



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PULPA
DE *Couroupita guianensis* Aubl. “ayahuma” FRENTE A BACTERIAS
PATÓGENAS, IQUITOS - PERÚ**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

PRESENTADO POR:

VÍCTOR GERMÁN REÁTEGUI CÁRDENAS

ASESORES:

Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.

Ing. REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS, Dra.

IQUITOS, PERÚ

2023

ACTA DE SUSTENTACION



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 002-CGT-UNAP-2023

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante sala presencial, a los 30 días del mes de enero del 2023, a las 17:35pm horas se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: **“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PULPA DE *Couroupita guianensis* Aubl. “ayahuma” FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS, IQUITOS - PERÚ”** presentado por el Bachiller **VÍCTOR GERMÁN REÁTEGUI CÁRDENAS**, autorizada mediante **RESOLUCIÓN DECANAL N°008-2023-FCB-UNAP**, para optar el Título Profesional de **BIÓLOGO**, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante **RESOLUCIÓN DECANAL N° 217-2020-FCB-UNAP**, de fecha 18 de diciembre de 2020, integrado por los siguientes Profesionales:

- | | |
|--|---------------------|
| - Blga. MARÍA ELENA BENDAYÁN ACOSTA, M.Sc. | - Presidente |
| - Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc. | - Miembro |
| - Blga. MIRLE CACHIQUE PINCHE, Dra. | - Miembro |

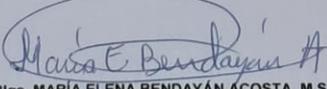


Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron **absueltas**:
SATISFACTORIAMENTE

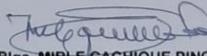
El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis han sido aprobado con la calificación de buena estando el Bachiller apto para obtener el Título Profesional de **BIÓLOGO**.

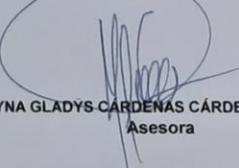
Siendo las 18:40 p.m. horas se dio por terminado el acto de sustentación.


Blga. **MARÍA ELENA BENDAYÁN ACOSTA, M.Sc.**
Presidente

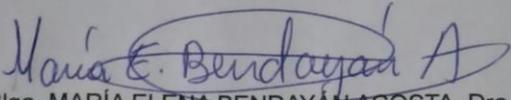

Blgo. **RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.**
Miembro

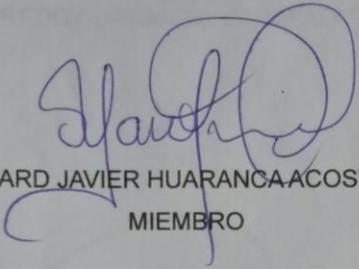

Blga. **MIRLE CACHIQUE PINCHE, Dra.**
Miembro

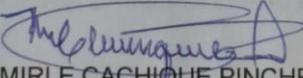

Blgo. **FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.**
Asesor


Ing. **REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS, Dra.**
Asesora

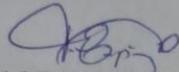
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR


Blga. MARÍA ELENA BENDAYAN ACOSTA, Dra.
PRESIDENTA

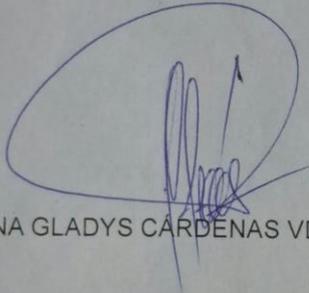

Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc,
MIEMBRO


Blga. MIRLE CACHIQUE PINCHE, Dra.
MIEMBRO

ASESORES



Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.



Ing. REYNA GLADYS CÁRDENAS VDA. DE REÁTEGUI, Dra.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS - REATEGUI CARDENAS VICTOR G
ERMAN.pdf

RECuento DE PALABRAS

10509 Words

RECuento DE CARACTERES

59737 Characters

RECuento DE PÁGINAS

48 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

688.0KB

FECHA DE ENTREGA

Jan 28, 2023 3:13 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jan 28, 2023 3:14 PM GMT-5

● 26% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 25% Base de datos de Internet
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- 14% Base de datos de trabajos entregados

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Resumen

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Víctor Virgilio Reátegui Dávila y Reyna Gladys Cárdenas Vda. de Reátegui, quienes dieron lo mejor de sí en mi formación personal y profesional y poder aportar a la sociedad.

Víctor Reátegui

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento infinito a mis padres quienes me inculcaron el deseo de superación y me apoyaron en todo momento para que pueda terminar esta carrera, al personal académico y administrativo de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Facultad de Ciencias Biológicas, quienes supieron impartir sus conocimientos con mucho esfuerzo, para hacer posible mi preparación profesional.

A la Turun Ylipisto o Universidad de Turku por complementar mi formación académica y abrirme nuevas perspectivas en el quehacer del biólogo y mostrarme como aportar al desarrollo de la sociedad.

A la Ing. Gladys Cárdenas Dra., Ing. Maritza Grandez Dra., por acogerme en su equipo de investigación y formarme continuamente en la investigación acerca de los Productos Naturales.

A mis asesores, quienes en todo momento estuvieron brindándome su apoyo y guía para completar este proyecto.

Agradezco a la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe y al ing. Alimentario Alexander Javier Iman Torres por su apoyo en la logística del ensayo de concentración inhibitoria mínima.

Especial agradecimiento a mis profesores y amigos queridos que ya no se encuentran con nosotros por que aprendí mucho de ellos: Javier Sousa Tecco, Luis Sicchar Valdez, Manuel Flores, Julia Bardales y Felicia Diaz Jarama.

Víctor Reátegui

ÍNDICE

	Pág.
PORTADA.....	i
ACTA DE SUSTENTACION.....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESORES.....	iv
RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE ANEXOS	xiv
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Antecedentes.....	4
1.2 Bases Teóricas.....	8
1.2.1 Aspectos generales de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl. 1775	8
1.2.2 Aspectos generales de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887.....	9
1.2.3 Aspectos generales de <i>Escherichia coli</i> Escherich, 1885	12
1.3 Definición de términos básicos.....	13

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	16
2.1 Formulación de la hipótesis	16
2.2 Variables y su operacionalización	16
CAPITULO III: METODOLOGÍA	19
3.1 Diseño metodológico	19
3.1.1 Método descriptivo y experimental	19
3.2 Diseño muestral	19
3.2.1 Área de estudio.....	19
3.2.2 Población y muestra.....	19
3.3 Procedimientos de recolección de datos	21
3.4 Procesamiento y análisis de datos	37
3.5 Aspectos éticos.....	37
CAPITULO IV: RESULTADOS	38
4.1 Extracto etanólico (EtOH) y Tamizaje fitoquímico del EtOH de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.....	38
4.2 Prueba de sensibilidad del extracto etanólico de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	40
4.2.1 Datos de la prueba de sensibilidad del Extracto etanólico de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	40
4.2.2 Análisis Estadístico de las pruebas de sensibilidad del extracto etanólico de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl	42
4.3 CMI del extracto etanólico de pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.....	45
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	46
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	49
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	50
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN	51
ANEXOS	55

Anexo 01. Vista aérea del lugar de colecta.....	55
Anexo 02. Certificación taxonómica de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.....	56
Anexo 03. Método de Chhabra et al. para el tamizaje fitoquímico(24)	57
Anexo 04: Foto del extracto EtOH de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl...59	
Anexo 05: Prueba de ANOVA de dos vías	60

ÍNDICE DE TABLAS

Pag

Tabla 01: Operacionalización de variables.....	17
Tabla 02. Metabolitos presentes en las fracciones del tamizaje fitoquímico de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl. La escala de cruces fue realizada acorde a lo indicado en el trabajo Phytochemical screening of Tanzanian Medicinal Plants ⁽²⁴⁾	38
Tabla 03. Actividad antibacteriana del extracto EtOH de la pulpa de <i>C. guianensis</i> Aubl. frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> , según diámetro de inhibición durante 24 horas.	40
Tabla 04. Actividad antibacteriana de antibióticos conocidos frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> , según diámetro de inhibición.	41
Tabla 05. CMI del extracto EtOH de la pulpa de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl. frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Pag

Figura 1: Analisis de Normalidad por Shapiro Test del diametro de Zona de Inhibición bacteriana del Extracto etanólico de pulpa de <i>Couropita guianensis</i> Aubl.....	42
Figura 2: Analisis de Normalidad por Shapiro Test entre la interacción de las bacterias y las concentraciones del Extracto etanólico de pulpa de <i>Couropita guianensis</i> Aubl.....	43
Figura 3: Anova de doble via del diametro de Zona de Inhibicion bacteriana del Extracto etanólico de pulpa de <i>Couropita guianensis</i> Aubl.	44

INDICE DE ANEXOS

	Pag
Anexo 01. Vista aérea del lugar de colecta.....	55
Anexo 02. Certificación taxonómica de <i>Couropita guianensis</i> Aubl.	56
Anexo 03. Método de Chhabra et al. para el tamizaje fitoquímico(24)	57
Anexo 04: Foto del extracto EtOH de la pulpa de <i>Couropita guianensis</i> Aubl.	59
Anexo 05: Prueba de ANOVA de dos vías	60

ABREVIATURAS

<i>C. guianensis</i> Aubl.	:	<i>Couroupita guianensis</i> Aublet
<i>K. pneumoniae</i>	:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
CMI	:	Concentración Mínima Inhibitoria
IR	:	Infrarojo
Anti-MRSA	:	Anti-metilresistent <i>Staphylococcus aureus</i>
EtOH	:	Etanólico
DCM	:	Diclorometano
CEE	:	Extracto de Etanol Crudo
AgNP	:	Nanopartículas de Plata estables
UV-visible	:	Ultra violeta visible
SPR	:	Resonancia del Plasmón de la superficie
Fe ₃ O ₄	:	Magnetita
CGFe ₃ O ₄ NPs nanoparticles	:	<i>Couroupita guianensis</i> Magnetite
EPOC	:	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
IV	:	Intra-venoso
UTI	:	Urinary Tract infections
EPEC	:	<i>E. coli</i> enteropatégena
ETEC	:	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EHEC	:	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	:	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
DAEC	:	<i>E. coli</i> con adherencia difusa

EAEC : *E. coli* enteroagregativa
DMSO : Dimetilsulfoxido

RESUMEN

En la amazonia peruana existen muchas especies vegetales que se desconocen sus propiedades farmacológicas por lo que en la presente investigación se tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. “ayahuma”. Los frutos se colectaron en la localidad de San José – Ullpa caño, río Itaya. El tamizaje fitoquímico se realizó, por el método modificado de Chhabra *et al.* y la actividad antibacteriana del extracto etanólico de pulpa fue medida por la prueba de susceptibilidad de disco difusión de Kirby-Bauer así como también la prueba de concentración inhibitoria mínima (CMI) frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Obteniendo como resultados en el tamizaje fitoquímico del extracto la presencia de saponinas, fenoles y taninos, esteroides, agrupamientos lactónicos, aceites esenciales y grasas, y finalmente compuestos reductores; a su vez este extracto mostró actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae* mostró mayor sensibilidad al extracto etanólico de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. en una concentración de 300 mg/mL y una CMI de 8 mg/mL; el ANOVA de doble vía nos muestra que en la interacción de las bacterias con el extracto muestra una diferencia significativa en contraparte la interacción entre concentraciones de los extractos frente a las bacterias mostró que no hay una diferencia significativa, lo que se debe a que el rango de concentraciones no es muy amplio y biológicamente expresan lo mismo. Concluyendo que el extracto etanólico de pulpa de *C. guianensis* Aubl. presenta una buena actividad antibacteriana frente a *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida frente a *Escherichia coli*; estas actividades están asociadas a los metabolitos secundarios encontrados, principalmente las saponinas, compuestos fenólicos, esteroides y los agrupamientos lactónicos.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, *C. guianensis*, tamizaje fitoquímico, Ullpa caño.

ABSTRACT

In the Peruvian Amazon there are many plant species whose pharmacological properties are unknown, so in the present investigation the objective was to evaluate the antibacterial activity of the ethanolic extract of *Couroupita guianensis* Aubl "ayahuma" pulp. The fruits were collected in the town of San José - Ullpa caño, Itaya river. Phytochemical screening was performed by the modified method of Chhabra et al. and the antibacterial activity of the ethanolic pulp extract was measured by the Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test as well as the minimum inhibitory concentration (MIC) test against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Obtaining as results in the phytochemical screening of the extract the presence of saponins, phenols and tannins, steroids, lactone groups, essential oils and fats, and finally reducing compounds; in turn, this extract showed antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae* showed greater sensitivity to the ethanolic extract of the pulp of *Couroupita guianensis* Aubl. at a concentration of 300 mg/mL and a MIC of 8 mg/mL; the two-way ANOVA shows us that in the interaction of the bacteria with the extract it shows a significant difference in contrast, the interaction between concentrations of the extracts against the bacteria showed that there is no significant difference, which is due to the fact that the range of concentrations is not very broad and biologically they express the same thing. Concluding that the ethanolic extract of the pulp of *C. guianensis* Aubl. it has good antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae* and to a lesser extent against *Escherichia coli*; These activities are associated with the secondary metabolites found, mainly saponins, phenolic compounds, steroids, and lactone groups.

Keywords: Antibacterial activity, *C. guianensis*, phytochemical screening, Ullpa caño.

INTRODUCCIÓN

Actualmente uno de los principales problemas que enfrentan los tratamientos médicos, provienen por el aumento a la disponibilidad de antibióticos convencionales para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tanto en hospitales como en la comunidad, esto ha producido diversos problemas en pacientes y consumidores, tales como resistencia bacteriana, reacciones adversas y predisposición a enfermedades cancerígenas⁽¹⁾ lo que constituye una alarmante preocupación para la salud humana. Así mismo la pérdida de la eficacia de ciertos fármacos administrados a causa de la resistencia a los mismos, como los antibióticos; contribuyendo así a la pérdida de su productividad y, a menudo, a la mortalidad del paciente⁽²⁾.

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud que viene creciendo en el mundo actual y presenta gran complejidad, que afecta a muchos individuos de varias localidades alrededor del mundo. Esta problemática también afecta a nuestro país, siendo una de las causas relevantes: el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales y comunidades⁽³⁾.

Un inconveniente que presenta la investigación científica debido a la resistencia de estos microorganismos frente a los antibióticos, es la toxicidad de ellos y muchas veces su elevado costo, por lo que la intensa búsqueda de nuevas moléculas obtenidas por síntesis, o bien la obtención de nuevas fuentes naturales antibióticas teniendo como punto clave, la investigación en plantas; con el fin de mejorar la calidad de vida de este tipo de pacientes⁽³⁾.

Los pobladores de la región Loreto, usan el fruto de la especie denominada *Couroupita guianensis* Aubl. “ayahuma” para contrarrestar la peste en las aves

de corral, siendo un excelente alimento para superar esta patología. Lo que nos permite suponer que esta especie vegetal podría tener una buena actividad antimicrobiana, antiviral, entre otras; validando de esta forma el conocimiento utilizado en nuestras poblaciones nativas y rurales ancestrales. Siendo este un tratamiento alternativo, pero eficaz, así como a su vez tolerado en las dosis presentes en los frutos que los pobladores dan de comer a las aves de corral.

A razón de lo anterior se vino realizando estudios en *Couroupita guianensis*, en donde enfrentada a una batería de 40 bacterias patógenas, inhibía el crecimiento de estas de las cuales los patógenos más importantes eran *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella sp.*⁽⁴⁾. A su vez, *Couroupita guianensis* ha venido siendo utilizado como parte primordial de muchos nuevos compuestos a través de la “Síntesis Verde” en donde una gran variedad de nanopartículas y moléculas a partir de las mismas presentaron una potente actividad antibacteriana, antifúngica y anticancerígena, dentro de las cuales podemos mencionar a las AuNPs (Nanopartículas de oro utilizando *Couroupita guianensis*), AgNPs (Nanopartículas de Plata utilizando *Couroupita guianensis*), Fe₃O₄ (Nanopartículas de Magnetita utilizando *Couroupita guianensis*), etc.⁽⁵⁻⁷⁾

Por lo tanto, en el presente estudio, mediante el conocimiento de las familias químicas encontradas en el extracto etanolico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl, se observó la susceptibilidad de bacterias patógenas: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, frente al extracto enfrentado; para ello, se ha evaluado al EtOH de pulpa de *C. guianensis* mediante su respectivo tamizaje fitoquímico y se realizó las pruebas de sensibilidad al extracto

obtenido. Haciendo esto se pretendió demostrar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. Mediante el método de Kirby Bauer y la Concentración Mínima Inhibitoria o CMI por el método de macrodilución en caldo frente a bacterias patógenas.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

El 2012, en India encontraron que el extracto clorofórmico de la fruta de *C. guianensis* Aubl., mostró actividad antibiopelículas efectiva contra *Pseudomona aeruginosa* de 2 mg/mL, con una inhibición del 52% de la formación de biopelículas, pero mostró baja actividad antimicrobiana. Las zonas de inhibición por extracto cloroformico variaron de 0 a 26 mm.⁽⁸⁾

En 1985, en la investigación realizada en Suecia: “Estructura y Propiedades de Algunos Constituyentes Indólicos en *C. guianensis* Aubl.”, trabajaron con el extracto de los frutos secos de *C. guianensis* Aubl., la extracción fue realizada con cloroformo, y diclorometano. Encontraron el 6,12-dihidro-6,12-dioxindolo, quinazoline, añil, indirubin. Las identificaciones fueron realizadas a través de pruebas espectrofotométricas IR y el espectro de masa⁽⁹⁾.

El 2016, en Brasil, en el trabajo de investigación “Actividad anti-MRSA *in vitro* del extracto de *C. guianensis* Aubl. y su componente Tryptanthrin”, evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y las fracciones de flores de *C. guianensis* Aubl. y el aislamiento del componente bioactivo. Estos extractos y fracciones fueron puestos en contacto con cultivos de bacterias, hongos filamentosos y levaduras por el método de difusión y se midió, MIC, TLC. Entre las fracciones de extracto de EtOH, la fracción de DCM fue la más activa, particularmente contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) con una MIC de 156 µg/mL. El compuesto activo en esta fracción se identificó

como Tryptanthrin. Las pruebas de citotoxicidad demostraron que la fracción de DCM y Tryptanthrin mostraron baja toxicidad⁽¹⁰⁾.

El 2011, en “Una Revisión Corta Sobre los Usos Terapéuticos de *C. guianensis* Aubl.” en India, informan las actividades farmacológicas de *C. guianensis* Aubl. quien posee actividad antimicrobiana y cicatrizante reportado por Umachigi *et al.* actividad antihelmíntica en cloroformo, acetona y extractos etanólicos de flores de *C. guianensis* Aubl. en *Pheretima posthuma* reportado por Rajamanickam *et al.* Para la actividad inmunoreguladora en extracto de metanol de *C. guianensis* Aubl. Los resultados del extracto metanólico mostraron un aumento significativo relacionado con la dosis en la reacción de hipersensibilidad en 100 y 200 mg/kg. Observaron que el extracto de metanol sucesivo estimulaba la respuesta inmune mediada por células y anticuerpos en ratas reportado por Pradhan *et al.* Para la actividad antinociceptiva: los efectos antinociceptivos del extracto de etanol crudo (CEE) y sus fracciones de hojas de *C. guianensis* Aubl. en tres modelos analgésicos. Todas las fracciones mostraron actividad antinociceptiva en el modelo de sacudida de la cola, siendo el hexano y el acetato de etilo las fracciones más potentes y de acción prolongada. En el método de placa caliente, el mayor efecto observado fue a la dosis de 100 mg/kg de todas las fracciones. La administración de naloxona inhibió el efecto antinociceptivo de las fracciones reportado por Mariana *et al.*⁽¹¹⁾.

El 2016, en un trabajo de investigación en la India: “Evaluación del potencial sintético de las nanopartículas de plata de *C. guianensis* Aubl., extraído de

capullos florales y su actividad antibacteriana sinérgica”, demuestra que los botones florales de *C. guianensis* Aubl. extraídos con la síntesis mediada por nanopartículas de plata estables (AgNP). La formación instantánea de AgNPs se confirmó principalmente por la aparición de un color marrón amarillento y una banda SPR plateada característica en el espectro UV-visible. La fuerte actividad antibacteriana de AgNPs sintetizados contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas mostró el potencial para la formulación de bactericidas sinérgicos mediante la combinación de propiedades antibacterianas del extracto de brotes de flor de *Couroupita* y sales de plata para aplicaciones biomédicas⁽⁶⁾.

El 2015, en la investigación denominada “Actividad antimicrobiana *in vitro* de la planta tradicional utilizada en el chamanismo mestizo de la Amazonía peruana en caso de enfermedad infecciosa”, Iquitos Perú, evaluaron 52 extractos de plantas seleccionadas por sus propiedades antimicrobianas contra un panel de 36 bacterias o levaduras sensibles y multirresistentes. Determinaron las CMI de los extractos brutos de la planta utilizando el método de dilución en agar y variaron entre 0,075 y 5 mg/mL. Además, indican que de las 40 plantas analizadas 9 especies mostraron CMI $\leq 0,3$ mg/mL (*Anacardium occidentale*, *C. guianensis* Aubl., *Croton lechleri*, *Davilla rugosa*, *Erythrina amazonica*, *Jacaranda copaia* subsp. *Spectabilis*, *Oenocarpus bataua*, *Peperomia macrostachya* y *Phyllanthus urinaria*) para uno o varios de los 36 microorganismos y solo 6 extractos de drogas fueron inactivos⁽⁴⁾.

El 2017, en el estudio realizado en la India denominado “Síntesis verde de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 utilizando el extracto del fruto de *C. guianensis* Aubl. por sus actividades antibacteriana y citotóxica”. Ellos encontraron que los fitoquímicos esenciales como los terpenos, flavonoides, cetonas, aldehídos, aminos y ácidos carboxílicos fueron los principales responsables de la reducción de los iones metálicos y la producción de la estabilización en las nanopartículas denominadas $\text{CGFe}_3\text{O}_4\text{NPs}$. Adicionalmente los estudios anticancerígenos *in vitro* de la nanopartícula sintetizada $\text{CGFe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ mostró un elevado efecto citotóxico a dosis mínimas de 44.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; de la misma forma mostró una estupenda actividad antibacteriana mucho mayor en bacterias Gram negativas que frente a bacterias Gram positivas. Como dato extra este grupo de investigadores realizaron pruebas de Hemocompatibilidad al compuesto sintetizado en donde ellos detectaron una baja toxicidad sobre los hematíes, y sugieren que este compuesto puede tener grandes potenciales quimioterapéuticos y otras posibles aplicaciones en muchos campos de la biomedicina como “carriers” de drogas⁽⁷⁾.

1.2 Bases Teóricas

1.2.1 Aspectos generales de *Couroupita guianensis* Aubl. 1775

1.2.1.1 Clasificación taxonómica de *Couroupita guianensis* Aubl. 1775

Couroupita guianensis Aublet presenta la siguiente clasificación taxonómica⁽¹²⁾

Reino	Plantae - Plantas
Sub-reino	Tracheobionta – Plantas vasculares
Super-división	Spermatophyta – Plantas con semilla
División	Magnoliophyta – Plantas con Flores
Clase	Magnoliopsida - Dicotyledonias
Subclase	Dilleniidae
Orden	Ericales
Familia	Lecythidaceae – Familia de las nueces de Brazil
Genero	<i>Couroupita</i> Aubl
Especie	<i>Couroupita guianensis</i> Aubl. 1775

1.2.1.2 Descripción botánica de la especie

Couroupita guianensis es un árbol que crece hasta 20 metros de altura. Hojas alternas, oblonga-obaladas, hasta 20 cm de largo, entero a ligeramente aserrado y peludo en las venas de abajo. Inflorescencia racimosa, surgiendo del tronco y otras ramas grandes. Flores con estambre nacido en un andróforo general. De frutos grandes, globosas marrón rojizas, de 15 a 24 cm, con una

capsula leñosa, conteniendo de 200 a 300 semillas cada una. Su polinización es realizada por abejas y murciélagos. El árbol exhibe sobre el tronco y ramas principales, grandes frutos leñosos globosos; en forma de grandes balas de cañón oxidadas que cuelgan en racimos, como bolas en una cuerda. La fruta contiene pequeñas semillas en una gelatina comestible blanca de olor desagradable, que quedan expuestas cuando la mitad superior de la fruta se desprende como una cubierta. Las largas ramas frutales que cuelgan le dan al árbol un aspecto descuidado.⁽¹²⁾

1.2.2 Aspectos generales de *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887

1.2.2.1 Clasificación taxonómica de *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887

Klebsiella pneumoniae (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887 se encuentra clasificado de la siguiente manera^(13,14)

Dominio : Bacteria
Filo : Proteobacteria
Clase : Gammaproteobacteria
Orden : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Género : *Klebsiella*
Especie : *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887^(13,14)

1.2.2.2 Descripción de *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887

Klebsiella pneumoniae descrita a priori por Carl Friedlander en 1882 como una bacteria aislada de los pulmones de pacientes que habían muerto de neumonía. Las especies de *Klebsiella* se encuentran de forma ubicua en la naturaleza, incluidos el agua, el suelo y los animales, y pueden colonizar dispositivos médicos y el entorno sanitario⁽¹⁵⁾.

Las especies de *Klebsiella* se consideran patógenos oportunistas que colonizan las superficies mucosas sin causar patología; sin embargo, de las mucosas, *Klebsiella* puede diseminarse a otros tejidos y causar infecciones potencialmente mortales, como neumonía, infecciones urinarias, infecciones del torrente sanguíneo y sepsis. Las infecciones por *K. pneumoniae* son un problema particular entre los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunodeprimidas dentro del entorno de la atención médica. Este organismo también es responsable de un número significativo de infecciones adquiridas en la comunidad en todo el mundo. Las características definitorias de estas infecciones son la capacidad de diseminarse por metástasis y su importante morbilidad y mortalidad. Las cepas de *Klebsiella* asociadas con estas infecciones se consideran hipervirulentas, y estudios epidemiológicos recientes indican que estas cepas comparten características genéticas específicas.⁽¹⁵⁾

1.2.2.3 Cuadros clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887

Klebsiella pneumoniae es el agente causante de una variedad de infecciones, que incluyen, entre otras, neumonía, sepsis, infecciones del tracto urinario (UTI), bacteriemia, meningitis y abscesos hepáticos piógenos. Al considerar estas infecciones, es importante recordar que es mucho más probable que las cepas hipervirulentas o HV causen infecciones sistémicas y adquiridas en la comunidad en personas sanas, pero en su mayor parte, estas cepas están geográficamente limitadas a Taiwán y el sudeste asiático. Por el contrario, las cepas clásicas de *Klebsiella pneumoniae* suelen causar infecciones nosocomiales graves o infecciones urinarias y pueden encontrarse en todo el mundo. Si bien existe una gran superposición de los tipos de infecciones causadas por las cepas clásicas frente a las HV, es mucho más probable que algunas enfermedades sean causadas por las HV que por las cepas clásicas.⁽¹⁶⁾

Aparte de las infecciones como las UTIs, bacteremias ya sean primarias o secundarias; las neumonías causadas por *K. pneumoniae* pueden dividirse en dos categorías: neumonías adquiridas comunitariamente (CAPs) y neumonías adquiridas hospitalariamente; siendo este tipo de neumonías preocupante, pero no inesperadas, que sean las más multidrogoresistentes.⁽¹⁶⁾

1.2.3 Aspectos generales de *Escherichia coli* Escherich, 1885

1.2.3.1 Clasificación taxonómica de *Escherichia coli* Escherich, 1885

Escherichia coli Escherich, 1885. Se encuentra clasificado de la siguiente manera^(14,17)

Dominio	:	Bacteria
Filo	:	Proteobacteria
Clase	:	Gammaproteobacteria
Orden	:	Enterobacteriales
Familia	:	Enterobacteriaceae
Género	:	<i>Escherichia</i>
Especie	:	<i>Escherichia coli</i> Escherich, 1885 ^(14,17)

1.2.3.2 Descripción de *Escherichia coli* Escherich, 1885

Escherichia coli, llamada en un principio como “*Bacterium coli commune*”, fue aislada por primera vez en heces de un niño en 1885 por el pediatra austriaco Theodor Escherich (Escherich, 1885). *Escherichia coli* es parte de la flora común del tracto gastrointestinal de humanos y animales. E. coli posee cepas que son comensales inofensivos del tracto intestinal; así como otras cepas que son los principales patógenos de humanos y animales. Las cepas de E. coli patógenas se dividen en cepas que causan enfermedades dentro del tracto intestinal y otras que pueden afectar sitios extra-intestinales. El cultivo de *Escherichia coli* se da muy fácilmente en los laboratorios clínicos, pero la identificación de sus genotipos patógenos requiere métodos de detección

especiales como detección de ciertos genes de virulencia que no suelen estar disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos⁽¹⁸⁾.

1.2.3.3 Cuadros clínicos de *Escherichia coli* Escherich, 1885

E. coli es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, se ha reportado su participación en cerca del 50% de las UTI intrahospitalarias y en el 90% de las infecciones de este tipo en pacientes ambulatorios.

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se han agrupado en siete tipos de patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC), adherente-invasiva (AIEC) y enteroagregativa (EAEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento; adicionalmente también tenemos a las cepas que causan afección extraintestinal como la Uropatógena (UPEC), meningitis neonatal (NMEC) y la patógena aviar (APEC).⁽¹⁷⁾

1.3 Definición de términos básicos

- **Extracto:** Los extractos son preparados o concentrados de consistencia sólida, líquida intermedia, derivados generalmente de material vegetal

desechado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos ⁽¹⁹⁾.

- **Productos naturales:** Compuesto químico aislado de fuentes naturales, y es producido en el metabolismo secundario⁽²⁰⁾.
- **Metabolito secundario:** Conjunto de compuestos no esenciales para la vida con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo; tiene lugar a partir de los metabolitos primarios.^(21,22)
- **Actividad:** Conjunto de fenómenos que producen efectos rápidamente⁽²³⁾.
- **Actividad antibacteriana:** Fenómenos donde probamos la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en un cultivo⁽²³⁾.
- **Bacterias:** Microorganismos cosmopolitas que causan o no enfermedad y dolencias al ser humano⁽¹⁴⁾.
- **Bacterias resistentes:** Microorganismos bacterianos tipificadas que desarrollaron resistencia a ciertos fármacos⁽¹⁴⁾.
- **Ensayos:** Repeticiones realizadas a las pruebas de susceptibilidad⁽²³⁾.

- **Metabolito primario:** Los metabolitos como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos involucrados en actividades primordiales como el crecimiento, desarrollo, respiración y fotosíntesis, y finalmente síntesis de hormonas y proteínas.⁽²²⁾
- **Escala de Cruces:** Sistema cualitativo empleado para determinar aproximadamente la cantidad de metabolitos secundarios visible a través de las reacciones de determinación desarrollado por Chhabra *et al.*⁽²⁴⁾
- **Metodología de Chhabra:** Conjunto de reacciones químicas para determinar aproximadamente de manera cualitativa la presencia o ausencia de determinados metabolitos secundarios presentes.⁽²⁴⁾

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la hipótesis

Hi: El extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. “ayahuma” presenta actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

2.2 Variables y su operacionalización

2.2.1 Variable independiente:

- Extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

2.2.2 Variable dependiente:

- Actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, del extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

2.2.3 Operacionalización de variables

La operacionalización de la variable se muestra en la Tabla 01:

Tabla 01: Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Tipo de variable por su naturaleza	Indicador	Índices	Escala de medicación	Valores	Medio de verificación
Extracto etanólico de pulpa de C. <i>guianensis</i> Aubl.	Producto de la extracción de metabolitos secundarios que se obtendrá por maceración y concentración de la muestra del fruto de C. <i>guianensis</i> Aubl. con etanol	Cuantitativa	Cantidad del extracto etanólico de pulpa del fruto de C. <i>guianensis</i> Aubl. obtenido	Concentraciones de los extractos 300 mg/mL, 250 mg/mL, 200 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL	Escala de Razón	gramos	Peso en gramos del polvo o sustancia oleosa del extracto obtenido

	Método						
	empleado						
	para						
Actividad	determinar		Actividad				Diámetro
antimicrobi	la		antibacteri				del halo
ana del	sensibilida		ana del				de
extracto	d de un		extracto				Inhibición
etanólico	agente	Cuantitat	frente a	Diámetro de	Escala	milímetr	de
de pulpa	microbian	iva	<i>Klebsiella</i>	la inhibición	de	os	de
de C.	o frente al		<i>pneumoni</i>		razón		crecimien
<i>guianensis</i>	extracto		<i>ae</i> y				to
Aubl.	etanólico		<i>Escherichi</i>				bacterian
	del fruto		<i>a coli</i>				o
	de C.						
	<i>guianensis</i>						
	Aubl.						

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Método descriptivo y experimental

Es experimental, porque la susceptibilidad antibacteriana se midió frente a diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. "ayahuma". Prospectivo, porque el registro de la información se tomó a partir de la fecha de estudio.

3.2 Diseño muestral

3.2.1 Área de estudio

El área de estudio donde se desarrolló este proyecto fue en la comunidad de Ullpa caño, situado al margen derecho del río Itaya, provincia de Maynas, distrito de Belén, región Loreto con coordenadas UTM 18M 695956 mE 9580815 mS.

3.2.2 Población y muestra

3.2.2.1 Población vegetal

La población vegetal estuvo constituida por 5 arboles de la especie *Couroupuita guianensis* Aubl. "ayahuma" de la comunidad de Ullpa caño, río Itaya, distrito de Belén. Geográficamente la colecta se realizó entre las coordenadas UTM 18M 695365.16 mE 95820685.13 mS elev. 87m (3° 46' 45.54" latitud Sur y 73° 14' 26.80", longitud Oeste, con una altitud aprox., de 89 m.s.n.m.) Ver Imagen en el Anexo 01.

3.2.2.2. Muestra vegetal

La muestra vegetal estuvo constituida por 200 gramos. de pulpa fresca de los frutos de *Couroupita guianensis* Aubl. “ayahuma”, colectadas debajo de los árboles no muy jóvenes ni senescentes a criterio del botánico Ingeniero forestal Juan Celidonio Ruíz Macedo. Como criterio propio colecté los frutos cuya capsula leñosa protectora no haya dejado expuesta al medio ambiente la pulpa del fruto. El volumen de la muestra, en estudio no involucró grandes cantidades que hagan peligrar la existencia de la especie.

3.2.2.3 Población bacteriana

La población estudiada estuvo conformada por bacterias resistentes de *Klebsiella pneumoniae* (resistente a betalactámicos) y *Escherichia coli* (resistente a Neomicina, Colistina, Kanamicina, Cefalexina, Gentamicina, Cefaloridina, Nalidixino y Cloranfenicol) donadas por el área de Laboratorio Clínico del Departamento de Apoyo al Diagnóstico de Hospital III EsSalud Iquitos, e identificadas con el Analizador Automatizado para la Identificación y Sensibilidad Microbiana – VITEK, mediante el método de Fotometría, Fluorometría y Colorimetría; gracias a las cuales se conoce la resistencia de las bacterias donadas, los mismos que fueron ensayados con diferentes concentraciones del extracto vegetal.

3.2.2.4 Muestra bacteriana

La muestra bacteriana estuvo constituida por las bacterias que se sembraron en las placas de agar Müller Hinton para la prueba de sensibilidad y las bacterias que se inocularon en los tubos Ependorff de 2 mL para la CMI; adicionalmente se obtuvo bacterias sembradas con el fin de funcionar a modo de control, enfrentándolas a determinados antibioticos.

3.3 Procedimientos de recolección de datos

3.3.1 Colecta del material vegetal

La colecta del material vegetal de la especie de *C. guianensis* Aubl. “ayahuma” fue realizado en la comunidad Ullpa caño, río Itaya, distrito de Belén; en un día soleado cuidando que los días previos también cumpliera con las mismas características. Al ser frutos que se consideran maduro cuando caen del árbol, se colectaron aproximadamente unos 20 kilos de fruta. El área de colecta se encuentra geográficamente ubicada entre las coordenadas UTM 18M 695365.16 mE 95820685.13 mS elev. 87m (3° 46' 45.54" latitud Sur y 73° 14' 26.80", longitud Oeste, con una altitud aprox., de 89 m.s.n.m.). Ver Imagen en el Anexo 01.

3.3.2 Identificación taxonómica de *Couroupita guianensis* Aubl.

La identificación taxonómica de las muestras estuvo a cargo del Herbarium Amazonense AMAZ, siendo esta parte del proyecto, previo a la Actividad

antibacteriana del extracto etanólico de hojas y frutos de *C. guianensis* Aubl. e identificación de polimorfismos de nucleótidos únicos del exón 2 del gen CYP2D6 en población mestiza de Loreto”. Ver Anexo 02.

3.3.3 Preparación del material vegetal

Cuando los frutos de *C. guianensis* Aubl. están maduros se desprenden del tronco y caen al suelo; de allí es donde se realizó la colecta en bolsas de tela, para transportarlo al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se procedió a hacer la clasificación y el lavado de los frutos, para luego partir la cápsula leñosa protectora del fruto y exponer el interior, procediéndose a separar las semillas de la pulpa. A la pulpa (torta) se le pesó, obteniendo dos kilogramos netos los cuales se secaron en estufa a 40°C evitando así la pérdida de metabolitos secundarios termolábiles que se pierden a mayor temperatura, durante una semana invirtiendo la posición de la torta diariamente hasta el secado uniforme de la misma. Pasado este tiempo, se trituró la muestra y se pasó por Tamiz número 30 (0.59436 milímetros) a fin de uniformizar la granulometría; obteniendo un total de 400 gramos de muestra seca. Guardándose en envases cerrados herméticamente.

3.3.4 Familias químicas del extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. (Obj. Específico n-1)

El tamizaje fitoquímico se realizó con el objetivo de determinar los metabolitos secundarios presentes en la pulpa de *C. guianensis* Aubl., en dependencia de

sus características estructurales y solubilidad de cada uno de ellos, que permitieron su identificación en uno u otro solvente (agua, alcohol y n-hexano). Con la finalidad de extraer todos los metabolitos presentes en la muestra, se trabajó con solventes de polaridad creciente hasta agotar el material vegetal.

Estas pruebas fueron llevadas a cabo en el Laboratorio SL11LAB12: de Química de Recursos Naturales y Farmacognosia, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Se usó la metodología descrita por Chhabra y *et al.* en 1984⁽²⁴⁾ modificada, que se emplea en el laboratorio de Química de Recursos Naturales y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNAP (Anexo 03).

Se pesó 5 gramos de la pulpa seca y se maceró en 50 mL de n-hexano, después de un tiempo de maceración se filtró, para luego identificar los metabolitos secundarios presentes en este extracto, y así sucesivamente se trabajó con etanol y agua hasta agotar el marco. En los extractos obtenidos con los diferentes solventes se procedieron a identificar la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios, mediante diferentes ensayos que a continuación se detallan.

3.3.4.1 Ensayo de Dragendorff para alcaloide

A la fracción disuelta en 1 mL de solución de ácido clorhídrico al 1% en ausencia de solvente orgánico se mezcló con una gota del reactivo de

Dragendorff (preparado mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30 % con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua; dejando reposar por un periodo de 24 horas, posteriormente se decantó y aforó a 100 ml). Para la fracción acuosa, a la alícuota se le añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y se procedió de la misma forma. Los resultados se interpretaron de la siguiente forma: opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++) de color rojo ladrillo.

3.3.4.2 Prueba de espuma para saponinas

Permitió la identificación de saponinas tanto del tipo esteroidal como del tipo triterpénica. A una alícuota disuelta en alcohol, se diluyó 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 2 minutos. Al ensayo se le consideró positivo si presentaba espuma de 2mm de altura en la superficie del líquido y esta persistía por más de 2 minutos.

3.3.4.3 Ensayo de cloruro férrico para fenoles y taninos

La fracción disuelta en 1 mL de etanol se añadió 0,5 mL de solución de cloruro férrico al 5% en solución salina. Si presentaba un color o precipitado verde oscuro indicaba la presencia de fenoles y/o taninos. En la fracción acuosa se adicionó acetato de sodio previo al ensayo.

3.3.4.4 Ensayo de Liebermann-Buchard para terpenos y esteroides

A la fracción disuelta en 1 mL de anhídrido acético se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayo de 16x150 mm., se dejó correr 2 ó 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, sin agitar: Se observó un ensayo positivo por un cambio rápido de coloración. Para Terpenos se observó una formación de anillo rojizo en la interfaz de la reacción, considerándolo, como reacción positiva. Para esteroides se observó la formación de una coloración verdosa en la parte superior de la reacción, considerándolo, como reacción positiva.

3.3.4.5 Ensayo de Borntrager para quinonas

A la fracción disuelta en 1 mL de cloroformo se agitó con 1 mL de solución de hidróxido de amonio al 5% en agua. La fase acuosa alcalina (superior) se coloreó de rosado o rojo, considerando al ensayo positivo (naftaquinona y antraquinona).

3.3.4.6 Ensayo de Baljet para agrupamientos lactónicos

Permitió reconocer en el extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo: como las lactonas sesquiterpénicas, cardiotónicos, etc. Para la alícuota de la fracción acuosa, se evaporó el solvente en baño maría y se disolvió en alcohol hasta 1 mL. Posteriormente

se le adicionó 1 mL de reactivo, considerándolo positivo por la aparición o coloración de precipitado rojo respectivamente.

3.3.4.7 Ensayo de Sudán para aceites esenciales y grasas

En una alícuota de la fracción en el solvente de extracción se añadió 1 mL de una solución diluida en agua del colorante de Sudan III. Se calentó en baño maría hasta la evaporación del solvente. La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro indicó la presencia de aceites esenciales y grasas.

3.3.4.8 Ensayo de Fehling para compuestos reductores o azúcares reductores

El residuo se dividió en 1-2 mL de agua, para caso de las fracciones no acuosas, se adicionaron 2 mL del reactivo, se calentó la mezcla en baño maría durante 10 a 30 minutos. El ensayo se consideró positivo cuando la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.

3.3.4.9 Ensayo de Ninhidrina para aminas y aminoácidos

Se tomó una alícuota del extracto y estos se evaporan a sequedad para las fracciones, se mezclaron con 2 mL de solución al 0,2% de ninhidrina. La mezcla se calienta de 5 a 10 minutos en baño maría. Este ensayo se consideró positivo al observarse un color azul violáceo.

3.3.4.10 Ensayo de Shinoda para flavonoides

A 2 mL de la fracción acuosa o el residuo disuelto en 2 mL de agua se le adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedazo pequeño de cinta de magnesio metálico o zinc. Al terminarse esa reacción, se le añadió 1 mL de alcohol amílico y se agitó. El ensayo se consideró positivo al observarse que el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

3.3.4.11 Ensayo de Kedde para glucósidos cardiotónicos

Las fracciones se disuelven en 1 mL de alcohol etílico, se mezclaron con 1 mL de reactivo y se dejó reposar durante 5 a 10 minutos. El ensayo se consideró positivo al observarse una coloración violácea persistente.

3.3.5 Determinación de la susceptibilidad antibacteriana (Obj. Específico n-2)

3.3.5.1 Preparación del extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

Para realizar las pruebas biológicas se preparó el extracto etanólico, para lo cual se pesó 200 gramos de pulpa seca, para realizar la maceración en 2 Litros de etanol, durante 15 días en frasco color ámbar, agitándolo por inversión 2 veces al día. Pasado el tiempo de maceración, se procedió a filtrar, a fin de separar el marco (parte sólida) del extracto (parte líquida). Lo obtenido

de la filtración se secó y concentró en Rota-vapor y luego se pasó a la estufa para eliminar por calor seco el remanente del solvente. Obteniendo el extracto propiamente dicho. Lo obtenido en este proceso se almacenó en envases herméticos para evitar la contaminación, teniendo en cuenta todas las precauciones que dicta la norma

3.3.5.2 Susceptibilidad antibacteriana del extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. mediante el método de Kirby-Bauer

En el método de Kirby Bauer, los microorganismos de *K. pneumoniae* y *E.coli* donadas por el área de Laboratorio Clínico del Departamento de Apoyo al Diagnóstico de Hospital III EsSalud Iquitos fueron inoculados en la superficie de las placas de agar Müeller Hinton, sobre el cual se colocaron discos impregnados de 10 µL del extracto EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. viniendo a ser 13 tratamientos cada uno con concentraciones de 300 mg/mL, 250 mg/mL, 200 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL respectivamente. Las placas se incubaron por 12-24 horas a 35-37°C. A su vez, estos microorganismos fueron enfrentados como controles a una batería de antibióticos como: Acnalidíxico, Piperacilinatazobactam, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Imipenem, Ceftazidima, Ampicilina, Vancomicina, Amicacina y Gentamicina. Estos ensayos fueron repetidos por triplicado para cada tratamiento (concentraciones) como lo indica la norma tanto al ser enfrentado los microorganismos a los extractos como a los antibióticos de control. Durante la incubación, el extracto se difundió radialmente desde el disco a

través del agar, por lo que su concentración fue disminuyendo a medida que se alejaba del disco. En un punto determinado, la concentración del extracto en el medio fue incapaz de inhibir a las bacterias de estudio.

Para obtener resultados confiables y reproducibles mediante este método, se siguió las instrucciones del Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad Antimicrobiana por el método de disco difusión del Ministerio de Salud de Perú⁽²³⁾.

3.3.5.3 Selección de colonias

De la placa previamente sembrada con *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* donadas por el área de Laboratorio Clínico del Departamento de Apoyo al Diagnóstico de Hospital III EsSalud Iquitos se seleccionaron 3 a 5 colonias de las bacterias en estudio utilizando un hisopo estéril, teniendo el cuidado de solo tomar las colonias que hayan estado bien aisladas, lo cual nos permitió disminuir la posibilidad de error.

3.3.5.4 Preparación y estandarización de la suspensión del inóculo

Utilizamos el método de suspensión directa de colonias en suero fisiológico ya que este provee resultados precisos para estas dos bacterias, estandarizando nuestro tubo de ensayo de 16x150 mm al estándar de 0,5 de McFarland, lo que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Estas

suspensiones estandarizadas, fueron usadas como inóculo en los minutos subsiguientes habiendo tenido como un máximo de media hora.

3.3.5.5 Preparación de las placas con el medio agar Müller Hinton

El agar en polvo se disolvió en agua destilada acorde a las especificaciones del envase que lo contiene, el preparado se puso a esterilizar en autoclave horizontal de Laboratorio. Una vez esterilizado el Agar se procedió a agregarlo en las placas Petri hasta que cada placa contenga una profundidad de 4 milímetros cada una. Se dejó endurecer a temperatura ambiente.

3.3.5.6 Sembrado de las bacterias en las placas con medio agar Müller Hinton

Antes de inocular se agitó la suspensión del organismo asegurándonos que este bien mezclada. Luego se sumergió el hisopo de algodón estéril en la suspensión. Se removió el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra las paredes del tubo de ensayo de 16x150 mm. Empezando en la parte superior de la placa se comenzó con el sembrado al inocular la superficie con el hisopo. Cubriendo toda la placa de extremo a extremo de un borde a otro. Rotando la placa y teniéndola en ángulo y se repitió este procedimiento de sembrado alrededor de unas 3 a 4 veces, asegurándonos que el inóculo se hubo distribuido homogéneamente por toda la placa.

3.3.5.7 Preparación de los discos con el extracto EtOH de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

Para la preparación de los discos con el extracto, se procedió a con la selección de un papel filtro de filtrado ultra lento, posterior a ello, se procedió a hacer huecos en el papel filtro con un perforador previamente esterilizado, los discos obtenidos de las perforaciones se colocaron en una placa Petri que posteriormente se introdujo a la estufa esterilizadora por 20 minutos a una temperatura de 220°C. Culminado el proceso de esterilización de los discos, se procedió a agregar 10 µL de extracto EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. en cada disco para las siguientes concentraciones: 300 mg/mL, 250 mg/mL, 200 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL., siendo cada concentración un tratamiento que fue repetido por triplicado.

3.3.5.8 Aplicación de los discos con el extracto EtOH de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

Se colocaron los discos aproximadamente unos 15 a 20 minutos después de la inoculación de las bacterias en las placas. Fueron colocados 4 discos por placa hasta completar los 13 tratamientos por triplicado para cada bacteria. En las placas controles, adicionalmente se corrió con una batería de 10 antibióticos: acnadilíxico, piperacilinatazobactam, ceftriaxona, ciprofloxacino, amipenem, ceftazidima, ampicilina, vancomicina, amicacina y gentamicina; siendo repetido 3 veces. Ver Tabla 04.

3.3.5.9 Incubación de las placas de agar

Después de la aplicación de los discos, las placas fueron colocadas de forma invertida en la incubadora para su incubación. La temperatura de la incubadora fue de 35°C.

3.3.5.10 Medidas de zonas de inhibición

La lectura de la placa petri se realizó mediante la determinación del diámetro del halo de inhibición (incluyendo el diámetro del disco). Se colocó la placa sobre una superficie negra pero bien iluminada, con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo. Posteriormente se procedió a medir el diámetro de inhibición con una regla milimétrica al milímetro más cercano.

3.3.5.11 Determinación de la CMI del extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. mediante macrodilución en caldo

Se determinó la menor concentración del extracto etanólico de pulpa de *C. guianensis* Aubl. que fue capaz de matar las cepas bacterianas en estudio. Para calcular se emplearon procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo con distintas diluciones del extracto. Partiendo de los mismos métodos utilizados para obtener la CMI por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. Donde lo que se pretendió fue comprobar en los tubos Eppendorf de 2 mL, qué concentración de antimicrobianos ha matado, no sólo inhibido, el aislado bacteriano estudiado.

3.3.5.12 Preparación del medio tripticasa de soya

El medio tripticasa de soya se pesó acorde a las especificaciones de su envase y se disolvió en agua destilada; luego se llevó a la autoclave a esterilizar a una temperatura de 121°C y a una presión de 15 atm durante 15 minutos. Previamente se esterilizaron las placas y tubos de ensayo de 16x150 mm en la estufa a 220°C durante 20 minutos⁽²³⁾, dejándolos enfriar y retirando el papel reciclado en la cual estaban envueltas las placas y tubos de ensayo de 16x150 mm para proceder a plaquear con agar tripticasa de soya, luego se guardó en refrigeración para su posterior uso.

3.3.5.13 Conservación de las bacterias

Para este proceso las cepas que estaban conservadas a 5°C, se atemperaron al medio ambiente y luego en un tubo de ensayo de 16x150 mm con el medio agar tripticasa de soya se sembró una pequeña cantidad de colonias. El sembrado se realizó durante 3 días consecutivos con la finalidad de obtener colonias jóvenes.

3.3.5.14 Preparación del caldo Mueller Hinton

El caldo Mueller Hinton se pesó acorde a las especificaciones del envase y se disolvió en agua destilada; luego fue llevado a la autoclave a una temperatura de 121°C y a 15 atm de presión durante 15 minutos. Se dejó enfriar y luego se depositó 1 mL en 9 tubos Eppendorf de 2mL para la muestra vegetal y control positivo, y en 1 tubo Eppendorf de 2mL para el control negativo. Realizando estos ensayos por triplicado

3.3.5.15 Preparación del inóculo bacteriano

La preparación para el inóculo bacteriano se realizó de la siguiente forma:

A dos matraces conteniendo 35 mL de caldo Müller Hinton cada uno, de las placas sembradas con bacterias jóvenes, utilizando el asa bacteriológica se tomaron tres a cinco colonias aisladas para depositarlas en cada matraz junto al mechero, se agitaron hasta obtener la turbidez equivalente al tubo de ensayo de 16x150 mm de 0,5 de la escala de McFarland.

La suspensión del inóculo preparado contiene aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Esta preparación del inóculo bacteriano estandarizado se hizo en un tiempo de 15 minutos para evitar que el número de bacterias aumente por duplicación.

3.3.5.16 Preparación de la muestra vegetal

Se pesó 300 mg del EtOH de Pulpa de fruto de *C. guianensis* Aubl. en viales tipo Eppendorf estériles al cual se diluyó en 1 mL de Dimetilsulfoxido o DMSO para alcanzar una solución de prueba de 300 mg/mL o solución madre.

3.3.5.17 Preparación del control

El control positivo que se empleó en esta prueba fue la Gentamicina (160 mg/2 mL), del cual se utilizó 0.64 mL que se colocó en un tubo de ensayo estéril de 16x150 mm y se le agregó agua destilada diluyéndolo hasta 5 mL, para obtener así la solución Madre de 10,24 mg/mL.

3.3.5.18 Sembrado de la muestra por el método de macrodilución

De la solución madre de la muestra vegetal se tomó 0,1 mL que se añadió al tubo Eppendorf de 2 mL N° 01 que contenía 0,9 mL de caldo Müeller Hinton. Del tubo Eppendorf de 2 mL N° 01 se tomó 0,5 mL para ser pasado al tubo Eppendorf de 2 mL N° 02; y así sucesivamente hasta llegar al tubo Eppendorf de 2 mL N° 09. Del tubo Eppendorf de 2 mL N° 09 se tomó 0,5 mL el cual se

desechó. Culminado esto se procedió a añadir a todos los tubos Eppendorf de 2 mL, 0,5 mL de la suspensión bacteriana. Para que el volumen final mínimo, en cada tubo Eppendorf de 2 mL, sea de 1 mL. Las concentraciones o tratamientos de la muestra vegetal estuvieron comprendidas en el rango de 300 mg/mL y 0.5 mg/mL.

3.3.5.19 Sembrado del control por el método de macrodilución

De la solución Madre se tomó 0,1 mL el cual fue añadido al tubo Eppendorf de 2 mL N° 1 que contiene 0,9 mL de caldo Mueller Hinton. Del tubo Eppendorf de 2 mL N° 1 se tomó 0,5 mL y se le añadió al tubo Eppendorf de 2 mL N° 2; y así sucesivamente hasta llegar al tubo Eppendorf de 2 mL N° 9. Del tubo Eppendorf de 2 mL N° 9 se tomó 0,5 mL que fue desechado. Al culminar esto se añadió a todos los tubos Eppendorf de 2 mL, 0,5 mL de la suspensión bacteriana para que el volumen final mínimo por tubo Eppendorf de 2 mL haya sido de 1 mL. Las concentraciones estuvieron comprendidas en el rango de 1,024 mg/mL a 0,004 mg/mL.

3.3.5.20 Lectura e interpretación de la Concentración Inhibitoria Mínima o CMI

La CMI corresponde a la mínima concentración del antibiótico (gentamicina) en la que no debe observarse turbidez, por consiguiente, se dice que no hay crecimiento bacteriano. La CMI se expresa en mg/mL.

Inactivo: > 16 mg/mL, Poco Activo: 6 - 15 mg/mL, Moderado activo: 1-5 mg/mL, Buena Actividad: < 1 mg/mL⁽²⁵⁾.

3.4 Procesamiento y análisis de datos

- a) Los resultados obtenidos de los diferentes ensayos fueron expresados en términos estadísticos, según el grupo de estudio.
- b) Se calculó la media y la desviación estándar, los cuales serán presentados a través de tablas.
- c) Los datos se procesarán a través de un análisis de varianza de doble vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$, las cuales serán sometidas a una prueba post hoc para verificación de los valores del ANOVA de dos vías
- d) Para el análisis de resultados se empleó el programa estadístico STATA15 con licencia válida 2019-2020.

3.5 Aspectos éticos

Los aspectos éticos ambientales fueron llevados a cabo acorde al protocolo estandarizado para eliminación de residuos biológicos establecidos en los Procedimientos Operacionales Estandarizados: normas de bioseguridad del Laboratorio de Química de Recurso Naturales y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Extracto etanólico (EtOH) y Tamizaje fitoquímico del EtOH de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

El extracto EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. obtenido es de consistencia oleosa, olor a chocolate intenso y color marrón oscuro; debido a las características de los componentes presentes en el fruto.

Al extracto obtenido, se le hizo una determinación de metabolitos acorde a sus características estructurales y solubilidad de sus componentes lo que permitió su identificación en uno u otro solvente al que llamaremos fracción.

En la fracción hexánica del extracto se obtuvo presencia de abundantes esteroides, aceites esenciales y grasas. En la fracción etanólica del extracto se obtuvo abundante presencia de fenoles y taninos, agrupamientos lactónicos y compuestos reductores; mientras que hubo poca presencia de esteroides. En la fracción acuosa solo se encontró poca presencia tanto de Saponinas como de compuestos reductores.

Tabla 02. Metabolitos presentes en las fracciones del tamizaje fitoquímico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. La escala de cruces fue realizada acorde a lo indicado en el trabajo Phytochemical screening of Tanzanian Medicinal Plants⁽²⁴⁾

Tamizaje fitoquímico			
Metabolitos secundarios	Pulpa del fruto		
	n-Hexano	Etanólico	Acuoso
Alcaloides	-	-	-
Saponinas		-	+
Fenoles y taninos		+++	-
Esteroides	+++	+	
Triterpenos	-		
Quinonas	-	-	
Agrupamientos lactónicos	-	+++	
Aceites esenciales y grasas	+++		
Compuestos reductores		+++	+
Aminas		-	
Flavonoides		-	-
Glucósidos cardiotónicos		-	

Fuente: Elaborado por el autor.

4.2 Prueba de sensibilidad del extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

4.2.1 Datos de la prueba de sensibilidad del Extracto etanólico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

Tabla 03. Actividad antibacteriana del extracto EtOH de la pulpa de *C. guianensis* Aubl. frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, según diámetro de inhibición durante 24 horas.

Actividad antibacteriana de <i>Couroupita guianensis</i> Aubl.			
		Bacterias en estudio	
		Diámetro de zona de inhibición (mm)	
Concentración (mg/mL)		X ± SD	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
C1	300 mg/mL	11.67 ± 0.6	7.00 ± 0.6
C2	250 mg/mL	9.67 ± 0.6	7.00 ± 0.6
C3	200 mg/mL	9.83 ± 0.6	2.67 ± 0.6
C4	150 mg/mL	10.00 ± 0.6	4.33 ± 0.6
C5	100 mg/mL	9.67 ± 0.6	2.00 ± 0.6
C6	50 mg/mL	8.67 ± 0.6	3.33 ± 0.6
C7	25 mg/mL	9.33 ± 0.6	4.67 ± 0.6
C8	20 mg/mL	8.67 ± 0.6	7.00 ± 0.6
C9	15 mg/mL	7.67 ± 0.6	3.00 ± 0.6

C10	10 mg/mL	7.00 ± 0.6	2.00 ± 0.6
C11	5 mg/mL	7.67 ± 0.6	0.00 ± 0.6
C12	1 mg/mL	6.67 ± 0.6	2.00 ± 0.6
C13	0.5 mg/mL	7.00 ± 0.6	1.87 ± 0.6

Fuente: Elaborado por el autor.

Según la Tabla 03, el extracto etanolico de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl presentó a mayor concentración una inhibición de 11.67 ± 0.6 mm frente a *K. pneumoniae*, mientras que a menor concentración su actividad antibacteriana fue del 7.00 ± 0.6 mm. Las concentraciones del extracto enfrentado a *E. coli* presentó un rango máximo de halo de inhibición no mayor del 7.00 ± 0.6 mm, mientras que a menor concentración de la misma, fue de 1.87 ± 0.6 mm. Este patrón nos indica que a medida que la concentración del extracto EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. disminuye, su actividad antibacteriana también lo hace constantemente.

Tabla 04. Actividad antibacteriana de antibióticos conocidos frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, según diámetro de inhibición.

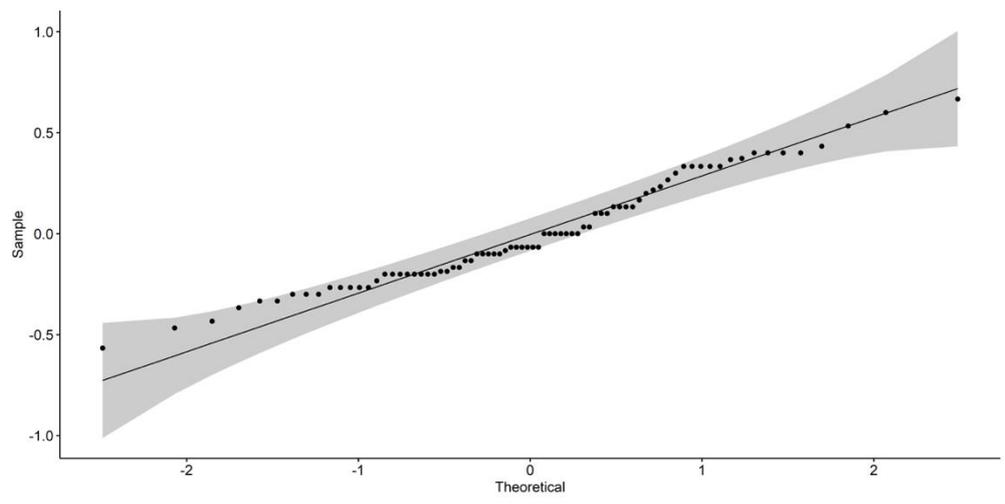
Bacterias		
Diámetro de zona de inhibición (mm)		
Antibióticos	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Acanilíxico	29 mm	15 mm
Piperacilinatazobactam	29 mm	09 mm
Ceftriaxona	34 mm	11 mm

Ciprofloxacino	43 mm	26 mm
Imipenem	30 mm	23 mm
Ceftazidima	15 mm	0 mm
Ampicilina	30 mm	0 mm
Vancomicina	15 mm	0 mm
Amicacina	33 mm	28 mm
Gentamicina	14 mm	07 mm

Fuente: Elaborado por el autor

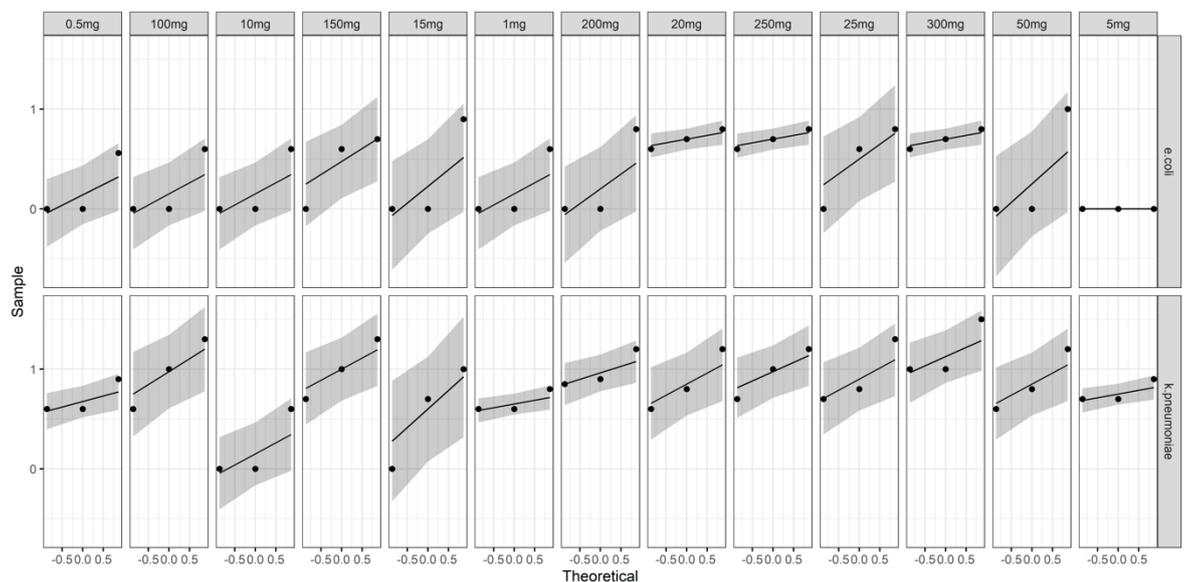
4.2.2 Análisis Estadístico de las pruebas de sensibilidad del extracto etanólico de la pulpa de *Couropita guianensis* Aubl

Figura 1: Analisis de Normalidad por Shapiro Test del diametro de Zona de Inhibición bacteriana del Extracto etanólico de pulpa de *Couropita guianensis* Aubl.



En la Figura 1 El pvalor es igual a 0.0401 ($p < 0.05$) por lo que no existe normalidad en los datos y es observado de manera diferente en la imagen mediante el Shapiro Test, tienden a la linea central en la gráfica.

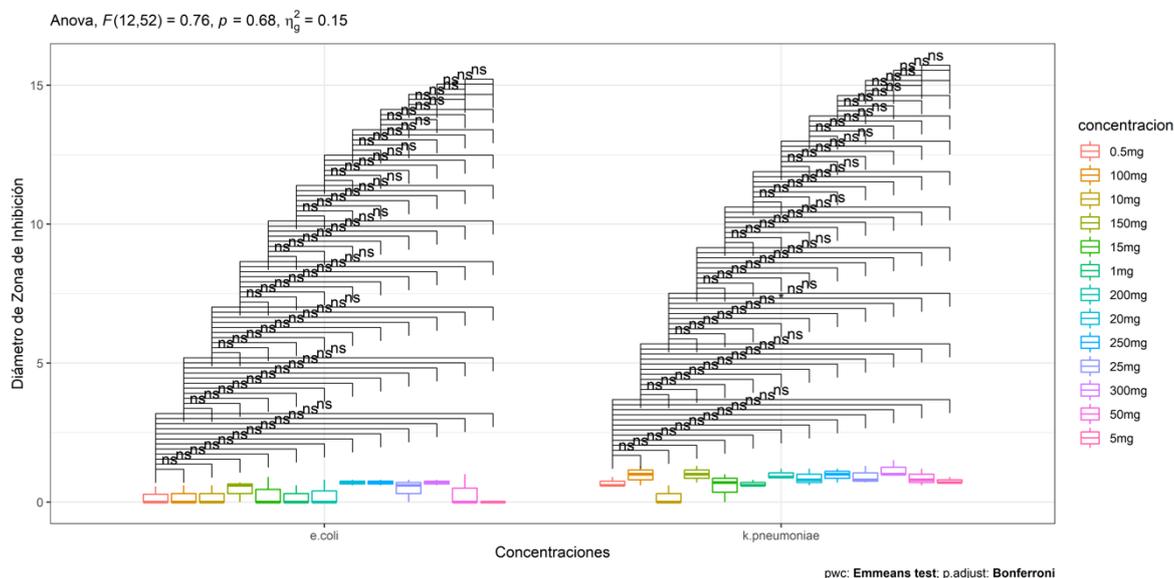
Figura 2: Analisis de Normalidad por Shapiro Test entre la interacción de las bacterias y las concentraciones del Extracto etanólico de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.



En la Figura 2 no se observa normalidad entre todas las interacciones de las bacterias y las concentraciones del extracto etanolico de frutos de *C. guianensis*

Adicionalmente el análisis de homogeneidad de varianza muestra que la interacción de las variables bacterias/concentración cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianzas al tener un pvalor = 1.00 ($p > 0.05$).

Figura 3: Anova de doble via del diametro de Zona de Inhibicion bacteriana del Extracto etanólico de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.



En la Figura 3 se observan las comparaciones múltiples entre las concentraciones de cada especie, en las cuales se observa que la mayoría de comparaciones son **no significativas (ns)** y se observa el pvalor = 0.76.

De acuerdo al resultado obtenido en el ANOVA, ver Anexo 5, existe diferencias entre los diámetros de inhibición y las especies (*E. coli* y *K. pneumoniae*) (pvalor = $8.50e-08$). En el caso de las concentraciones, sí existe diferencias con los diámetros de inhibición sobre las especies (pvalor = $1.50e-02$). En la interacción especie:concentración, según el ANOVA, demuestra que no hay una diferencia significativa (pvalor = $6.85e-01$).

De acuerdo al análisis post hoc realizados para verificar los valores del ANOVA, se observa que la interacción *E. coli*:concentracion no existe significancia (pvalor = 0.319), lo mismo en la interacción *K. pneumoniae*:concentracion no existe significancia (pvalor = 0.055). Entonces

esto responde al por qué la interacción de especie:concentracion no presenta diferencia significativa al tener un pvalor = 6.85e-01.

4.3 CMI del extracto etanólico de pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.

Tabla 05. CMI del extracto EtOH de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl. frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Bacteria	N° dilución	CMI	Resultado (*)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C3	8 mg/mL	POCO ACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	C2	16 mg/mL	POCO ACTIVO

* Actividad antimicrobiana/Valor de CMI.

Fuente: Elaborado por el autor

Referente a la Tabla 05, se observó que el extracto EtOH de la pulpa de *C. guianensis* Aubl. frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* es poco activo ya que logró inhibir el crecimiento bacteriano en una concentración de 8mg/mL y 16 mg/mL respectivamente.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. “ayahuma”.

Acorde a los resultados obtenidos, se observa que nuestro extracto EtOH tuvo una mejor actividad antibacteriana frente a *K. pneumoniae* presentando un halo de inhibición de 11.33 mm y una CMI de 8 mg/mL; resultados similares se reporta en el trabajo de Machado, donde logró una elevada actividad antibacteriana para el extracto EtOH de flores de *C. guianensis* Aubl. llegando a aislar del mismo el Thyptanthrin⁽¹⁰⁾. Otro estudio evaluó el potencial antibacteriano de la molécula sintética obtenida a partir de nanopartículas de plata utilizando al *C. guianensis* Aubl., obteniendo metabolitos con una fuerte actividad antibacteriana enfrentadas a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Describiendo así el potencial biomédico sinérgico de estos compuestos a partir de la formulación de nuevos componentes mediante síntesis verde⁽⁶⁾.

Un trabajo similar con *Couroupita guianensis* Aubl, evaluó los usos terapéuticos de esta especie en la India, donde reportó usos terapéuticos como cicatrizante y antibacteriano. Chandolu en su trabajo, encontró que *E. coli* presentaba una CIM de 7 mg/mL⁽⁶⁾ mientras que en el presente estudio la CIM encontrada para esta bacteria fue de 16 mg/mL. Esta diferencia encontrada puede deberse no solo al tipo de órgano estudiado (parte de la planta empleada), sino al tipo de extracción y solvente empleado para la misma; por lo que para mejorar su efecto muchas veces se sugiere un juego

en los mecanismos de extracción y combinación de solventes acorde a los objetivos del estudio.

El grupo de científicos que evaluaron la actividad antibacteriana del extracto EtOH de flores y sus fracciones de *C. guianensis* Aubl. y su componente bioactivo aislado, a los cuales enfrentaron a cultivos de levaduras, hongos filamentosos y bacterias. De entre las fracciones más activas del extracto, obtuvieron que la fracción DCM presentó una mayor actividad específicamente contra *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) con una CIM de 156 µg/mL⁽¹⁰⁾; adicionalmente en otro estudio con *Couroupita guianensis* Aubl se encontró una marcada actividad antibacteriana frente a *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *E. coli*, en la cual para el extracto de frutos trabajado tuvo un promedio de inhibición de 15.33 mm⁽⁸⁾.

La actividad antibacteriana del extracto EtOH de pulpa de frutos de *C. guianensis* Aubl. frente a *K. pneumoniae* y *E. coli* podría atribuirse a los compuestos fenólicos, taninos, esteroides, agrupamientos lactónicos, aceites esenciales y saponinas encontrados en el tamizaje fitoquímico realizado; los compuestos reductores hallados, sugieren que este fruto ayuda a estabilizar y reducir muchos componentes, por las propiedades descritas de la misma en la literatura, cuando se realiza síntesis verde utilizando la fruta, lo que concuerda justamente con un trabajo de investigación realizado en la India en donde encontraron que los fitoquímicos esenciales presentes en su extracto tales como terpenos, flavonoides, cetonas, aldehidos, aminas y ácidos carboxílicos fueron los responsables de la reducción y estabilización de la

molécula de nanopartículas denominada Nanopartícula de Magnetita a partir de *Couroupita guianensis* Aubl o CGFe₃O₄NPs, la cual presentó excelentes actividades antibacterianas, especialmente en bacterias Gram-negativas a diferencia de las bacterias Gram-positivas que tuvieron menor actividad antibacteriana. ⁽⁷⁾

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extrato EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. fueron azúcares reductores, compuestos fenólicos y taninos, esteroides, agrupamientos lactónicos, aceites esenciales y grasas, siendo todos estos encontrados en mayor cantidad; mientras que las saponinas que también estuvieron presentes en el extracto, se encontraron en menor cantidad que sus predecesores mencionados. Lo importante de los compuestos encontrados viene a ser que por generalización quimiotaxonómica estos compuestos pueden actuar de manera indistinta o conjunta para exhibir las actividades descritas.
2. El extracto EtOH de pulpa de *C. guianensis* Aubl. mostró actividad antibacteriana frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Siendo *Klebsiella pneumoniae* quién presentó un mayor halo de inhibición a una concentración de 300 mg/mL y la medición de este halo fue de 11.67 ± 0.6 mm; a su vez una CIM de 8 mg/mL indicando que el extracto viene a ser poco activo.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Los compuestos reductores o azúcares reductores presentes en grandes cantidades en este estudio indican que es un excelente extracto del cual se sugiere como punto de partida para la síntesis de nuevos compuestos a través de la nanotecnología, pues son estos quienes ayudan a estabilizar los nuevos compuestos sintetizados.

Basándonos en los resultados obtenidos en el presente estudio, en los estudios posteriores se sugiere no solo trabajar el extracto en bruto, sino que también se sugiere ir trabajando la actividad de los compuestos aisladamente.

De los resultados de este estudio exploratorio, se recomienda generar un nuevo protocolo más certero para lograr obtener datos relevantes con una amplia solidez estadística a partir de la concentración biológicamente activa encontrada en el presente estudio.

CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Maguiña C, Ugarte C, Montiel M. Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Med Per.* 2006;23(1):15–23.
2. Villar M, Villavicencio O. *Manual de Fitoterapia.* Organización Panamericana de la Salud. 2001;
3. Sharapin N. Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos Resumen [Internet]. Vol. 1, *Revista de Fitoterapia.* 2000. Available from: www.fitoterapia.net
4. Roumy V, Gutierrez-Choquevilca A-L, Lopez Mesia J, Ruiz L, Ruiz Macedo J, Abedini A, et al. In vitro antimicrobial activity of traditional plant used in mestizo shamanism from the Peruvian amazon in case of infectious diseases. *Pharmacognosy Magazine.* 2015;11(44):625.
5. Manjumeena R, Elakkiya T, Duraibabu D, Feroze Ahamed A, Kalaichelvan PT, Venkatesan R. “Green” biocompatible organic-inorganic hybrid electrospun nanofibers for potential biomedical applications. *Journal of Biomaterials Applications.* 2015 Feb 17;29(7):1039–55.
6. Rajesh Kumar TV, Murthy JSR, Narayana Rao M, Bhargava Y. Evaluation of silver nanoparticles synthetic potential of *Couroupita guianensis* Aubl., flower buds extract and their synergistic antibacterial activity. *3 Biotech.* 2016 Dec 1;6(1).
7. Sathishkumar G, Logeshwaran V, Sarathbabu S, Jha PK, Jeyaraj M, Rajkuberan C, et al. Green synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles using *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract for their antibacterial and

- cytotoxicity activities. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2018 Apr 3;46(3):589–98.
8. Al-Dhabi NA, Balachandran C, Raj MK, Duraipandiyar V, Muthukumar C, Ignacimuthu S, et al. Antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm properties of *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012 Dec 4;12.
 9. Bergman J, Lindstrom J-O, Tilstam U. The structure and properties of some Indolic Constituents in *Couroupita guianensis* Aubl. 1985.
 10. Costa DCM, Azevedo MMB de, Silva DO e., Romanos MTV, Souto-Padrón TCBS, Alviano CS, et al. In vitro anti-MRSA activity of *Couroupita guianensis* extract and its component Tryptanthrin. *Natural Product Research*. 2017;31(17):2077–80.
 11. Kumar CS, Naresh G, Sudheer V, Veldi N, Elumalai A. A Short Review On Therapeutic Uses Of *Couroupita Guianensis* Aubl [Internet]. Vol. 1, *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* Available online at www.irjpas.com *Int. Res J Pharm. App Sci*. 2011. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/225034226>
 12. Sumathi S, Anuradha R. *Couroupita guianensis* Aubl An update review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017;3(1):1–8.
 13. Ma Y, Wu X, Li S, Tang L, Chen M, An Q. Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Research in Microbiology*. 2021 Sep;172(6):103851.
 14. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica*. 2014.

15. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. Vol. 43, FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press; 2019. p. 123–44.
16. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2016 Sep;80(3):629–61.
17. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Ilio C di. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. International Journal of Environmental Research and Public Health 2013, Vol 10, Pages 6235-6254 [Internet]. 2013 Nov 25 [cited 2021 Oct 24];10(12):6235–54. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/10/12/6235/htm>
18. Welch RA. The Genus *Escherichia*. The Prokaryotes [Internet]. 2006 [cited 2021 Oct 24];60–71. Available from: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30746-X_3
19. Carrión A, García C. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. Cuenca; 2010.
20. Teijaro CN, Adhikari A, Shen B. Challenges and Opportunities for Natural Product Discovery, Production, and Engineering in Native Producers versus Heterologous Hosts. Journal of industrial microbiology & biotechnology [Internet]. 2019 Mar 29 [cited 2021 Oct 24];46(3–4):433. Available from: /labs/pmc/articles/PMC6405299/
21. Gutiérrez Á, Estévez A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp). 2009;103(2):409–19.

22. Hounsome N, Hounsome B, Tomos D, Edwards-Jones G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*. 2008 May;73(4).
23. Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 2002. p. 68 p.
24. Chhabra SC, Uiso FC, Mshiu EN. Phytochemical screening of Tanzanian Medicinal Plants. I. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984;11:157–79.
25. Lagos D, Quinto R. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (Mullaca) en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, In vitro [Internet]. [Lima]; 2018 [cited 2021 Oct 25]. Available from: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/3074/008599_Tesis%20LAGOS%20TALAVERANO%20DANIEL-%20QUINTO%20ANCIETA%20ROCIO.pdf?sequence=3&isAllowed=y

ANEXOS

Anexo 01. Vista aérea del lugar de colecta



Anexo 02. Certificación taxonómica de *Couropita guianensis* Aubl.



Centro de Investigación de
Recursos Naturales
Herbarium Amazonense – AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA N° 026-2018-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

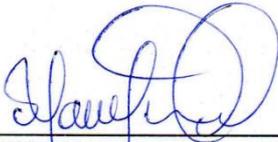
HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, fue colectada con fines de investigación científica como parte del proyecto "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS DE HOJAS Y FRUTOS DE *Couropita guianensis* Aubl. "ayahuma", y ha sido DETERMINADA en este centro de investigación y enseñanza Herbarium Amazonense-AMAZ - CIRNA-UNAP, como se indica a continuación:

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMÚN	N° de colecta J. Ruiz <i>et al</i>
1	LECYTHIDACEAE	<i>Couropita guianensis</i> Aubl.	"ayahuma"	22052

A los diecinueve días del mes de noviembre del año 2018 se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estimen conveniente.

Atentamente,


Blgo. Richard J. Huaranca Acostupa M.Sc.
Coordinador del Herbarium AMAZ
CIRNA – UNAP



Anexo 03. Método de Chhabra et al. para el tamizaje fitoquímico(24)

Tipos de compuestos	Grupo fitoquímico		Reactivos	Procedimientos	Resultados
Compuestos fenólicos	Flavonoides (Metodo de Shinoda)	Flavonas	HCl "c" y Cinta de Mg	A 1 mL de extracto etanólico se le adiciona 2 o 3 gotas de HCl "c" y un fragmento de cinta de Mg	Color naranja (Rx +)
		Flavonas	HCl "c" y Cinta de Mg		Color rojo (Rx +)
		Flavonoles	HCl "c" y Cinta de Mg		Color rojo azulado (Rx +)
		Xantonas	HCl "c" y Cinta de Mg		Color violeta (Rx +)
	Taninos	Pirogállicos	HCl "c" y Formaldehído	1 mL de extracto etanólico se le añade unas gotas de HCl "c" y 1 mL de formaldehído, hervir durante varios minutos	Presencia de una precipitado (Rx +)
		Catéquicos	FeCl ₃ al 1%	La solución se filtra y se añade FeCl ₃ al 1%	Formacion de un color azul (Rx +)
Terpenos y esteroides	Triterpenos (Reaccion de Liebermann - Buchard)		Anhídrido acético, H ₂ SO ₄ "C"	A 1 mL de extracto acuoso, se le añade 1 mL de anhídrido acético y 0,5 mL de H ₂ SO ₄ "c", dejándolo caer por la pared del tubo de ensayo de 16x150 mm	Formación de un anillo rojizo en la interface (RX +)
	Esteroles (Reaccion de Lieberman - Buchard)		Anhídrido acético, H ₂ SO ₄ "C"	A 1 mL de extracto acuoso, se le añade 1 mL de anhídrido acético y 0,5 mL de H ₂ SO ₄ "c", dejándolo caer por la pared del tubo de ensayo de 16x150 mm	Formación de una coloración verdosa en la parte superior (Rx +)

	Saponinas	Agua	Preparar una solución al 10% de extracto en agua hirviendo, agitar por 1 minuto cuando esté fría	La aparición y persistencia de 1 cm de espuma en 30 minutos (Rx +)
Alcaloides	Alcaloides/Micro-extracción	H ₂ SO ₄ [0.5N], amoníaco al 25%, CH ₂ Cl ₂ , Reactivo de Dragendorff	A 1 mL de extracto etanólico se le añade 1 mL de H ₂ SO ₄ [0.5N], agitar y basificar con amoníaco al 25%, medir el pH (>9) y extraer con diclorometano (CH ₂ Cl ₂), luego con un capilar sembrar la muestra en una placa de cromatografía de capa fina (TLC) y revelar con Dragendorff	La formación de una coloración anaranjada (Rx +)
Lactonas	Lactonas	Ácido Pírico, NaOH	A 1 mL de extracto etanólico se añade 1 mL de ácido pírico al 1% en etanol y 1 mL de NaOH al 10% en agua	Un color o precipitado rojo-naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos (Rx +)

Anexo 04: Foto del extracto EtOH de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl.



Fuente: Tomada por el autor.

Anexo 05: Prueba de ANOVA de dos vias

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)	
Extracto	1	4.454	4.454	44.185	1.81E-08	***
Concentracion	12	4.623	0.385	3.821	0.000348	***
Extracto:concentracion	12	1.937	0.161	1.601	0.120433	
Residuals	52	5.242	0.101			
Signif. Codes:	0 "****"	0.001 "***"	0.01 "**"	0.05 "."	0.1 " "	1