



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA
DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima
Y Ciencias del Mar

« Estudio de la acción de un desinfectante natural
extraído de la planta Bidens leucantha sobre bacterias
Gram negativas, Coliformes totales, y su posible
aplicación en el tratamiento de larvas de
Camarón Penaeus vannamei. »

Tesis de Grado
Previa a la obtención del Título de
ACUICULTOR

Presentada por
Marcela Dunn Insua

Guayaquil - Ecuador

1.991

TRIBUNAL DE GRADO



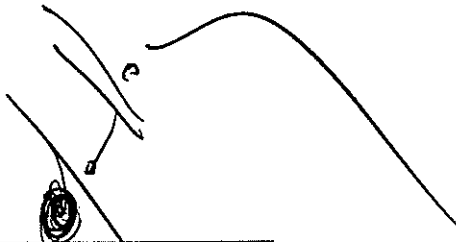
Ing. Jorge Fayton Durango
PRESIDENTE



Dr. Nicolás Campaña Gómez
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Nelly Camba Campos
VOCAL PRINCIPAL

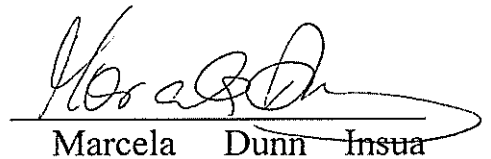


Ing. Ecuador Marcillo Gallino
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de graduación de la ESPOL)



Marcela Dunn Insua

INDICE GENERAL

RESUMEN	II
INDICE GENERAL	III
INDICE DE DIBUJOS Y GRAFICOS	IV
INDICE DE FOTOS	V
INTRODUCCION	1
I. ANTIBIOTICOS	3
1.1. Definición	3
1.2. Clasificación de acuerdo a la forma de acción	3
1.3. Propiedades ideales	4
1.4. Peligros del uso indiscriminado	5
1.5. Factores que ayudan a limitar la resistencia a una droga	6
II. CARACTERISTICAS BACTERIANAS RELACIONADAS CON LA APLICACION DE ANTIBIOTICOS.	7
2.1. Crecimiento bacteriano	7
2.2. Mutaciones	8
III. RESEÑA DE LA PLANTA <u>Bidens leucantha</u>	10
3.1. Ubicación taxonómica	11
3.2. Descripción del ciclo de desarrollo.	12
IV. INFORMACION TEORICA	14
4.1. Antibiogramas	14
4.2. Cultivos por filtro de membrana	15
4.3. Dosis mínima inhibitoria	16
4.4. Toxicidad	16
V. MATERIALES Y METODOS	19
5.1. Metodología de extracción del principio activo	19

5.2.	Pruebas de antibiogramas efectuadas con extracto obtenido por infusión	22
5.2.1.	Antibiograma para Coliformes totales con agua de un laboratorio	22
5.2.2.	Antibiogramas para coliformes totales. Concentraciones al 2,5% y 10%	23
5.2.3.	Antibiograma para bacterias específicas	24
5.3.	Pruebas cuantitativas de antibiogramas	26
5.3.1.	Antibiogramas para coliformes totales, concentraciones al 2, 5, 10%	26
5.3.2.	Antibiogramas para bacterias específicas utilizando antibioticos convencionales	27
5.4.	Pruebas de Dosis Mínima Inhibitoria (MIC) con coliformes totales	28
5.5.	Bioensayos realizados con extracto obtenido por infusión	29
5.6.	Bioensayos con cristales químicamente puros	31
5.7.	Descripción de equipos utilizados	34
VI.	RESULTADOS OBTENIDOS	37
6.1.	Cantidad del principio activo (g) obtenida de las extracciones	37
6.2.	Datos de zonas de inhibición para antibiogramas con extracto obtenido por infusión	38
6.2.1.	Para coliformes totales con agua de un laboratorio	38
6.2.2.	Para coliformes totales, concentraciones de extracto al 2, 5 y 10%	39
6.2.3.	Para bacterias específicas	40
6.3.	Datos de zonas de inhibición para pruebas cuantitativas de antibiogramas	41

6.3.1. Para coliformes totales, concentraciones al 2, 5 y 10 %	41
6.3.2. Para Salmonellas y Shiguellas utilizando antibióticos convencionales	43
6.4. Datos obtenidos de las pruebas de (MIC)	43
6.5. Datos de bioensayos realizados con extracto obtenido por infusión	44
6.6. Datos de bioensayos realizados con cristales químicamente puros	45
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
7.1. Conclusiones	48
7.2. Recomendaciones	54
BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE DIBUJOS Y GRAFICOS

	Pag
1. Imágen explicativa: antibiograma	55
2. Extracción del principio activo	56
3. Efecto inhibitorio al 1% comparación hojas/semillas/cristales	57
4. Efecto inhibitorio al 2% comparación semillas/cristales	58
5. Efecto inhibitorio al 5% comparación semillas/cristales	59
6. Efecto inhibitorio al 10% comparación semillas/cristales	60
7. Efecto inhibitorio : Gráfico general	61
8. Técnica de aplicación del antibiótico	62

INDICE DE FOTOS

	Pag
1. Planta <u>Bidens leucantha</u>	63
2. Inflorescencias	64
3. Inflorescencias secas y semillas	65
4. Hojas	66
5. Cristales del principio activo	67
	68

RESUMEN

Mediante el presente trabajo se pretende extraer y demostrar el efecto inhibitor del principio activo de la planta Bidens leucantha sobre bacterias Gram negativas, coliformes totales, para la selección de un agente antibiótico natural y su posible utilización en terapias de laboratorios de larvas. Además, determinar una dosis mínima inhibitoria y la probable existencia de un efecto inhibitor en bacterias específicas: Vibrios, pseudomonas, salmonellas y shiguellas.

Se hicieron 15 extracciones del principio activo, cristales químicamente puros, y se comparó su efectividad en antibiogramas, con el extracto obtenido por simple infusión de hojas y de semillas de la planta.

Se realizaron 4 pruebas de dosis mínima inhibitoria, además 2 bioensayos cualitativos-cuantitativos con PI 6-11, que incluían observación del comportamiento de las larvas y conteos de coliformes totales con la técnica de filtro de membrana.

Los cristales químicamente puros demostraron tener un comportamiento más estable, tanto en su efectividad como en su composición.

Los mejores efectos se encontraron con los cristales químicamente puros sobre coliformes totales.

INTRODUCCION

La industria camaronera ha venido evolucionando en los últimos años de un sistema extensivo a uno semi-intensivo. Esto implica un aumento de las densidades de siembra, con lo que el papel de los laboratorios de larvas en la producción de dicha industria adquiere mayor importancia; ya que lo ideal sería no tener que depender del medio ambiente para que las camaroneras puedan obtener larvas resistentes que tengan buenos porcentajes de sobrevivencia. Sin embargo, si no reciben el manejo adecuado, el aumento de la carga orgánica el stress producido en los camarones, ocasiona la aparición de brotes epidémicos producidos por patógenos primarios. Este problema en muchos casos se ve agravado por larvas de laboratorio debilitadas por un excesivo e indebido uso de antibióticos como desinfectantes generales.

Bajo condiciones de stress y mal manejo, las bacterias, patógenos secundarios encuentran el medio ambiente propicio para su proliferación, convirtiéndose en un grupo importante de patógenos primarios. Se hace necesario, entonces un estudio más detallado para desarrollar nuevos y efectivos métodos de control y evitar la creación de bacterias resistentes debido al uso indiscriminado de antibióticos en los laboratorios.

Por información obtenida del Ing Gustavo Galindo se conoció del uso, en forma rudimentaria, de una planta de la familia de las

compuestas, para antibiosis en piscinas camaroneras en Brasil. El Ing. Hector Ayón localizó una planta de la misma familia en nuestro medio y en el proyecto « Incidencias de las enfermedades bacterianas en el Ecuador », se hace un análisis en el que se concluye que dicha planta, conocida vulgarmente como «Amor seco» o «Shirán», presenta cierta actividad antibiótica que actúa sobre bacterias Gram negativas. Lo que se muestra como una alternativa para el tratamiento de dichas bacterias, mediante el estudio adecuado de la utilización y extracción de este antibiótico natural.

I. ANTIBIOTICOS

1.1. Definición

El término antibiótico se define como: Sustancia producida por un microorganismo o total o parcialmente por síntesis química, que en bajas concentraciones, inhibe el crecimiento de otros microorganismos (12).

Sustancia natural o sintética que utilizada en pequeñas dosis inhibe el crecimiento de microorganismos, y que en dosis más elevadas provoca su muerte (11).

Otra definición dice: Sustancias capaces de inhibir el desarrollo y crecimiento de microorganismos (11).

1.2 Clasificación

Los antibióticos, desde su descubrimiento, se emplean en la lucha contra los gérmenes patógenos. En la actualidad todavía no se comprende en su totalidad el mecanismo de acción de la mayor parte de los medicamentos antimicrobianos. Sin embargo, estos mecanismos se encuentran divididos según su forma de acción en 4 grupos:

Aquellos que actúan:

- 1.- Por inhibición de la síntesis de la pared celular.
- 2.- Por alteración de la permeabilidad de la membrana celular o inhibición del transporte activo a través de la membrana.
- 3.- Por inhibición de la síntesis proteica. Es decir inhibición de la traducción y transcripción del material genético.
- 4.- Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.

Es importante recalcar que algunos antibióticos pueden tener más de un sitio primario de ataque o más de un mecanismo de acción.

1.3 Propiedades ideales

Un agente anticibrobiano ideal muestra toxicidad selectiva, con este término queda implícito que un medicamento es nocivo para un parásito sin serlo para el huésped. En la realidad, se observa con frecuencia que dicha toxicidad selectiva es más relativa que absoluta. Lo que indica que se debe buscar la concentración que actúa sobre el parásito y que sea tolerable para el huésped.

Idealmente el mejor antimicrobiano es

- De efecto bactericida, más que bacteriostático. Ya que estos últimos inhiben el desarrollo bacteriano y se apoyan en los mecanismos de defensa celulares y

humorales del huésped para erradicación total de la infección.

- Su administración prolongada y de dosis relativamente grandes no debe provocar efectos colaterales adversos.
- Preferiblemente los niveles bactericidas en el organismo deben poder alcanzarse con rapidez y mantenerse durante periodos largos.
- Es deseable además, que dicho antibiótico sea hidrosoluble y estable.

1.4 **Peligros del uso indiscriminado**

Es importante conocer cuales son los riesgos que implica el uso indiscriminado de antibióticos y la necesidad e importancia que de esos riesgos deriva un mejor conocimiento de las dosis correctas, con este objetivo lo mejor es llevar un control periódico. Algunos de los peligros del uso indiscriminado son:

- Cambios en la flora normal del cuerpo con enfermedades resultantes por "superinfección" debido a crecimiento excesivo de organismos resistentes al medicamento.
- Enmascaramiento de infecciones graves sin erradicarlas. Es decir, desaparecen las manifestaciones visibles de la enfermedad y se suprime el antibiótico sin haber curado la infección.
- Toxicidad directa del medicamento.

- Desarrollo de resistencia medicamentosa en poblaciones microbianas. En los laboratorios, eliminación de microorganismos sensibles y sustitución por microorganismos resistentes debido a un medio saturado de antibióticos.

1.5 Factores que ayudan a limitar la resistencia a una droga

Para minimizar el desarrollo de resistencia a una droga pueden considerarse algunos puntos de importancia:

- a.- Mantener suficientemente altos los niveles de la droga o antibiótico para que éste inhiba la infección.
- b.- Limitar el uso de antibióticos como agentes de prevención, es decir utilización de dosis bajas y continuas.
- c.- Evitar la exposición de micro-organismos a un antibiótico especialmente valioso mediante la limitación de su uso.
- d.- Es recomendable administrar dos antibióticos en forma simultánea; siempre y cuando éstos no tengan resistencia cruzada, para que de esta manera cada una de ellas demore la aparición de mutantes resistentes al otro antibiótico.

II. CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS RELACIONADAS CON LA APLICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

2.1. Crecimiento bacteriano

Como es conocido, las células bacterianas se reproducen mediante fisión binaria, y esto se expresa como 2^n . El término de 2^n es el símbolo del último número de progresión, es decir el número máximo de células que eventualmente alcanzaría la población.

El tiempo de generación es diferente de acuerdo a las especies bacterianas. Por ejemplo, la *Escherichia Coli*, bacteria representativa de los bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos, puede ser tan corto como de 15-20 minutos, mientras para otras especies en las mismas condiciones, el tiempo de generación varía.

Es importante subrayar que la misma especie bacteriana sometida a distintas condiciones, varía notablemente su tiempo de generación. El tiempo de generación depende fuertemente de la idoneidad de los nutrientes que hay en el medio y de las adecuadas condiciones físicas.

Cuando se inocula un medio fresco con un número conocido de células, se determina la población

bacteriana intermitentemente a lo largo de un periodo de incubación de 24 horas y se coloca en un sistema de coordenadas los logaritmos del número de células frente al tiempo. De este modo se obtiene la típica curva de desarrollo bacteriano.

Es importante anotar que proporcionando un continuo aporte de nutrientes y simultáneamente la eliminación de medio viejo o de desechos, se consigue prolongar la fase logarítmica, es decir un cultivo continuo. En los tanques de cultivo de larvas en los laboratorios, bajo condiciones normales de desarrollo, el aporte de nutrientes y la eliminación de desechos es constante para mantener la calidad del agua y conseguir larvas activas y saludables. Bajo estas condiciones, al ocurrir una infección bacterial, podríamos también estar prolongando la fase exponencial del crecimiento bacteriano. De esto resulta importante la coordinación de la concentración mínima inhibitoria, el tiempo de máxima efectividad del antibiótico, el tiempo que el antibiótico tarda en alcanzar su máximo efecto, y la duración del tratamiento.

2.2. Mutaciones

La tasa de mutaciones está dada por la probabilidad que tiene un gen de mutar en una determinada división celular. Se puede definir la tasa de mutación como:
Número de mutaciones por división celular.

Generalmente la tasa de mutación para un gen oscila entre 10^{-3} y 10^{-8} por división celular. Los genes mutan el azar y en forma independiente, la probabilidad de que una misma célula presente dos mutaciones es más difícil, ya que deben sumarse las dos tasas de mutación; por ejemplo, para dos antibióticos diferentes:

$$10^{-3} + 10^{-8} = 10^{-11}$$

Por esta razón en muchos casos para el tratamiento de ciertas infecciones bacterianas se combina el uso de dos antibióticos y se aumenta de este modo la probabilidad de inhibición o muerte de las bacterias.

Como es conocido, los microorganismos pueden desarrollar resistencia en diferentes grados a cierto antibiótico, este hecho se debe en gran medida a las mutaciones y es de mucho interés en el tratamiento de enfermedades, pues si originalmente un antibiótico es efectivo para el control de una determinada infección, éste puede perder su grado de efectividad e incluso puede convertirse en inefecaz a medida que aparecen mutantes resistentes a dichos antibióticos.

III: RESEÑA DE LA PLANTA Bidens leucantha

Es importante recalcar que la información botánica se obtuvo consultando trabajos principalmente de otras partes. La poca información nacional que se encontró, fue sólo de la ENUMERACION BOTANICA de Luis Cordero, que se refiere específicamente a plantas que se dan en las provincias del Azuay y Cañar.

Es una planta herbácea completa, es decir, posee raíz, tallo, hojas y flores; sus hojas no tienen estípulas.

Su flor consta de:

- 5 sépalos
- 5 pétalos
- 5 estambres
- 2 carpelos abiertos

Sus cabezuelas, provistas de 2 aristas ganchosas; que es lo que significa BIDENS, se adhiere a la ropa por lo que en algunas partes se le conoce vulgarmente como "Amor Seco".

Se puede localizar dicha planta en la costa ecuatoriana. Se observa buena cantidad ya desarrollada durante los meses de

Noviembre a Marzo y una ausencia casi total de la misma el resto del año. Además se pudo comprobar que al sembrar las semillas, la germinación se producía aproximadamente dentro de 5 días. Mientras que bajo las mismas condiciones al sembrar las semillas a mediados de Mayo, la germinación demoró entre 20-25 días. De lo que se concluye que se trata de una planta estacional; el clima cálido de la estación lluviosa favorecería en gran medida su desarrollo.

La misma planta: *Bidens Leucantha*, vegeta también en los campos de temperaturas algo frías de las provincias de Azuay y Cañar; donde prefiere zonas cultivadas (4).

3.1. Ubicación Taxonómica

Nombre común: Amor Seco o Shirán (quichua)

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Tipo	Fanerógama
Subtipo:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledonea
Subclase:	Metaclamideas o Simpétales
Familia:	Compuestas
Tribu:	Tubulíferas
Especie:	<u><i>Bidens leucantha</i></u>

3.2. Descripción del ciclo de desarrollo

Meses Apropriados para su desarrollo: Noviembre-Marzo. Las semillas se siembran sobre la superficie del suelo y para la germinación no se requiere de mucho agua, simplemente mantener húmedo el suelo. La germinación se produce luego de aproximadamente 5 días. Se trata de semillas epigeas, es decir que salen de la tierra en el curso de la germinación.

El agua del suelo entra a la semilla por absorción y hace que ésta se hinche ligeramente y se produce una rotura de los tegumentos por el que sale un pequeño eje cónico que se entierra; es la raicilla. Al mismo tiempo de esto, el tallo empieza a dirigirse hacia arriba y con él sube la semilla. Cuando el tallo alcanza varios cm fuera de la tierra el tegumento de la semilla se desprende y los cotiledones se separan y el tallo empieza a surgir ahora de entre los cotiledones en una yemita. Desde la germinación han pasado aproximadamente 10 días.

Luego los cotiledones se caen. El tallo, herbáceo, es muy fino en la mayoría de los casos el peso de la planta y el viento lo vence un poco llevándolo hacia el suelo. Tiende a enrollarse ligeramente hasta que alcanza mayo desarrollo y tiende a subir.

Sus hojas son dentadas y nervadas y demora aproximadamente mes y medio más hasta que aparecen

los primeros capullos de la flor que se abrirán en aproximadamente 5 días. Estos presentan en su base brácteas, que son hojas modificadas como escamitas verdes que rodean la flor amarilla.

Las inflorescencias durarán aproximadamente una semana y media y luego empiezan a abrirse más y a perder su color amarillo, sustituyéndolo por un tono más pardo. De entre las inflorescencias empieza entonces a producirse las primeras semillas. Transcurrida una semana aproximadamente, se ha formado una especie de estrella compuesta por semillas que han sustituido a las inflorescencias. Estas se esparcerán con el viento o serán transportadas mecánicamente debido a su propiedad de adherirse con facilidad. Luego de esto la planta empieza a secarse y muere. La planta adulta llega a medir alrededor de 65 cm.

IV. INFORMACION TEORICA

4.1. Antibiogramas

Para medir la susceptibilidad bacterial a un antibiótico puede utilizarse los principios de difusión en agar. Con este fin las técnicas de difusión pueden ser utilizadas en forma cualitativa, o mediante procedimientos cuantitativos; sin embargo generalmente se utilizan las categorías de: resistentes, intermedios o susceptibles a un determinado antibiótico.

Para los antibiogramas se utiliza papel filtro seco en forma de discos que contienen una determinada concentración de un antibiótico. El principio de su funcionamiento es la absorción de agua del agar que disuelve el antibiótico contenido en el disco para que este pueda viajar libremente a través del agar, de acuerdo a las leyes físicas de difusión de moléculas en un medio. De esta manera se obtienen diferentes concentraciones de antibiótico a medida que éste se aleja del punto donde se encuentra el disco. Mientras esto ocurre, también hay un desarrollo microbiano en la caja petri; una fase de la-

tencia seguida de la fase logarítmica. En este punto la multiplicación bacterial es más rápida que la difusión de la droga, de tal manera que las bacterias que no se encuentran en el campo de acción del antibiótico y aquellas que no son inhibidas por éste continuarán su desarrollo. En el área donde hay concentraciones inhibitorias no habrá crecimiento bacterial. De esta manera los organismos que tengan un crecimiento más lento o una fase de latencia más prolongada, aparecerán como más susceptibles al antibiótico; mostrando un área mayor desprovista de crecimiento, lo que se debe a que el antibiótico ha tenido más tiempo para su difusión a través del agar.

Debido a que la solubilidad de cada antibiótico varía, las zonas de inhibición producidas por uno no pueden ser comparadas con las obtenidas con otro antibiótico.

4.2. Cultivos por filtro de membrana

La membrana filtrante es un disco muy delgado de acetato de celulosa, o colodión, con poros de 0.5 micras o menos. Esta membrana, previamente esterilizada, se monta sobre una placa perforada en un aparato filtrante en forma de embudo (bomba al vacío).

Cuando el líquido se extrae por aspiración a través del filtro, las partículas microscópicas, como bacterias u

hongos son retenidas por la acción tamizadora de la membrana y depositadas en su superficie.

Podemos estimular el crecimiento de estos gérmenes, llevando ascépticamente la membrana a una caja petri, colocándola encima de una almohadilla saturada de caldo estéril (en este caso se utilizó caldo Endo). Al difundirse en la membrana el caldo, proporciona alimento a los microorganismos. Se pueden utilizar diversos medios selectivos según se quiera cultivar diferentes tipos de bacterias y hongos. A través de este método se puede demostrar en menos de 24 horas la contaminación de muestras de agua por bacterias Coliformes.

4.3. Dosis mínima inhibitoria

Es un método de dilución en tubo para la valoración microbiológica de antibióticos y de algunos otros agentes quimioterapéuticos. En él, la inhibición del crecimiento (disminución de la turbidez) producida en la muestra estandar, se compara con la producida por muestras con diferentes concentraciones de antibiótico o de otros agentes quimioterapéuticos.

4.4. Toxicidad

Las sustancias utilizadas como quimioterapéuticas tienen toxicidad selectiva. Es decir , inhiben el crecimiento o mata al agente causante de enfermedad y causa poco o ningún daño a las células del hospedador.

Muchos antibióticos presentan dosis máximas a las que pueden ser administradas, al utilizar dosis mayores a éstas, no solo tienen efecto sobre las células malignas, sino que producen efectos dañinos, e incluso mortales sobre el organismo hospedador.

Durante los pasados veinte años se han usado varias especies de decápodos marinos para bioensayos, debido a que los crustáceos son un grupo relevante para la determinación de toxicidad de pesticidas en los medios acuáticos. Esto se debe a su parentesco cercano con los insectos, para cuyo control se han desarrollado la mayor parte de los pesticidas.

Así como en muchos otros grupos, las larvas de los juveniles de los crustáceos, se prefieren generalmente para bioensayos de periodos cortos debido a que éstos estadios son significativamente más susceptibles a los tratamientos (5).

Los bioensayos en los cuales se trabaja con estadios larvarios deberían durar de unas cuantas horas a treinta días como máximo. Los criterios para determinar toxicidad en las larvas son:

- Éxito en el trabajo de muda
- Metamorfosis
- Habilidad para nadar
- Mortalidad

Tendencia a perder apéndices

Cuando hay una toxicidad aguda, se observa parálisis y muerte (5).

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Metodología para la extracción del principio activo

Las plantas de la familia del género de las tubulíforas, poseen como principio activo la SANTONINA C₁₅H₁₈O₃ (3). Con esta información se procedió a realizar la extracción del principio activo, de acuerdo al método descrito en el CODEX Medicamentarius Gallicus (Pharmacopée Française).

Mayor cantidad de cristales mejor formados se obtuvo cuando la extracción se realizó de las inflorescencias.

Las cabezuelas florales tienen mayor cantidad del principio activo, (2.5%); disminuyendo dicha cantidad considerablemente cuando las flores se han abierto.

Al realizar la extracción se obtiene 2 isómeros, el ácido santonínico y el ácido santónico. De éstos el ácido santonínico tiene acción vermífuga (2).

Pasos seguidos para la extracción:

1.- Se pesa y tritura en un mortero 10 gr. De las inflorescencias con amoníaco oficial.

*Generalmente se precisa 5cc. De amoníaco oficial (1).
En este caso, en las extracciones realizadas se utilizó 10cc.

2.- Se deja secar al aire por 12-13 horas y el polvo adquiere una coloración negro verdosa.

*Cuando se hizo la primera extracción con semillas, a pesar de que se trituró e incluso, para obtener polvo, se utilizó una licuadora, no fue posible conseguir pulverizarlo por completo.

3.- Se agrega 100cc. De benzeno, se deja en contacto por media hora por lo menos y se filtra. De lo que se obtiene aproximadamente 80cc. De solución benzeníca.

4.- Se destila la solución en baño-maría y se expulsan los últimos vestigios de benzeno en una estufa a 100°C por una hora.

5.- Se dilata el residuo con 60cc. De agua de barita en baño maría hirviendo por 10min. Y se filtra.

6.- Se deja enfriar y se agrega 5cc. De ácido clorídrico oficial (ácido clorídrico al 10%). El medio debe quedar ligeramente ácido e incoloro.

*En algunos casos el pH, con los 5cc. De ácido clorídrico bajó mucho y fue necesario agregar agua de barita para subir el pH un poco. Se notó claramente que de una solución turbia blanquecina, al agregar el ácido, el medio se hacia incoloro.

7.- Se deja cristalizar por 24 horas al abrigo de la luz, se lava con agua destilada fría y se deseca en la estufa a 100°C por 2 horas.

*En la mayor parte de las extracciones, luego de dejar la solución en cristalizadores por 24 horas e incluso or 48 horas, no se había cristalizado y había todavía solución. Este problema se solucionó colocando la solución a cristalizar en baño-maría doble hasta que se habíaa evaporado la mayor parte del líquido y luego se puso a cristalizar al ambiente por 24 horas al abrigo de la luz.

8.- Ya formados los cristales, para extraer los vestigios de humedad del ambiente, se coloca en un desecador.

Los cristales tienen forma de prismas, son transparentes o ligeramente coloreados de amarillo; en grupo toman una coloracion blanca nacarada.

La luz afecta su efectividad transformando los cristales en fotosantonina C₂₃ H₂₄ O₆; por lo que se recomienda mantenerla al abrigo de la luz y utilizarla en solución preferiblemente y no en polvo.

La cantidad obtenida de las extracciones varió considerablemente, no solo de acuerdo a la parte de la planta de la cual se realizaba la extracción, sino también de acuerdo al tiempo transcurrido desde que se obtenía la planta, hasta que se realizaba la extracción. Esto se debe, de acuerdo a la literatura consultada, a que el principio activo disminuye grandemente al abrirse las inflorescencias (3). A pesar que las plantas fueron desecadas al abrigo de la luz para que ella no afecte el principio activo.

5.2. Pruebas de antibiogramas efectuadas con extracto obtenido mediante infusión

Para realizar las infusiones se calienta agua destilada hasta 100°C y se obtiene una solubilidad de 1:250. El agua fría la santonina es casi insoluble 1:5000.

5.2.1. Antibiogramas para Coliformes totales con agua de un laboratorio:

GRUPO # 1

Para coliformes totales se realizaron:

- 2 antibiogramas con réplicas, utilizando extracto de las semillas .
- 2 antibiogramas con réplicas utilizando extracto de las hojas.

Tanto con la semilla-inflorescencias, como con las hojas se hizo la extracción con una relación de 1gr. De planta en 100 ml. De agua destilada (1%).

ANTIBIOGRAMAS:

- 1.1.- Con agua de reservorio (2)
- 1.- Extracto de semillas
 - 1.2.- Con agua de Larvicultura (2)
- 2.1.- Con agua de reservorio (2)
- 2.- Extracto de hojas
 - 2.2.- Con agua de larvicultura (2)

5.2.2. Antibiogramas para coliformes totales.

Concentraciones al 2,5% y 10%

Los discos para los antibiogramas preparados de esta manera, se utilizaron en siembras de coliformes totales en medio Muller Hinton.

Tres réplicas utilizando las soluciones preparadas con extracto de semillas.

5.2.3. Antibiogramas para bacterias específicas

Antibiogramas para Salmonellas-Shigellas:

Grupo # 2

Se hizo una aislación previa, mediante el uso de agar SS. Y su incubación a 37°C por 24 horas.

Para este ensayo se utilizaron 2 cajas petri, la primera correspondía a 3 discos de antibiogramas con concentración de 1% y 3 discos de antibiogramas con concentraciones de 2%; la segunda caja petri correspondía a 3 discos de antibiogramas con concentración de 5% y 3 discos de antibiogramas con concentración de 10% , además sus respectivas réplicas.

Antibiogramas para Vibrios:

GRUPO # 3

Previamente se realizó el aislamiento de los vibrios, mediante un enriquecimiento de agua de mar de la zona de Manglaralto en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 3% de CINA y su incubación por 24 horas. Los tubos que presentaron turbidez fueron sembrados en agar TCBS e incubados a 37°C por 24 horas. Las colonias que reunían las características descritas en el manual de Merk (colonias grandes y amarillas), consideradas como Vibrio

alguinoliticus; fueron seleccionadas para realizar los antibiogramas.

Se utilizaron discos con concentraciones de 1, 2, 5, 10% del extracto y sus respectivas réplicas (Prueba # 1 para Vibrio).

Posteriormente se hizo una nueva prueba para Vibrio con concentraciones de extracto de 10 y 20% en los discos de antibiograma y una réplica (Prueba # 2 para Vibrio).

Luego se realizó un último ensayo con discos de antibiogramas con concentraciones de 20 y 30%, (Prueba #3 para Vibrio).

Antibiogramas para Psuedomonas:

GRUPO # 4

Previa la realización de esta prueba, se hizo un aislamiento de pseudomonas. El primer paso fue hacer una siembra en agar cetrimide con incubación a 42°C por 48 horas. Luego se inoculó de las colonias resultantes, en un agar nutritivo; para concluir con la siembra en el agar Muller Hinton, en el cual se realizó el antibiograma.

Para este ensayo, los antibiogramas se hicieron con discos con concentraciones de 1, 2, 5, y 10% respectivamente, y sus réplicas.

5.3. Pruebas cuantitativas de antibiogramas

Después de haberse realizado la extracción del principio activo cristalizado, se procedió a realizar los antibiogramas con cultivos de coliformes totales que procedían de las aguas de la zona de Manglaralto.

Se utilizó un caldo nutritivo para un enriquecimiento previo, y luego se procedió a la siembra en el agar Muller Hinton, en el cual se realizaron los antibiogramas.

Es importante recalcar, que a pesar de que la literatura consultada, se refiere a los coliformes como organismos bacterianos que se desarrollan exclusivamente en aguas dulces; se encontró presencia de dichos organismos en aguas de mar en la zona de Manglaralto (donde se tomaron muestras).

5.3.1. Antibiogramas para coliformes totales, Concentraciones al 2, 5, 10%

GRUPO # 5

Se realizaron 3 antibiogramas para coliformes totales con concentraciones de los discos de 2, 5, 10% y con sus réplicas respectivas. Los mismos que fueron controlados cada 6 horas durante las 24 horas posteriores a la siembra.

Solución preparada con cristales, con concentraciones de 2%, 5%, y 10%.

GRUPO # 6

Los discos para los antibiogramas preparados de esta manera, se utilizaron en siembras de coliformes totales en medio Muller Hinton.

Tres réplicas utilizando las soluciones preparadas con cristales.

5.3.2. Antibiograma para bacterias específicas utilizando antibióticos convencionales

Antibiograma para Salmonellas y Shigellas

GRUPO # 7

Se realizó un aislamiento previo, mediante el uso de agar SS. A 37°C por 24 horas. Luego del mismo, se procedió a realizar la siembra en Agar Muller Hinton

y a la colocación de los discos de antibióticos. En este caso se utilizaron:

<u>ANTIBIOTICO</u>	<u>CONCENTRACION</u>
Penicilina	2 unidades
Cloranfenicol	5mcgr.
Nitrofurantoina	100 mcgr.
Tetraciclina	5mcgr.

5.4. Pruebas de Dosis Mínima Inhibitoria (MIC) con coliformes totales:

Se realizaron 4 pruebas de dosis mínima inhibitoria (MIC), con el uso de 5 tubos para cada prueba. Para las primeras 3 pruebas, todos los tubos contenían 10 ml. De caldo nutritivo. Para la prueba # 4, los tubos contenían 10 ml. de agua de mar autoclavada. Para cada prueba se hizo una réplica respectiva.

Para el aislamiento de coliformes totales se utilizó caldo endo, mediante la técnica de membrana filtrante. Luego de la siembra, cada grupo se incubó por 24 horas a 37°C. Se realizó entonces una observación a simple vista para la demostración de turbidez; y para mayor precisión, se utilizó espectrofotometría con tarjetas de Turbidez y de número de coliformes totales.

MIC #	Tipo de siembra	Concentración
1	directamente de una colonia cultivada en caldo Endo	80mg/l, 200mg/l 400mg/l, 600mg/l
2	directamente de una colonia cultivada caldo Endo	80mg/l, 200mg/l 400mg/l, 600mg/l
3	enriquecimiento en caldo nutritivo, 1 ml. se siembra en 9 ml. del mismo medio.	80mg/l, 200mg/l 400mg/l, 600mg/l
4	una colonia cultivada en caldo se inocula en 10 ml de agua de mar autoclavada.	80mg/l, 200mg/l 400mg/l, 600mg/l

5.5. Bioensayos realizados con extracto obtenido por infusión

Se realizaron un total de 4 bioensayos, para los dos primeros bioensayos se utilizó la solución del extracto de semillas (infusión), y para los dos bioensayos restantes, se utilizó la solución preparada con los cristales químicamente puros.

Bioensayo # 1 :

Para este bioensayo se utilizaron port-larvas (PL6) provenientes de un laboratorio de la zona de la Península. Las post-larvas presentaban necrosis y la enfermedad conocida como "grumos".

Se hicieron dos grupos de 20 post-larvas cada uno, los mismos que fueron colocados en 2 fiolas con 800ml. de agua de mar autoclavada y una réplica respectiva para cada grupo. En las dos fiolas se colocó un sustrato de piedra-grava que había sido previamente esterilizado en la estufa a 160°C por 2 horas.

El grupo # 1, y su réplica fueron tratados con una dosis de 4ml. de extracto de semilla en una concentración inicial de 15% cada 12 horas durante 5 días.

El grupo # 2, y su réplica se mantuvieron con testigo. Durante este periodo de tiempo se alimentaron los dos grupos con artemia eclosionada y congelada.

Se realizaron recambios de agua del 20% diarios y se mantuvo la aereación.

Bioensayo #2

Este bioensayo se realizó con post-larva (PL11), obtenidas de un laboratorio de la zona de la Península. Las mismas que fueron infectadas mediante inoculación con un cultivo de coliformes totales desarrollados en caldo endo.

Se utilizaron dos fiolas con 800 ml. de agua de mar autoclavada, que contenían 20 PI cada una. Como sustrato se utilizó piedra grava esterilizada en la estufa a 160°C por 2 horas.

Una de las fiolas (grupo # 1) y su réplica se dosificaron con 2 ml. de extracto de semilla al 10% cada 12 horas, durante 3 días. Se mantuvo un recambio de agua del 20% diario.

5.6. Bioensayos con cristales químicamente puros

Bioensayo # 3

Mediante este bioensayo se quiso determinar la efecacia del antibiótico en relación con el tiempo transcurrido desde la infección. Para ello se infectaron 3 fiolas, que se encontraban en las mismas condiciones, con 0.5ml de un cultivo de coliformes totales.

Se utilizaron post-larva (PL10), de un laboratorio de la zona de la Península. Las post-larvas provenían de hembras silvestres. Se permitió que las larvas se aclimataran y alimentaran durante 24 horas antes de comenzar el bioensayo.

Para el bioensayo se utilizó agua de mar autoclavada, piedra grava; previamente esterilizada en la estufa a 160°C por 2 horas, y aereación. Las larvas fueron entonces, colocadas en tres fiolas en grupos de 20 cada uno. Las fiolas F1, F2, F3, fueron infectadas con coliformes totales al mismo tiempo (hora 0). Una hora después, (hora 1), en F1, se realizó un conteo de coliformes totales mediante la técnica de la membrana filtrante, y se aplicó una dosis de antibiótico.

Doce horas después de la infección, (hora 12), se hizo un conteo de coliformes mediante la técnica de la membrana filtrante en F2 y se aplicó la dosis de antibiótico correspondiente.

Luego de 24 horas desde la infección, (hora 24), se hizo un conteo mediante la técnica de la membrana filtrante en todas las fiolas (F1, F2, F3) y se aplicó la primera dosis de antibiótico en F3.

A las 48 horas desde la infección, (hora 48), se hizo un conteo de coliformes mediante la técnica de la membrana filtrante en F3.

Durante el tiempo que duró el bioensayo, se tomó el pH y la temperatura cada 12 horas. Luego de lo cual se sacó un promedio de los dos parámetros en F1, F2, y en F3.

Además, al terminar el bioensayo se sacó la sobrevivencia obtenida en cada fiola.

Bioensayo # 4

Para este bioensayo se utilizaron post-larvas (PL 9), del laboratorio "Imbiosa" de la zona de la Península. Los PL provenían de hembras silvestres de la zona de Jama.

Antes de comenzar el bioensayo, y debido al stress ocasionado por el manipuleo del transporte; se aclimataron y alimentaron las larvas con artemia fresca durante 24 horas.

Se trabajó con dos fiolas que contenían 20 PL en 800 ml. de agua de mar previamente autoclavada y sus respectivas réplicas. Como sustrato se utilizó piedra-grava esterilizada mediante calor en la estufa a 160°C por 2 horas. Durante el bioensayo se mantuvo la aereación.

Las fiolas fueron inoculadas con 0,5 ml. de un cultivo de coliformes totales desarrollados en caldo endo durante 24 horas a 37 °c y enriquecido en caldo nutritivo.

Luego de 1 hora de infección, se verificó el número de unidades formadoras de colonias (ufc), en las dos fiolas y en sus réplicas mediante cultivos realizados con la técnica de filtro de membrana.

Se procedió a aplicar la primera dosis (dosis doble) de antibiótico químicamente puro a la fiola # 1 y a su réplica. Transcurridas 5 horas desde la infección, se realizó una nueva aplicación de antibiótico (dosis simple), en la fiola # 1 y en su réplica.

A las 15 horas desde la infección, se realizó una nueva aplicación de antibiótico en la fiola # 1 y en su réplica.

Se hicieron dos aplicaciones más en la fiola # 1. Transcurridas 25 y 35 horas desde la infección.

Este procedimiento se continuó por espacio de 48 horas, completando así la aplicación de 3 dosis más; aplicadas cada 12 horas.

Durante este tiempo, se suspendió la alimentación para aumentar el stress y de esta manera crear condiciones críticas que no favorecían a las "defensas naturales" de los animales y se hizo un seguimiento del comportamiento de las larvas.

5.7. Descripción de equipos utilizados

Se enumerarán a continuación los materiales y equipos utilizados durante esta investigación:

Acuarios

Cajas petri

Bombas de doble salida

Discos de antibióticos

Mangueras	Microscopio
Cultivos de artemia	espectrofotómetro
Medios de cultivo	Balanza de precisión
pH-metro	Estereoscopio
Estufa	Incubadora
Autoclave	Termómetro
Filtros de membrana	Bomba al vacío
Material de vidrio	

Medios de cultivo utilizados:

Se utilizan medios especiales o enriquecidos, que se preparan enriqueciendo caldos o agares simples con la adición de carbohidratos, sangre, suero sanguíneo, caseína digerida, extracto de levadura u otras sustancias nutritivas especiales.

Medios diferenciales y selectivos.- Los medios diferenciales son aquellos que ponen de manifiesto las diferencias, cuando se inicia el desarrollo entre aquellos organismos que se quiere estudiar y otros gérmenes que pueda haber.

Los medios selectivos son aquellos que tienen sustancias químicas o colorantes de efecto inhibitor sobre el desarrollo de ciertas bacterias, favoreciendo el desarrollo de otras bacterias específicas para ese medio.

-Agar Muller Hinton.- Se utiliza para el aislamiento de gonococos y meningococos en cultivos primarios y determinación de sensibilidad de bacterias frente a antibióticos y sulfamidas.

-Agar MacConkey.- Se utiliza para aislamiento de Salmonellas, Shigellas y bacterias Coliformes.

-Caldo Endo.- Se utiliza para el recuento de bacterias coliformes en materiales líquidos.

-Caldo EC. .- Este caldo se utiliza para la identificación selectiva de bacterias coliformes en agua, leche y productos alimenticios.

-Caldo Infusión Cerebro Corazón.- Se utiliza para cultivo de microorganismos exigentes.

-Caldo nutritivo estandar II .- Es un medio de cultivo para gérmenes poco exigentes y preparación de medio de cultivo especiales.

- Agar Cetrimide.- Este medio se utiliza para el aislamiento e identificación de Pseudomonas aeruginosas (cultivo selectivo para Pseudomonas).

- Agar Thiosulfato, Citrato, Sales Biliares, Sucrosa (TCBS).- Se trata de un medio selectivo para el cultivo y aislamiento de las diferentes especies de vibrios.

VI. RESULTADOS OBTENIDOS

6.1 Cantidad del principio activo (g) obtenida en las extracciones

Se realizaron 15 extracciones para la obtención del principio activo a partir de las semillas y las inflorescencias. La cantidad de santonina obtenida en cada extracción varió de la siguiente manera:

Nº	peso de semillas	peso de principio activo (g)	(%)
1	10	0.21	2.1
2	10	0.19	1.9
3	10	0.65	6.5
4	10	0.54	5.4
5	10	0.54	5.4
6	10	0.52	5.2
7	10	0.45	4.5
8	10	0.46	4.6
9	10	0.44	4.4

11	10	0.32	3.2
12	10	0.30	3.0
13	10	0.25	2.5
14	10	0.21	2.1
15	10	0.23	2.3

El promedio de las extracciones del principio activo fue de 5.5%, es decir que por cada 10 g de semillas se obtiene 0.55 g del principio activo.

6.2. Datos de zonas de inhibición para antibiogramas con extracto obtenido por infusión

6.2.1. Para coliformes totales con agua de un laboratorio

Grupo # 1

Nº Extracto	Procedencia del agua	Concentración	Inhibición 24 hrs	
1.1	semillas	reservorio	1%	10.2mm.
1.2	semillas	larvicultura	1%	11.0mm.
2.1	hojas	reservorio	1%	8.0mm.
2.2	hojas	larvicultura	1%	9.0mm.

NOTA:

Todos los halos obtenidos presentaban límites difusos, es decir el límite entre la zona de crecimiento y la zona de inhibición no estaba claramente definido.

6.2.2. Para coliformes totales, concentraciones al 2, 5 y 10%

Nº	Conc. (%)	Zona de inhibición			observaciones
		6 hrs	12 hrs	24 hrs	
1	2	ND			No había crecimiento notorio.
1	2		–		Ausencia de halos.
1	2			–	Ausencia de halos.
2	5	ND			No había crecimiento notorio.
2	5		8		Halo bastante regular.
2	5			–	Halo relleno.
3	10	ND			No había crecimiento notorio.
3	10		7		Halo con bordes difusos.
3	10			–	Halo relleno (Bacteriostático).

6.2.3. Para bacterias específicas

Grupo # 2

Antibiogramas para Salmonellas y Shigellas:

Nº	extracto	concentración (%)	Inhibición en 24 hrs. (mm)	Forma de zona de inhibición
1	semillas	1	5.3	difuso
2	semillas	2	5.4	difuso
3	semillas	5	5.4	bastante uniforme
4	semillas	10	6.1	bastante uniforme

Grupo # 3

Antibiograma para Vibrios:

Ninguna de las pruebas realizadas, (1; 2; 3), obtuvo resultados positivos en la formación de una zona de inhibición. En todos los ensayos se obtuvo un crecimiento bastante uniforme en toda la caja petri.

Grupo # 4

Antibiograma para Pseudomonas:

Nº	extracto	concentración (%)	inhibición en 24 hrs (mm)	forma de zona de inhibición
1	semillas	1	--	--
2	semillas	2	--	--
3	semillas	5	7	+/- uniforme
4	semillas	10	7	+/- uniforme

NOTA:

El medio de cultivo presentó agrietamiento.

6.3. Datos de zonas de inhibición para pruebas cuantitativas de antibiogramas.

6.3.1. Para coliformes totales, concentraciones al 2, 5 y 10%.

Grupo # 5

Nº	conc.(%)	zona de inhibición			observaciones
		6hrs	12hrs	24hrs	
1	2	ND			No había crecimiento notorio.
1	2		11		Halo no definido.
1	2			6	Relleno debido a efecto bacteriostático.
2	5	ND			No había crecimiento notorio.
2	5		14		Halo bastante uniforme.
2	5			7	Relleno debido a efecto bacte

				riostático.
3	10	ND		No había crecimiento notorio.
3	10		17	Halo con bordes difusos.
3	10		11	Halo difuso y relleno (efecto bacteriostático)

Para coliformes totales, concentraciones al 2, 5 y 10%

Grupo # 6

Nº	Conc. (%)	Zona de inhibición			Observaciones
		6hrs.	12hrs.	24hrs.	
1	2	ND			No había crecimiento notorio.
1	2		10		Halo difuso.
1	2			6	rellenado debido a efecto bacteriostático
2	5	ND			No había crecimiento notorio.
2	5		15		Halo bastante regular.
2	5			5	Rellenado debido a efecto bacteriostático.
3	10	ND			No había crecimiento notorio.

3	10	15	Halo con bordes difusos.
3	10	7	Halo difuso y relleno (efecto bacteriostático)

Grupo # 7

6.3.2. Para Salmonellas y Shiguellas utilizando antióbticos convencionales.

Se utilizaron los siguientes antióbticos:

<u>ANTIBIOTICO</u>	<u>CONCENTRACION</u>
Penicilina	2 unidades
Cloranfenicol	5 mcgr.
Nitrofurantoina	100 mcgr.
Tetraciclina	5 mcgr.

Luego de 12 horas, se había formado un halo, pero transcurridas 24 horas, el halo se había relleno dejando un espacio de 7mm aproximadamente.

6.4. Datos obtenidos de las pruebas de (MIC) con coliformes totales

Para estas pruebas, los resultados se basaron en espectrofotometría. Se hicieron mediciones de coliformes totales y de turbidez mediante la técnica de Cunnigram y Timothy (3).

Mic #	<u>Medición de coliformes totales</u>					<u>Medición de Turbidez</u>				
	<u>Concentraciones (%)</u>					<u>Concentraciones (%)</u>				
	0	2	5	10	15	0	2	5	10	15
1	4.6	2.5	1.2	3.3	1.2	52	35	25	50	25
2	4.1	3.0	2.5	2.2	1.8	40	35	40	25	30
3	5.8	_	5.2	5.0	4.8	83	_	79	75	75
4	0.3	-	0.1	0.1	0.0	0.5	-	0.1	0.2	0.0

6.5. Datos de bioensayos realizados con extracto obtenido por infusión

Bioensayo # 1

Luego de cinco días de tratamiento, el grupo # 1, larvas que recibieron el tratamiento, aparecían más activas y se estaban alimentando. Al microscopio se observó la presencia de zonas necróticas y el hepatopáncreas ligeramente hinchado. Se hizo un seguimiento de las larvas durante un mes y éstas, a pesar de presentar la infección, se mantenían activas; las larvas seguían alimentándose, pero su crecimiento había disminuido.

Mientras en el grupo # 2, grupo testigo, las larvas presentaron síntomas mucho más marcados y hubo alta mortalidad.

Bioensayo # 2

Luego de los 3 días de tratamiento, algunos de los primeros síntomas que aparentemente se presenta en la enfermedad de los grumos; hepatopáncreas hinchado y focos necróticos, retardaron su aparición por 2 días aproximadamente. Con la diferencia que, después de la aparición de los mismos, las larvas se mantuvieron activas y alimentándose.

Este cuadro se mantuvo estable por 15 días aproximadamente, luego de los cuales la enfermedad se presentó francamente.

6.6. Datos de bioensayos realizados con cristales químicamente puros

Bioensayo # 3

Hora	Fiola # 1	Fiola # 2	Fiola # 3
1	10 ¹ TNTC 10 ² TNTC Aplicación de dosis		
12		10 ¹ TNTC	

		10 ² TNTC	
		Aplicación de dosis	
24	1.48 x 10 ⁵ col/100ml	1.0 x 10 ⁵ col/100ml	TNTC
	1.5 x 10 ⁵ col/100ml	1.0 x 10 ⁵ col/100ml	TNTC
			Aplicación dosis
48			1.8x10 ⁵ col/ml
			1.9x10 ⁵ col/ml
Ph	8.3	8.4	8.4
Temp °c	26	26	26
Sob. (%)	85	100	95

Donde TNTC (" too numerous to count ") muy numeroso para contar.

Durante el tratamiento las larvas se mantuvieron activas y no se observó síntomas indicadores de toxicidad debido a la aplicación del antibiótico.

Bioensayo # 4

Hora	Fiola # 1	Fiola # 2
1	10 ¹ TNTC	10 ¹ TNTC
	10 ² TNTC	10 ² TNTC
	10 ³ 3.1 x 10 ⁷ col /100ml	10 ³ 3.4 x 10 ⁷ col /100ml
	1 ^{era} Dosis de antibiótico	
5	2 ^{da} Dosis de antibiótico	
12	10 ¹ 1.42 x 10 ⁵ col / 100ml	10 ¹ TNTC
	10 ² 1.40 x 10 ⁵ col / 100ml	10 ² TNTC
	10 ³ 0 col / 100ml	10 ³ 2.5 x 10 ⁷ col / 100ml

	$10^4 0$ col/ 100ml	$10^4 2.3 \times 10^7$ col / 100 ml
15	3 ^{era} Dosis de antibiótico	
25	4 ^{ta} Dosis de antibiótico	
35	5 ^{ta} Dosis de antibiótico	
48	10^1 TNTC	10^1 TNTC
	$10^2 2.0 \times 10^5$	10^2 TNTC
	$10^3 2.0 \times 10^5$	$10^3 3.1 \times 10^7$ col / 100 ml
	10^4	$10^4 3.0 \times 10^7$ col / 100 ml

Al finalizar el bioensayo, las larvas de la fiola # 2 mostraron letargia marcada y pequeños focos necróticos a nivel de los pleópodos y de la zona bucal.

La fiola # 1 presentó letargia, pero no había focos necróticos. Los síntomas de letargia en las larvas se debieron en parte a la falta de alimentación y al "stress", sin embargo, la fiola # 1 no presentó focos necróticos y al terminar el bioensayo, se alimentaron normalmente. En cambio, al ser alimentadas las larvas de la fiola # 2, los síntomas de anorexia se mantuvieron.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1.-Conclusiones referentes a la extracción del principio activo :

- a.- El promedio del peso (g) extraído de 10 g de semillas es de 0.55 g, es decir, 5.5%.
- b.- Dicha cantidad (5.5 %), es mayor que la expresada en la literatura investigada. El MEDICAMENTO específicamente hace referencia a un 2.5% de cristales de santonina obtenidos de 10 g de semillas.
- c.- Esta diferencia puede deberse a que la Farmacología Francesa y el medicamento se refieren a Artemisa cina y a Artemisa marítima , mientras que nosotros trabajamos con una planta de la misma familia que se localizó en la costa de la provincia del Guayas (Bidens leucantha).
- d.- En las dos primeras extracciones los azúcares, que se encontraban formando glúcidos no fueron totalmente eliminados mediante el ataque con ácido clorhídrico . El Paso # 6 de la extracción del principio activo, que se describió

anteriormente, no se había seguido correctamente. Es importante añadir el ácido hasta que la muestra adquiriera un pH ligeramente ácido y se vuelva incolora.

- e.- Los cristales, obtenidos químicamente, son más estables en su comportamiento y efectividad que el extracto obtenido mediante infusión de semillas.
- f.- Los cristales mantienen mejor su efectividad a través del tiempo, que el extracto obtenido mediante infusión de semillas.
- g.- Para mantener el efecto antibiótico de los cristales es necesario conservarlos en recipientes oscuros, como frascos ambar.

2.- Conclusiones referentes a su efecto:

El antibiótico estudiado mostró mejor efecto de inhibición sobre coliformes totales.

De acuerdo al Manual de Bergey (Bergey's Manual), se citarán algunas de las características distintivas del grupo: Bacilos Gram-negativos, en el cual se encuentran los coliformes; grupo sobre el cual la santonina mostró efectos significativos.

BACILOS GRAM-NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS:

Muchas de las Bacterias más comunes pertenecen a este grupo y gran número de ellas son morfológicamente iguales, por lo que es necesario

recurrir a pruebas bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas para la identificación de especies.

Una de las especies de bacterias más ampliamente estudiadas de este grupo es *Escherichia coli*; que se caracteriza por ser un habitante normal del tracto intestinal del hombre y de otros animales. Según Ingram (Mossel 1.78) un micro-organismo índice es aquel cuya presencia implica la posible presencia de un germen patógeno y un micro-organismo indicador es aquel cuyos recuentos en un determinado producto refleja el éxito o el fracaso de la aplicación de las buenas prácticas de manufactura. Como representante del grupo índice sería *E. Coli* biotipo I , y del grupo indicador el más utilizado es el grupo de coliformes.

Las bacterias pertenecientes a este grupo (bacilos gram-negativos anaerobios facultativos), son responsables de muchas infecciones del tracto intestinal en humanos y otros animales. Su presencia en los laboratorios de larvas, a pesar de no ser bacterias halófilas (que necesitan de un medio salino), es continua y aunque no se han reportado casos de infecciones severas que causen mortalidades de larvas; si hay un debilitamiento de los animales de deben utilizar su energía, la cual normalmente estaría destinada a su crecimiento y normal desarrollo, para superar dichas infecciones. De esta manera, la larva debilitada se presenta mucho más vulnerable y sensible a otras infecciones que podrían causar mortalidades considerables.

Algunas de las especies pertenecientes a este grupo son:

Shigella sp; *Yersenia pestis*, *Vibrio colerae*, *Salmonella* sp; *Eerwinia* sp; entre otras.

Características del grupo:**Morfología celular:**

- Bacilos cortos (0,5 – 1,0 x 1,0 – 3,0 micrómetros)
- Considerable similitud entre los taxones.
- Las células móviles son periticas, o no son móviles.
- Anaerobias facultativas.
- Gram-negativas.
- La principal información para su identificación es a través de los cambios químicos en sustratos que produce cada uno de sus integrantes.

Habitat:

Ambientes acuáticos, suelos, alimentos, orina, heces.

3.-Conclusiones referentes a su aplicación:

En antibiótico extraído de la planta Bidens leucantha , debido a que demostró su mayor efectividad en Coliformes Totales, debería usarse cuando las larvas están afectadas por problemas menores : se observa poco crecimiento, letargia, leve anorexia, y por medio de un análisis se comprueba la presencia de un considerable número de colonias de Coliformes. Todos estos síntomas estarían debilitando las larvas y al mismo tiempo, las hace más vulnerables a infecciones que podrían ocasionar grandes mortalidades. En estos casos, de altas mortalidades, el uso de antibióticos se convierte en un arma de difícil manejo:

- a.- Por lo general no hay el tiempo necesario para hacer un MIC para determinar la dosis apropiada.
- b.- La dosis utilizada puede entonces, ser menor de lo que se necesita; lo que ocasionaría resistencia y con ella, en muchos casos encubrimiento de los verdaderos síntomas de la infección.
- c.- La dosis utilizada puede estar por encima de las dosis mínima inhibitoria, lo que no siempre sería un problema, pero podría ocasionar larvas de bajo crecimiento y mal rendimiento al ser trasladadas a medios naturales, como son las camaroneras.
- d.- Los síntomas anteriores se agravarían, si la dosis utilizada se acerca a los niveles tóxicos. Por lo que en los laboratorios, lo ideal sería limitar el uso de antibióticos al mínimo, para obtener larvas que resistan el gran cambio que se da del medio en que se desarrollan en el laboratorio y el medio existente en las camaroneras, en donde la larva de laboratorio muchas veces se encuentra en desventaja frente a la larva silvestre.

Conclusión referente a dosis terapéutica:

El antibiótico en estudio, de acuerdo a los antibiogramas y a los MIC realizados, alcanza su máximo efecto a las 12 horas aproximadamente y éste se mantiene por 10 horas más aproximadamente; esto es lo que ocurre en los medios de cultivo, sin embargo este comportamiento puede variar grandemente en los medios naturales. Para mantener una línea terapéutica constante y debido a que, de acuerdo a las pruebas realizadas no hay peligro por dosis tóxica; lo recomendable

sería administrar una dosis inicial doble para que alcance el máximo efecto en menor tiempo (aproximadamente la mitad del tiempo) y luego una segunda dosis 4 horas después, para continuar con 3 aplicaciones, una cada 10 horas. Con lo que se completaría un tratamiento de 48 horas (gráfico pág. 62).

Es importante mantener constantes los intervalos entre las aplicaciones del antibiótico, para no dejar espacios de tiempo en que el antibiótico pudiera disminuir su efectividad, ya que de esta forma estaríamos creando resistencia.

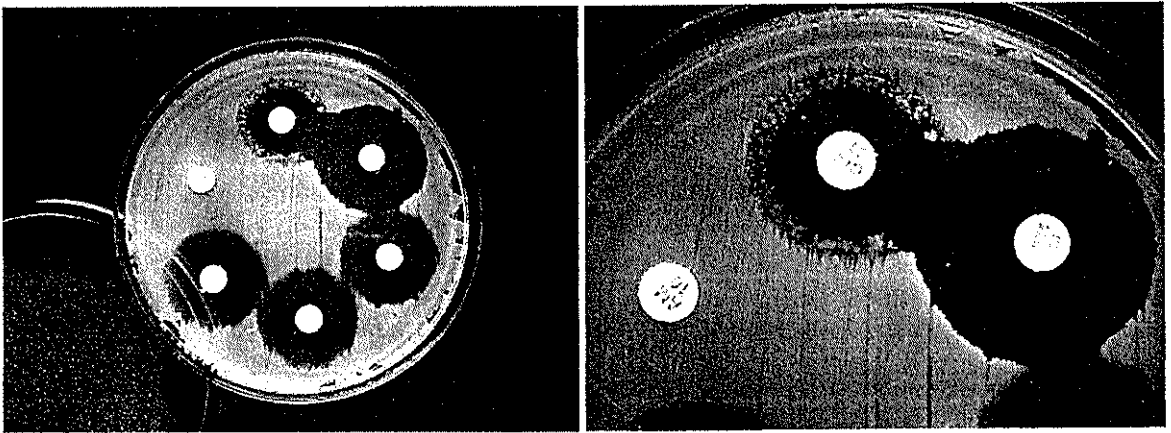
RECOMENDACIONES

- 1.- Este antibiótico debería de considerarse como no específico, es decir de amplio espectro.
- 2.- Es importante hacer estudios de la facilidad que tiene para crear resistencia.
- 3.- Se recomienda hacer un estudio de su comportamiento al ser utilizado conjuntamente con otros antibióticos convencionales, para determinar si hay efectos de simergismo o de antagonismo.
- 4.- Hacer un estudio del efecto acumulativo de esta droga a largo plazo.

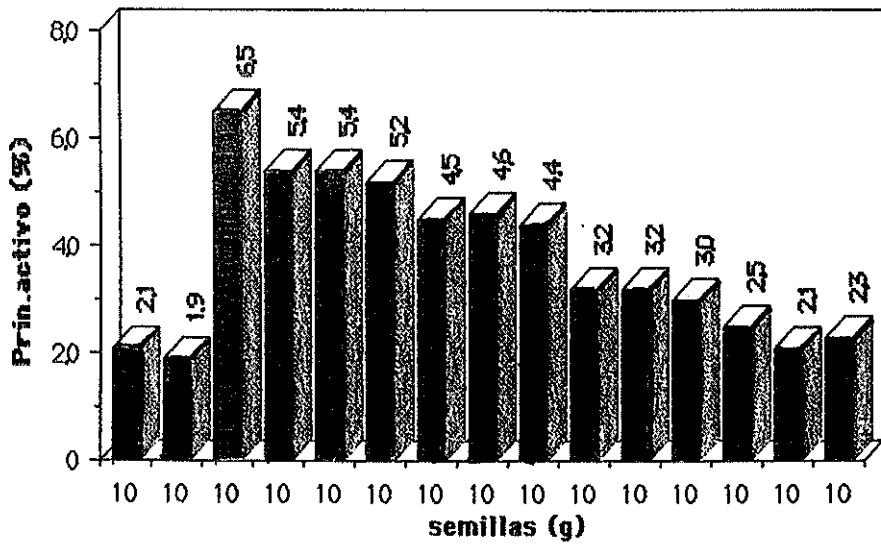
ANTIBIOGRAMA POR EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

En la imagen de la izquierda se muestra una vista general de una placa con crecimiento bacteriano y con seis discos de antibióticos. La zona de color claro que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento bacteriano en las zonas no inhibidas. Los círculos negros que rodean a cinco de los seis discos marcan las zonas en que los respectivos antibióticos han inhibido, con mayor o menor eficacia, el crecimiento del microorganismo a estudio. El sexto disco (AM-10) no tiene a su alrededor halo de inhibición lo que indica la resistencia del microorganismo a ese antibiótico.

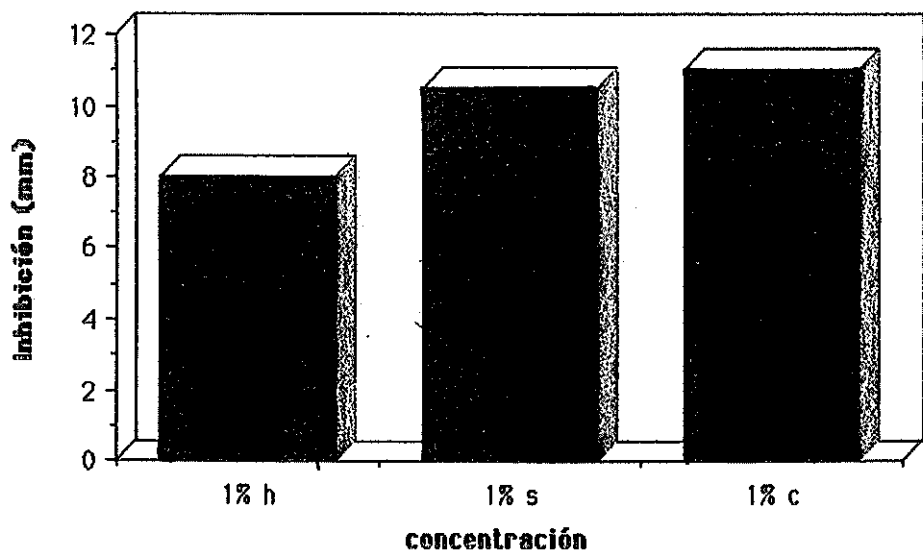
La foto de la derecha, puede verse además, con gran claridad, la especial disminución de la intensidad de crecimiento del microorganismo en la zona interior del halo de inhibición del disco de CTX-30, debido probablemente a la aparición de mutantes resistentes de dicho microorganismo capaces de soportar en mayor medida que el resto el efecto inhibitorio del antibiótico.



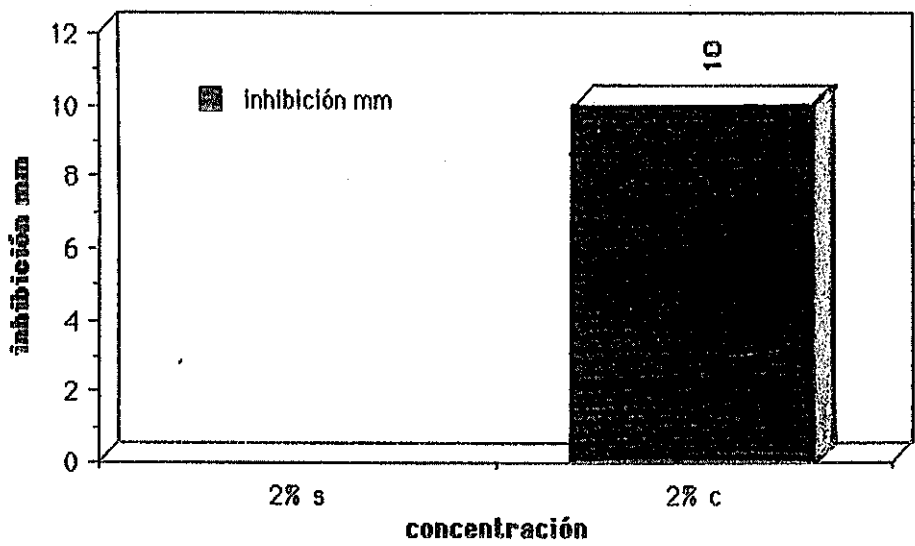
"Extracciones del principio activo"



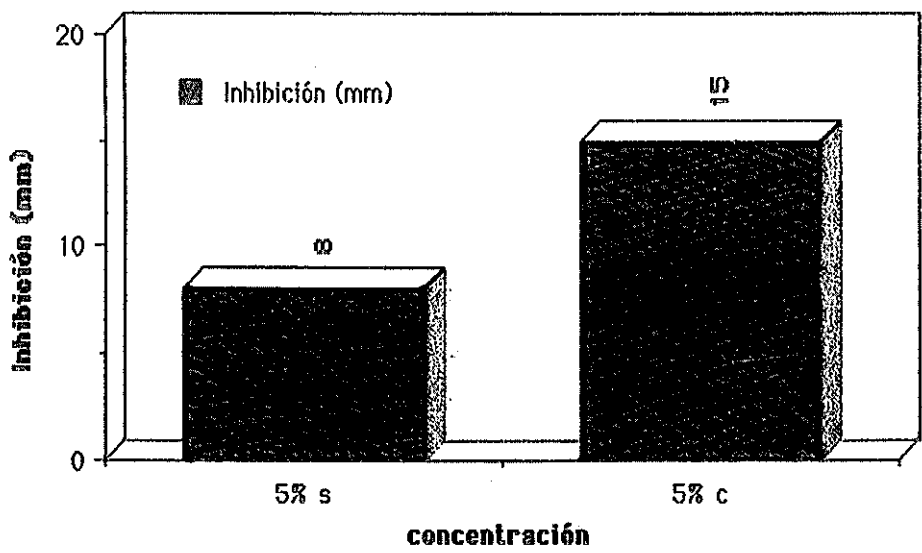
Comparación hojas/semillas/cristales 1%



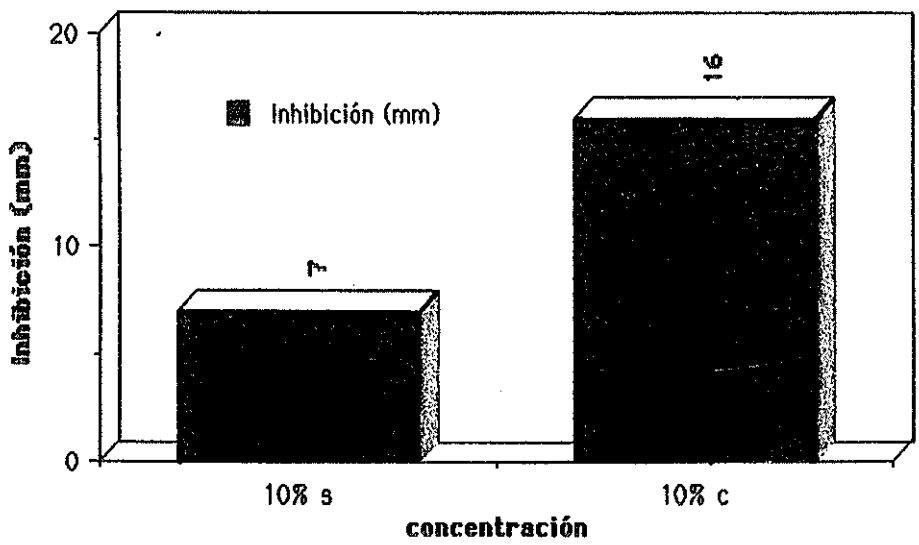
Comparación semillas/cristales al "2 %"



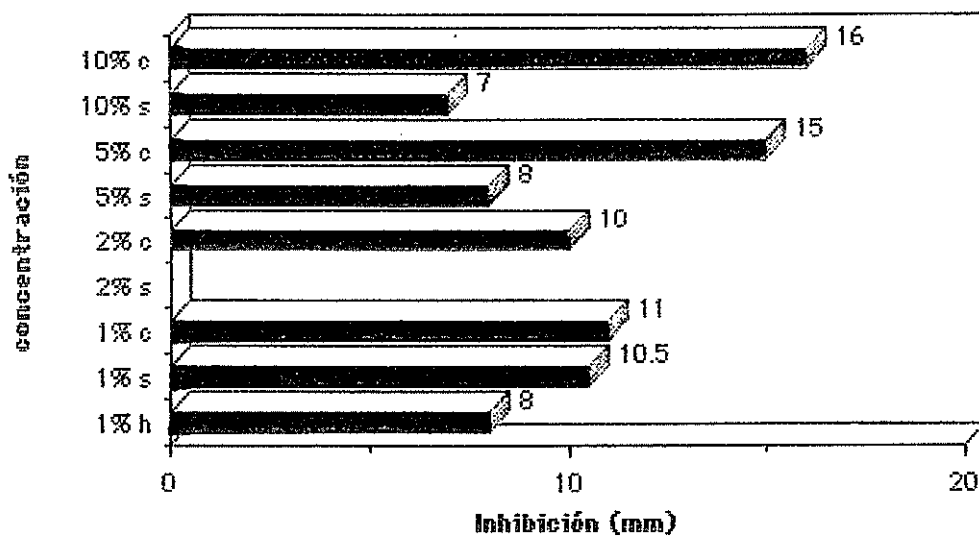
Comparación semillas/cristales al "5 %"



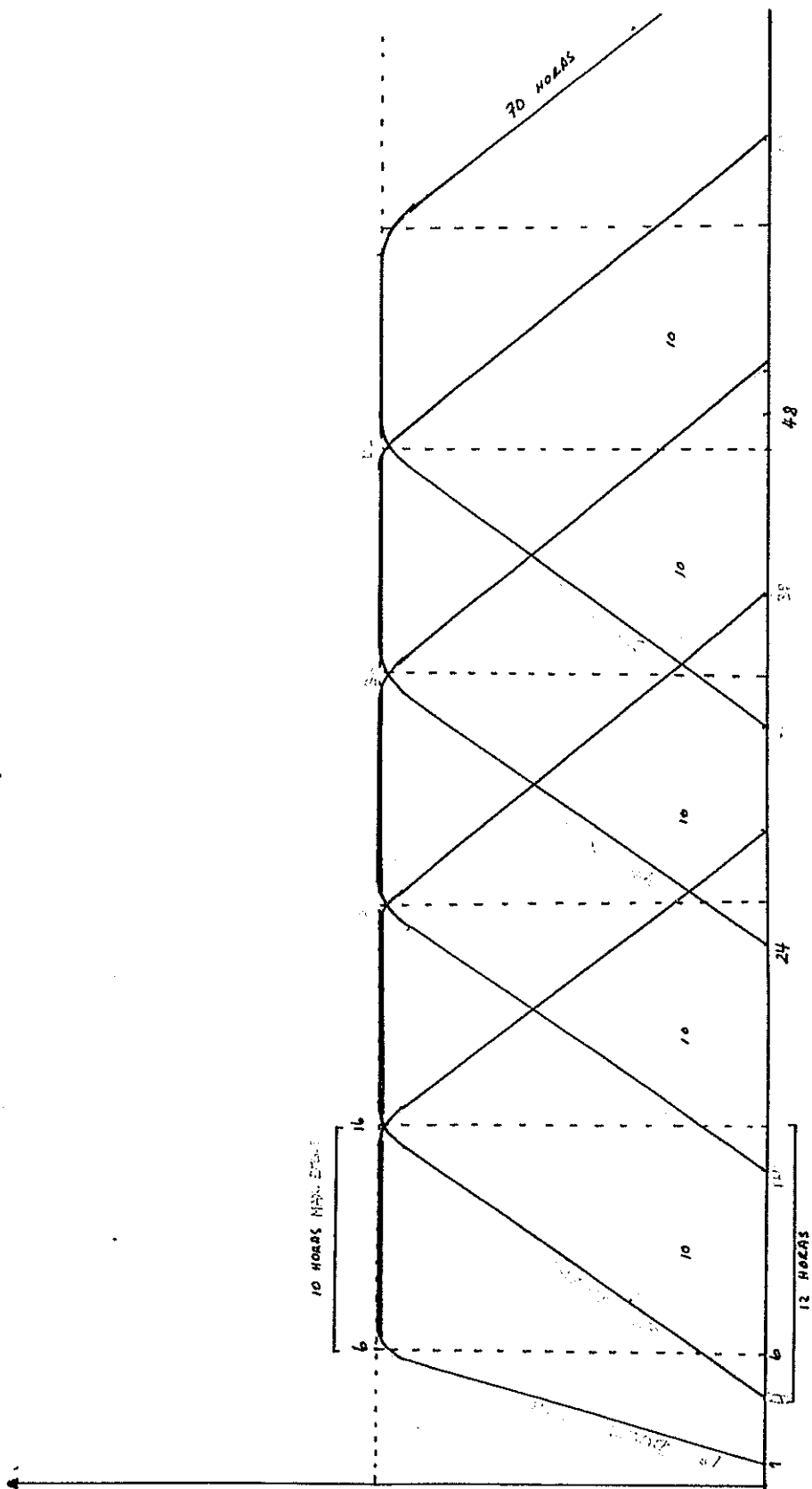
comparación semillas/cristales al 10 %



Comparación "hojas/semillas/cristales"



Técnica de aplicación del antibiótico



Planta Bidens leucantha



Se puede observar la planta adulta completa

Inflorescencias

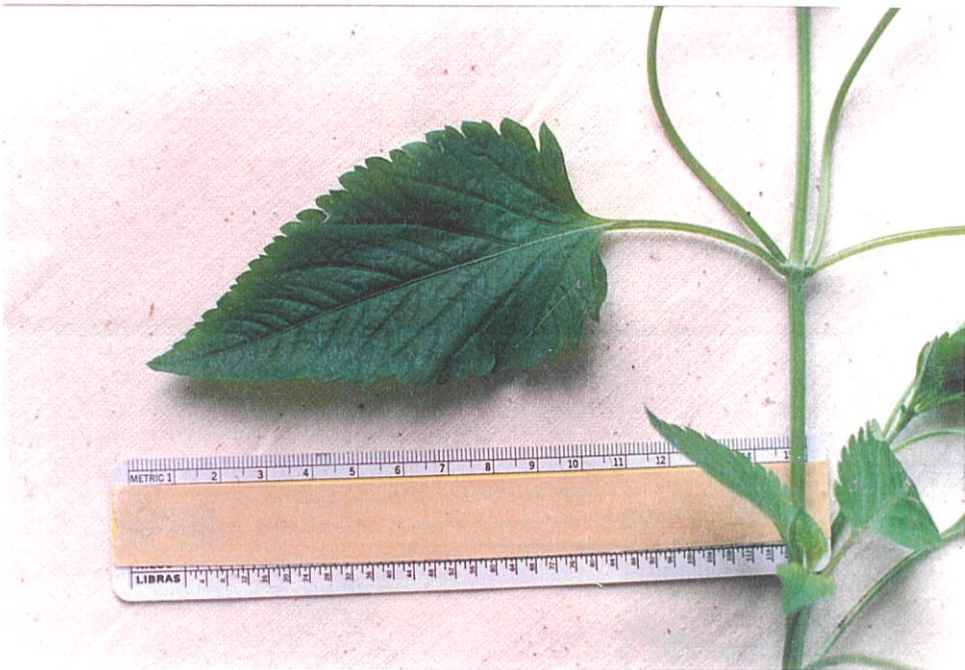


Inflorescencias secas y semillas

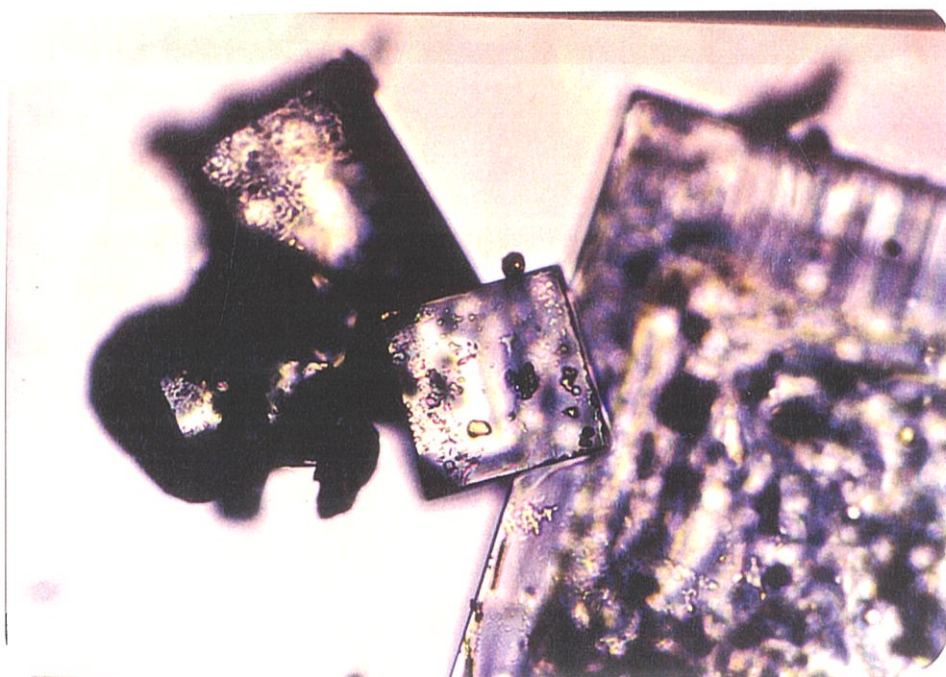
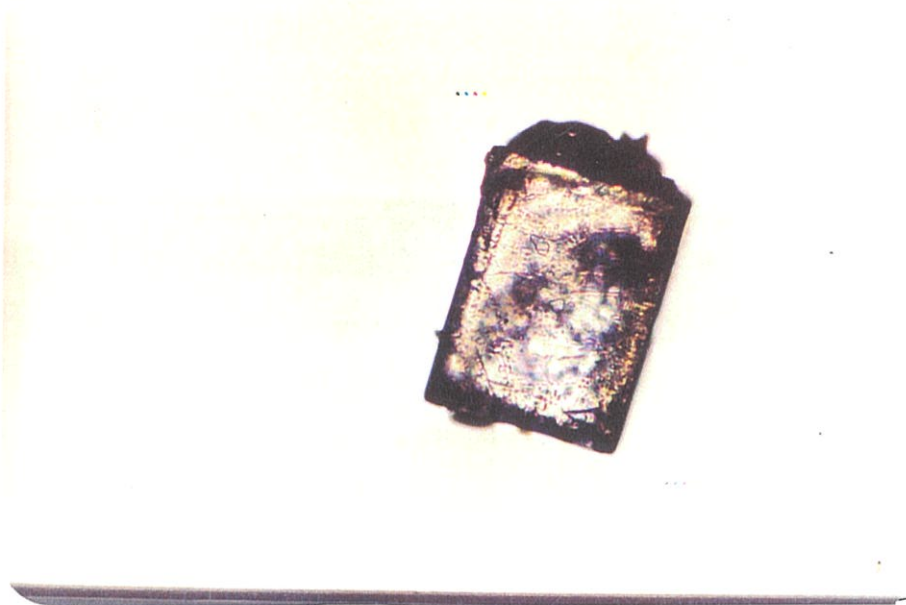


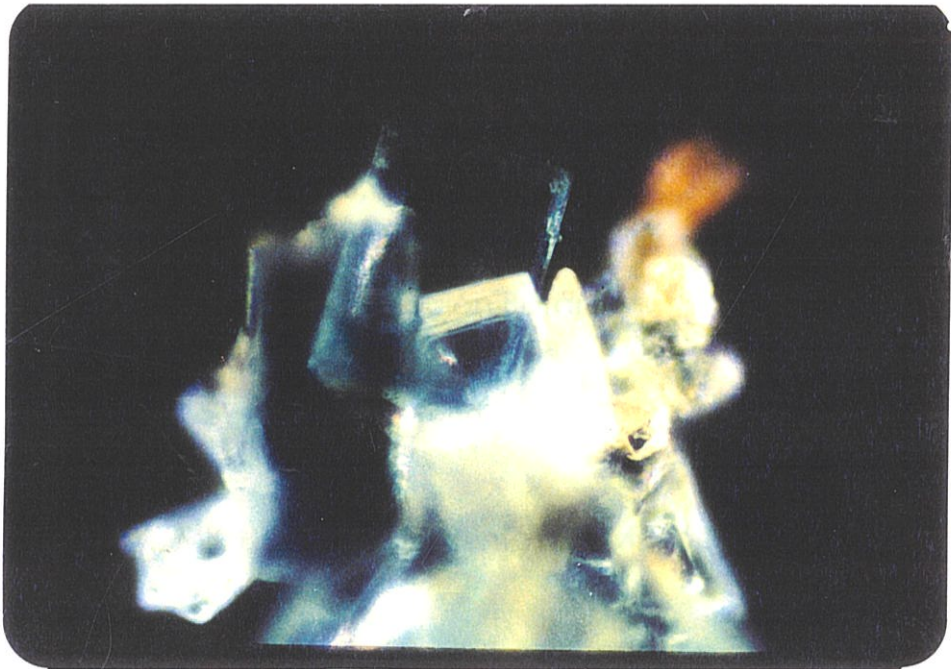
Nótese la forma de las semillas : termina en dos aristas ganchosas

Hojas



Cristales del principio activo





BIBLIOGRAFÍA

1. VARIOS AUTORES, Codex Farmacopea Francesa.
2. Dr. QUER FONT et al, Medicamenta, tomo tercero, sexta edición, ed. Labor S.A
3. CENDRERO, ORESTRES, Botánica General.
4. CORDERO, LUIS, Enumeración Botánica.
5. Standard Methos, 15 ed, 1980.
6. PELCZAR, MICHEAL J. , Elementos de Microbiología, 1984.
7. Recopilación del congreso latinoamericano de microbiología. Actualización en microbiología de alimentos, 1987.
8. BURDON WILLIAMS, Microbiología, 1974
9. DIFCO, medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología, décima edición, 1984.
10. BROCK, JAMES, Shrimp diseases, 1986.

11. LENDER-DELAVALT LE MOIGNE, Diccionario de Biología.
12. JAULETZ, MELNIK, ADEIBERG, Microbiología Médica.