso seco con ayuda de un vidrio de reloj.

Luego de obtener los extractos a evaluar se midió la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de perforación y difusión en gel, prueba que permitió medir la susceptibilidad *In vitro* de los microorganismos patógenos seleccionados frente a sustancia de origen natural con potencia antimicrobiana.

Al analizar los resultados del ensayo se observo que el extracto etanólico de *I. verum* presentó mayor actividad antimicrobiana en su concentración de 18,5 mg/mL frente a *E.coli y B. subtilis; L*a fracción de acetato de etilo presentó un mejor efecto antimicrobiano sobre *E.coli* y *S.epidermidis* a la concentración de 10 mg/mL comparado con el extracto etanólico y la fracción de cloroformo que se encontraban a la misma concentración; Finalmente, el cloroformo fue el que menor efecto antimicrobiano presento a comparación de la fracción de acetato de etilo y el extracto etanólico, La fracción de cloroformo presento un mayor efecto en *B.subtilis* en su concentración inicial de 45,5 mg/mL.

En este trabajo se concluyo que el extracto etanólico presento mayor acción frente a los tres microorganismos a su concentración inicial y que el acetato de etilo fue la mejor fracción que presento efecto inhibitorio sobre los microorganismos a la concentración de 10 mg/mL, de tal manera que se logro identificar a la fracción de acetato de etilo como la responsable del principio activo con potencial antimicrobiano; Finalmente, al ser comparada la actividad antimicrobiana del extracto con los antibióticos usados para cada microorganismo en los estudios de antibiogramas,

se evidencio que *S. epidermidis* presento resistencia, *E.coli* fue sensible y *B.subtilis* no fue comparado con otros agentes antimicrobianos ya que aun no ha sido reportado la resistencia y susceptibilidad de los agentes antimicrobianos frente a este microorganismo, ya que ha sido considerado un microorganismo poco recurrente; cabe anotar que para dar continuidad a futuras investigaciones en torno a la potencialidad antimicrobiana de la especie de *I. verum* es necesario el aislamiento de la (s) moléculas con capacidad de inhibir a los microorganismos seleccionados.

2. INTRODUCCION

Desde tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX se utilizaron por error, aquellos extractos que brindaban curar enfermedades; sin embargo esta práctica pasaba y se iba perfeccionando de generación en generación. Desde tiempos muy remotos las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales.

No obstante los innegables triunfos de la quimioterapia antimicrobiana, la cual ha revolucionado la practica farmacéutica y medica, los microorganismos no han sido en absoluto vencidos, pues se ha visto un aumento en la prevalencia de cepas resistentes a medicamentos, lo que ha motivado la búsqueda de agentes antimicrobianos más eficaces, a partir de fuentes naturales.

Debido a lo anterior, la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana, es importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes a antibióticos y a antisépticos, que permitan su utilización como agentes desinfectantes o como preservativos antimicrobianos en productos farmacéuticos o en alimentos, ya que muchas especies de microorganismos pueden producir infecciones graves en el hombre y en los animales, por lo tanto, es una necesidad encontrar compuestos activos ya que el número de agentes antimicrobianos desarrollados han sido relativamente escasos.

Con base a lo anterior en aras de buscar alternativas de aprovechamiento y conocer la presencia de principios activos en *Illiciun verum* , se planteó evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y las fracciones de cloroformo y acetato de etilo, frente a microorganismos patógenos *Escherichia coli* (NCIMB 8545), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8853) utilizando el método de perforación y difusión en agar, para determinar cual fracción presenta mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos.

3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

FORMULACION DEL PROBLEMA

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes no tradicionales como las plantas superiores, es importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes a antibióticos y otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos, desinfectantes o como preservativos antibacterianos en productos farmacéuticos o en alimentos.

De esta manera se pretende realizar un estudio del extracto de Anís estrellado (*Illicium verum*) contra los patógenos *Escherichia coli* (NCIMB 8545), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8853) especies representativas de varios grupos bacterianos que difieren en morfología, reacción al Gram y sensibilidad a los agentes antibacterianos y que a su vez son utilizadas como organismos patrón en valoraciones de antibióticos, evidenciando si presentan resistencia ante este extracto ya que es conocido por tener propiedades antimicrobianas.

JUSTIFICACIÓN

No obstante los innegables triunfos de la quimioterapia antimicrobiana, la cual ha revolucionado la practica farmacéutica y medica y, muy probablemente, represente el principal logro de las ciencias biomédicas, los “microorganismos” no han sido en absoluto “vencidos”, pues se han visto un aumento en la prevalencia de cepas resistentes a medicamentos y desinfectantes, lo que ha motivado la búsqueda de agentes antimicrobianos más eficaces, a partir de fuentes naturales.

Debido a lo anterior y a la necesidad de encontrar sustancias con actividad antimicrobiana que pueda ser aplicada no solo en el campo terapéutico, sino también en agricultura, buscando una nueva alternativa para la eliminación de microorganismos sometiéndolos a un proceso de inhibición por medio de la implementación del extracto proveniente de Anís estrellado (*Illicium verum*), que beneficiara en el futuro a un gran número de personas, ya que se daría a conocer un método natural para la eliminación de microorganismos sin causar daño ni alteraciones en el campo a usar.

La importancia de esta investigación va encaminada a la búsqueda de nuevos productos biológicos que se puedan generar a un menor costo y sin crear resistencia en los microorganismos, y lo mas importantes es que tiene un efecto menos agresivo en la salud humana.

Por otro lado se desea evaluar los efectos antimicrobianos de esta planta, ya que se han realizado pocos trabajos sobre el anís estrellado nativo y sus efectos de los aceites esenciales sobre microorganismos patógenos en Colombia.

4. MARCO TEORICO

Desde tiempos remotos la población del mundo ha recurrido a las plantas con el fin de curarse algunas dolencias. Las plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus virtudes de generación en generación; nadie buscaba saber porque o como actuaban, pero era un hecho sin respuesta y aparentemente mágico (Luid B *et al.)*

Numerosos compuestos con actividad antimicrobiana han sido aislados de plantas; de ellos los más importantes corresponden a compuestos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides, etc. (Luid B *et a.)*

Los productos de origen vegetal han sido, en las últimas dos décadas mayormente estudiados en su parte química, con énfasis en los metabolitos secundarios, los cuales están implicados en el control biológico contra patógenos o plagas (Kagale *et al. 2004*)

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol ó éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de las partes de una planta fresca o seca.(Bruneton,2001)

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de euros alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1.340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos. A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que estos por separado poseen mucha menos actividad que cuando se encuentran juntos (Martín, 2007)

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan: terpeno, aceites esenciales, cumarinas y flavonoides. (Martín, 2007)

Los mecanismos exactos de acción, de muchos extractos naturales, no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente, debe su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a la que somete a la membrana celular de los microorganismos, hecho que determina que pierda su control e integridad. (Martin, 2007)

Illicium verum es una planta con potencial fuente de componentes antimicrobianos y es comúnmente llamado anís estrellado, es un miembro de las *Magnoliaceae.* Se distribuye en el Atlántico, Norteamérica y las zonas tropicales y subtropicales de Asia.
Illiciunm verum es un árbol de hoja perenne que alcanza una altura de 8-15 m. los frutos tienes forma de estrella, con 8 carpelos que contienes semillas marrones. Se recolecta antes de su completa madurez, cuando el contenido de aceites esenciales es el máximo. El aceite esencial de anís estrellado e un líquido de color amarillo pálido. (De m *et al., 2001)*

El constituyente principal, muy mayoritario (80-90%) es el E-anetol. va acompañado de metilchavicol (=estragol), anisaldehido y constituyentes terpenicos (limoneno, linalol, hidrocarburos sesquiterpenicos). El fruto contiene también lignanos y dioles fenilpropánicos derivados del *Threo*-anetol glicol, ácido shikímico (hasta un 8,5%), flavonoides, taninos, triglicéridos así como sesquiterpenos pero en muy pequeñas cantidades (Bruneton, J 2001). El anetol es un compuesto terapéutico importante, con actividades antiinflamatorias y antifungicas. (De m *et al., 2001)*

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto proveniente del Anís estrellado (*Illicium verum*) contra *Escherichia coli* (NCIMB 8545), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8853) por el método de perforación y difusión en agar.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener a partir del Anís estrellado (*Illicium verum*) el extracto total y sus fracciones.
- Probar las propiedades antimicrobianas del extracto total del Anís estrellado (*Illicium verum*) y sus fracciones contra *Escherichia coli* (NCIMB 8545), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8853) por medio del método de perforación y difusión en agar.
- Evaluar Dos concentraciones del extracto, para producir el efecto antimicrobiano, en las cepas seleccionadas.

6. METODOLOGÍA

6.1 MÉTODOS

6.1.1. Preparación del material vegetal

El Anís estrellado fue adquirido comercialmente en cantidad de 500 gramos respectivamente, para luego, por medio de una molienda, reducir el Anís estrellado en tamaño de partículas. (Bermúdez y Barrera, 2000)

La extracción se realizó por el método de reflujo, donde el material vegetal triturado es sometido con etanol a un proceso de destilación por reflujo cercano a la temperatura del punto de ebullición del solvente, que consiste en extraer las posibles sustancias antimicrobianas (Gutiérrez, 2002); los extractos resultantes se llevaron a mínimo volumen o sequedad en una rota evaporadora a presión reducida que para el etanol de 175 bares. (Bermúdez y Barrera, 2000).

Posteriormente, se obtuvo mediante peso seco la concentración inicial del extracto puro; esta metodología se llevo a cabo, colocando sobre un vidrio de reloj 1 mL del extracto, colocando en baño de maría hasta que se evapore el solvente, obteniendo de esta manera una fase sólida, la concentración del extracto se determina pesando el vidrio de reloj después de la evaporación y realizando la resta del valor obtenido con el peso del vidrio de reloj sin extracto haciendo la relación del peso en un mL.

Una vez concentrado el extracto, fue sometido a un fraccionamiento líquido/ líquido por método discontinuo (Cayón, 2002 y Vivek *et al,* 2008), utilizando como solventes el cloroformo y acetato de etilo en orden ascendente de polaridad. Estos solventes se utilizaron con el fin de extraer los metabolitos de la planta a diferentes polaridades (Durán *et al.* 2007). En este fraccionamiento se colocó el extracto puro junto con el solvente de fragmentación (las dos sustancias son inmiscibles) en un embudo de decantación, se tapó y agitó manualmente, abriendo y cerrando la llave del embudo para permitir la evaporación del solvente, este procedimiento se repitió cuatro veces agregando solvente nuevo en cada repetición de la extracción de los principios activos de la planta; posterior a esto, el embudo de decantación se dejó quieto para observar el fraccionamiento, al separarse las dos fases se abrió la llave del embudo de decantación obteniendo los componentes extraídos por el solvente en un Beaker ; (Gutiérrez, 2002).

Finalmente, al igual que con el etanol, las fracciones obtenidas con el acetato de etilo y el cloroformo fueron sometidas a una rota-evaporación a presión reducida, empleando la presión correspondiente a cada solvente. (Bermúdez y Barrera, 2000)

6.1.2. Microorganismos de ensayo

Para la evolución de la actividad antibacteriana se escogieron especies representativas de varios grupos bacterianos *Staphylococcus epidermidis (*Gram positivo)*, Bacillus subtilis* (Gram positivo) Y *Escherichia coli* (Gram negativo) cepas utilizadas como organismos patrón en valoraciones de antibióticos y que fueron escogidas en las cepas enumeradas de la tabla I.

Tabla I. Organismos utilizados para la evaluación de la actividad antibacteriana de plantas superiores (Ramón, J y Sanabria, A)

No.	Organismo	Seleccionadas	Clasificación
1.	*Staphylococcus aureus*	N.A	Gram positivo
2.	*Staphylococcus epidermidis*	S.A	Gram positivo
3.	*Bacillus subtilis*	S.A	Gram positivo
4.	*Escherichia coli*	S.A	Gram negativo
5.	*Salmonella typhi*	N.A	Gram negativo
6.	*Klebsiella pneumonia*	N.A	Gram negativo
7.	*Pseudomonas aeruginosa*	N.A	Gram negativo
8.	*Mycobacterium fortuitum*	N.A	Acido resistente

N.A. No aplica
S.I. Si aplica

6.1.2.1. Preparación de los inóculos

Las distintas bacterias se sembraron por la técnica de siembra masiva en placas con Agar Muller-Hinton se incubaron por 24 horas a 35°C-37°C; a partir de una placa de cultivo en crecimiento activo con ayuda de un asa bacteriológica se tomaron 5 colonias y se inoculo en 25 mL de caldo BHI, se incubaron a 37 °C por 24 horas. (Ramón, J y Sanabria, A y Ramírez, L y Díaz, B, 2007). Transcurrido el tiempo de incubación, se ajusto la concentración del inóculo con caldo BHI, y se midió la Absorbancias hasta obtener un valor de 0.25 equivalente a concentración de 10^8 células/mL. (Guiza y Rincón, 2007*)*.

6.1.3. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto por el método de perforación y difusión en agar

Los inóculos indicados antes para las bacterias se homogenizaron en un vortex y se tomo 500µL, los cuales se inocularon en el Agar Muller Hinton fundido a 45°C y a un pH entre 7.2 y 7.4, este se homogenizó y se vertió sobre cajas de petri estériles, después de solidificado el medio se hicieron 4 perforaciones; en una de las perforaciones se aplicó 100µL de etanol del 95% (Control de inactividad del solvente) y en las otras tres perforaciones se inoculo el extracto etanólico, fracción con acetato de etilo y fracción con cloroformo; se dejaron en predifusión durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incubaron a 37°C durante 24 horas y al cabo de este tiempo se midió los diámetros de inhibición; los resultados son el promedio de 3 determinaciones. (Ramón, J y Sanabria, A). De cada extracto obtenido a partir de cada solvente utilizado se obtuvo un total de 6 tratamientos, donde se tuvieron en cuenta dos concentraciones diferentes por la extracción y fracción.

Las concentraciones obtenidas y evaluadas a partir del anís estrellado fueron: **extracto etanólico** 18,5 mg/mL y 10 mg/mL, c**loroformo** 45,5 mg/mL y 10 mg/mL, **acetato de etilo** 12 mg/mL y 10 mg/mL. **Etanol al 95 %**

7. RESULTADOS Y DISCUSIÒN

La planta escogida para esta investigación fue seleccionada principalmente por la actividad antimicrobiana, desinfectante y antiséptica que le otorga sus componentes E-anetol, metilchavicol (=estragol), anisaldehido y constituyentes terpenicos (limoneno, linalol, hidrocarburos sesquiterpenicos); que pueden ejercer un efecto sobre gran variedad de microorganismos como lo son bacterias Gram positivas y Gram negativas: *Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli y Bacillus subtilis,* entre otros.

La extracción de estos componentes se llevo a cabo por una destilación por reflujo, utilizando etanol como solvente, posterior a esto se realizo el fraccionamiento del extracto utilizando cloroformo y acetato de etilo, de acuerdo a esto se obtuvo dos fracciones por el extracto.(Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de los extractos totales obtenidos

PLANTA	SOLVENTE	PESO SECO EXTRACTO (mg/mL)
Anís estrellado	Etanol	18,5
	Cloroformo	45,5
	Acetato de etilo	12

7.1. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto por el método de perforación y difusión en agar

Muchas plantas han sido aceptadas para su uso antimicrobiano porque en su análisis químico y evaluación farmacológica han demostrado que contienen un principio especial, (Zapata *et al.,* 2003) la búsqueda es muy intensa en casi todo el mundo y se basa en explorar el parentesco sistemático con plantas curativas ya reconocidas que han servido para hallar otras nuevas; o bien se han descubierto por casualidad o por validación sistemática de la flora de una región (Romero *et al.,* 2006)

Observando el valor inhibitorio que se obtuvo después de enfrentar los microorganismos con los seis tratamiento (Tabla 3.) se logro evidenciar una buena inhibición sobre los tres microorganismos

con respecto al extracto etanólico y el acetato de etilo, y un bajo valor de inhibición con el cloroformo a las dos concentraciones evaluadas para dichos extractos (Tabla 5) (Tabla 6).

Tabla 3. Tratamientos empleados en el estudio

TRATAMIENTO	ESPECIFICACIÓN
1	Extracto etanólico 18,5 mg
2	Extracto etanólico 10 mg
3	Acetato de etilo 12 mg
4	Acetato de etilo 10 mg
5	Cloroformo 45,5 mg
6	Cloroformo 10 mg

Las concentraciones a las cuales se produjo la inhibición son bajas con respecto a otros estudios hechos con diferentes tipos de plantas. Sin embargo, dado los numerosos principios activos que en esta planta se encuentra, es muy probable que de esta fuente pueda aislarse moléculas eficaces para ser usadas como antimicrobianos; estudios reportan que una de las moléculas con mayor proporción en el Anís estrellado es el anetol y estragol, compuestos ampliamente utilizados como saborizantes y aromatizantes en la industria de alimentos y bebidas alcohólicas; además, son utilizados en perfumes, jabones y detergentes y como precursores en síntesis orgánica para formulaciones farmacéuticas. Estos compuestos presentan varias actividades biológicas como insecticidas, bactericida, antiinflamatoria y anestésica (Muños, A. *et al.,* 2007). Cabe destacar que, el anís estrellado adquirió en los últimos años un valor especial en el mercado farmacéutico, ya que de dicha planta extraen el ácido shikimico que, tras un complejo proceso de 10 etapas (tres pasos químicos desarrollados a baja temperatura en siete lugares diferentes), se transforma en el epóxido (una forma de alcohol) conocido como oseltamivir, el principal componente del medicamento **Tamiflu**, único tratamiento conocido hasta ahora para la gripe aviar.

Según lo descrito por De M *et al.* (2001) y Dzamic A *et al* (2009), mostraron que el Anís estrellado presenta 16 componentes en el aceite esencial, pero como componentes mayoritarios se encuentra el trans- anetol (90,82%) seguido el estragol (3,68%) (Tabla 4) siendo los posibles causantes de los efectos inhibitorios en los microorganismos.

Tabla 4. Composición química del aceite esencial expresada en % de *I. verum*
(Dzamic A *et al*., 2009)

Components	KI	*I. verum*
α-Pinene	939	0.13
α-Phellandrene	1005	0.11
p-Cymene	1026	0.06
Limonene	1031	0.67
Linalool	1097	0.79
Terpinen-4-ol	1177	0.12
α-Terpineole	1189	0.21
Estragole	1195	3.68
cis-Anethole	1253	0.41
p-Anisaldehyde	1250	0.78
trans-Anethole	1285	**90.82**
Anisylacetone	-	0.24
β-Caryophyllene	1418	0.20
trans-α-Bergamotene	1435	0.17
α-Muurolol	1641	0.07
Foeniculin	1677	1.00

KI: kovats index on DB-5 column.

La capacidad antimicrobiana del extracto de Anís y sus fracciones fueron obtenidas por la siguiente fórmula:

C = A - B

C= Valor inhibitorio
A = tamaño del halo + perforación
B = Tamaño de la perforación (6 mm)

El Valor de inhibición fue tomado del promedio de cada replica (Lizcano y Vergara, 2008)

La capacidad antimicrobiana podría ser atribuida a la presencia de trans- anetol, estragol y algunos sesquiterpenos. Se ha informado, que estos compuestos atacan la membrana citoplasmática del microorganismo destruyendo la capacidad selectiva y permitiendo el escape de componentes intracelulares (Nychas, 1995) lo que sumado a su capacidad de inactivar enzimas.

Un ejemplo de este comportamiento son los datos obtenido del valor inhibitorio después de haber administrado el extracto del Anís estrellado y sus fracciones sobre los microorganismos teniendo como resultado la acción inhibitoria. (Tabla 5) y (Tabla 6)

Tabla 5. Valor de inhibición a la concentración inicial del extracto etanólico y sus fracciones

Microorganismo	Fracción	Promedio de replica Mm	Diámetro de inhibición mm	Diámetro perforación mm	Valor de inhibición Mm
Escherichia coli	Extracto etanólico	28,3	28,3	6	22,3
	Cloroformo	8,6	8,6	6	2,6
	Acetato de etilo	25,6	25,6	6	19,6
Bacillus subtilis	Extracto etanólico	26,3	26,3	6	20,3
	Cloroformo	16	16	6	10
	Acetato de etilo	24,3	24,3	6	18,3
Staphylococcus epidermidis	Extracto etanólico	18,3	18,3	6	12,3
	Cloroformo	8,6	8,6	6	2,6
	Acetato de etilo	19,6	19,6	6	13,6

Tabla 6. Valor de inhibición a la concentración de 10 mg/mL para el extracto etanólico y sus fracciones

Microorganismo	Fracción	Promedio de replica Mm	Diámetro de inhibición mm	Diámetro perforación mm	Valor de inhibición Mm
Escherichia coli	Extracto etanólico	20,6	20,6	6	14,6
	Cloroformo	7,3	7,3	6	1,6
	Acetato de etilo	22,3	22,3	6	16,3
Bacillus subtilis	Extracto etanólico	15,3	15,3	6	9,3
	Cloroformo	9,3	9,3	6	3,3
	Acetato de etilo	15,3	15,3	6	9,3
Staphylococcus epidermidis	Extracto etanólico	17,3	17,3	6	11,3
	Cloroformo	7,3	7,3	6	1,3
	Acetato de etilo	18	18	6	12

En las siguientes figuras se evidenciaran los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de Anís estrellado y sus fracciones, logrando notar la respuesta de inhibición de los microorganismos cuando fueron sometidos al extracto.

La inhibición del crecimiento de los microorganismos se observan en las figuras 2 y 3, donde el control (Figura 4), es decir el medio de cultivo que no tiene adición de extracto permite ver el crecimiento de los microorganismos, mientras que con la adición de los extracto inhiben su normal crecimiento.

Al evaluar los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria, podemos indicar que el extracto etanólico y la fracción de acetato de etilo presentaron un fuerte efecto sobre *E. coli, B. subtilis* y *S. epidermidis* y la fracción de cloroformo presento un bajo rendimiento contra la inhibición de estos 3 microorganismos (Tabla 5 y 6); cabe destacar, que el rendimiento del extracto etanólico y el de las dos fracciones disminuye al diluir la concentración de los mismos, evidenciándose una disminución en los halos de inhibición y por ende su eficacia. (Figura 2.) (Figura 3)

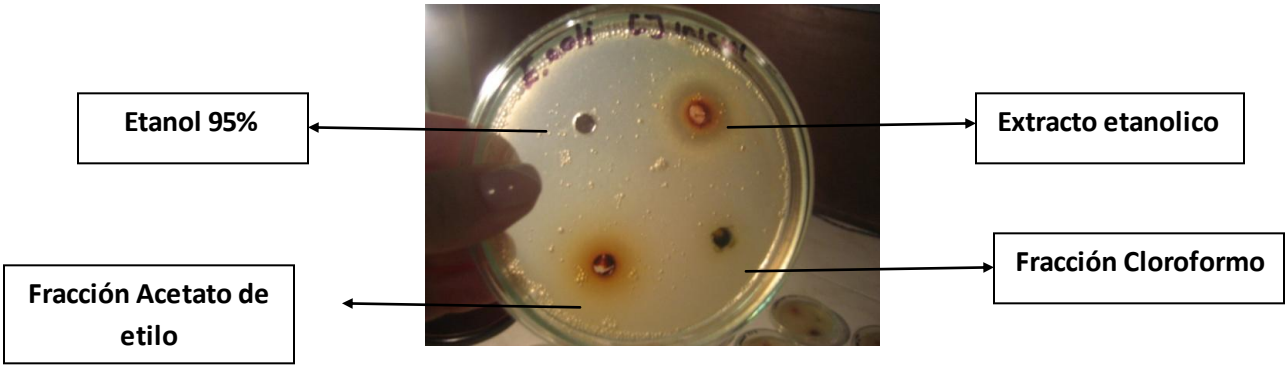
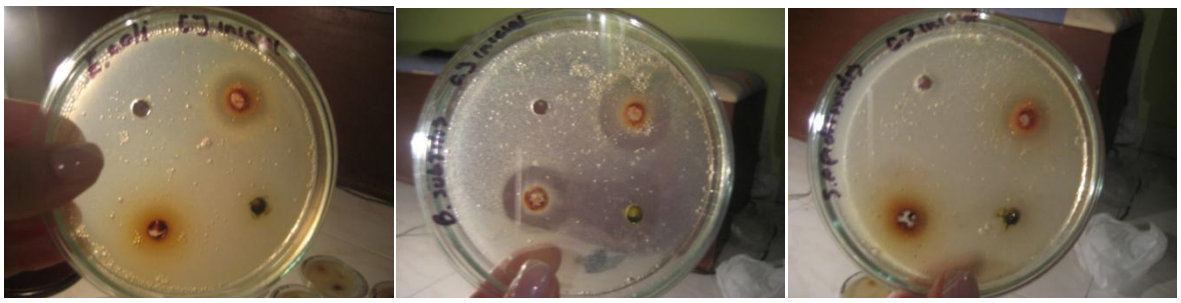
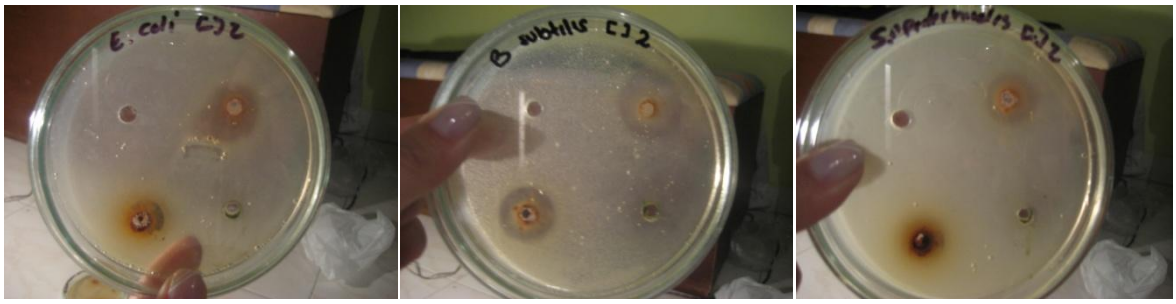


Figura 1. Distribución de los extractos al realizar la prueba antimicrobiana



Escherichia coli *Bacillus subtilis* *Staphylococcus epidermidis*

Figura 2. Inhibición de los microorganismos evaluados por el Extracto total, y las fracciones de Cloroformo y Acetato de etilo a su concentración inicial.



Escherichia coli *Bacillus subtilis* *Staphylococcus epidermidis*

Figura 3. Inhibición de los microorganismos evaluados por el Extracto total, y las fracciones de Cloroformo y Acetato de etilo a la concentración de 10 mg/mL.

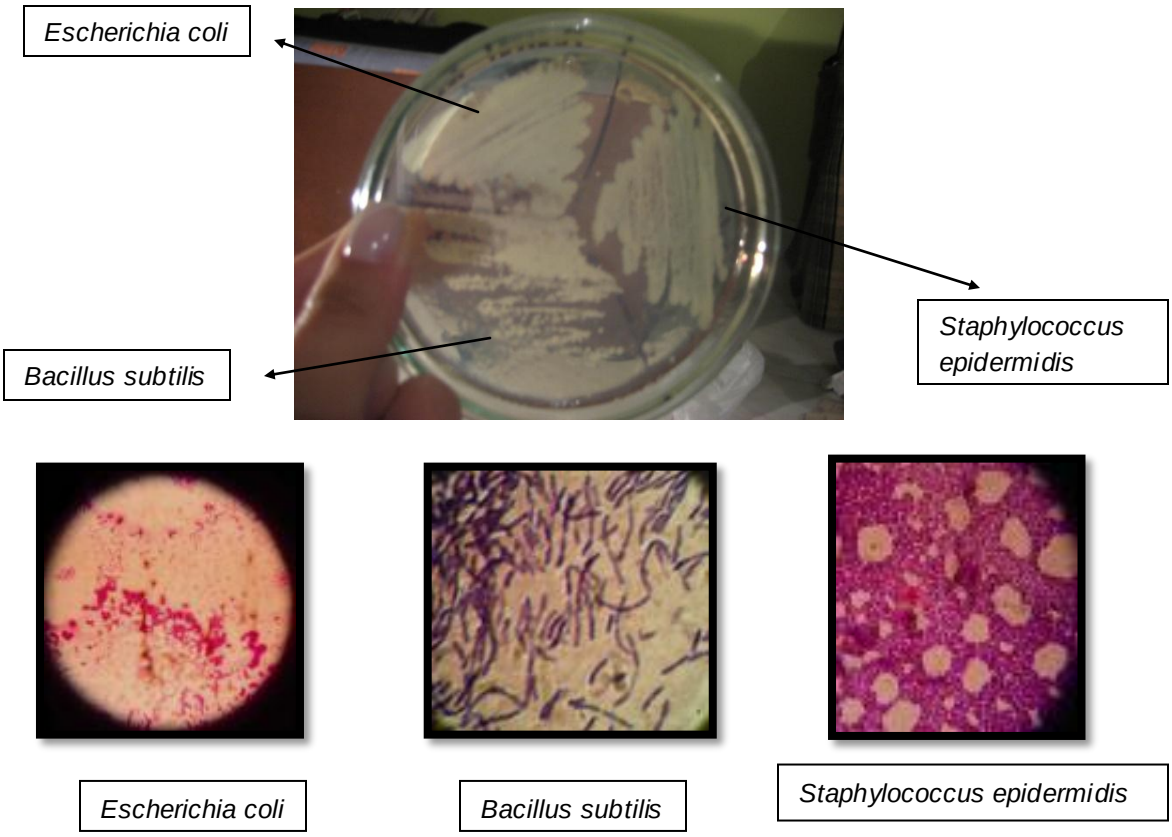


Figura 4. Control de viabilidad y microscopia de los microorganismos

Las concentraciones iniciales de cada fracción y del extracto etanólico a las cuales se produjo la inhibición son variadas; El cloroformo se encontró con una mayor concentración, comparado con las concentraciones halladas de la fracción de acetato de etilo y el extracto etanólico; Sin embargo, se evidencio que el cloroformo no presento un efecto inhibitorio satisfactorio frente a los microorganismo a diferencia de la fracción de acetato de etilo y el extracto etanólico que dejaron evidencia de una inhibición satisfactoria frente a los mismos microorganismos. Esto nos indica que los metabolitos que ejercen la actividad antimicrobiana se encuentra en la fracción de acetato de etilo y muy pocos en la fracción de cloroformo (Tabla 5 y 6).

La prueba de actividad antibacteriana realizada muestra que el extracto etanólico del Anís estrellado es el que mayor inhibición ocasiono sobre los microorganismos a su concentración de 18,5 mg/mL, siguiendo el acetato de etilo a su concentración de 12 mg/mL; sin embargo cabe destacar, que el extracto etanólico tiene todos los metabolitos presentes, logrando un mejor efecto antimicrobiano sobre los microorganismos, ya que no fue sometido a fraccionamiento.

En la figura 5 se observa que el extracto etanólico fue el que genero mayor inhibición en *E.coli y B.subtilis,* La fracción de acetato de etilo ocasiono una mayor inhibición sobre *S. epidermidis* comparado con el extracto total, y finalmente el cloroformo fue el que menor efecto inhibitorio ocasiono sobre los microorganismos, pero logro una inhibición mayor en *B.subtilis.*

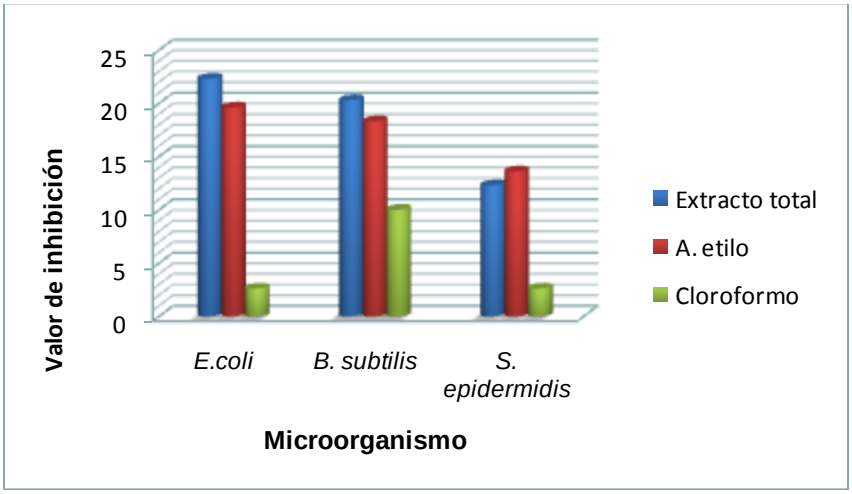


Figura 5. Valor de inhibición del extracto etanólico, fracción acetato de etilo y cloroformo a la concentración inicial.

En cuanto a la concentración de 10 mg/mL se evidencio una disminución en la inhibición de los microorganismos cuando fueron sometidos a esta concentración; en este caso se evidencio que el acetato de etilo presento mayor actividad antimicrobiana sobre los microorganismos con una mayor inhibición sobre *E.coli; el* extracto etanólico disminuyo su rendimiento frente a los microorganismo; finalmente, el cloroformo presento mayor efecto sobre *B. subtilis* nuevamente. (Figura 6). Según los resultados obtenidos de la comparación de las dos concentraciones se evidencia que el acetato de etilo es la fracción que presenta los compuestos con actividad antimicrobiana, ya que se evidencia su actividad inhibitoria en las dos concentraciones, predominando finalmente en la concentración de 10 mg/mL frente al el extracto total. (Figura 7).

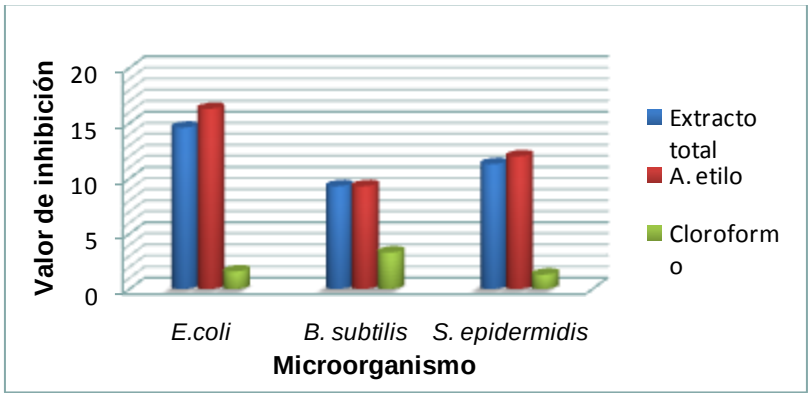


Figura 6. Valor de inhibición del extracto etanólico, fracción acetato de etilo y cloroformo a la concentración de 10 mg/mL.

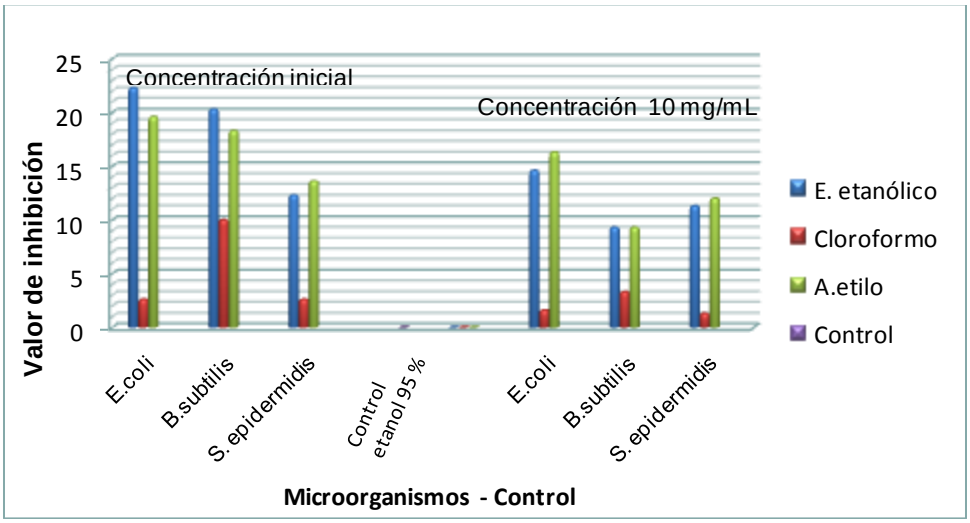


Figura 7. Comparación del valor de inhibición del extracto etanólico, fracción acetato de etilo y cloroformo a la concentración inicial y 10 mg/mL.

Algunos trabajos indican que el anetol es el principal compuesto que causa la actividad antimicrobiana, ya que los ensayos realizados con el compuesto aislado en relación con el patrón de anetol indicaron que ambos eran comparables en la inhibición del crecimiento de los microorganismos. Según DE M *et al., 2001* los valores de CMI indicaron que anetol aislado es tan eficaz como el patrón no solo en la inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 8), sino también en hongos y levaduras. Sin embargo, no se ha desarrollado un método para el aislamiento de anetol de alta pureza a partir de *I.verum.*

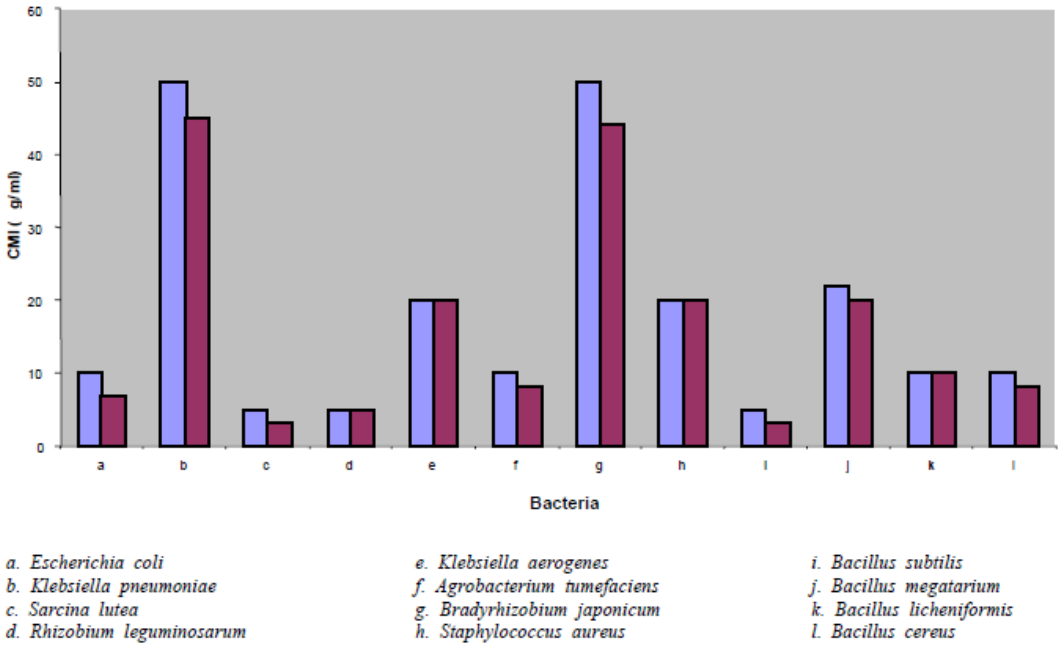


Figura 8. CMI del anetol patrón (barras de la izquierda) y extraído (barras de la derecha) sobre diversos microorganismos. (DE M *et al., 2001)*

Sin embargo, cabe destacar que los principales componentes pueden constituir hasta el 85 % del aceite y el resto de los compuestos se encuentran en pequeñas cantidades o razas. Existe evidencias de que los compuestos menores desempeñan un papel relevante en la función antimicrobiana, probablemente generando un efecto sinérgico con los otros constituyentes de la mezcla (Lambert *et al*., 2001).

Es precisamente debido a su compleja composición química, que son diversos en sus efectos, y en ello se fundamenta su acción antimicrobiana pues esto contribuye a hacer extremadamente difícil la mutación o inducción de resistencia de los microorganismos; al ser mezclas complejas de numerosas moléculas con gran diversidad d grupos químicos, es muy probable que la actividad antimicrobiana no se atribuya a un mecanismo especifico ya que en las células hay diferentes sitios en donde pueden actuar, y los eventos pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultáneamente o consecuentemente. El carácter hidrofóbico de los aceites les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas y mitocondriales, perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares viales, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo. Los aceites también podían actuar sobre las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática deformando la interacción lípido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular. (Lambert *et al*., 2001).

La elección de tratamientos frente a muchos procesos infecciosos no es fácil; la elección de un antibiótico concreto tampoco resulta fácil por la existencia de múltiples alternativas disponibles.
Comparando la susceptibilidad de *S. epidermidis* frente a los antibióticos usados para realizarle antibiograma, se evidencio que el extracto etanólico y sus fracciones presentan una susceptibilidad baja para dicho microorganismo ya que su sensibilidad se ve reflejada en un halo mayor que va entre 13 mm y 29 mm de inhibición para ser considerado como sensible según el antibiótico a usar y su concentración (Tabla 7). Al observar la tabla 5 y 6 se observar que la inhibición que presento el microorganismo frente al extracto etanólico y las fracciones se encuentra menor a 13,6 mm siendo el Acetato a su concentración de 12 mg el que presento dicha inhibición.

Tabla 7. Interpretación de halos de inhibición en test de difusión en agar (Kirby Bauer) para *Staphylococcus* **NCCLS – 2001**

Antimicrobiano	Carga del sensidisco (µg)	R*	MS*	S*
Penicilina	10 UI	< 28	-	> 29
Oxacilina	1	< 10	11-12	> 13
Oxacilina *S. coagulasa* neg.	1	< 17	-	> 18
Vancomicina	30	-	-	> 15
Eritromicina	15	< 13	14-22	> 23
Clindamicina	2	< 14	15-20	> 21
Cotrimoxazol (trimetoprim/sulfa)	1/23	< 10	11-15	> 16
Tetraciclina	30	< 14	15-18	> 19
Ciprofloxacina	5	< 15	16-20	> 21
Gatifloxacina	5	< 14	15-17	> 18
Rifampicina	5	< 16	17-19	> 20
Gentamicina	10	< 12	13-14	> 15
Nitrofurano	300	< 14	15-16	> 17

* R = resistente; M = medianamente susceptible. S = susceptible.

En cuanto a *E. coli* el extracto etanólico y la fracción de acetato de etilo presentó una buena inhibición ya que al comparar los resultados de los antibióticos con respecto a la actividad antimicrobiana de la planta se evidencio que *E.coli* presento sensibilidad frente al extracto etanólico, ya que este microorganismo es considerado sensible cuando su halo es mayor a 18 mm de inhibición; frente a la fracción de Acetato de etilo a la concentración de 10 mg se clasifica como intermedio ya que su halo se encuentra en 16,3 mm; finalmente se clasificaría como resistente si sus halos se encontraran menor a 13 mm. (NCCLS)

Finalmente, En la actualidad no existe mucho consenso sobre cuándo se debe realizar el estudio de susceptibilidad en *Bacillus* spp. y tampoco se tiene suficiente información sobre si los resultados *in vitro* tendrán algún significado clínico. Pero como en el último tiempo se ha visto que *Bacillus* spp es capaz de causar infecciones severas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Palavecino E., 2002); se han realizado estudios de susceptibilidad de *Bacillus sp.* donde se ha indicado que la interpretación de los resultados de penicilina se pueden usar los puntos de corte de *S. aureus*. (Palavecino E., 2002).

Según los resultados obtenidos del extracto etanólico y la fracción de acetato de etilo, se evidencio una buena inhibición sobre *B.subtilis* con el extracto etanólico; en cuanto al acetato de etilo se mostro un halo menor que el del extracto etanólico cuando se encuentran en su concentración inicial, ya que a la concentración de 10 mg/mL el extracto total y el acetato de etilo presentaron un mismo halo de inhibición. Sobre este microorganismo no se puede aun realizar comparaciones con respecto a los antibióticos puestos que la NCCLS no ha establecido la susceptibilidad y resistencia del mismo. (Bhattacharjee *et al.,* 2006)

Tabla 8. Susceptibilidad de *E. coli* y *B.subtilis* **frente agentes antimicrobianos**

	Diameter of the inhibitory zones (mm)	
Antibiotics (µg/ml)	*Escherichia coli*	*Bacillus subtilis*
Amoxycillin (30)	7	0
Ampicillin (10)	0	0
Amikacin (30)	0	29
Cotrimoxazole (25)	0	14
Ciprofloxacin (5)	27	31
Chloramphenicol (30)	0	22
Cloxacillin (1)	0	0
Cefadroxil (30)	0	0
Cefuroxime (30)	0	0
Doxycycline (30)	20	30
Erythromycin (15)	0	22
Gentamycin (10)	22	19
Gatifloxacin (10)	37	37
Kanamycin (30)	10	26
Lomefloxacin (10)	25	34
Levofloxacin (5)	23	30
Nalidixic acid (30)	11	20
Norfloxacin (10)	24	0
Ofloxacin (5)	20	20
Penicillin-G (10)	0	0
Sparfloxacin (10)	30	36
Tobramycin (10)	0	17
Tetracyclin (30)	12	25

Sin embargo, al realizar comparaciones entre antibióticos y con estudios *In vitro* con aceites esenciales de diferentes plantas, se han podido evidenciar que los microorganismos evaluados con el aceite esencial del Anís estrellado resultaron ser sensibles a CMI ≥ 10 mg/mL (Concentración final), esto se evidencia, ya que los microorganismos por las estructuras tan complejas que presentan los aceites esenciales de las plantas y los lugares donde actúan, impiden crear resistencia ante dichos compuestos, de tal manera que los antibióticos y los aceites resultan un poco complejo compararlos, puesto que los microorganismos ya han creado resistencia y sensibilidad a los antibióticos por su mecanismo de acción y en los aceites esenciales no se han reportado resistencias a dichos componentes, ni se conoce muy bien su mecanismo de acción sobre los microorganismo.

Se observo una notable sensibilidad de las diferentes cepas, cuyo crecimiento fue inhibido por los aceites del Anís estrellado. Los aceites esenciales son en general ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a bacterias Gram negativas. Esto puede deberse a la influencia de la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales, de naturaleza lipófilica.
En el caso de las bacterias Gram negativas sensibles, así como las Gram positivas, los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando la estructura y haciéndolas más permeables. Como consecuencia tiene lugar a una fuga de iones y otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que pudo llevar a la muerte celular de los microorganismos finalmente. (Zekaria, D.)

8. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente investigación se puede concluir:

- Por medio del método de perforación y difusión en agar, se logro evidenciar la actividad antimicrobiana del Anís estrellado (*I.verum)* contra las cepas *Escherichia coli* (NCIMB 8545)*, Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8853)

- Se determino que la técnica de destilación por reflujo permitió la extracción y obtención del extracto total (etanólico) y que al ser sometido a fraccionamiento líquido/líquido con los solventes cloroformo y acetato de etilo, se logro obtener las fracciones por polaridades permitiendo separar los compuestos y de esta manera facilitando la identificación de la fracción con mayor actividad antimicrobiana.

- Los extractos acuosos del Anís estrellado tienen efecto inhibitorio sobre las tres cepas evaluadas, evidenciándose que el extracto total y el acetato de etilo fueron los antimicrobianos que presentaron mejor efecto sobre los microorganismos a comparación del cloroformo.

- Se observo que a las concentraciones iniciales de cada fracción, el extracto total de Anís estrellado a su concentración de 18,5 mg/mL fue el que presento mejor efecto sobre *E.coli* y *B. subtilis;* Sin embargo a la concentración de 10 mg/mL, la fracción de acetato de etilo fue la que mejor efecto antimicrobiano presento y su mayor inhibición fue reflejada sobre *E.coli;* finalmente, el que menor efecto antimicrobiano presento en sus dos concentraciones fue el cloroformo, evidenciándose sobre *B.subtilis* su mayor inhibición en los dos casos.

9. RECOMENDACIONES

- Es necesario llevar el extracto de Anís (*Illicium verum)* a un análisis cromatográfico y de espectrometría de masas para conocer la totalidad de sus componentes y su concentración individual con el fin de conocer cuál es el componente con mayor proporción que posee la característica antimicrobiana.

- Para próximos estudios es recomendable evaluar una mínima concentración, para así observar el valor inhibitorio, frente a los microorganismos de estudio.

- Es importante evaluar la estabilidad del producto, para así evidenciar si este presenta cambio alguno en tiempos diferentes de almacenamiento y condiciones ambientales.

- Realizar un estudio de la recuperación de células dañadas; ya que este permite diferenciar entre actividad bacteriostática y actividad bactericida del compuesto a evaluar.

10. BIBLIOGRAFIA

BHATTACHARJEE, I. KUMAR, S. CHATTERJEE, S & CHANDRA, G. 2006. Antimicrobial potentiality of *Argemone mexicana* solvent extracts against some pathogenic bacteria.Mem inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101 (6): 645-648.

BERMUDEZ A. BARRERA A. 2000. Evaluación antifungica de los extractos de hojas secas de *Pentacalia tolimensis* (Compositae – Asteráceae). Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de Bacteriología. Bogotá

BRUNETO, J. 2001. Farmacognosia, Fitoquimica Plantas Medicinales. 2 edicion. Zaragoza, España. Pag: 563-564

CAYÓN M. 2002. Estudio de los extractos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y de las metodologías de extracción, en la determinación de la actividad de atracción o repelencia sobre *Macrociphum rosae*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

CHRYSTAL, J. 2002 Evaluation of *Staphylococcus* spp *in vitro* susceptibility. Laboratorio de Microbiologia, Hospital del Salvador. Rev chil infect; 19 (supl.2): S 116-118.

DE M; DE AK; MUKHOPADHYAY, R; MIRO, M and ANERJEE, AB. 2001. Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* HOOK. F. Ars Pharmaceutica, 42:3-4; 209

DURÁN M., GONZALEZ P., CARDONA L. 2007. Obtención y caracterización de la oleoresina del ajo (Allium Sativum). Scientia Et Technica. Vol. XIII - N° 037. Pp. 551-555

DZAMIC A., SOKOVIC M., RISTIC M., GRIJIC S., VUKOJEVIC Y MARIN P.2009. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 45, No.2. pp 259.261

GUIZA D., RINCON, L. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación termina sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus.* Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

GUTIÉRREZ M. 2002. “Estudio de los extractos de tabaco *(Nicotiana tabacum)* y de las metodologías de extracción, en la determinación de la actividad de atracción o repelencia sobre *Macrociphum rosae”.* Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

KAGALE, S.; MARIMUTHU, T; THAYUMANAVAN, B.; NANDAKUMAN, R. and SAMIYAPPAN, R. 2004. Physiological and Molecular Plan Pathology. 65. 91-100 p.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91, 453-462.

LIU B, H; LENGUA, L; LEON, G; LA TORRE, C; HUAPAYA, J Y CHAUCA, J. Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus sp.* “eucalipto”.

LIZCANO, M. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus Vulgaris)* contra *Botrytis cinérea, Fusarium oxysporium* y *Sclerotina sclerotium.* Trabajo de grado (Microbióloga agrícola y veterinaria). Pontificia Universidad Javeriana, carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá.

LIZCANO, A. Y VERGARA J.2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* rente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Trabajo de grado (Microbiología industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

MARTINEZ, C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de veterinaria. Tesis (Doctoral)

MORENO, M Y RUIZ, E. 2007. *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. Hospital General. Vol 70, Num. 1. Pp 24-29.

MUÑOS A., BOTTIA E., CARDENAS C., PATIÑO J., DIAZ O., MATINEZ J., KOUZNETSOV V., STASHENKO E. 2007. Estudio comparativo sobre la capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS+. Por los aceites ecensiales de especies aromaticas con alto contenido de Trans-anetol t Estragol. Scientia t technica, abril, año/vol. XIII, numero 033. Universidad Tecnologica de Pereira, Colombia. Pp.117-120

NYCHAS, GJE.1995.Natural antimicrobials from plants. En new Methods of Food Preservation. Gould G W. (Ed), Champman y Hall. London, UK. Chap. 4:59-89

PALAVECINO, E. 2002. Recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards para el estudio de susceptibilidad en microorganismos fastidiosos y en microorganismos que presentan mecanismos de resistencia difíciles de detectar. Rev. Chil. Infectol. V.19. supl. 2. Santiago. 129-134

RAMON J Y SANABRIA, A. Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. Universidad nacional de Colombia.

RAMIREZ, L Y DIAZ. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibarbo (Rumex conglomerates). Scientia Et Technica, Unversidad Tecnologica de Pereira, numero 033, 397-400 p.

REYES, J. VALERO, K. D´POOL, G. GARCIA, A.& CAGNASSO , M. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de la leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. Revista científica, junia, año/vol. XV, numero 003, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Pp 227-234

ROMERO, RA. 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas de Mycosphaerella fijiensis en bananos. En: memorias XVII Reunion Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E;Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds) Editorial, Epagri, Estacion experimental de Itajai, SC, Brasil. P.92-99

VIVEK K., SABITA S., AND SUN CH. 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. Bioresource Technology. 99: 8903-8908.

ZAPATA. R, SANABRIA. M, RODRIGUEZ.D. 2003. Reducción del desarrollo de Hongos Fitopatógenos con extracto de cardon lefaria. Interciencia, mayo, año/vol.28, numero 005. Caracas Venezuela. Pp. 302-306

ZEKARIA, D. Los aceites esenciales una alternative a los antimicrobianos. Laboratorios Calier.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1

11.1.1. Certificado de las cepas evaluadas

CERTIFICADO DE *Escherichia coli*

FREEZE-DRIED NCIMB CULTURES : ACDP GROUP 2
HAZARD INFORMATION

PRODUCT:	Freeze-dried bacterial culture.
STRAIN NAME:	*Escherichia coli* NCIMB 8545
USE:	Inoculum for preparing laboratory culture.
PHYSICAL & CHEMICAL PROPERTIES:	Dry powder sealed *in vacuo*. Chemically inactive.
FIRE HAZARDS:	None.
HEALTH HAZARDS:	Risk of infection if improperly handled. This species is considered to belong to Hazard Group 2, defined by the Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) as 'A biological agent that can cause human disease and may be a hazard to employees; it is unlikely to spread to the community and there is usually effective prophylaxis or effective treatment available'. This species has been associated with:- This species has been associated with diarrhoea, urinary tract infections. For more detailed information consult a standard text such as references 1, 2, 3 below.
HANDLING/USE:	Ampoules must be opened and used by, or under the direct supervision of, persons trained and competent in microbiological techniques, and in laboratories meeting the containment requirements for ACDP Category 2 organisms (see reference 4 below). Instructions for opening ampoules and a summary of ACDP 2 containment requirements are provided with this notice. This culture should not be used by, or in the presence of, compromised persons (page 6 ACDP). **ACDP Hazard Group 2 organisms are dispatched with the understanding that they are not supplied to third parties outwith the host Institute or Country of receipt.**
STORAGE:	Refrigerator or cool, dark place. Avoid direct sunlight.

CERTIFICADO DE *Staphylococcus epidermidis*

FREEZE-DRIED NCIMB CULTURES : ACDP GROUP 1
HAZARD INFORMATION

PRODUCT:	Freeze-dried bacterial culture.
STRAIN NAME:	*Staphylococcus epidermidis* NCIMB 8853
USE:	Inoculum for preparing laboratory culture.
PHYSICAL & CHEMICAL PROPERTIES:	Dry powder sealed *in vacuo.* Chemically inactive.
FIRE HAZARDS:	None.
HEALTH HAZARDS:	This strain is considered to belong to Hazard Group 1, defined by the Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) as 'a biological agent unlikely to cause human disease'. **It should NOT be assumed, however, that this organism will be innocuous in all situations or that infection can never occur.** For more detailed information consult a standard text such as references 1, 2, 3 below.
HANDLING/USE:	Ampoules must be opened and used by, or under the direct supervision of, persons trained and competent in microbiological techniques, and in laboratories meeting the containment requirements for ACDP Category 1 organisms (see reference 4 below). Instructions for opening ampoules and a summary of ACDP 1 containment requirements are provided with this notice. This culture should not be used by, or in the presence of, compromised persons (page 6 ACDP).
STORAGE:	Refrigerator or cool, dark place. Avoid direct sunlight.
DISPOSAL:	After opening, discard remains of ampoule into disinfectant. Hypochlorite solution (at least 2500 ppm available chlorine) is recommended. Allow to soak overnight before disposing of safely. Autoclave all subcultures before disposal.
SPILLAGE:	If ampoule is accidentally broken, soak contaminated area with disinfectant. Pick up any broken glass with forceps.

Certificate of Authenticity, Traceability and Viability
(CRM 2A)

for **microbial freeze-dried cultures** sold by NCIMB Ltd.

This is to certify that cultures supplied:

- Are viable[1] and pure.
- To the best of our knowledge are authentic and true to type.
- Are traceable to strains maintained by NCIMB bearing original NCIMB accession numbers.
- Are derived from controlled original seed stock.
- Have been prepared by NCIMB in accordance with its documented quality procedures which are registered to ISO 9001:2000.
- Have at least three[2] months warranty of viability, from time of purchase, if stored and cultured according to manufacturer's instructions.
- Are, to the best of our knowledge, directly equivalent to the same strain deposited in another culture collection, bearing the acronym of that collection (e.g. ATCC, NCTC etc).

Authorised Signatory:

Peter N. Green

Dr Peter Green, Curator

[1] Providing cultures are stored and resuscitated according to instructions provided by NCIMB Ltd

[2] If stored correctly (chilled and in away from direct sunlight) many cultures will remain viable for considerably longer periods than 90 days.

CERTIFICADO DE *Bacillus subtilis*

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

Specifications	
Microorganism Name	Bacillus subtilis subsp. spizizenii
Catalog Number	0486
Lot Number	48685
Reference Number	ATCC® 6633™*
Purity	Pure
Recovery	> 1000 CFUs per Pellet
Passage from Reference	< / = 4
Expiration Date	2009/07

Additional Information

Release Information:

Quality Control Technologist: Nicole Ruprecht

Release Date: 2007-10-01

Disclaimer:

Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number

Performance

Macroscopic Features

Large, irregular, flat, undulate edge, gray and wrinkled with ground glass appearance; beta hemolysis and slight yellow coloring may appear in wrinkles by 48 hours.

Microscopic Features

Straight, gram positive rod, with an ellipsoidal, central or terminal endospore

Medium

SBAP

Method

Gram Stain

VITEK® Phenotypic Features	BACILLUS Results
Negative Control	-
Sucrose	+
Tetrazolium Red	-
Tagatose	-
Glucose	+
Inositol	-
Galactose	-
Arabinose	+
Xylose	-
Mannitol	+
Raffinose	-
Salicin	+
Amygdalin	-
Inulin	-
Ribose	-
Maltose	+
Trehalose	+
Palatinose	+
Sorbitol	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	-
Amylopectin	+
Potassium Thiocyanate	+
7% Sodium Chloride	+
Mandelic acid	+
Oleandomycin	-
Sodium Acetate	+
Arabitol	-
Polyamidohygrostreptin	+
Naladixic acid	-
Esculin	+
Thermophile	-

Other Features/Challenges: Results

AUTHORIZED SIGNATURE

Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

ATCC Licensed Derivative

The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2008 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved.

217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303

DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml

11.2 Anexo 2

11.2.1. Recolección de datos

Escherichia coli								
Extracto etanólico (18,5 mg)			**Cloroformo (45,5 mg)**			**Acetato de etilo (12 mg)**		
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
28 mm	**28 mm**	**29 mm**	**7 mm**	**9 mm**	**10 mm**	**25 mm**	**27 mm**	**25 mm**

Bacillus subtilis								
Extracto etanólico			**Cloroformo**			**Acetato de etilo**		
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
25 mm	**28 mm**	**26 mm**	**15 mm**	**17 mm**	**16 mm**	**23 mm**	**22 mm**	**28 mm**

Staphylococcus epidermidis								
Extracto etanólico			**Cloroformo**			**Acetato de etilo**		
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
18 mm	**18 mm**	**19 mm**	**10 mm**	**8 mm**	**8 mm**	**18 mm**	**21 mm**	**20 mm**

Tabla 1. Prueba microbiológica a la concentración inicial del extracto y sus fracciones

Escherichia coli								
Extracto etanólico (10mg)			**Cloroformo (10 mg)**			**Acetato de etilo (10 mg)**		
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
22mm	**18 mm**	**22 mm**	**7 mm**	**8 mm**	**7 mm**	**24 mm**	**20 mm**	**23 mm**

Bacillus subtilis								
Extracto etanólico			**Cloroformo**			**Acetato de etilo**		
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
14 mm	**14 mm**	**18 mm**	**10 mm**	**9 mm**	**9 mm**	**12 mm**	**15 mm**	**19 mm**

Staphylococcus epidermidis								
Extracto etanólico			**Cloroformo**			**Acetato de etilo**		
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
16 mm	**18 mm**	**18 mm**	**7 mm**	**8 mm**	**7 mm**	**18 mm**	**20 mm**	**16 mm**

Tabla 2. Prueba microbiológica a la concentración de 10 mg/mL para el extracto etanólico y sus fracciones