

**“AÑO DEL DIALOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL”**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**TESIS**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE COMBINACIONES  
VEGETALES DE *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L* Y *Lupinus mutabilis*  
*Sweet* FRENTE A *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* Y *Staphylococcus aureus*,  
IMET – ESSALUD IQUITOS –2016”**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. FLORES BARATA, LOURDES EUGENIA MILAGRITOS**

**Bach. VÁSQUEZ GATICA, LLAJHAIRA ELIZABETH**

**ASESOR:**

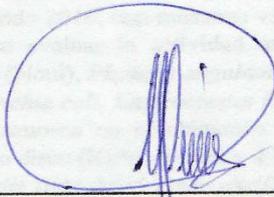
**Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG**

**IQUITOS - PERÚ**

**2018**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE COMBINACIONES  
VEGETALES DE *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L* Y *Lupinus mutabilis*  
*Sweet* FRENTE A *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* Y *Staphylococcus aureus*,  
IMET – ESSALUD IQUITOS –2016”**

**PAGINA DE APROBACIÓN**



***Dra. Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui***

**PRESIDENTE**



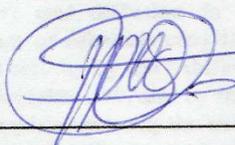
***M.c Charles Ocampo Falcón***

**MIEMBRO**



***Ing. Cleto Jara Herrera***

**MIEMBRO**



***Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong***

**ASESOR**



**UNAP**

Facultad de  
Farmacia y Bioquímica

*"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"*

Dirección: carretera Zungarococha – Nina Rumí, San Juan Bautista – Maynas – Loreto – Perú

www.unapikitos.edu.pe

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 17 días del mes de Febrero del dos mil dieciocho, siendo las 12 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 048-FFB-UNAP-2016, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Ing. REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS, Dra.      **PRESIDENTA**
- Ing. CLETO JARA HERRERA, Mgr.                      **MIEMBRO**
- Méd. Ciruj. CHARLES OCAMPO FALCÓN              **MIEMBRO**



Se constituyeron en el Auditorio de la Oficina General de Bienestar Universitario-UNAP, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada :**"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In vitro DE COMBINACIONES VEGETALES DE Morinda citrifolia L, physalis angulata L Y Lupinus mutabilis sweet FRENTE A escherichia coli, Enterococcus faecalis Y Staphylococcus aureus, IMET- ESSALUD 2016"**, presentado por las Bachilleres LOURDES EUGENIA MILAGRITOS FLORES BARATA y LLAJHAIRA ELIZABETH VÁSQUEZ GATICA, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

Adecuadamente

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido Aprobada por unanimidad
- 2.- Observaciones Ninguna



Siendo las 13:30 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándose a los sustentantes por su .....

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

.....  
**Ing. CLETO JARA HERRERA, Mgr.**  
**MIEMBRO**

.....  
**Méd. Ciruj. CHARLES OCAMPO FALCÓN.**  
**MIEMBRO**

Dirección: carretera Zungarococha – Nina Rumí, San Juan Bautista – Maynas – Loreto – Perú

www.unapikitos.edu.pe

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE COMBINACIONES  
VEGETALES DE *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L* Y *Lupinus  
mutabilis sweet* FRENTE A *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* Y  
*Staphylococcus aureus*, IMET – ESSALUD – 2016”**

**Flores Barata, L.E.M<sup>1</sup> ; Vásquez Gatica, L.E<sup>2</sup>**

**1: Bachiller en Farmacia y Bioquímica, 2: Bachiller en Farmacia y Bioquímica; FFBO-  
UNAP-IQUITOS**

---

**RESUMEN**

El objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de las combinaciones vegetales de *Morinda citrifolia L* (noni), *Physalis angulata L* (bolsa mullaca) y *Lupinus mutabilis sweet* (tarwi o chocho) frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) y dilución en caldo (macrodilución) frente a cepas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*; se evaluó dos combinaciones: a) Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L* mas jugo del fruto de *Physalis angulata L*, b) Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis Sweet*(semilla).

Ambas combinaciones no mostraron actividad antibacteriana por ninguno de los métodos “difusión en disco” y “dilución en caldo” frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* *Escherichia coli*. A ser expuestas a las diferentes concentraciones de 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg/mL. Se concluye que las combinaciones de extractos acuosos no presentan actividad antibacteriana.

**Palabras claves:** *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L*, *Lupinus mutabilis sweet*, difusión en disco, dilución en caldo.

**“ *In vitro* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE VEGETABLE  
COMBINATIONS OF *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L* AND  
*Lupinus mutabilis sweet* AGAINST AND *Escherichia coli*, *Enterococcus  
faecalis* AND *Staphylococcus aureus*, IMET – ESSALUD IQUITOS –2016”**

**Flores Barata, L.E.M<sup>1</sup> ; Vásquez Gatica, L.E<sup>2</sup>**

**1: Degree in Pharmacy and Biochemistry, 2: Degree in Pharmacy and Biochemistry;  
FFBQ-UNAP-IQUITOS**

---

**ABSTRACT**

The objective was evaluate the *in vitro* antibacterial activity of the vegetable combinations of *Morinda citrifolia L* (noni), *Physalis angulata L* (mullaca pouch) and *Lupinus mutabilis sweet* (tarwi or chocho) against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The antibacterial activity was determined by the disk diffusion method (Kirby-Bauer) and dilution in broth (macrodilution) against strains *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*; Two combinations were evaluated: a) Extraction of the fruit of *Morinda citrifolia L* + juice of the fruit of *Physalis angulata L*, b) Aqueous extract of *Physalis angulata L* (whole plant) + *Lupinus mutabilis Sweet* (seed).

Both combinations showed no antibacterial activity by any of the methods "disk diffusion" and "dilution in broth" against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* *Escherichia coli*. To be exposed to different concentrations of 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 mg / mL. It is concluded that the combinations of aqueous extracts do not exhibit antibacterial activity.

**Key words:** *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L*, *Lupinus mutabilis sweet*, diffusion in disc, diffusion in broth.

## **DEDICATORIA**

La presente dedico principalmente a mi DIOS todo poderoso por darme la vida, la sabiduría y permitir seguir adelante con mis objetivos; a mis padres JOSE FLORES y GLADYS BARATA por el apoyo económico, moral y sobre todo el amor, cariño y fortaleza que a diario vinieron haciendo a pesar de la distancia que se encontraron en la etapa de mi formación profesional, así mismo a mis hermanos: FREDDY, GLADYZ, JOSE, FIORELLA y JOHANNA por la guía y ejemplo para formarme como profesional y humano con valores y principios, también dedico a mis bellas mujeres pensantes: ELIZABETH, ASTRID, MAYTHE, ADRIANA y LUCY, que durante los 6 años de nuestra hermosa carrera profesional demostraron sus cariño y sus buenos deseos de superación.

*“Milagritos Flores Barata”*

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi madre Elizabeth Gatica del Águila, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaste, sin importar nuestras diferencias de opiniones. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti. A mi padre que me ha apoyado siempre hasta que el señor lo llevó a su gloria, gracias por tanto Papá.

Finalmente, a los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

*“Elizabeth Vásquez Gatica”*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos principalmente a Nuestro Padre Celestial por permitirnos continuar en esta vida; dándonos salud, llenándonos de sabiduría, fortaleza y sobre todo permitirnos terminar con éxito nuestro proyecto de tesis, para así culminar la primera etapa de nuestra carrera profesional.

A nuestra prestigiosa Facultad de Farmacia y Bioquímica, que con sus grandes maestros enriquecieron nuestra mente de sabias enseñanzas y así nos formaron dignos profesionales en bien del desarrollo de nuestro País.

A nuestro asesor Q.F Henry Vladimir Delgado Wong, gracias a su asesoramiento, tiempo, disponibilidad, y seguimiento constante también hizo que este sea posible.

Al IMET, gracias a esta institución fue posible que realicemos la parte experimental de nuestro proyecto de tesis. Al Ing. Jorge Ysaac Villacrés Vallejo. MSc., por darnos la oportunidad de continuar en esta institución y así culminar satisfactoriamente nuestro proyecto.

A Nuestra Presidenta Dra. Gladys Cárdenas de Reátegui y a Nuestros Asesores: Ing. Cleto Jara Herrera y Mc. Charles Ocampo Falcón, por todo el compromiso que tuvieron durante todo este tiempo para realizar el seguimiento respectivo a nuestro proyecto de tesis.

A Nuestros padres que día a día vinieron formándonos como personas y orientándonos para que culminemos este gran paso que dimos.

***“Milagritos & Elizabeth”***

## INDICE

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	II
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
INDICE DE TABLAS .....	VIII
INDICE DE FIGURAS .....	X
INDICE DE ANEXOS.....	XI
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.2.1. General.....	5
1.2.2. Específicos.....	5
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>6</b>
2.1. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1.1. ANTECEDENTES .....	7
2.1.1.1. <i>Morinda citrifolia</i> “Noni” .....	7
2.1.1.2. <i>Physalis angulata</i> L “Bolsa Mullaca” .....	8
2.1.1.3. <i>Lupinus mutabilis sweet</i> “tarwi o chocho” .....	9
2.1.2. BASES TEÓRICAS .....	10
2.1.2.1. <i>Morinda citrifolia</i> L “Noni” .....	10
2.1.2.1.1. Clasificación taxonómica.....	10
2.1.2.1.2. Descripción botánica.....	10
2.1.2.1.3. Hábitat y Descripción .....	10
2.1.2.1.4. Composición Química .....	11
2.1.2.1.5. Usos tradicionales .....	11
2.1.2.1.6. Toxicidad .....	12
2.1.2.2. <i>Physalis angulata</i> L “Bolsa Mullaca” .....	12
2.1.2.2.1. Clasificación Taxonómica.....	12
2.1.2.2.2. Descripción Botánica .....	13
2.1.2.2.5. Usos Tradicionales.....	14
2.1.2.2.6. Toxicidad .....	14
2.1.2.3. <i>Lupinus mutabilis sweet</i> “Tarwi” o “chocho” .....	15
2.1.2.3.1. Clasificación Taxonómica.....	15
2.1.2.3.2. Descripción Botánica .....	15
2.1.2.3.5. Uso Tradicional.....	17
2.1.2.3.6. Toxicidad .....	17
2.1.2.4. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICA DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO .....	17
2.1.2.4.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	17
2.1.2.4.1.1 Descripción Taxonomía.....	17
2.1.2.4.2 Características .....	18
2.1.2.5 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.1.2.5.1 Descripción Taxonomía .....	19
2.1.2.5.2 Características .....	19
2.1.2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.1.2.6.1 Descripción Taxonomía .....	20
2.1.2.6.2 Características .....	20
2.1.3 ANTIBIOTICOS .....	20
2.1.3.4 Importancia historica .....	20
2.1.3.5 ENSAYOS ANTIMICROBIANOS .....	23
2.1.3.5.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN.....	23
2.1.3.5.2 MÉTODOS DE DILUCIÓN.....	24

2.2.	DEFINICIONES OPERACIONALES .....	25
2.2.1.	VARIABLES .....	25
2.2.1.1.	Variable Independiente .....	25
2.2.1.2.	Variable Dependiente.....	25
2.2.2.	INDICADORES .....	25
2.2.2.1.	Indicadores de la variable independiente.....	25
2.2.2.2.	Indicadores de la variable dependiente.....	26
2.2.3.	OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE .....	27
2.2.4.	OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE .....	28
<b>CAPITULO III.....</b>		<b>29</b>
3.1	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	30
3.1.1	TIPO DE ESTUDIO .....	30
3.2.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	30
3.3.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	30
3.3.2.	Muestra vegetal.....	31
3.3.3.	Criterios de inclusión.....	31
3.3.4.	Criterios de exclusión .....	31
3.3.5.	Población bacteriana.....	31
3.3.6.	Muestra bacteriana.....	31
3.3.7.	Criterios de inclusión.....	31
3.3.8.	Criterios de exclusión .....	32
3.4.	MÉTODO.....	32
3.4.1.	Método de difusión en medio sólido .....	32
3.4.1.1.	Prueba de sensibilidad.....	32
3.4.1.2.	Concentración inhibitoria mínima.....	32
3.4.2.	Preparación de la especie vegetal .....	32
3.4.2.1.	Preparación de extractos acuosos .....	33
3.4.2.3.	Preparación de los extractos a diferentes concentraciones .....	35
3.4.2.4.	Recuperación de cultivos conservados.....	35
3.4.2.5.	Aplicación de los discos con extractos.....	37
3.4.2.6.	Incubación.....	37
3.4.2.7.	Lectura de las placas e interpretación de los resultados .....	37
	Tabla 1. Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.....	38
3.4.3.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO (MACRODILUCIÓN) .....	39
	Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición <sup>39</sup> .....	39
	$\% \text{ Inhibición} = \text{Diámetro de la muestra} / \text{Diámetro de control} \times 10$ .....	39
3.4.3.1.	Preparación y almacenamiento de las diluciones .....	39
3.4.3.1.1.	Método de Dilución en Caldo (macrodilución) <sup>44</sup> .....	39
	Tabla 2. Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración mínima inhibitoria.....	39
3.5.	ASPECTOS ÉTICOS .....	40
<b>CAPITULO IV .....</b>		<b>41</b>
4.1.	RESULTADOS .....	42
4.1.1.	Actividad antibacteriana del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L + Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> L. ....	42
4.1.1.1.1.	Actividad Antibacteriana Frente a <i>Enterococcus faecalis</i> . ....	43
4.1.1.1.2.	Actividad Antibacteriana frente a <i>Escherichia coli</i> . ....	45
4.1.1.2.	Método de Difusión en Caldo: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	46
4.1.1.2.1.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	46
4.1.1.2.2.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) .....	48
4.1.1.3.	Actividad antibacteriana Extracto Acuoso de <i>Physalis angulata</i> L(planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) por el método de difusión en disco (Kirby - Bauer).....	49

4.1.1.4.	Método de Dilución en Caldo: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	55
4.1.1.4.1.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	55
4.1.1.4.2.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) .....	57
4.2.	DISCUSIÓN.....	58
4.3.	CONCLUSIONES.....	61
4.4.	RECOMENDACIONES .....	62
4.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición	38
Tabla 2 : Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración mínima inhibitoria.	39
Tabla 3 : Actividad antibacteriana por el método de difusión en disco (Kirby - Bauer), obtenida del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . Según diámetro de la zona de inhibición.	42
Tabla4 : Actividad antibacteriana obtenida del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> L frente a <i>Enterococcus faecalis</i> . Según Diámetro de la zona de inhibición.	44
Tabla5 : Actividad antibacteriana obtenida del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> L frente a <i>Escherichia coli</i> . Según diámetro de la zona de inhibición.	45
Tabla6 : Concentración Inhibitoria Mínima (CMI), del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> L frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	47
Tabla7 : Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> Lfrente a <i>Enterococcus faecalis</i> .	47
Tabla 8 : Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> + Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> Lfrente a <i>Escherichia coli</i> .	48
Tabla 9 : Concentración Bactericida Mínima (CBM) Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> Lfrente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Escherichia coli</i> .	48
Tabla 10 : Actividad antibacteriana obtenida del Exudado Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (semilla) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . Según diámetro de la zona de inhibición.	49

Tabla 11 :	Actividad antibacteriana obtenida del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L(planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <b><i>Enterococcus faecalis</i></b> . Según Diámetro de la zona de inhibición.	51
Tabla 12 :	Actividad antibacteriana obtenida del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <b><i>Escherichia coli</i></b> . Según Diámetro de la zona de inhibición.	53
Tabla 13 :	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (semilla) frente a <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> .	55
Tabla 14 :	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L(planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <b><i>Enterococcus faecalis</i></b> .	56
Tabla 15 :	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <b><i>Escherichia coli</i></b> .	56
Tabla 16 :	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L(planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <b><i>Enterococcus faecalis</i></b> .	57

## INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 :	Fruto de noni 10
Figura 2 :	Bolsa mullaca 12
Figura 3 :	Semillas tarwi 15
Figura 4 :	<i>Enterococcus faecalis</i> 17
Figura 5 :	<i>Escherichia coli</i> 19
Figura 6 :	<i>Staphylococcus aureus</i> 20
Figura 7 :	Procedimiento para prueba de difusion en disco 35
Figura 8 :	Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar 37
Figura 9 :	Categorización del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia L</i> + Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata L</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , según Diámetro de la zona de inhibición. 43
Figura 10 :	Categorización del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia L</i> + Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata L</i> frente a <i>Enterococcus faecalis</i> según Diámetro de la zona de inhibición. 44
Figura 11 :	Categorización del Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia L</i> + Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata L</i> frente a <i>Escherichia coli</i> según Diámetro de la zona de inhibición. 46
Figura 12 :	Categorización del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata L</i> (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según Diámetro de la zona de inhibición. 50
Figura 13 :	Categorización del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata L</i> (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <i>Enterococcus faecalis</i> según Diámetro de la zona de inhibición. 52
Figura n° 14 :	Categorización del Extracto acuoso de <i>Physalis angulata L</i> (planta entera) y <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semilla) frente a <i>Escherichia coli</i> según Diámetro de la zona de inhibición. 54

## INDICE DE ANEXOS

		PÁGINA
Anexo 1 :	Preparación del Agar Muller Hinton	68
Anexo 2 :	Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de Mc-Farland	69
Anexo 3 :	Recuperación de cultivos conservados	70
Anexo 4 :	Procedimiento del método de dilución en caldo	71
Anexo 5 :	Flujograma del proceso de preparación de extractos acuosos y liofilizados para <i>Physalis angulata L.</i>	72
Anexo 6 :	Procedimiento para obtención del extracto acuoso liofilizado <i>Physalis angulata L.</i>	73 - 74
Anexo 7 :	Obtención del exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia L.</i>	75
Anexo 8 :	Procedimiento para obtención del extracto de <i>Morinda citrifolia L.</i>	76
Anexo 9 :	Obtención del extracto Acuoso de la planta de <i>Lupinus mutabilis sweet.</i>	77
Anexo 10 :	Procedimiento para obtención del extracto de <i>Lupinus mutabilis sweet.</i>	78
Anexo 11 :	Preparación de los discos de sensibilidad	79
Anexo 12 :	Preparación del inculo	80
Anexo 13 :	Prueba de sensibilidad	81
ANEXO 14 :	Dilución de extractos y aplicación de discos	82
Anexo 15 :	Método de difusión en disco y resultados	83
Anexo 16 :	Método de dilución en caldo y resultados	84
Anexo 17 :	Preparación de las diluciones	85
Anexo 18 :	Incubación de los microtubos	86

ANEXO N° 19 :	Concentración Bactericida Mínima	87
ANEXO N° 20 :	Formato para la Recolección de Datos	88
ANEXO N° 21 :	Constancia de certificación de <i>Lupinus mutabilis sweet.</i>	89
ANEXO N° 22 :	Constancia de certificación de <i>Physalis angula L</i> y <i>Morinda citrifolia L.</i>	90

# CAPITULO

# I

## 1.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran gama de antibióticos de primera, segunda y hasta tercera generación que ofrecen una amplia variedad de opciones para el tratamiento de padecimientos causados por bacterias.<sup>1</sup> Muchos antibióticos están perdiendo eficacia por primera línea para la salud pública global <sup>2, 3</sup>. Esto se debe, principalmente al tratamiento farmacológico incompleto de los pacientes, debido a la automedicación y abandono de los tratamientos respectivos. A esto se suma, el uso irracional de antibióticos que contribuyen a la aparición de cepas microbianas multidrogas resistentes <sup>4</sup>.

Este problema, se agudiza cada vez más por el elevado costo de los fármacos, lo cual resulta inaccesible para la población de bajo recursos económicos <sup>5</sup>. El conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces, políticas, estrategias, programas y metodologías que proporcionen una adecuada vigilancia en la elaboración y uso racional de antibióticos <sup>6</sup>.

Los microorganismos enteropatógenos como la *Escherichia coli* son causantes de una gran parte de morbilidad y mortalidad en los países de vías en desarrollo como es el caso de Perú y sobretodo de la región Loreto, que es la más afectada por estas clases de bacterias enteropatógenos. Entre otros microorganismos productores de infecciones intrahospitalarias registradas por el Instituto Nacional de Salud (INS) se tiene a *Enterococcus faecalis* (15%), *Staphylococcus aureus* (50%) y *Pseudomona aeruginosa* (70%)<sup>7</sup>.

El uso de la medicina alternativa hoy en día está muy extendido; ya no es patrimonio de sociedades con historia cultural tradicional, como la nuestra. En una encuesta realizada en los Estados Unidos, un tercio de los encuestados refirió haber usado al menos una terapia no convencional. El uso de terapias alternativas en otros países desarrollados también es elevado. Informes indican que un 46% de los australianos, así como 49% de franceses y 70% de canadienses han utilizado alguna de esas terapias. En Alemania, uno de cada tres alemanes ha utilizado alguna terapia alternativa, siendo la acupuntura y la homeopatía las más empleadas <sup>8</sup>.

En el Perú, las especies de flora son aproximadamente unas 300 mil especies vegetales y muchas de ellas han sido reportado por su uso como antimicrobianos <sup>9</sup>, sin embargo carecen de estudios de actividad y de estudios fitoquímicos.

Las bondades tradicionales del jugo de fruta de noni es recomendada para estimular el sistema inmune, combatir microorganismos, así como para prevenir la formación y proliferación de tumores algunos de los cuales son de tipo maligno. Sin embargo también hay reportes de uso de todos los órganos de la planta. En artículos clínicos se reporta el alivio de la artritis y diabetes por consumo de este fruto y refieren que el efecto curativo se debería a la presencia de metabolitos tipo cumarinas (escopoletina), alcaloides, fenoles y esteroides. La reputación curativa del noni paso fronteras y su consumo se extendió por EEUU, Japón y Europa<sup>10</sup>.

La especie vegetal del tarwi es usado por los grupos Aymara en Puno, para el caso de enfermos con Diabetes diagnosticada por el medico, se usa harina de tarwi cruda sin desamargar que es hervida hasta formar una pasta. Con la punta de la cuchara se toma un poco de la pasta para ser consumida en ayunas por un mes, luego de este tiempo los síntomas propios del diabético deben desaparecer.

En los casos de males renales los síntomas de cansancio, fatigas, ardores en la planta de los pies, los dolores y calambres a nivel de la cintura. Estos pueden ser aliviados con el agua de remojo del tarwi con un poco de sal de cocina calentada en tostadora o también agua de cocción del tarwi durante el proceso del desamargado; este líquido tibio con ayuda de un paño se aplica en la parte adolorida. El tratamiento debe ser acompañado de reposo.

Luego de consumir licor la llamada resaca del campesino (desánimo, nerviosismo y muchos deseos de beber agua) puede ser apagada elaborando el tauri xuq'u, el cual consume en forma directa los granos de tarwi desamargados, la recuperación es muy rápida. Para eliminar los exoparásitos del ganado vacuno, se hace hervir en agua de tarwi producto del desamargado, el ajeno y hollín de cocina. Luego estas aguas son usadas para bañar al ganado <sup>11</sup>.

*El género Physalis* pertenece a la familia de las solanáceas, las numerosas especies herbáceas anuales o perennes, nativas de Norte tropical y América del Sur. De las cuales algunas son comestibles y otras son usadas como anti-inflamatorias, para casos de asma, problemas urinarios, el reumatismo y tumores y en otros casos como anti-espasmódica <sup>12</sup>.

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos tiende a enfocarse hacia agentes con nuevos mecanismos de acción que sean capaces de evadir los mecanismos de resistencia bacteriana actuales<sup>13, 14, 15</sup>. De la misma forma, el surgimiento y transmisión de cepas con resistencia a los glucopéptidos, hace urgente la prioridad en el desarrollo de estrategias de tratamiento y la creación de nuevos fármacos para el control en la diseminación de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA por sus siglas en inglés) <sup>16, 17, 18</sup>

Estas tres plantas son solo algunas, de las 25 mil especies vegetales (10% del total mundial) de la gran biodiversidad de Perú, de las cuales de las cuales un 30% son endémicas y solo de algunas se cuenta con registros incompletos y fragmentados. Perú ocupa el quinto lugar en el mundo en número de variedad de especies y décimo en especies domesticadas nativas. Solo se sabe que aproximadamente 4 400 especies son usadas con fines medicinales <sup>19</sup>.

Entre las diez enfermedades mas frecuentes de la región Loreto, las enfermedades infecciosas son infactables. Y la vigencia de los antimicrobianos frente a la alta resistencia requiere de búsqueda de moléculas alternativas, que aseguren eficaz y segura a los agentes causantes de estas enfermedades. Por la gran biodiversidad vegetal de nuestro Perú y su frecuente uso como medicina alternativa, de estas tres especies vegetales y ante la necesidad de encontrar una solución real a problemas de salud, se planteo lo siguiente:

¿Cuál es la actividad antibacteriana *in vitro* de las combinaciones de los extractos acuosos de *Morinda citrifolia* L con *Physalis angulata* L (Frutos) y *Lupinus mutabilis* sweet con *Physalis angulata* L (Planta entera) frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*?

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. General

- ✓ Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de las combinaciones vegetales de *Morinda citrifolia L*, *Physalisangulata L* y *Lupinusmutabilis sweet* frente a *Escherichia coli*, *Enterococcusfaecalis* y *Staphylococcus aureus*, por método de difusión en disco y dilución en caldo.

### 1.2.2. Específicos

- ✓ Obtener los extractos acuosos y las combinaciones vegetales de *Morinda cirifolia L* (Noni), *Physalis angulata L* (Bolsa Mullaca) y *Lupinus mutabilis sweet* (Tarwi o Chocho).
- ✓ Determinar el % de inhibición y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las combinaciones de extractos acuosos de la planta entera de *Physalisangulata L*, con el extracto de las semillas de *Lupinusmutabilissweet* sobre el crecimiento de *Escherichiacoli*, *Enterococcusfaecalis* y *Staphylococcus aureus* según el método de dilución en caldo “macrodilución”.
- ✓ Determinar el % de inhibición y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto acuoso de *Morindacitrifolia L* con el jugo de frutos de *PhysalisangulataL* sobre el crecimiento de *Escherichiacoli*, *Enterococcusfaecalis* y *Staphylococcus aureus* según el método de dilución en caldo “macrodilución”.

# CAPITULO

## II

## 2.1. MARCO TEÓRICO

### 2.1.1. ANTECEDENTES

#### 2.1.1.1. *Morinda citrifolia* “Noni”

**Chan-Blanco (2006)**, refiere que *Morinda citrifolia* L, el "noni", se ha utilizado en la medicina tradicional de la Polinesia durante más de 2000 años. *Morinda citrifolia* L(Rubiaceae) es un arbusto de hoja perenne cuya fruta madura tiene un fuerte olor a ácido butírico y sabor. Como resultado de estos usos y del mercado que se está desarrollando en torno al "jugo de noni", se ha vuelto cada vez más importante confirmar las propiedades terapéuticas reales de esta planta. Si bien estudios recientes han demostrado que esta fruta tiene propiedades antibióticas y antioxidantes in vitro, todavía no contamos con evidencia científica que respalde los valores nutricionales y medicinales del noni en humanos. Sin embargo, tanto la fruta como el damnacantal, un compuesto de antraquinona extraído de raíces de noni, se están estudiando actualmente en el contexto de la investigación contra el cáncer. Si en el futuro se pueden evaluar los valores nutricionales y médicos del noni, especialmente su actividad anticancerígena, esta fruta podría desempeñar un papel económico notable en los países productores.<sup>20</sup>

**Wang (2002)**, reportó que *Morindacitrifolia* L, tiene una gran historia de uso en la medicina tradicional en Polinesia para el tratamiento de enfermedades infecciosas y sus propiedades antivirales, antimicóticas y antibacterianas han sido investigadas *in vitro* confirmando que tienen efectos curativos contra algunas enfermedades infecciosas. Recientemente, Duncandemostró que la Escopoletina del noni inhibe la actividad de *E. coli*, bacteria causante de infecciones entéricas serias. También contribuye a sanar úlceras gástricas inhibiendo a la bacteria *Helicobacter pylori*.<sup>21</sup>

**Leach (1988)**, demostró que los extractos acuosos de *Morindacitrifolia* Lofrecían actividad antibacteriana.El amplio uso medicinal de esta planta sugiere que verdaderamente contiene sustancias farmacológicamente activas y que se deberían utilizar nuevos métodos para extraer estas sustancias y evaluarlas, con la finalidad de encontrar el compuesto bioactivo principal y desarrollar nuevas drogas.<sup>22</sup>

**Atkinson (1956)**, manifiesta que existen evidencias de que el noni inhibe el crecimiento de ciertas bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*,

*Salmonella* y *Shigella*. Se estima que el efecto antimicrobiano puede ser debido a ciertos compuestos fenólicos como laacubina, alizarina, escopoletina y otras antraquinonas.<sup>23</sup>

**Bushnell (1950)**, reportó que el Noni es utilizado tradicionalmente en fracturas, heridas profundas, contusiones y ampollas. Los extractos del fruto maduro mostraron actividad antibacteriana moderada contra *Ps. aeruginosa*, *M. pyogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella schottmuelleri* y *Shigella paradys*.<sup>24</sup>

#### **2.1.1.2. *Physalis angulata* L “Bolsa Mullaca”**

**Pietro et al. (2000)**, en un estudio realizado sobre los agentes antimicrobianos de *Physalis angulata* L, extrae a través de fraccionamiento con ensayos bio guiados, mediante la determinación *in vitro* de la concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando el método de microdilución con colorante azul Alamar de oxidación-reducción, demostró que los extractos de CHCl<sub>3</sub> crudo a partir de las partes aéreas (500 g / ml) de *Physalis angulata* L, causó la inhibición del crecimiento total de *Mycobacterium tuberculosis* células Rv H37. Por otra parte, 32 g / ml y 625 g / ml de las fracciones que contienen Physalin-eran necesarias para inhibir 100% de *M. tuberculosis* y *M. avium*, respectivamente. Purificada Physalis B mostró valores de MIC contra *M. tuberculosis* H37 Rv cepa de 32 g / ml. (Departamento de Ciencias Farmaceuticas, Universidad de Ribeirao Preto - UNAERP Ribeirao Preto, SP Brasil)<sup>26</sup>

**Lopes et al. (2006)**, demostró que los extractos y fracciones de los frutos y raíces de *Physalis angulata* L, (Solanaceae) fueron ensayados para encontrar la actividad antibacteriana. Aplicando el método de difusión en agar, todas las muestras fueron testadas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. El extracto etanólico de los frutos presentó actividad antibacteriana, la cual tuvo una actividad fototóxica estimada en ensayos cuando expusieron a la luz ultravioleta, y no fueron observados los eritemas. Esos datos impulsaron a investigar diferentes formas de obtención de extractos de la planta, con el objetivo de preparar formulaciones con actividad anti- séptica, que puedan presentarse más eficaces y seguras, cuando aplicadas en el tratamiento de dolencias infecciosas.<sup>27</sup>

**Rengifo et al. (2013)**, en una revisión bibliográfica sobre *Physalis angulata L.*, menciona que el aceite esencial tiene propiedades antimicrobianas contra *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*; tiene actividad antifúngica con *C. albicans*, *C. stellatoidea* y *C. Torulopsis*, que son resistentes a muchos antibióticos. La fruta y raíz presenta actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 mostrando respuesta significativa cuando se compara a la ampicilina. El extracto etanólico de las flores exhiben notable actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* que causan la caries dental. El extracto etanólico de la fruta muestran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú) <sup>28</sup>.

### **2.1.1.3. *Lupinus mutabilis sweet* “tarwi o chocho”**

**Villacrés (2009)**, demostró que el grano tiene alcaloides que le confieren un carácter tóxico y sabor amargo. La utilización potencial de los alcaloides como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas, se fundamenta en su actividad inhibidora de la síntesis de proteína, del RNA transmisor, depresores del sistema nervioso central, oxitóticos, antiarrítmicos e hipoglucemiantes. A través del método de dilución en placas Petri utilizando como medio de cultivo agar base, como control positivo estreptomycin y agua como control negativo, se determinó que la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto de hojas de chocho, contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), es de 10 mg/mL <sup>29</sup>.

**Castañeda-Castañeda (s.f.)**, determinó el efecto antimicrobiano de los alcaloides de *Lupinus mutabilis sweet* (tarwi) en cepas de *E. Coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* por el Método de Kirby Bauer. Previamente se realizó la marcha fitoquímica para determinar la presencia de los principios activos y la posterior separación y purificación de los alcaloides, para realizar la prueba antibacteriana. Obtenido el pool de alcaloides quinolizidínicos del LMS, se preparó las concentraciones respectivas, mediante la dilución con agua destilada en 8 balones (16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125), para de esa manera proceder a demostrar el efecto antimicrobiano. y la determinación de la MIC de las cepas por inspección visual de tubos. Se comprobó el efecto antimicrobiano del pool de alcaloides del LMS, mediante el CIM y el CBM en cepas de *E. coli*, *Klebsiella* y *Salmonella*.<sup>30</sup>

## 2.1.2. BASES TEÓRICAS

### 2.1.2.1. *Morinda citrifolia* L “Noni”

#### 2.1.2.1.1. Clasificación taxonómica

Reino	: Plantae
Filo	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Gentianales
Familia	: Rubiaceae
Sub-familia	: Rubioideae
Tribu	: Morindeae
Género	: <i>Morinda</i>
Especie	: <i>Morinda citrifolia</i> L <sup>31</sup> .



Figura 1: “Noni”  
FUENTE: IMET

**Nombres comunes:** noni, guanábana cimarrona, fruta del diablo o mora de la India.

#### 2.1.2.1.2. Descripción botánica

El género *Morinda* (Rubiácea), que incluye la especie *Morinda citrifolia* L, está formado por alrededor de 80 especies de *Morinda citrifolia* L, es un arbusto o árbol pequeño, de 3 a 10 m de altura, con abundantes hojas anchas elípticas (5-17 cm de largo, 10 a 40 cm de ancho). Sus flores aromáticas están dispuestas en cabezuelas globosas, con el cáliz truncado y la corola tubular de color blanco. El fruto de noni (3-10 cm largo, 3-6 cm de ancho) es oval, su color varía de verde a amarillo hasta casi blanco al momento de su recolección, con una cáscara cubierta de pequeñas protuberancias, cada una de las cuales contiene una semilla. El fruto maduro desprende un fuerte olor rancio semejante al del ácido butírico; la pulpa es jugosa y amarga, de color amarillo opaco o blanco y aspecto gelatinoso, presentando numerosas cavidades triangulares de color marrón rojizo las cuales contienen cuatro semillas.<sup>25</sup>

#### 2.1.2.1.3. Hábitat y Descripción

Noni prospera muy bien en el trópico húmedo en donde la precipitación va desde los 2500 hasta los 4500 mm anuales. La temperatura típica de la franja tropical de donde originario está entre los 28°- 29°C. Sin embargo, en tiempos muy calurosos y especialmente en

cultivos sin sombra, las hojas con más exposición a la radiación solar se enrollan para disminuir la pérdida de agua por transpiración.<sup>31</sup>

Es una planta resistente, tolera fácilmente suelos salinos y en general se adaptan a condiciones que son comunes a las áreas costeras. Se adaptan a elevaciones que van de 0 a 200 msnm donde crece rápidamente, produciendo frutos todo el año.<sup>32</sup>

#### **2.1.2.1.4. Composición Química**

La planta de noni ha sido muy estudiada y el contenido de sus componentes varían según sea el órgano estudiado. Se ha identificado 160 compuestos entre fenoles, ácidos orgánicos y alcaloides. Entre los compuestos fenólicos más importantes están las antraquinonas, acubina, ácido asperulósido y escopoletina; ácidos orgánicos: caproico y caprílico, como alcaloide principal reportado la xeronina.

Sobre la caracterización fisicoquímica completa del fruto aún falta información se sabe que, la fruta contiene 90% de agua y el estudio de la materia seca determina presencia de fibra dietética, proteínas (11.3%) y sólidos solubles en agua. Se han identificado como aminoácidos mayoritarios al ácido aspártico, el ácido glutámico y la isoleucina.

Las cenizas minerales a partir de la materia seca es de 8,4% y contiene potasio, azufre, hierro, zinc, calcio y fósforo, además de trazas de selenio. Por otra parte, en el jugo de noni se han identificado los compuestos fenólicos: damnacantal, escopoletina, morindona, alizarina, acubina, nor-damnacantal, rubiadina.

También se han identificado en la fruta madura de noni aproximadamente 51 compuestos aromáticos, incluyendo ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, cetonas y lactonas.<sup>31</sup>

#### **2.1.2.1.5. Usos tradicionales**

La diversidad de usos tradicionales algunos de los cuales ya descritos, las tizanas consumen en casos de diabetes, asma, espasmos estomacales, parasitosis; arterioesclerosis, la intoxicación de la sangre, dismenorreas, metrorragias, leucorrea y fiebre, náuseas, vómitos, disentería y decaimiento general.

La reputación del jugo del fruto parte de Hawai y Tahiti donde es utilizado como un remedio anticáncer, ingerido con sal es considerado digestivo, laxante y emenagogo. Las

hojas frescas se aplican como emplastos para tratar problemas reumáticos y forunculosis  
32.

#### 2.1.2.1.6. Toxicidad

La voz popular no recomienda su consumo en mujeres embarazadas debido a que produce efectos relajantes del tono muscular uterino. El consumo de raíz no es recomendado por su contenido de 1-hidroxiantraquinona, sustancia clasificada como carcinógeno en humanos (grupo 2B) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) de la OMS de *M.citrifolia* L. Los frutos no contienen dicha sustancia. Por otro lado, los pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 5 (Filtración glomerular < de 15 o que se diálizan) no es recomendable el consumo de jugo de noni por su alto contenido de potasio.<sup>32</sup>

#### 2.1.2.2. *Physalis angulata* L “Bolsa Mullaca”

##### 2.1.2.2.1. Clasificación Taxonómica

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Solanales
Familia	: Solanaceae
Sub-familia	: Solanoideae
Tribu	: Physaleae
Sub-tribu	: Physalinae
Género	: <i>Physalis</i>
Especie	: <i>P. angulata</i> L. <sup>33</sup>



Figura 2: “Bolsa Mullaca”  
FUENTE: IMET

**Nombres comunes:** Bolsa mullaca, Mullaca, Capulí Cimarrón, Camapu( v. brasileña), Shimon (v. shipibo conibo).<sup>33</sup>

#### **2.1.2.2. Descripción Botánica**

Es un arbusto anual, que alcanzan un tamaño de hasta 1m de altura; los tallos erectos, angulados y ramificados, grueso fistuloso, verde pardusco, carnosos triangular en la parte inferior y cuadrangular en la superior. Las hojas son alternas, ovadas o lanceoladas, de hasta 10 cm de largo, el ápice acuminado, agudo u obtuso, la base angosta, irregularmente dentadas pero a veces subasteras; con pecíolos de 1–4 cm de largo. Las flores solitarias de con pedicelo de 8–12 mm de largo de color crema; el cáliz sub angulado, de 3–4 mm de largo pedúnculo recurvado sin macula y sin anteras, comprimidas rubescentes, de 1.5mm de longitud <sup>33</sup>.

**Hojas**, presentan varios componentes químicos como el 28 hidroxiwitanolido, withanólidos, physalinas, phygrina, flavonoides (kaempferol) y flavonol (quercentina). Algunos de estos compuestos tienen una fuerte actividad antioxidante.

**Frutos**, son ricos en azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa; contiene vitaminas como el retinol, algunas vitaminas del complejo B y ácido ascórbico; minerales como hierro, calcio y fósforo. Los ácidos orgánicos presentes son en orden decreciente el cítrico, málico y oxálico. Mas su actividad farmacológica entre las que predomina la ciititóxicas, se debería a su contenido de withanólidos tipo lactonasesteroidales.

**Raíz**, este órgano presenta tizalina, tropeira, higrina, proteínas y vitaminas A y C, tropano, ácido clorogenico, sitosferol, glicósidospeno flavonoides, physalinas y principios amargos <sup>33</sup>.

#### **2.1.2.2.3. Hábitat Descripción**

Es una especie de distribución mundial y común en diferentes lugares de Perú: Amazonas, Cajamarca, Huánuco, Junín, La Libertad, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín, Ucayali. Crece a nivel del mar hasta 1600 metros.

#### **2.1.2.2.4. Composición Química**

*Physalis angulata* L su caracterización química revela que presenta alcaloides tipo higrina y/o tropano (ubicados en la raíz), flavonoides simples y glicolisados, ácidos grasos,

carotenoides, terpenoides, esteroides, proteínas y vitaminas A y C. El género *Physalis*, presenta alcaloides del, glicósidos pinto flavonoides, physalinas y principios amargos.

El principal grupo de esteroides presentes en esta especie son las physalinas, moléculas derivadas del ergostano del tipo 13, 14-seco-16, 24 ciclo ergostano, carboxilados en C-15, dentro del género *Physalis* ya fueron identificadas 19 physalinas, la especie *Physalis angulata* L. posee en su constitución las physalinas B, D, Y, F, G, H, I, J, K.

#### **2.1.2.2.5. Usos Tradicionales**

Las raíces, una cantidad Aprox. de 16gr maceradas en alcohol se usa en caso de reumatismo. En infusión como agua de tiempo para casos de hepatitis y como diurético.

Las parte aérea de la planta se emplean en infusión o tizanas caliente 3 veces al día o como agua de tiempo se consumen en casos de asma, paludismo, malaria. Y en caso de otalgias instilar (echar gota a gota) el zumo de la planta en el oído.

El jugo de las hojas machacadas y maceradas se consume para combatir helmintos, y hojas frescas trituradas se friccionan sobre la zona afectada en casos de hemorroides, inflamaciones y heridas, también se puede agregar frutos cocidos. Las hojas frescas con sal asada se aplica en emplastos sobre abscesos y micosis dérmica.

El fruto verde se tritura y la masa obtenida se aplica directamente sobre la herida sarna durante siete días<sup>33</sup>.

#### **2.1.2.2.6. Toxicidad**

Los estudios de toxicidad denotan una baja toxicidad de la mullaca.

### 2.1.2.3. *Lupinus mutabilis sweet* “Tarwi”o “chocho”

#### 2.1.2.3.1. Clasificación Taxonómica

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Sub-familia	: Faboideae
Tribu	: Genisteae
Género	: <i>Lupinus</i>
Sub-género	: <i>Platycarpus</i>
Especie	: <i>Lupinus mutabilis sweet</i> <sup>38</sup> .



Figura 3: semillas “tarwi”  
FUENTE: IMET

**Sinonimia:** *Lupinus cruckshanksii* Hook, *Andean Lupin*, *Lupinus cunninghamii* Cook

**Distribución geográfica:** Sierra y Selva del Perú y en países como Ecuador, Colombia y Brasil.

**Nombres vulgares o comunes:** tarwi, chocho, lupino, andean lupine, altramuz, altramuz andino, altramuz sudamericano, Perú altramuz campo o altramuz perla.<sup>38</sup>

#### 2.1.2.3.2. Descripción Botánica

Es una planta anual herbácea erecta de tallos robustos, algo leñosa con una altura aproximada de 0,8 a 2,5 m. Su raíz principal es corta y fuerte que puede alcanzar 3 m de longitud <sup>33</sup>.

Se cultiva en países latinoamericanos desde la época preincaica principalmente en zonas alto andinas entre los 2 000 y 3800 msnm, como una planta alimenticia para el hombre y los animales, por su contenido de proteínas que es superior al de la soja. Sus semillas se emplean en la gastronomía de <sup>33</sup>.

La corola alcanza 1 a 2 cm y contiene cinco pétalos. Éstas emiten un aroma parecido al de la miel. La coloración es muy variada y va desde blanco a púrpura. La coloración

blanca es recesiva a púrpura y penden de las hojas para atraer a los insectos polinizadores  
33.

El fruto es una vaina de 5 a 12 cm de largo, dependiendo de la cantidad de semillas. Una cápsula contiene un promedio de 2 a 3 semillas, pero puede tener hasta 9 semillas por vaina. Las semillas son ovaladas, de 0,6 a 1 cm de diámetro. El millar de semillas pesa alrededor de 200 g<sup>33</sup>.

#### **2.1.2.3.3. Hábitat Descripción**

Se cultiva en las zonas templadas y frías de los valles interandinos y el Altiplano boliviano-peruano, y se comercializa en todos los países andinos y aun a nivel del mar en fase de experimentación. En el Perú se cultiva principalmente en zonas como Cajamarca, Ancash, en el Valle del Mantaro, Ayacucho, Cusco y en Puno.

En lo relacionado al fotoperiodo, es aparentemente indiferente, aunque se cultiva más en condiciones de días cortos de luz y en condiciones de secano y puede cultivarse todo el año. Crece de maera natural en bosques húmedo y requiere precipitaciones fluviales de 350 a 850 mm<sup>3</sup>. Es susceptible al exceso de humedad y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado. No tolera las heladas en la fase inicial y en la formación de vainas, aunque algunos ecotipos cultivados en el Altiplano y a orillas del Lago Titicaca tienen mayor resistencia al frío. Es muy tolerante a climas cálidos y fríos (resiste a las heladas).

#### **2.1.2.3.4. Composición Química**

El tarwi contiene ácidos grasos predominantemente de tipo no saturados, como el oleico, linoleico y linolenico; se han encontrado 26 diferentes alcaloides quinolizidínicos de los cuales se identificaron 19 como la lupinina (el principal) esparteína y lupanidina, estos metabolitos secundarios serían los responsables de la actividad farmacológica en afecciones cardiacas.

Es rico en el aminoácido lisina, en pectina, en minerales como hierro, calcio, fósforo, zinc, sodio y vitaminas A, B, E, entre otros componentes. Con un alto valor energético mayor al de la quinua y kiwicha.

También posee alto contenido en ácido glutámico, arginina y tirosina comparada con la de otra leguminosa como el frijol.

#### 2.1.2.3.5. Uso Tradicional

A las semillas cocidas o en infusión se le atribuye actividad antiparasitario, antipirético, antigripal, anticaspa, antireumático, antiartrítico y antigotoso, antiinflamatorio y en también útil en caso de neuralgias, cólicos renales y vesiculares y para combatir la caída del cabello se usa en cataplasmas <sup>38</sup>.

#### 2.1.2.3.6. Toxicidad

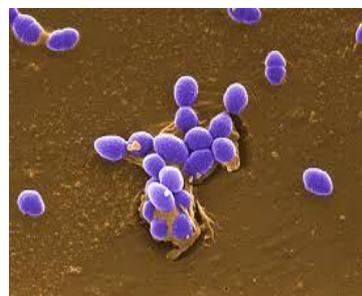
La toxicidad de la lupanina en la proporción que se encuentra en la semilla, fue comprobada en ensayos efectuados sobre *Artemia salina*, *Bacillus megaterium* y embrión de pollo. Los síntomas de un trastorno tóxico en peces son muy variados. Entre las propiedades toxicológicas de los alcaloides del chocho *Lupinus mutabilis* Sweet, también se menciona su capacidad para inhibir la germinación de varias semillas.

### 2.1.2.4. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICA DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

#### 2.1.2.4.1 *Enterococcus faecalis*

##### 2.1.2.4.1.1 Descripción Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Lactobacillales
Familia	: Enterococcaceae
Género	: <i>Enterococcus</i>
Especie	: <i>Enterococcus faecalis</i> (Orla-Jensen 1919) <sup>18</sup>



**Figura 4:** *Enterococcus faecalis*  
FUENTE: INSTITUTO NACIONAL  
DE SALUD

#### 2.1.2.4.2 Características

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, inmóviles y catalasa negativos. Estos cocos suelen colonizar el aparato gastrointestinal es lo que origina el nombre dado de enterococo, aunque también se les puede aislar en la cavidad bucal, tracto genitourinario, vías respiratorias superiores y piel. También se encuentra en entornos ambientales, en el agua y en la vegetación. Con anterioridad, los *Enterococcus*, se clasifican en el grupo serológico “D” de los *Streptococcus*. A diferencia de la mayor parte de los *Streptococcus*, los *Enterococcus* son fácilmente cultivables, en muchos medios de cultivo habituales y son oportunistas clásicos que presentan un potencial patógeno relativamente escaso <sup>18</sup>.

Esta bacteria a pesar de su baja virulencia, pero ha adquirido resistencia virtualmente a todos los antibióticos en uso. Puede causar infecciones especialmente en ambientes nosocomiales, que pueden comprometer la salud de los pacientes de avanzada edad con enfermedades subyacentes graves o inmunocomprometidos y que han estado hospitalizados por períodos prolongados y usaron dispositivos invasivos (catéteres) o que recibieron terapia antimicrobiana de amplio espectro. En otras ocasiones se comporta como un oportunista, produciendo infecciones del tracto urinario, sangre, abdomen y heridas <sup>19</sup>.

Los *Enterococcus faecalis* deben su patogenicidad a: citolisinas, factores de agregación que permite la adherencia con otros enterococcus, proteasas como gelatinasa con actividad endopeptidasa, hialuronidasa que es un factor de difusión y actividad mucopolisacárida, AS – 48 bacteriocina activa frente a otras bacterias. Y para tratarlos es necesario usar una sinergia de antibióticos entre los cuales se debe considerar un aminoglucosido para tratar las infecciones más graves <sup>18</sup>.

### 2.1.2.5 *Escherichia coli*

#### 2.1.2.5.1 Descripción Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacterias
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>Escherichiacoli</i> ( <i>E. freundii</i> ) <sup>7</sup> MIGULA 1895



Figura 5: *Escherichia coli*  
FUENTE: INSTITUTO NACIONAL  
DE SALUD

#### 2.1.2.5.2 Características

La *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, esta bacteria coloniza el intestino a las pocas horas después del nacimiento, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productoras de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). Su identificación puede darse por pruebas bioquímicas o serológicas. Es una de las más estudiadas y ciertas técnicas han permitido estudiar sus mecanismos de patogenicidad por pruebas in vitro e in vivo y ahora empleando técnicas de biología molecular se pone en evidencia la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos <sup>7</sup>.

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. El cuadro II muestra algunos serotipos más frecuentemente asociados con los grupos patógenos <sup>7</sup>.

### 2.1.2.6 *Staphylococcus aureus*

#### 2.1.2.6.1 Descripción Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: <i>Staphylococcus</i>
Especie	: <i>Staphylococcus aureus</i> <sup>7</sup> ROSENBAACH 1884

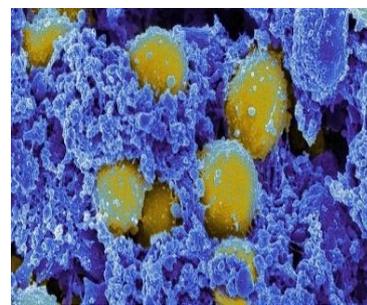


Figura 6: *Staphylococcus aureus*  
FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE  
SALUD

#### 2.1.2.6.2 Características

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que forma parte de la familia Micrococaceae, género *Staphylococcus*, que agrupa más de 30 especies diferentes y muchas de éstas forman parte de la microflora de la piel y las mucosas del hombre. Es un coco Grampositivo anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias, no móvil, no esporula, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es productor de catalasa y coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas<sup>7</sup>.

El *Staphylococcus aureus* es altamente patógeno y responsable de diferentes manifestaciones clínicas en la piel (impétigo) y abscesos localizados en otros sitios como pulmon tracto urinario. También puede producir infecciones profundas en el sistema nervioso central, osteomielitis, septicemia y endocarditis<sup>36</sup>. Es la principal causa de infecciones nosocomiales también provoca intoxicación alimentaria y el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo<sup>37</sup>.

### 2.1.3 ANTIBIOTICOS

#### 2.1.3.4 Importancia historica

Sir Alexander Fleming (1881-1955), bacteriólogo Escocia, quien con el descubrimiento de la penicilina, permitió posteriormente a Howard Florey y Ernst Chain, en 1940 iniciar

la terapia con antibióticos. Fleming fue alumno y catedrático de bacteriología en St. Mary's Hospital de la Universidad de Londres desde 1928 hasta 1948, año en que fue nombrado profesor emérito <sup>12</sup>.

Fleming desarrolló importantes investigaciones en los campos de la bacteriología, la quimioterapia y la inmunología. En 1945 compartió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina con los científicos británicos Howard Walter Florey y Ernst Boris Chain por sus contribuciones al desarrollo de la penicilina.

**Definición de antibiótico:** Se denomina antibiótico (del griego, anti, 'contra'; bios, 'vida'), a los compuesto químico, que sirven para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Estas moléculas poseen toxicidad selectiva a los microorganismos invasores. La era de la penicilina se inicia con la penicilina y ha sido empleado para tratar múltiples enfermedades infecciosas, como la sífilis, la gonorrea, el tétanos o la escarlatina. En un principio, el término antibiótico sólo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos que resultaban tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar también compuestos sintéticos o semi-sintéticos. La principal categoría de antibióticos son los antibacterianos, pero se incluyen los fármacos antiprotozoos y antivirales.

**Historia de los antibióticos:** El concepto de tratamiento de las infecciones por compuestos orgánicos data de la antigüedad, pero su mecanismo de acción de los antibióticos recién se dilucidó en el siglo XX. Los extractos vegetales de uso medicinales y también el uso ciertos hongos que crecen en ciertos quesos para el tratamiento tópico de las infecciones. Fue el químico francés Louis Pasteur quien observó el efecto antibiótico en el siglo XIX cuando al descubrir que algunas bacterias saprofitas podían destruir gérmenes del ántrax. Por los años 1900, el bacteriólogo alemán Rudolf von Emmerich aisló una sustancia, capaz de destruir *in vitro* al *Vibrio cholerae* y al agente causal de la difteria, pero no así *in vivo*.

En la primera década del siglo XX, el físico y químico alemán Paul Ehrlich se involucró en la síntesis de compuestos orgánicos que pudieran combatir las infecciones sin perjuicio para el huésped. Posteriormente sus esfuerzos sirvieron para el desarrollo del salvarsán

(1909), usado contra las espiroquetas de la sífilis. Posteriormente fue sustituido por la penicilina en la década de 1940.

En 1922 descubrió la lisozima, un antiséptico natural aislado de las lágrimas, secreciones corporales, la albúmina y ciertas plantas, esta sustancia presentaba una intensa actividad antimicrobiana, principalmente frente a bacterias no patógenas. Fleming descubrió de forma accidental la penicilina en 1928 como un derivado del hongo *Penicillium notatum*. Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos.

La tirotricina fue aislada de ciertas bacterias del suelo por el bacteriólogo americano René Dubos en 1939; fue el primer antibiótico utilizado en enfermedades humanas. Se emplea para el tratamiento de ciertas infecciones externas, ya que es demasiado tóxico para su utilización general. Los antibióticos producidos por un grupo diferente de bacterias del suelo denominadas actinomicetos han resultado más eficaces. La estreptomycinina pertenece a este grupo, descubierta en 1944 por el biólogo americano Selman Waksman y colaboradores; es efectiva en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas, incluida algunas, contra la que la penicilina no es eficaz, como la tuberculosis.

En la década de 1950 se generaliza el empleo de los antibióticos y cambio de forma radical el panorama de las enfermedades. Enfermedades infecciosas que habían sido la primera causa de muerte, como la tuberculosis, la neumonía o la septicemia, son mucho menos graves en la actualidad. También ha mejorado los resultados de las cirugías al prevenir las infecciones y prevenir el riesgo de las mismas.

Se emplean igualmente en el tratamiento y prevención de infecciones por protozoos especialmente la malaria (una de las principales causas de muerte en los países en desarrollo) y también el tratamiento de las micosis no siendo tan notorio su éxito en el tratamiento de las infecciones virales. Pero la resistencia a los antibióticos obliga a la continua búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana <sup>12</sup>.

## 2.1.3.5 ENSAYOS ANTIMICROBIANOS

### 2.1.3.5.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN

#### 2.1.3.5.1.1 MÉTODO DEL ANTIBIOGRAMA DISCO - PLACA

**Fundamento:** El antibiograma disco-placa basado en el método de Kirby y Bauer es uno de los métodos recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este método consiste en hacer una siembra por diseminación con la bacteria de prueba, luego la sustancia de prueba, se deposita en unos discos de papel secante, los mismo que luego de 5 minutos de haber dejado secar la siembra se depositan equidistantes unos de otros sobre la superficie húmeda del agar. El disco rápidamente se humedece y la sustancia de prueba comienza a difundir de forma radiada por el agar dejando un gradiente de concentración <sup>44</sup>.

La placa se deja en incubación de 18 a 24 horas, al cabo de ese tiempo se busca visualizar una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y es muy cercana a la concentración mínima inhibitoria (CMI) que bien se puede obtener por métodos de dilución, concentración que no es posible leer en la placa-disco. Para cuantificarla, hay que determinar previamente la CMI con varias cepas conocidas, las cuales ya se les ha terminado la CMI a diferentes antibióticos por el método de dilución <sup>44</sup>.

Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición <sup>44</sup>.

La determinación de la CMI de una cepa se obtiene de medir el halo de inhibición en mm y luego por extrapolación se encuentra la CMI en el gráfico. Existen, datos estandarizados del diámetro de inhibición para cada antimicrobiano. La interpretación de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS <sup>44</sup>.

### **Indicaciones y limitaciones**

El antibiograma es un análisis rutinario del laboratorio clínico cuando se requiere conocer la sensibilidad de la bacteria aislada a partir de una muestra de un proceso infeccioso. Este análisis es determinante en caso de que la bacteria muestre resistencia a los antimicrobianos de prescripción habitual. Esta prueba de sensibilidad también son usadas en estudios epidemiológicos, para contar con un primer marcador epidemiológico disponible. El método de disco-placa es rápido, fácil y barato especialmente para bacterias aerobias, no exigentes de crecimiento rápido como son las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. También con ligeras modificaciones puede usarse para *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* spp<sup>44</sup>.

#### **2.1.3.5.2 MÉTODOS DE DILUCIÓN**

**Fundamento:** Los métodos de dilución permiten cuantificar *in vitro* la sensibilidad a los antimicrobianos. Estos métodos permiten manejar una gradiente de concentración en las cuales se determina el crecimiento de las bacterias diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones emplean un sistema de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Estos métodos son más engorrosos, complejos y más caros, frente a la simplicidad de los métodos en placa que permite evaluar la sensibilidad de un gran número de bacterias en un mínimo de tiempo.

La era de las micropipetas y de placas de microtitulación permitió el desarrollo de método de microdilución con caldo; actualmente se cuenta con métodos automatizados comerciales adaptable a una semi automatización de microdilución en caldo que da resultados rápidos pero con costos encarecidos. Tradicionalmente se han venido determinando la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos y sustancias de prueba. Suele preparan diluciones del antimicrobiano sustancia de prueba en progresión geométrica en base 2, usando como diluyente un caldo de cultivo adecuado y luego de la incubación se determina a qué concentración se da la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un sub-cultivo en medio sin

antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.

**Indicaciones y limitaciones:** Los métodos de dilución son referentes en la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. La variabilidad del método depende del microorganismo, el medio de cultivo y el inóculo, variables responsables de las oscilaciones en el resultado, de manera que se necesita estandarizar el método. Los valores de la CMI reales de la sustancia de prueba se ubica entre valor la CMI experimental obtenida y la concentración inmediata inferior. La diferencia entre el valor real y experimental de la CMI no es relevante cuando se trata de concentraciones bajas, más si lo es en concentraciones altas que se acercan a las concentraciones alcanzables *in vivo* <sup>44</sup>.

## **2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES**

### **2.2.1. VARIABLES**

#### **2.2.1.1. Variable Independiente**

La actividad antibacteriana resultante.

#### **2.2.1.2. Variable Dependiente**

Combinaciones de extractos acuosos de especies vegetales (*Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata Ly* *Lupinus mutabilis sweet*) a diferentes concentraciones.

### **2.2.2. INDICADORES**

#### **2.2.2.1. Indicadores de la variable independiente**

- Las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) más filtrado de *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) combinación liofilizada, y exudado del fruto de *Morinda citrifolia L* más el jugo del fruto de *Physalis angulata L* liofilizado.

Concentración baja: 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mg/mL

### **2.2.2.2. Indicadores de la variable dependiente**

- Halo de inhibición producido por los discos de sensibilidad.
- Turbidez del medio de cultivo.

### 2.2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
<p><b>Extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera) + Extracto de <i>Lupinus mutabilis sweet</i>(semilla).</b></p>	<p>Producto de la extracción por decocción de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera) más el filtrado de la trituración de <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semillas), donde fueron mezcladas, congeladas y luego liofilizadas.</p>	<p>Producto obtenido por un proceso de liofilizado de la mezcla del extracto acuoso de <i>Physalis angulata</i> L (planta entera), más el extracto de <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (semillas) para luego ser utilizado en las diluciones respectivas.</p>	<p><i>Physalis angulata</i> L. <i>Lupinus mutabilis sweet</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Physalis angulata</i> L + <i>Lupinus mutabilis sweet</i> (1:1)</li> </ul> <p><b>Método de Difusión en Disco:</b> Concentración: 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mg/mL</p> <p><b>Método de Macrodilución:</b> CMI: 0 y CMB: 0</p>	<p><b>Medición:</b> Intercalar</p> <p><b>Tipo:</b> Cuantitativo.</p>
<p><b>Exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L+ Extracto del jugo de fruto de <i>Physalis angulata</i> L.</b></p>	<p>Producto de la exudación del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L, mezclado con el jugo de los frutos de la <i>Physalis angulata</i>L, donde fueron refrigerados, congeladas y luego liofilizados.</p>	<p>Producto obtenido por un proceso de liofilizado del exudado del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> más la mezcla del jugo del fruto de <i>Physalis angulata</i> L, para luego ser utilizado en las diluciones respectivas.</p>	<p><i>Morinda citrifolia</i>. <i>Physalis angulata</i> L</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Morinda citrifolia</i> + <i>Physalis angulata</i> L (1/7:1/3)</li> </ul> <p><b>Método de Difusión en Disco:</b> Concentración: 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mg/mL</p> <p><b>Método de Macrodilución:</b> CMI: 0 y CMB: 0</p>	

## 2.2.4. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
<b>Actividad antibacteriana de las combinaciones de extractos vegetales</b>	Capacidad de una sustancia cualquiera para inhibir el crecimiento y/o producir la muerte de una o más bacterias.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Sensibilidad bacteriana</b> Grado de susceptibilidad de los microorganismos frente al extracto de la especie vegetal en estudio, con la formación de un halo de inhibición.</li> <li>• <b>Concentración inhibitoria mínima</b> Es la mínima concentración con la cual el extracto de la especie vegetal en estudio es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos.</li> </ul>	<p>Diámetro en milímetros (mm) del halo de inhibición.</p> <p>Presencia de precipitado en el fondo del tubo de ensayo.</p> <p>Turbidez del medio de cultivo.</p>	<p><b>1. Grado de sensibilidad.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivo &lt;40%</li> <li>• Poco activo 40-50%</li> <li>• Moderado activo 51-75%</li> <li>• Buena actividad &gt;76%</li> </ul> <p><b>2. Capacidad inhibitoria.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivo &gt;16mg/ml</li> <li>• Poco activo 6-15mg/ml</li> <li>• Moderado activo 1-5mg/ml</li> <li>• Buena actividad &lt;1mg/ml</li> </ul>	<p>Intercalar</p> <p>Tipo cuantitativo.</p>

# CAPITULO

## III

### **3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1.1 TIPO DE ESTUDIO**

- Correlacional: Se relaciona las concentraciones de la variable dependiente con las concentraciones de las combinaciones de los extractos de los grupos experimentales y de control.
- Prospectivo: El registro de información se tomaron en cuenta a partir de la fecha de aprobación del estudio.

### **3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Experimental: Se manipulo la concentración en cada tubo, obteniéndose diferentes concentraciones para ser investigadas en su actividad antibacteriana.

1. Se obtuvo los extractos acuosos de las siguientes combinaciones vegetales: exudado del fruto de *Morinda citrifolia L* (noni), más el jugo del fruto *Physalis angulata L*. Y extracto acuoso de la planta entera de *Physalis angulata L* más extracto de la semilla de *Lupinus mutabilis sweet* y posteriormente se evaluó la actividad antibacteriana frente a las cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, y *Staphylococcus aureus*, utilizando los métodos de difusión en disco y de dilución en caldo.
2. Se evaluó la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, y *Staphylococcus aureus* utilizando los métodos de difusión en disco y de dilución en caldo.

### **3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.3.1. Población vegetal**

Constituida por el conjunto de plantas de *Morinda citrifolia L* “noni”, *Physalis angulata L* “bolsa mullaca”, *Lupinus mutabilis sweet* “tarwi o chocho”

### **3.3.2. Muestra vegetal**

- 50 mL del extracto acuoso de la planta entera de *Physalis angulata* L “bolsa mullaca”
- 50 mL del filtrado de las semillas de *Lupinus mutabilis* sweet “tarwi o chocho”
- 70 mL de exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L “noni”
- 30 mL de jugo del fruto de *Physalis angulata*L “bolsa mullaca”

### **3.3.3. Criterios de inclusión**

- Plantas sanas bien conservadas
- Plantas libre de excremento animal.

### **3.3.4. Criterios de exclusión**

- Plantas infestadas por microorganismos.
- Plantas secas o en mal estado de conservación.
- Plantas con resto de excremento animal.

### **3.3.5. Población bacteriana**

El estudio se realizará en cepas bacterianas de, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

### **3.3.6. Muestra bacteriana**

Colonias bacterianas que se emplearán para la preparación del inoculo bacteriano.

### **3.3.7. Criterios de inclusión**

- Colonias que reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- Colonias con resultado positivo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.

### **3.3.8. Criterios de exclusión**

- Colonias que no reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- Colonias con resultado negativo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.
- Colonias con presencia de contaminantes.

## **3.4. MÉTODO**

### **3.4.1. Método de difusión en medio sólido**

#### **3.4.1.1. Prueba de sensibilidad**

- Grupos experimentales: Extracto acuoso del exudado de *Morinda citrifolia* L “noni”, más el jugo del fruto de *Physalisangulata*L “bolsa mullaca” y el extracto acuoso de la planta entera más el filtrado de las semillas del *Lupinus mutabilis* sweet “tarwi o chocho” en diferentes concentraciones.
- Grupo control: Gentamicina 10µg.

#### **3.4.1.2. Concentración inhibitoria mínima**

- Grupos experimentales: Tubos que contengan el extracto acuoso en combinaciones.
- Grupo control: Tubo que contengan solo el medio de cultivo.

### **3.4.2. Preparación de la especie vegetal**

#### ***Morinda citrifolia* L “noni”**

- Se usó el fruto de la planta.
- Se seleccionó 80 frutos con un peso total de 12 kg.
- Se cortó en pequeños fragmentos.
- Luego se puso los fragmentos en baldes para desecación por un lapso de 1 mes.
- El exudado obtenido se guardó en matraces para su utilización posterior.

### *Physalis angulata* L “bolsa mullaca”

- Se usó la planta entera.
- Se seleccionó los frutos en un recipiente para su respectivo uso
- Luego se separó la planta entera y se secó al medio ambiente x 5 días.
- Después del tiempo de secado se cortó en fragmentos muy pequeños, para luego ser utilizado.

### *Lupinus mutabilis sweet* “tarwi o chocho”

- Se usó las semillas de la planta.
- Se seleccionó 385 semillas sanas para obtener un peso de 100 gr.
- luego se pulverizó, haciendo uso de una licuadora de cuchillas de acero inoxidable.
- Asimismo, se dejó en remojo por 24 horas.
- Pasado el tiempo se filtró la muestra y se guardó en un vaso precipitado.

#### 3.4.2.1. Preparación de extractos acuosos

### *Morinda citrifolia* L “noni”

La preparación del extracto se llevó a cabo mediante la obtención del exudado de los frutos de la planta en un recipiente limpio; es decir se desinfectó los frutos con agua destilada y lejía en una bandeja, después se cortó todos los frutos en pequeños fragmentos; tardó aproximadamente 1 mes de tiempo para la obtención del exudado de noni (macerado); obtenido el extracto se procedió a filtrar la muestra por medio de embudos con algodón y papel filtro en un matraz, obteniendo aprox. 5 litros de la muestra; que luego se sacó la cantidad suficiente para su posterior utilización.

### *Physalis angulata* “bolsa mullaca”

**La planta entera**, se llevó a cabo mediante la cocción triturada (máquina de moler) de 100 gr de la planta entera en 1000 mL de agua destilada una temperatura entre 70-80 °C durante dos horas; es decir, primero se realizó el secado con las muestras trituradas a una temperatura de 40 a 50 °C, el tiempo del proceso se demoró entre 4 a 6 días, se cortó en

trozos muy pequeños para luego ser molido. Se volvió a pesar la cantidad obteniendo 100gr. de la muestra en un vaso precipitado y luego se mezcló con 1 litro de agua destilada, la solución que se obtuvo después del Baño María fue de 700 mL; Seguidamente el extracto fue filtrado, primero en un algodón y después en papel filtro, utilizando respectivamente embudos y matraces. Las mezclas se concentraron en un rotavapor a 50 °C y a 40 rpm. De esta manera se obtuvo 200 mL del extracto.

**Para el fruto,** se pesó 100 gr de los frutos de *Physalis angulata* (bolsa mullaca) se llevó a una extractora, donde se trituró. Se obtuvo 70 mL del jugo del fruto de *Physalis angulata*.

***Lupinus mutabilis* Sweet** “tarwi o chocho” semillas

La preparación se realizó a partir de la selección de las semillas sanas del *Lupinus mutabilis sweet* “tarwi o chocho”; de las cuales se pesó 100 gr, se trituró (licuadora) y dejamos remojar en 1000 mL de agua destilada en vaso precipitado de 5 litros por 24 horas, después del tiempo transcurrido se filtró solamente el líquido obtenido y el sedimento fue desechado, obteniéndose 600 mL del extracto.

**Liofilizado:** Se consideró para los 4 extractos.

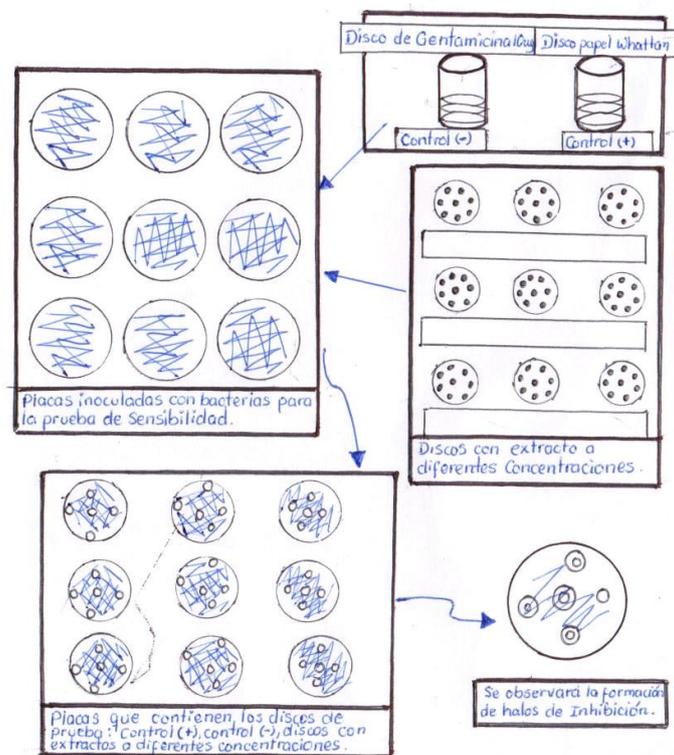
Los extractos concentrados fueron vertidos en bandejas del equipo liofilizador considerando una cantidad 200 mL por bandeja y seguidamente fueron colocados bajo refrigeración entre 20- 40 °C por 24 horas a una presión de 13 pascales por 48 horas.

#### **3.4.2.2. Procedimiento para la Preparación de los Extractos de los Liofilizados:**

- La primera solución fue una mezcla de 70 mL de exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L más 30 mL de jugo del fruto de *Physalis angulata* L, obteniéndose 100 mL de solución, la cual se colocó en un envase de plástico y congelado. Seguidamente fue liofilizado.
- La segunda solución se mezcló 50 mL del extracto de *Physalis angulata* L (planta entera) más 50 mL del filtrado de *Lupinus mutabilis* Sweet, donde se ha obtenido 100 mL y luego se liofilizó.

### 3.4.2.3. Preparación de los extractos a diferentes concentraciones

- Se procedió a hacer el cálculo de las concentraciones para cada extracto a utilizar.
- Se pesó 4 gr. de extracto acuoso liofilizado en 4 mL de agua destilada estéril para obtener la solución stock con una concentración de 1000 mg/mL, en la concentración madre.
- A partir de esta solución stock se preparó las siguientes concentraciones: 500mg/mL, 600 mg/mL, 700/mL, 800 mg/mL y 900 mg/mL.
- Como control positivo se utilizó pozos impregnados con 10µg de Gentamicina, los cuales fueron obtenidos de una casa matriz.
- El control negativo fue 30uL de agua estéril colocado en los pozos llenados.



**Figura 7.** Procedimientos para prueba de disco difusión.

### 3.4.2.4. Recuperación de cultivos conservados

**Descongelamiento:** Las cepas para los ensayos antimicrobianos se descongelaron a temperatura ambiente, luego en baño de agua a 36°C – 37°C por unos minutos. Una vez descongelado se transfirió una alícuota del criotubo a un medio apropiado como agar tripticosa soya.

**Cultivos en agar:** Con asa de siembra estéril rompimos el agar y tomamos una azada y sembramos en medio sólido de tripticasa de soya.

Luego incubamos a 35 – 37°C durante 18 – 24 horas, y antes de utilizarlos realizamos previamente otro subcultivo obteniendo colonias aisladas. El primer cultivo se realizó en tubo por picadura y estría, el segundo cultivo se realizó en placa por estrías simples.

#### **3.4.2.4. Inoculación**

##### **Preparación del inóculo**

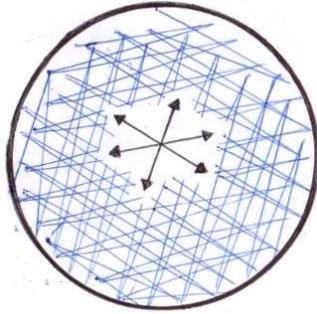
Método de desarrollo previo:

- a. Se seleccionó tres colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en agar TSA.
- b. Se tocó la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfirió a un tubo que contiene de 3 a 4 mL de caldo TSA.
- c. Se incubó el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta que alcanzó la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- d. Se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.
- e. La suspensión preparada contenía aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL.

##### **Inoculación de las Placas**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se deslizó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos, para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.



**Figura 8.** Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar

#### **3.4.2.5. Aplicación de los discos con extractos**

Una vez realizado la siembra del inóculo, se procedió a colocar los disco con extractos de las plantas en estudios, previa rotulación en la base de las placa.

Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 2,5 cm uno del otro y a 1,5 cm del borde la placa. No deberán colocarse más de 11 discos en una placa de 150 mm, ni más de 5 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. El disco no deberá ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunas muestras se difunden rápidamente.

#### **3.4.2.6. Incubación**

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C durante 18 a 24 horas, posteriores a la aplicación de la muestra en disco.

Después del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

#### **3.4.2.7. Lectura de las placas e interpretación de los resultados**

- Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador.
- Se mantuvo iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.
- Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.

- El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio visible, que podrá ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que podrán ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.
- Se consideró como indicadores:
  - ✓ Se mantuvo iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.
  - ✓ Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.
  - ✓ El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio visible, que podrá ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que podrán ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

**Tabla 1.** Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

<b>Actividad antimicrobiana</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
Inactivo	< 40%
Poco activo	40 – 50%
Moderado activo	51 – 75%
Buena actividad	> 76%

**Fuente:** Instituto de Medicina Tradicional-EsSalud. Manual de procedimientos-Protocolo de Investigación (MINSAP). Lima – Perú. (2005) <sup>3</sup>.

### 3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO (MACRODILUCIÓN)

Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición <sup>39</sup>

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diametro de la muestra}}{\text{Diametro de control}} \times 10$$

#### 3.4.3.1. Preparación y almacenamiento de las diluciones

##### 3.4.3.1.1. Método de Dilución en Caldo (macrodilución) <sup>44</sup>.

- Se pesó 4 g del extracto, diluidos en 4 mL de agua estéril para alcanzar una concentración de prueba de 1000 mg/mL (Solución madre o Stock).
- De la solución madre se sacó 1 mL y fue añadido al tubo N° 01 que contuvo 1 mL de caldo Mueller Hinton.
- Del tubo N° 01 se sacó 1 mL para ser añadido al Tubo N° 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N°12.
- Del tubo N° 12 se sacó 1 mL que fue desechado.
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 1 mL de la suspensión bacteriana.
- El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 2 mL.
- Las concentraciones fueron comprendidas entre los rangos de 512 mg/mL a 0,25 mg/mL.

**Tabla 2.** Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración mínima inhibitoria

Actividad Antimicrobiana	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>Inactivo</b>	>16 mg/mL
<b>Poco activo</b>	6 – 15 mg/ml
<b>Moderado activo</b>	1 – 5 mg/ml
<b>Buena actividad</b>	< 1 mg/ml

**Fuente:** Instituto de Medicina Tradicional-EsSalud. Manual de procedimientos-Protocolo de Investigacion (MINSAP). Lima – Perú. (2005) <sup>39</sup>.

**Esquema que muestra los criterios para la lectura del antibiograma según diámetro del halo de inhibición**, el mismo que será tomado en cuenta para la lectura de los cultivos

Esquema DZI frente a Control positivo & Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición

Resistente :	<12 mm	Inactivo :	< 40%
Intermedio:	13 - 14 mm	Pocoactivo :	40 – 50%
Sensible :	> 15 mm	Act. Moderada :	51 – 75%
		Buena actividad :	> 76 %

### **3.5. ASPECTOS ÉTICOS**

El experimento *in vitro* no atenta contra la vida de ningún animal o persona, el material biológico de experimentación son bacterias, este método es de buena sensibilidad. Para el material biológico de prueba de origen vegetal, la cantidad de muestra tomada no atenta contra la vida del individuo, ni mucho menos de la especie, por lo que la presente investigación responde a las normas éticas.

El área de microbiología donde se realizan los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial, que no presenta riesgos de enfermedades infecciosas, para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. También se usaron las barreras de protección personal y se observaron las medidas de bioseguridad de manera estricta.

### **3.6. Plan de análisis e interpretación de datos**

El procesamiento de datos con respecto a las variables de estudio se efectuó mediante Microsoft Excel 2010, los cuales nos permitirán elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular algunos datos estadísticos necesarios para el estudio.

# CAPITULO

## IV

## 4.1. RESULTADOS

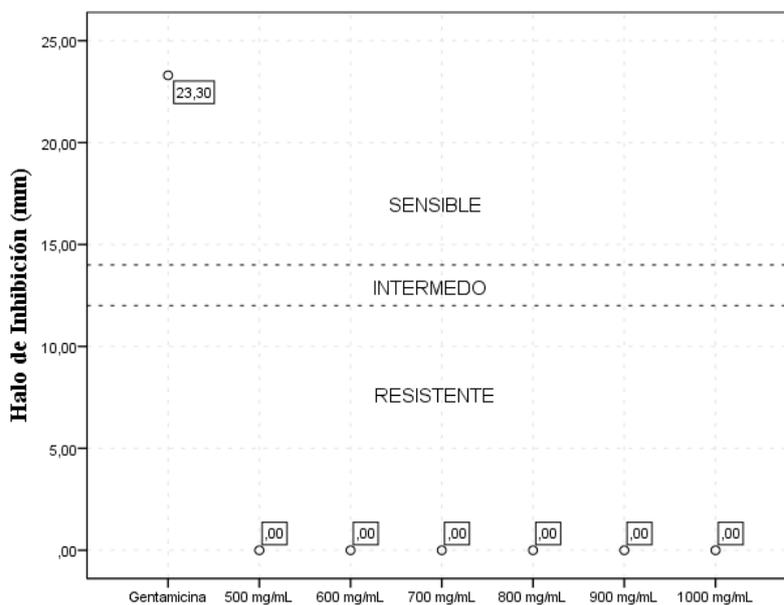
### 4.1.1. Actividad antibacteriana del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L + Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata* L.

**Tabla 3.** Actividad antibacteriana por el método de difusión en disco (Kirby - Bauer), obtenida del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata* L frente a *Staphylococcus aureus*. Según diámetro de la zona de inhibición.

Concentración (mg/mL)	Resultado	Inhibición (%)	Actividad antibacteriana (&)
1000	Resistente	0	Inactivo
900	Resistente	0	Inactivo
800	Resistente	0	Inactivo
700	Resistente	0	Inactivo
600	Resistente	0	Inactivo
500	Resistente	0	Inactivo
Control positivo gentamicina	Sensible		Activo

La tabla 3, muestra que la mezcla del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L+ extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata* L, resultó **inactivo** a las diferentes concentraciones, al no presentar halo de inhibición, en las lecturas del ensayo de difusión en disco frente a *Staphylococcus aureus*.

El control Positivo (Gentamicina 10 µg), obtuvo un promedio de Diámetro de la zona de inhibición (DZI) de 23,3 mm resultado que según parámetros del método de Kirby – Bauer es Sensible (Sensible  $\geq 15$  mm).



**Figura 9.** Categorización del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L* + Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.

La figura 9, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* y del control positivo Gentamicina 10 µg con un diámetro de inhibición de 23,3mm categoriza como **sensible**, respecto al diámetro de la zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*. Bacteria que no mostraron halos de inhibición, por lo cual se categoriza como **resistente**.

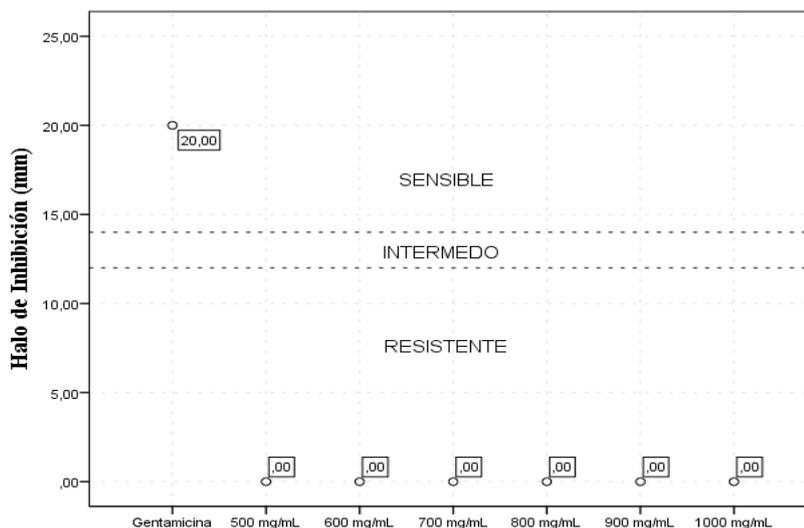
#### 4.1.1.1.1. Actividad Antibacteriana Frente a *Enterococcus faecalis*.

**Tabla 4 .** Actividad antibacteriana obtenida del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Enterococcus faecalis*. Según Diámetro de la zona de inhibición.

Concentración (mg/mL)	Kirby – Bauer	Inhibición (%)	Actividad antibacteriana (&)
1000	Resistente	0	Inactivo
900	Resistente	0	Inactivo
800	Resistente	0	Inactivo
700	Resistente	0	Inactivo
600	Resistente	0	Inactivo
500	Resistente	0	Inactivo
Control Positivo Gentamicina	Sensible		Activo

La Tabla 4, muestra que la mezcla del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L+ extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata* L, resultó **inactivo** a las diferentes concentraciones, al no presentar halo de inhibición, en las lecturas del ensayo de difusión en disco frente a *Enterococcus faecalis*.

El control Positivo (Gentamicina 10 µg), obtuvo un promedio de Diámetro de la zona de inhibición (DZI) de 20,0 mm resultado que según parámetros del método de Kirby – Bauer es Sensible (Sensible  $\geq 15$  mm).



**Figura 10.** Categorización del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia* L+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata* L frente a *Enterococcus faecalis* según Diámetro de la zona de inhibición.

La Figura 10, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* y del control positivo Gentamicina 10 µg con un diámetro de inhibición de 20,0mm categoriza como **sensible**, respecto al diámetro de la zona de Inhibición (DZI) frente a *Enterococcus faecalis*. Bacteria que no mostraron halos de inhibición, por lo cual se categoriza como **resistente**.

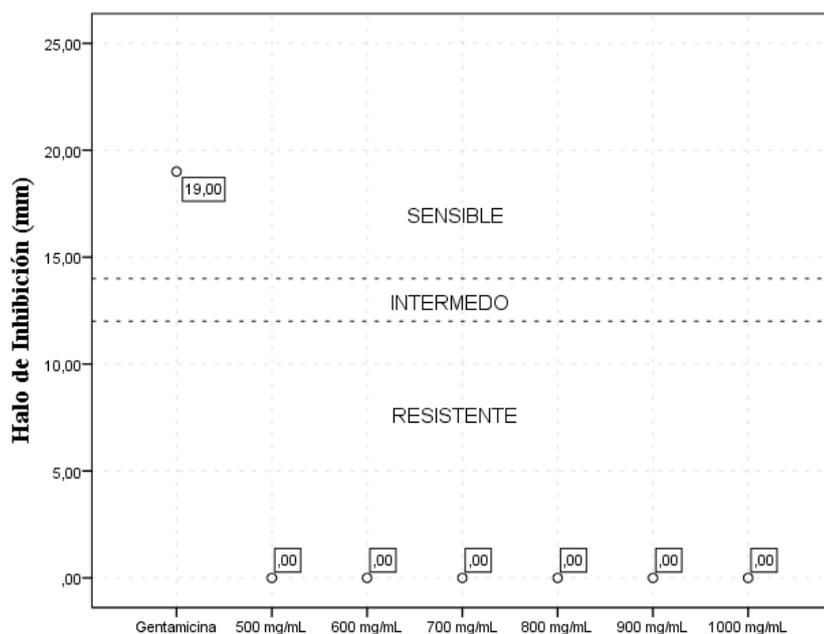
#### 4.1.1.1.2. Actividad Antibacteriana frente a *Escherichia coli*.

**Tabla 5.** Actividad antibacteriana obtenida del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Escherichia coli*. Según diámetro de la zona de inhibición.

Concentración (mg/mL)	Kirby – Bauer	Inhibición (%)	Actividad antibacteriana (&)
1000	Resistente	0	Inactivo
900	Resistente	0	Inactivo
800	Resistente	0	Inactivo
700	Resistente	0	Inactivo
600	Resistente	0	Inactivo
500	Resistente	0	Inactivo
Control Positivo Gentamicina	Sensible		Inactivo

La tabla 5, muestra que la mezcla del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L*, resultó **inactivo** a las diferentes concentraciones, al no presentar halo de inhibición, en las lecturas del ensayo de difusión en disco frente a *Escherichia coli*.

El control Positivo (Gentamicina 10 µg), obtuvo un promedio de diámetro de la zona de inhibición (DZI) de 19,0 mm resultado que según parámetros del método de Kirby – Bauer es Sensible (Sensible  $\geq 15$  mm).



**Figura 11.** Categorización del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Escherichia coli* según diámetro de la zona de inhibición.

La figura 11, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* y del control positivo Gentamicina 10 µg con un diámetro de inhibición de 19,0mm que categoriza como **sensible**, respecto al diámetro de la zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*. La bacteria mostraron DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como **resistente**.

#### 4.1.1.2. Método de Difusión en Caldo: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

##### 4.1.1.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

**Tabla 6.** Concentración Inhibitoria Mínima (CMI), del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Staphylococcus aureus*.

N° Dilución	Concentración extracto	Observación
C1	96 mg/mL	Presenta turbidez
C2	48 mg/mL	Presenta turbidez
C3	24 mg/mL	Presenta turbidez
C4	12 mg/mL	Presenta turbidez
C5	6 mg/mL	Presenta turbidez
C6	3 mg/mL	Presenta turbidez
C7	1.5 mg/mL	Presenta turbidez
C8	0,75 mg/mL	Presenta turbidez

La tabla 6, muestra que la mezcla del medio de cultivo con Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L*, presentó turbidez, es decir hubo crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Por lo que, no se pudo determinar la CMI.

**Tabla 7.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Exudado del fruto de *Morinda citrifoliaL*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L*frente a *Enterococcus faecalis*.

N° Dilución	Concentración extracto	Observación
C1	96 mg/mL	Presenta turbidez
C2	48 mg/mL	Presenta turbidez
C3	24 mg/mL	Presenta turbidez
C4	12 mg/mL	Presenta turbidez
C5	6 mg/mL	Presenta turbidez
C6	3 mg/mL	Presenta turbidez
C7	1.5 mg/mL	Presenta turbidez
C8	0,75 mg/mL	Presenta turbidez

En la tabla 7, muestra que la mezcla del medio de cultivo con Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L*, presentó turbidez, es decir hubo crecimiento de la bacteria *Enterococcus faecalis*. Por lo que, no se pudo determinar la CMI.

**Tabla 8.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Exudado del fruto de *Morinda citrifolia* + Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Escherichia coli*.

N° Dilución	Concentración extracto	Observación
C1	96 mg/mL	Presenta turbidez
C2	48 mg/mL	Presenta turbidez
C3	24 mg/mL	Presenta turbidez
C4	12 mg/mL	Presenta turbidez
C5	6 mg/mL	Presenta turbidez
C6	3 mg/mL	Presenta turbidez
C7	1.5 mg/mL	Presenta turbidez
C8	0,75 mg/mL	Presenta turbidez

En la tabla 8, muestra que la mezcla del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L*, presentó turbidez, es decir hubo crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. Por lo que, no se pudo determinar la CMI.

#### 4.1.1.2.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

**Tabla 9:** Concentración Bactericida Mínima (CBM) Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.

Especies bacterianas	Clasificación	CBM
<i>S. aureus</i>	gram-positivos	0 mg/mL
<i>E. faecalis</i>	gram-positivos	0 mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	gram-negativos	0 mg/mL

En la tabla 9, se muestra la concentración Bactericida mínima presentada por la acción del Exudado del fruto de *Morinda citrifolia L*+ Extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L* frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*; se evidencia que la mezcla no presentó concentración bactericida mínima.

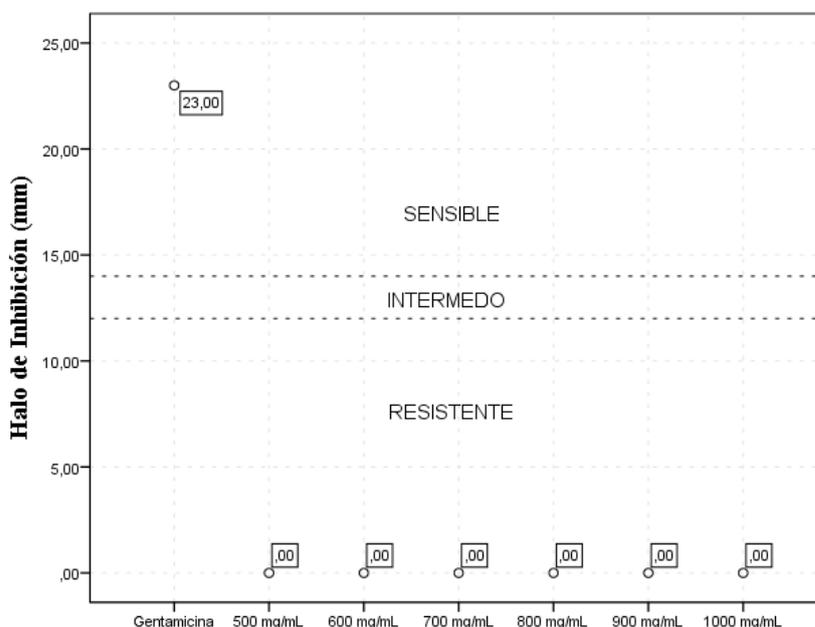
**4.1.1.3. Actividad antibacteriana Extracto Acuoso de *Physalis angulata L*(planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet*(semilla) por el método de difusión en disco (Kirby - Bauer)**

**Tabla 10.** Actividad antibacteriana obtenida del Exudado Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis Sweet* (semilla) frente a *Staphylococcus aureus*. Según diámetro de la zona de inhibición.

Concentración (mg/mL)	Kirby – Bauer	Inhibición (%)	Actividad antibacteriana (&)
1000	Resistente	0	Inactivo
900	Resistente	0	Inactivo
800	Resistente	0	Inactivo
700	Resistente	0	Inactivo
600	Resistente	0	Inactivo
500	Resistente	0	Inactivo
Control Positivo Gentamicina	Sensible		Inactivo

La Tabla 10, muestra que la mezcla del medio de cultivo con Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis Sweet* (semilla) resultó inactivo a las diferentes concentraciones, al no presentar halo de inhibición, en las lecturas del ensayo de difusión en disco frente a *Staphylococcus aureus*.

El control Positivo (Gentamicina 10  $\mu$ g), obtuvo un promedio de Diámetro de la zona de inhibición (DZI) de 23,3 mm resultado que según parámetros del método de Kirby – Bauer es Sensible (Sensible  $\geq$ 15 mm).



**Figura 12.** Categorización del Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet*(semilla) frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.

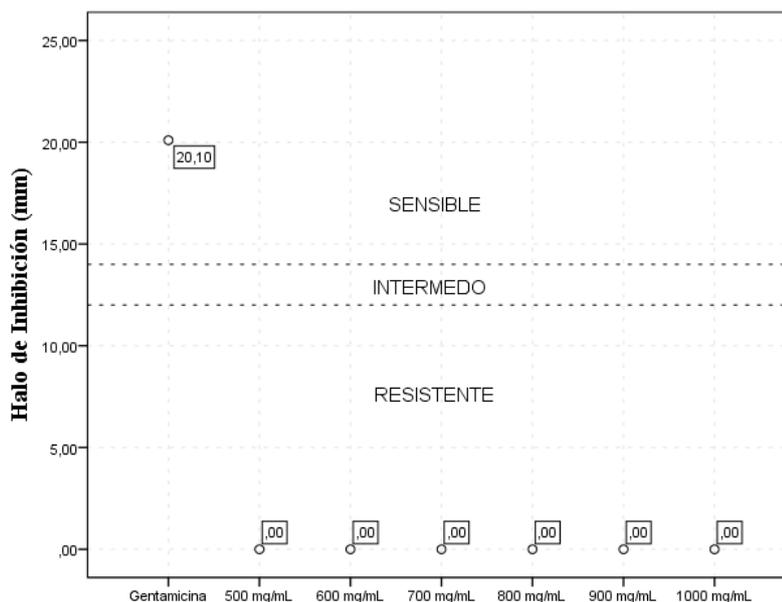
La figura 12, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del Exudado acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) y del control positivo Gentamicina 10  $\mu$ g con un diámetro de inhibición de 23,3mm que categoriza como **sensible**, respecto al diámetro de la zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*, bacteria que no mostrará halos de inhibición, por lo cual se categoriza como **resistente**.

**Tabla 11.** Actividad antibacteriana obtenida del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L(planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Enterococcus faecalis*. Según Diámetro de la zona de inhibición.

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Kirby – Bauer</b>	<b>Inhibición (%)</b>	<b>Actividad antibacteriana (&amp;)</b>
1000	Resistente	0	Inactivo
900	Resistente	0	Inactivo
800	Resistente	0	Inactivo
700	Resistente	0	Inactivo
600	Resistente	0	Inactivo
500	Resistente	0	Inactivo
Control Positivo Gentamicina	Sensible		Inactivo

La Tabla 11, muestra que la mezcla del medio de cultivo con Extracto acuoso de *Physalis angulata* L (planta entera) y *Lupinus mutabilis Sweet* (semilla) resultó inactivo a las diferentes concentraciones, al no presentar halo de inhibición, en las lecturas del ensayo de difusión en disco frente a *Enterococcus faecalis*.

El control Positivo (Gentamicina 10 µg), obtuvo un promedio de diámetro de la zona de inhibición (DZI) de 23,3 mm, resultado que según parámetros del método de Kirby – Bauer es Sensible (Sensible  $\geq 15$  mm).



**Figura 13.** Categorización del Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Enterococcus faecalis* según Diámetro de la zona de inhibición.

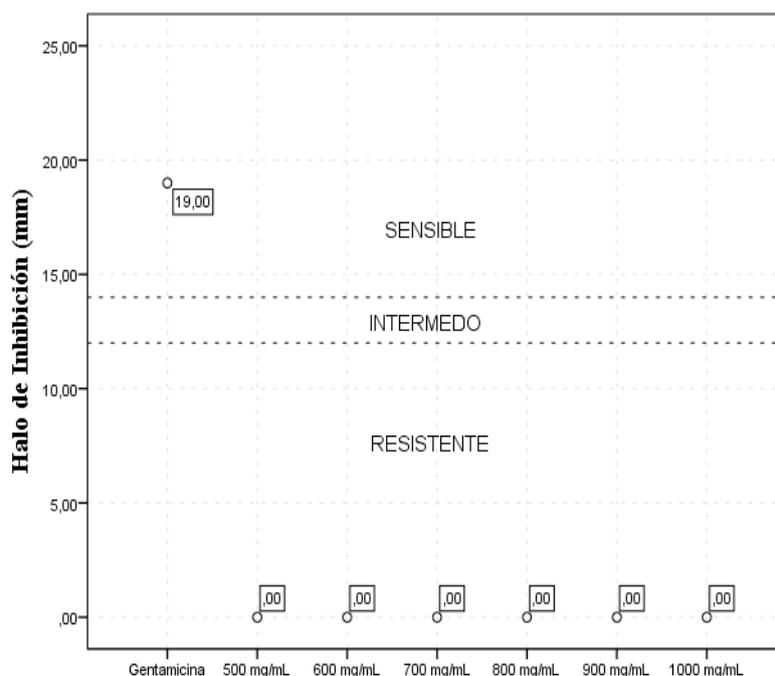
La Figura N° 13, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del Exudado acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) y del control positivo Gentamicina 10 µg con un diámetro de inhibición de 20,0mm que categoriza como **sensible**, respecto al diámetro de la zona de Inhibición (DZI) frente a *Enterococcus faecalis*, bacteria que mostrará valores DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como **resistente**.

**Tabla 12.** Actividad antibacteriana obtenida del Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Escherichia coli*. Según Diámetro de la zona de inhibición.

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Kirby – Bauer</b>	<b>Inhibición (%)</b>	<b>Actividad antibacteriana (&amp;)</b>
1000	Resistente	0	Inactivo
900	Resistente	0	Inactivo
800	Resistente	0	Inactivo
700	Resistente	0	Inactivo
600	Resistente	0	Inactivo
500	Resistente	0	Inactivo
Control Positivo Gentamicina	Sensible		Inactivo

La Tabla 12, se observa que la mezcla no presentó halo de inhibición, además se muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición del control positivo que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de difusión en disco frente a *Escherichia coli*.

El control Positivo (Gentamicina 10  $\mu$ g), obtuvo un promedio de 19 mm. En el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado Sensible según parámetros del método de Kirby – Bauer (Sensible = >15 mm.).



**Figura 14.** Categorización del Extracto acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Escherichia coli* según Diámetro de la zona de inhibición.

La Figura N° 14, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del Exudado acuoso de *Physalis angulata L* (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) y del control positivo Gentamicina 10  $\mu$ g con un diámetro de inhibición de 20,0mm que categoriza como **sensible**, respecto al diámetro de la zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli.*, bacteria que mostrará valores DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como **resistente**.

#### 4.1.1.4. Método de Dilución en Caldo: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

##### 4.1.1.4.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

**Tabla 13.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L (planta entera) y *Lupinus mutabilis* Sweet (semilla) frente a *Staphylococcus aureus*.

N° Dilución	Concentración extracto	Observación
C1	96 mg/mL	Presenta turbidez
C2	48 mg/mL	Presenta turbidez
C3	24 mg/mL	Presenta turbidez
C4	12 mg/ml	Presenta turbidez
C5	6 mg/ml	Presenta turbidez
C6	3 mg/ml	Presenta turbidez
C7	1.5 mg/ml	Presenta turbidez
C8	0.75 mg/ml	Presenta turbidez

En la tabla N° 13, muestra que la mezcla del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L(planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) presentó turbidez, es decir hubo crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*, hecho que no permitió calcular la CMI.

**Tabla 14.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L(planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Enterococcus faecalis*.

Nº DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN EXTRACTO	OBSERVACIÓN
C1	96 mg/ml	Presenta turbidez
C2	48 mg/ml	Presenta turbidez
C3	24 mg/ml	Presenta turbidez
C4	12 mg/ml	Presenta turbidez
C5	6 mg/ml	Presenta turbidez
C6	3 mg/ml	Presenta turbidez
C7	1.5 mg/ml	Presenta turbidez
C8	0.75 mg/ml	Presenta turbidez

En la tabla N° 14, muestra que la mezcla del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L(planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) presentó turbidez, es decir hubo crecimiento de la bacteria *Enterococcus faecalis*, hecho que no permitió calcular la CMI.

**Tabla 15.** Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Escherichia coli*.

Nº DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN EXTRACTO	OBSERVACIÓN
C1	96 mg/ml	Presenta turbidez
C2	48 mg/ml	Presenta turbidez
C3	24 mg/ml	Presenta turbidez
C4	12 mg/ml	Presenta turbidez
C5	6 mg/ml	Presenta turbidez
C6	3 mg/ml	Presenta turbidez
C7	1.5 mg/ml	Presenta turbidez
C8	0.75 mg/ml	Presenta turbidez

En la tabla N° 15, muestra que la mezcla del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L(planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) presentó turbidez, es decir hubo crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*, hecho que no permitió calcular la CMI.

#### 4.1.1.4.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

**Tabla 16.** Concentración Bactericida Mínima (CBM) del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla) frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.

Especies bacterianas	Clasificación	CBM
<i>S. aureus</i>	Gram-positivos	0 mg/mL
<i>E. faecalis</i>	Gram-positivos	0 mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativos	0 mg/mL

En la tabla 16, se muestra la concentración bactericida mínima presentada por la acción del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet*(semilla) frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*; se evidencia que la mezcla no presentó concentración bactericida mínima.

## 4.2. DISCUSIÓN

La mezcla del exudado de *Morinda citrifolia L* y el extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata L*, no presento actividad antibacteriana frente a las cepas en estudio *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Asimismo, en estudios realizados por Rodriguez y Zevallos (2013), donde evaluaron bajo las mismas condiciones el exudado liofilizado del fruto de *Morinda citrifolia L* frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, determinando que fueron inactivas frente a estas cepas,<sup>40</sup> por su parte Osho *et al.* (2010) determinaron que *Bacillus Subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fueron sensibles a los aceites esenciales de las partes aéreas de *Physalis angulata*.<sup>41</sup>

Respecto al extracto de *Physalis angulata L*, Pietro *et al.* (2000) determinaron que el extracto clorofórmico crudo a partir de las partes aéreas presentó buena actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis* y *M. avium*; por su parte Lopes *et al.* (2006) demostró la eficacia del extracto de los frutos de *Morinda citrifolia L* frente a *Staphylococcus aureus*.<sup>26</sup> Rengifo *et al.* (2013), también demostraron las propiedades antibacterianas de los frutos de esta especie vegetal frente a *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*, además determinó que esta especie posee actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Candida Torulopsis*, mientras que el extracto etanólico de las flores también presentaron actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.<sup>28</sup>

Respecto a las asociaciones de extractos con *Physalis angulata L*, estudios realizados por Donkor *et al* (2012) determinaron que el extracto de frutos de *Physalis angulata* era ineficaz contra *P. aeruginosa* en todas las concentraciones utilizadas, pero eficaz contra *S. aureus* en grados variables. Cuando el extracto de frutos de *Physalis angulata* era asociado a pomada de óxido de zinc fueron sólo ligeramente activas contra *S. aureus* a la concentración más alta, concluyendo que por sí solo el extracto de frutos de *Physalis angulata L*, presentó la actividad inhibidora más alta contra *S. aureus* en todas las concentraciones utilizadas con zonas de inhibición entre 34,5 mm y 50,5 mm, seguido de

una formulación del extracto con base oleaginosa (pomada), con zonas de Inhibición entre 12,8 mm y 20,3 mm.<sup>42</sup>

Debido a que el exudado de *Morinda citrifolia* L presenta buena capacidad antioxidante,<sup>43</sup> se buscó asociar el exudado con el extracto del jugo de fruto de *Physalis angulata* L. Lo expuesto por Donkor et al (2012) nos haría suponer que las asociaciones de compuestos a *Physalis angulata* disminuye la actividad antibacteriana de esta, en este caso al asociar con el exudado de *Morinda citrifolia* L la actividad resultó nula. En la medicina folclórica se usan diversos preparados, aisladamente o en combinaciones, los usos concomitantes de varios preparados pueden generar sinergismo o antagonismo, al asociar estos dos preparados se produce un efecto antagónico.

Se estudió en la asociación del Extracto acuoso de *Physalis angulata* L (planta entera) y *Lupinus mutabilis sweet* (semilla), ya que además del alto contenido proteico de este último, también se ha reportado que posee buena capacidad antiinflamatoria, se ha evidenciado la actividad antiinflamatoria (aguda y subcrónica) en modelos experimentales, administrándose el extracto de *Lupinus* por vía oral a una dosis de 2000 mg/Kg de peso corporal.<sup>10</sup> Estudios similares desarrollados por Villacrés (2009) determinó que los alcaloides del grano de *Lupinus mutabilis* presenta actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* (con una concentración mínima inhibitoria).<sup>29</sup> Castañeda-Castañeda B. et al (2010) demostraron el efecto antimicrobiano de los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) en cepas de *E. Coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*.<sup>30</sup> Es por ello que se pretendió asociar un extracto con actividad antiinflamatoria y potenciar su actividad antibacteriana con el extracto de frutos de *Physalis angulata*, los resultados obtenidos muestran que la actividad antibacteriana de ambos extractos es anulada cuando se usan en forma conjunta.

En adición, es imperativo descubrir nuevos antimicrobianos o nuevas prácticas que sean eficaces para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes a fármacos. Debido a la riqueza etnofarmacológica en las diversas culturas, en la actualidad se busca, además del estudio individual de las plantas medicinales y sus compuestos, estudiar combinaciones de ellos para observar lo anteriormente mencionado (sinergismo o antagonismo). Olayinka et al (2011) investigaron los resultados sinérgicos cuando el extracto metanólico crudo de la corteza del tallo de *Azelia africana* y los

antibióticos se combinaron contra un grupo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos que han estado implicadas en infecciones. El extracto de *Afzelia africana* mostró actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas compuestas por cepas ambientales y estándar a una concentración de 5 mg / mL. Las CMI de los extractos brutos y los antibióticos variaron entre 1 µg / ml y 5,0 mg / ml. En general, la respuesta sinérgica constituyó aproximadamente el 63,79% de todo tipo de combinaciones de extracto y antibióticos contra todos los organismos de ensayo. Ellos no detectaron antagonismo entre las 176 pruebas realizadas.<sup>11</sup>

### 4.3. CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de las combinaciones vegetales de *Morinda citrifolia* L (noni), *Physalis angulata* L (bolsa mullaca) y *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi o chocho) frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* por método de difusión en disco y dilución en caldo.
- ✓ Se evaluó el porcentaje de inhibición de las combinaciones de extractos acuosos de la planta entera de *Physalis angulata* L, con el extracto de las semillas de *Lupinus mutabilis sweet* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* según el método Disco difusión Kirby Bauer, obteniendo una inhibición del 0%.
- ✓ Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las combinaciones de extractos acuosos de la planta entera de *Physalis angulata* L, con el extracto de las semillas de *Lupinus mutabilis sweet* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* según el método de Macrodilución, observando que los extractos no inhibieron el crecimiento de las bacterias en ninguna dilución.
- ✓ Se evaluó el porcentaje de inhibición del exudado de frutos de *Morinda citrifolia* L con el jugo de frutos de *Physalis angulata*L sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* según el método Disco difusión Kirby Bauer, obteniendo una inhibición del 0%.
- ✓ Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* L con el jugo de frutos de *Physalis angulata*L sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* según el método de Macrodilución, observando que los extractos no inhibieron el crecimiento de las bacterias en ninguna dilución.

#### 4.4. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda estudiar más asociaciones de extractos cuya actividad haya sido demostrada frente a bacterias patógenas y hongos.
- ✓ Se recomienda realizar ensayos de actividad antibacteriana en extracto hidroalcohólico del exudado del fruto y otras partes de la especie de *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L*, *Lupinus mutabilis sweet*. Asimismo usar otras especies de cepas bacterianas.
- ✓ Realizar pruebas toxicológicas del exudado del fruto y otras partes de la especie de *Morinda citrifolia L*, *Physalis angulata L*, *Lupinus mutabilis sweet*.
- ✓ Realizar evaluaciones fitoquímicos adecuados de las especies utilizadas en el presente trabajo de investigación, para identificar la molécula que probablemente poseen la actividad antibacteriana.
- ✓ Los ensayos de dilución presenta el grave problema de la dificultad para detectar contaminaciones del medio de cultivo, lo que podría producir una falsa resistencia, por lo que se recomienda mantener las condiciones de esterilidad durante el ensayo.

#### 4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrow L. 2004. Capacidad Antibiótica de Aceites Esenciales empleados en Aromaterapia. Microbiología general, 3ª edición, México D.F. Págs. 753-754
2. Consejo de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. 2000. “Declaración de la Agrupación Farmacéutica Europea (PGEU). Control de los antibióticos”. Farmacéuticos. Pág. 237.
3. Kumar A. 1997. “Microbial resistance to drugs – a Universal Problem in Urgent need of a Comprehensive Approach”. NatlMed J India 10 (5): 221-4
4. Zohary, Daniel and Hopf, Maria. Domestication of plants in the Old World, third edition (Oxford: University Press, 2000), Pág. 197.
5. *Lehoux, Daryn (2003). «Tropes, Facts, and Empiricism» Perspectives on Science. Vol. 11. pp. 326–345. DOI 10.1162/106361403773062678.*
6. Sacsa Quispe Contreras, Rosa Elena; Velásquez Pomar, Jorge. 2002. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Instituto Nacional de Salud. Pág. 67
7. Instituto Nacional de Salud. Reporte de las principales enfermedades infecciosas en el Perú. INS (Lima) 2007. 15 pp.
8. Peña A, Paco O. medicina Alternativa: Intento de Análisis. AnFacMed (Lima) 2007; 68 (01): 87 – 96.
9. Reference Service Health Canada. February 2009. It’s yourhealth. Págs. 16-17
10. Castañeda et al. EFECTO ANALGÉSICO DEL LUPINUS MUTABILIS S (CHOCHO) COMPARADO CON MORFINA. Cultura: Lima (Perú) 27: 243-254, 2013.
11. Olayinka A., Adekanmi A., Sunday O., David A., Anthony O. actions of Antibiotics and Methanolic Crude Extracts of Afzelia Africana (Smith.) Against Drug Resistance Bacterial Isolates. Int J Mol Sci. 2011; 12(7): 4477–4503.
12. Su BN1, Pawlus AD, Jung HA, Keller WJ, McLaughlin JL, Kinghorn AD. Chemical constituents of the fruits of Morinda citrifolia (Noni) and their antioxidant activity. J Nat Prod. 2005 Apr;68(4):592-5.
13. Critchley, I. A., Blosser-Middleton R. S., Jones, M. E., Thornsberry, C., Sahm, D. F., y Karlowsky, J. A. 2003. Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. Antimicrob Agents Chemother. 47:1689-1693.

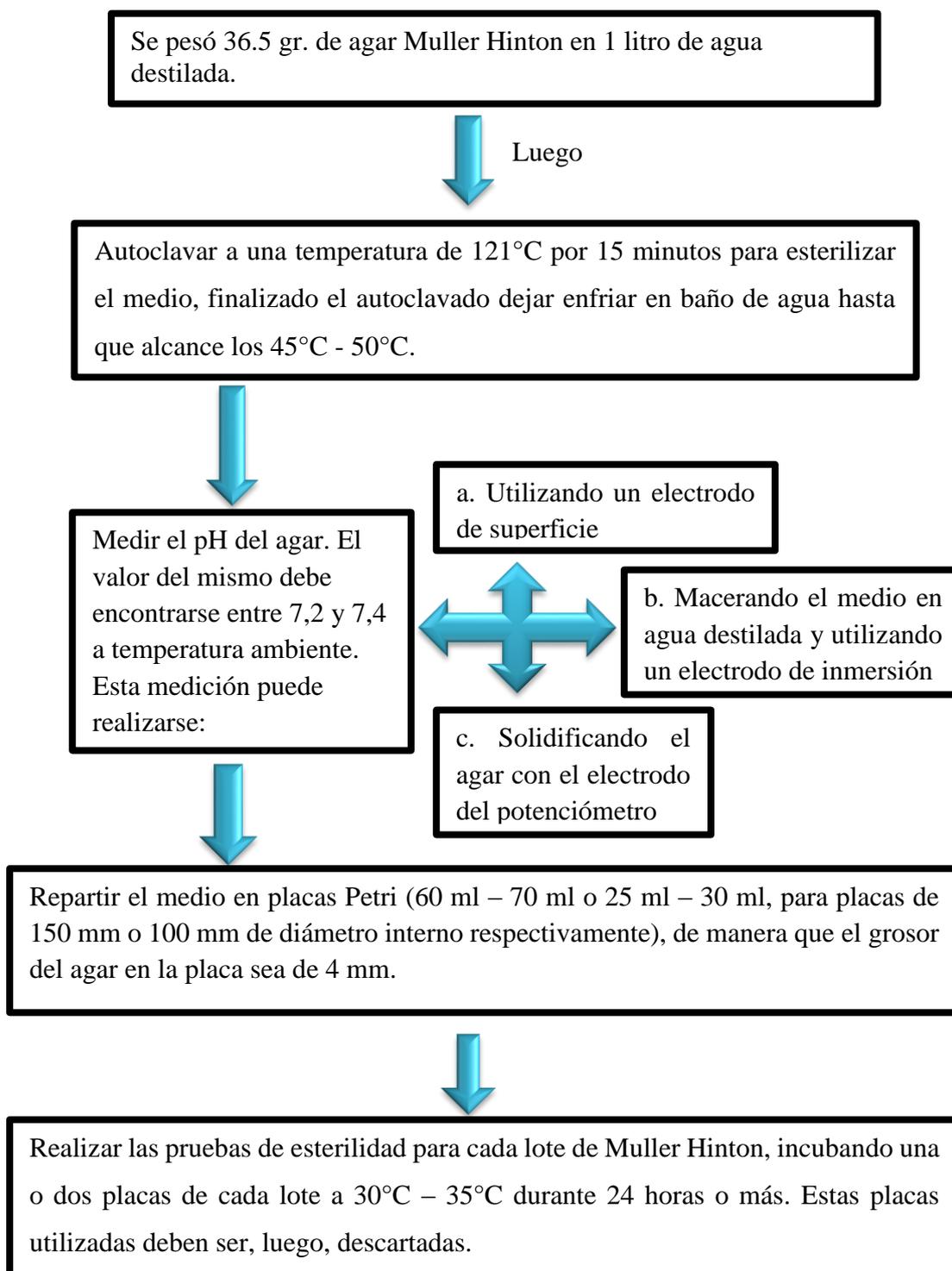
14. Dartois, V., Sanchez-Quezada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., Granja, J., Gritzen, C., Weinberger, D., Reza-Ghadiri, M., y Parr, T. R. Jr. 2005. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3302-3310.
15. Dryla, A., Prustomersky, S., Gelbmann, D., Hanner, M., Bettinger, E., Kocsis, B., Kustos, T., Henics, T., Meinke, A., y Nagy, E. 2005. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *ClinDiagnLabImmunol.* 12:387-398.
16. Cooper, B.S., Medley, G. F., Stone, S. P., Kibbler, C. C., Cookson, B. D., Roberts, J. A., Duckworth, G., Lai, R., y Ebrahim, S. 2004. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. *ProcNatlAcadSci USA.* 101:10223-10228.
17. Jacqueline, C., Caillion, J., Le Malbecque, V., Miègeville, A.-F., Donnio, P.-Y., Bugnon, D., y Potel, G. 2003. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J. AntimicrobChemother.* 51:857-864.
18. Jacqueline, C., Navas, D., Batard, E., Miegerville, A. F., Le Mabecque, V., Kergueris, M. F., Bugnon, D., Potel, G., y Caillon, J. 2005. In vitro and in vivo synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.*49:45-51.
19. INEI. Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2012. Lima: Centro de Edición del INEI; 2012.
20. Morinda Citrifolia. Noni. Adaptógenos Internacionales. CMA. 2008. (Fecha de acceso: 02 diciembre 2013). URL disponible en: [www.adaptogeno.com/productos/noni.asp](http://www.adaptogeno.com/productos/noni.asp)
21. Armando J, Rosas P, Ramírez J, Ulloa B. El noni: propiedades, usos y aplicaciones potenciales. *Revista Fuente* Año 4 No. 10 Enero - Marzo 2012. Pág.: 44-49. (Fecha de acceso: 05 Diciembre 2013). URL disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/04-10/5.pdf>.
22. Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., Januario, A. H., & Franca, S. C. (2000). In vitro antimycobacterial activities of *Physalisangulata* L. *Phytomedicine*, 7(4), 335-338.

23. Deise Cristina D.X.P. Lopes, Zaida M.F. Freitas, Elisabete P. Santo. Actividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalisangulata*L. Revista Brasileira de Farmacognosia BrazilianJournalofPharmacognosy. Pág: 16(2): 206-210, Abr./Jun. 2006
24. Rengifo Salgado, E., y Vargas Arana, G. *Physalisangulata* L. (BolsaMullaca): a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 2013. 12(5), 431-445.
25. Villacrés, E.; Peralta, E.; Cuadrado, L.; Revelo, J.; Abdo, S. y Aldaz, R. 2009. Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho (*Lupinusmutabilissweet*). INIAP-ESPOCH-SENACYT. Págs. 6, 8 y 10. Editorial Grafistas, Quito, Ecuador. Pp.
26. Castañeda-Castañeda B, Gamarra-Castillo F., Galán-Loro D., Campos-Cavero J., Díaz-Claudio A, 2010 Efecto Antimicrobiano De Los Alcaloides Del *Lupinusmutabilissweet* “Tarwi” en cepas de E. coli, Klebsiella, Salmonella, y Stafilococosaureus. “Forjando”. Resúmenes de investigaciones. Pág. 21.
27. Jiménez V. 2003. Elaboración de cuatro productos a partir del Noni. Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar el título de ingeniera agrónoma con el grado de licenciatura. Guácima, Costa Rica. Pág.: 4.
28. Gupta M, Santana A. El fruto de noni (*Morindacitrifolia* L.). Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN), Universidad de Panamá. Apartado 0824-00172, Panamá, República de Panamá. Revista de Fitotapia 2012; 12 (1): 45-52. (Fecha de acceso 05 Diciembre 2013). URL disponible en: [www.fitoterapia.net/revista/pdf/RdF12-1\\_Gupta\\_Morinda.pdf](http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RdF12-1_Gupta_Morinda.pdf)
29. Instituto de Medicina Tradicional (IMET). “Plantas medicinales de la amazonia peruana utilizada por curanderos y chamanes con fines anticonceptivos”. Iquitos – Perú. (1997). Pág. 79 y 95.
30. Chiang HC, Jaw SM; et al. “Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro”. Anticancer Research 2007; [02 de mayo 2013]; [Alrededor de 8 páginas]. Disponible desde internet en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S102251292009000300006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S102251292009000300006&script=sci_arttext)
31. Rodríguez E, Rockenbach I, et al. “Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalisperuviana* L.” Ciencia e Tecnol Alimentos 2009; [02 de mayo 2013];

- [Alrededor de 5 páginas]. Disponible desde internet en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071775182010000400007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071775182010000400007&script=sci_arttext).
32. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. [sitio en internet]. Disponible en: [http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist\\_OMS\\_estrategia\\_mundial\\_contra\\_resistencias.pdf](http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf). Consultado: 05 de Setiembre del 2013.
  33. Fórum social mundial. La Amazonía y el Foro Social Mundial. Belem. Brasil. 2009. [sitio en internet]. Disponible en: <http://www.ceam-ong.org/wp-content/uploads/2009/04/la-amazonia-y-el-fsm.pdf>. Consultado: 05 de Agosto del 2013.
  34. Jacobsen, S –E., Mujica, A. (2006).El tarwi (*Lupinus mutabilis sweet.*) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Pág.: 465.
  35. Fuente:Instituto de Medicina Tradicional-EsSalud. Manual de procedimientos-Protocolo de Investigacion (MINSAP). Lima – Perú. (2005).
  36. Rodríguez M., Zevallos F. Actividad antibacteriana in vitro del fruto de Morinda citrifolia L. y planta entera de Notholaena nivea (Poiret) Desv, frente a escherichia coli, staphylococcus aureus y enterococcus faecalis, IMET - EsSalud 2013. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
  37. Osho A, Adetunji T, Fayemi SO, Moronkola DP. Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata* L. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines [Internet]. 2010 [citado 26 de julio de 2017];7(4). Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/56696>
  38. AM Donkor, RLK Glover, JK Boateng, VY Gakpo. *Antibacterial activity of the fruit extract of Physalis angulata and its formulation*. 2012 Journal Home. Vol 1, No 4.
  39. Su BN1, Pawlus AD, Jung HA, Keller WJ, McLaughlin JL, Kinghorn AD. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. J Nat Prod. 2005 Apr; 68(4):592-5.
  40. Instituto Nacional de Salud (INS). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN. Ministerio de Salud. LIMA -2002. Pág.: 13-19; 60-63.
  41. Pinazco J.J. Procedimientos de Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Pág. 4-19. España 2000.

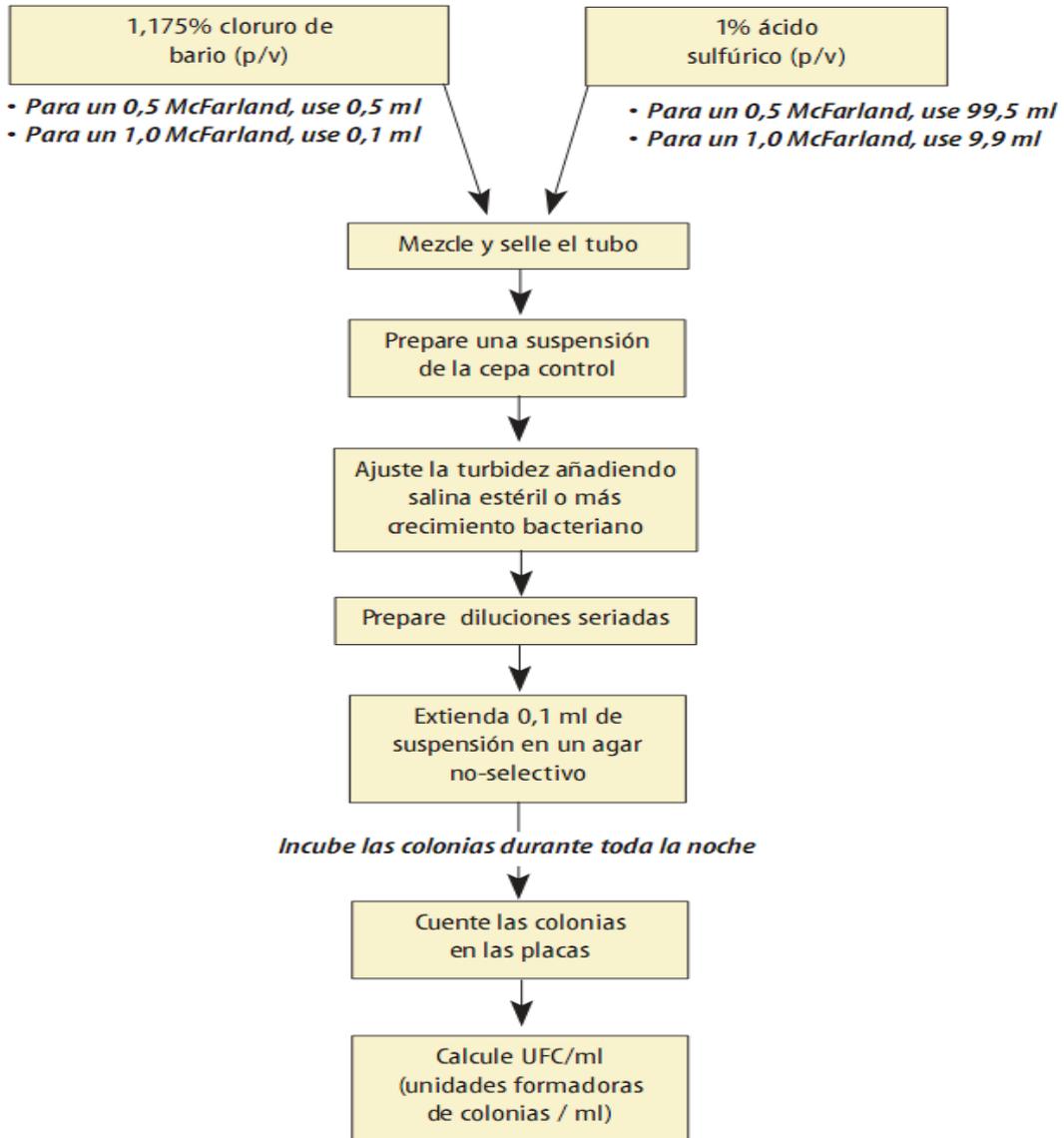
# ANEXOS

## ANEXO N° 01: PREPARACIÓN DEL AGAR MULLER HINTON

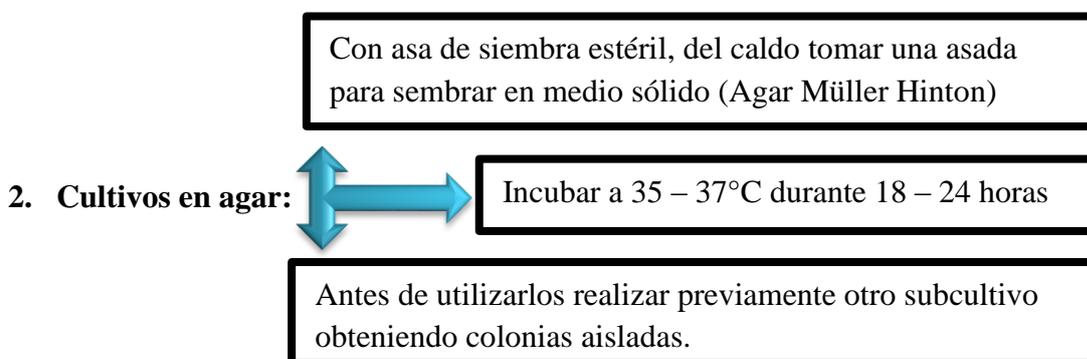
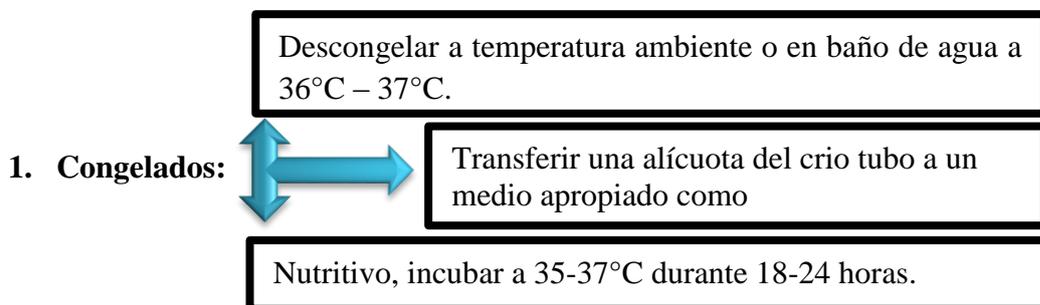


**Fuente:** Instituto Nacional de Salud, Ministerio de salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de normas técnicas n° 30, pp 1:67. Lima – Perú. (2002).<sup>40</sup>

ANEXO N° 02: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN Y EL CONTROL DE CALIDAD DE LA TURBIDEZ ESTÁNDAR DE MC- FARLAND.



## ANEXO N° 03: RECUPERACIÓN DE CULTIVOS CONSERVADOS



**Fuente:** Instituto Nacional de Salud, Ministerio de salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de normas técnicas n° 30, pp 1:67. Lima – Perú. (2002).<sup>40</sup>



ANEXO N° 05: FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS Y LIOFILIZADOS PARA *Physalis angulata L.*



ANEXO N° 06: PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO  
ACUOSO LIOFILIZADO *Physalis angulata* L.

Se procedió a recolectar la muestra de *Physalis angulata* L., para luego llevar a la sala de secada, por un lapso de 48 horas.

Luego:



**Pesamos la planta entera**



**Picado de la planta entera**



**Concentración de la planta entera**



**Picado total de la planta entera**

**Para el fruto;** Se pesó 100 gr. de los frutos de *Physalis angulata* (bolsa mullaca) se llevó a una extractora, se trituró y obtuvimos 70 ml del jugo del fruto de *Physalis angulata*.

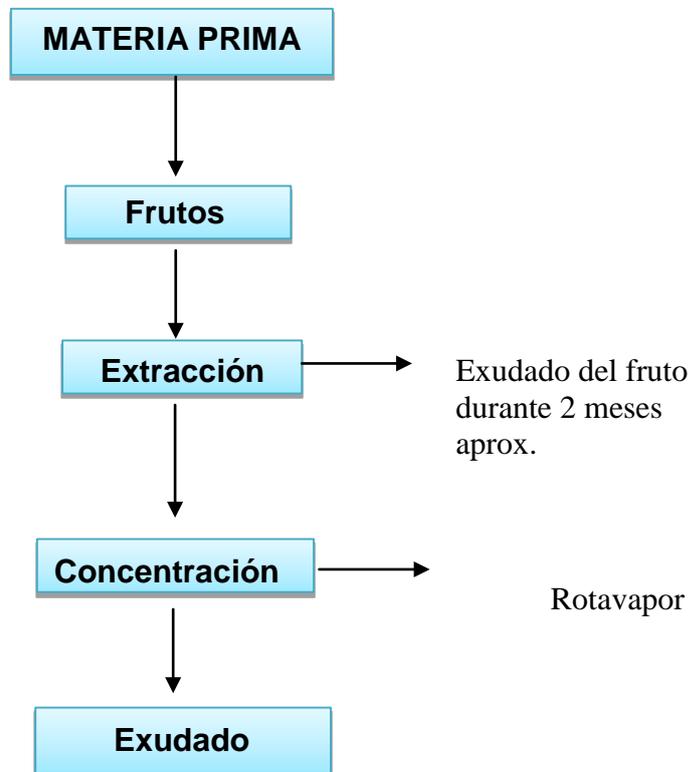


**Filtración del extracto**



**Obtención del extracto**

ANEXO N° 07: OBTENCIÓN DEL EXUDADO DEL FRUTO DE *Morinda citrifolia*  
L.



ANEXO N° 08:PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE *Morinda citrifolia* L.

Frutos de calidad de *Morinda citrifolia* L.



**Exudado de los  
frutos de noni**



**Obtención del  
exudado (5 litros  
de la muestra)**

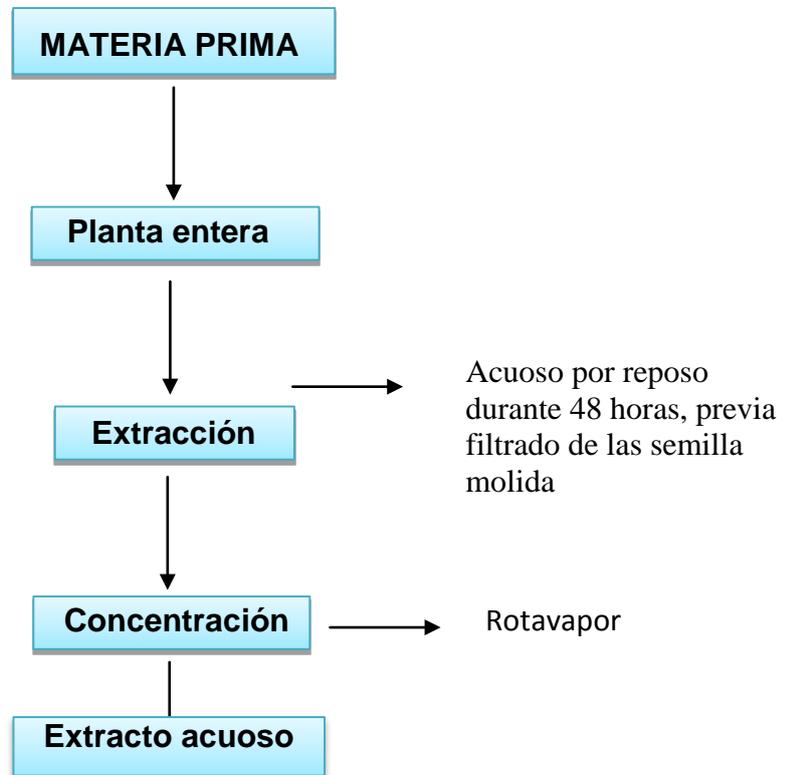


**Obtención del filtrado**



**Filtrado del  
exudado**

ANEXO N° 09: Obtención del extracto Acuoso de la planta de *Lupinus mutabilis sweet*



ANEXO N° 10:PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE  
*Lupinus mutabilis sweet.*



**Granos sanos y de calidad**



**Peso exacto**



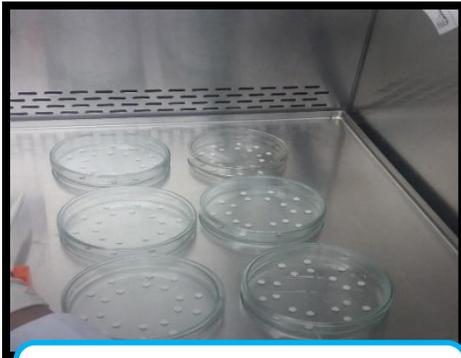
Pasado los días se recolección solo el líquido precipitado se obtuvo 2 litros de la solución extracto deseado.



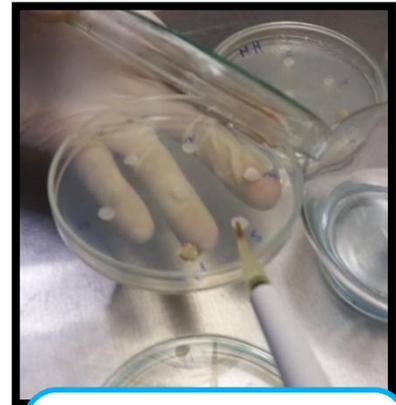
Luego se a triturar en una licuadora, para posteriormente decantar por lapso de 48 horas.

## ANEXO N° 11: PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD

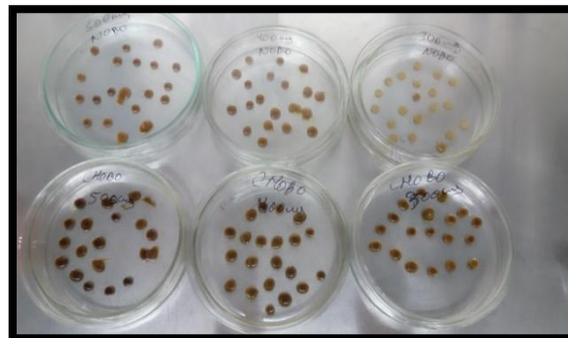
Los discos de sensibilidad se preparó utilizando papel Wattman N° 3 y se empleó un perforador convencional. Estos discos se esterilizaron en autoclave a 121C° en 15 libras de presión por 15 minutos.



**Separación de los discos para la esterilización**



**20 ul de la impregnación de las concentraciones de los extractos**



**Secamiento a 45°C por un espacio de 24 horas.**



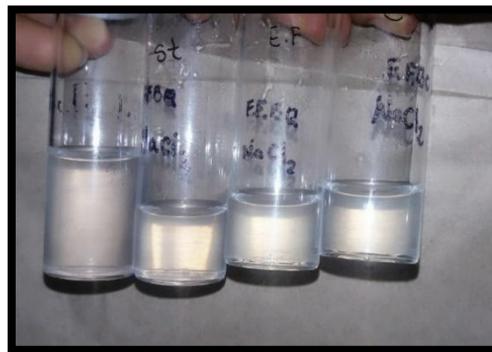
ANEXO N° 12: PRERACION DEL INOCULO



**Activación y Crecimiento de colonias bacterianas en agar M-H**



**Preparación del inculo en tubos de CNa 0.5 % siguiendo el estándar de Mc. Farland**



**Comparación visual con el estándar Mc. Farland**

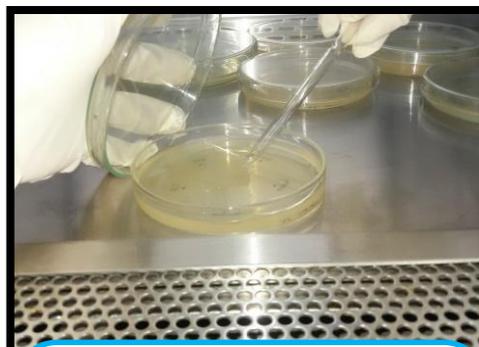


## ANEXO N° 13: PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Bajo condiciones estériles se procedió a:



**Impregnación de las bacterias**



**Siembra con una varilla de vidrio el inoculo bacteriano en placas con agar Mueller Hinton.**



**Incubación las placas a 37°C por 24 horas, en condiciones de aerobiosis.**



**Discos de sensibilidad con los extractos, el disco con el control negativo y el disco con el antibiótico control positivo, sobre la superficie del agar en forma manual con la ayuda de una pinza estéril.**

## ANEXO N° 14: DILUCIÓN DE EXTRACTOS Y APLICACIÓN DE DISCOS

- **Dilución de la combinación vegetal de *Morinda citrifolia* L con *Lupinus Mutabilis Sweet***

Procedimos a diluir las muestras de los extractos vegetales y luego mezclamos las combinaciones.



- **Dilución de la combinación de los extractos vegetal de *Physalis angulata* L (planta entera) *Lupinus mutabilis sweet*.**

Procedimos a diluir las muestras de los extractos vegetales y luego mezclamos las combinaciones.



## ANEXO N° 15: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO Y RESULTADOS

### INCUBACION



Incubación de las placas con los discos de sensibilidad impregnados con el extracto, control negativo y control positivo, en posición invertida a 35°C por 24 horas.

### LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.

No se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro completo), porque no hubo inhibición.



**Staphylococcus aureus**



**Escherichia coli**



**Enterococcus faecalis**

## ANEXO N° 16: METODO DE DILUCIÓN EN CALDO Y RESULTADOS

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO



**Activación y Crecimiento de colonias bacterianas en agar M-H**



**Preparación del inculo en tubos de Cl Na 0.9 % siguiendo el estándar de Mac Farland.**



**Preparación del inculo bacteriano (9,9 ml de caldo Müller Hinton más 0,1 ml de la solución bacteriana)**



**Comparación visual con el estándar Mc. Farland, frente a las bacterias.**

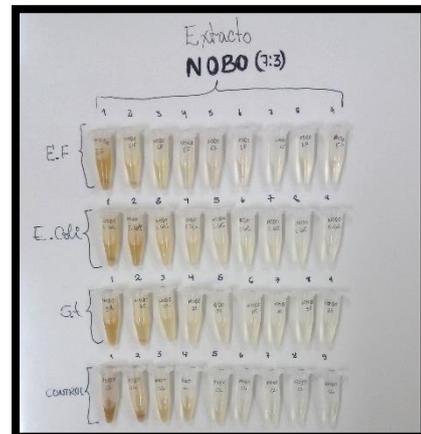
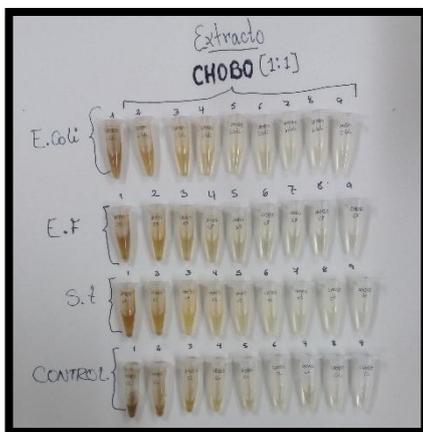


## ANEXO N° 18: INCUBACION DE LOS MICROTUBOS



Incubación de los microtubos con las diluciones del extracto y el inóculo bacteriano, control positivo, control negativo a 35°C por 24 horas.

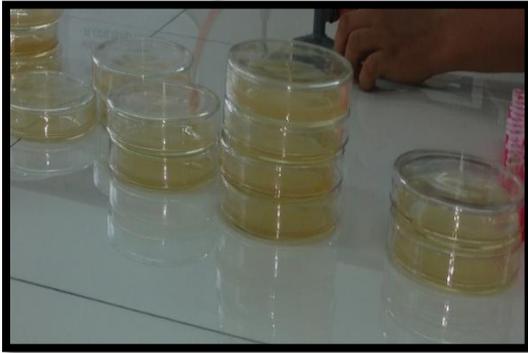
### LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO.



Lectura de la ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE COMBINACIONES VEGETALES DE *Morinda citrifolia* L, *Physalis angulata* L Y *Lupinus mutabilis* sweet FRENTE A *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* Y *Staphylococcus aureus*, por el método de dilución en caldo: Primero se procede a comparar cada dilución con el control negativo y positivo, para encontrar y determinar la dilución en caldo, la cual resultó negativo, porque no cumple con el estándar establecido.

ANEXO N° 19: CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA

Después de la lectura del CMI, se procedió a realizar el CMB utilizando las diluciones positivas, inoculando 100  $\mu$ L de cada dilución positiva en una placa con Agar Müller Hinton.



Una vez inoculadas las placas se procede a la incubación de las placas en forma invertida a 35°C por 24 horas.



ANEXO N° 20: FORMATO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIMICROBIANA DE  
EXTRACTOS VEGETALES EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA  
EN EL INSTITUTO DE MEDICINA TRADICIONAL IMET-ESSALUD.**

Extracto a Evaluar :  
 Género : Especie:  
 Nombre Común :  
 Fracción N° :  
 F. de Procesamiento :

**1. CAPACIDAD ANTIMICROBIANA:**

Microorganismos ATCC	DZI (mm)		
	Placa N°01	Placa N°02	Placa N°03

DZI: Diámetro de la zona de inhibición.

**2. PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO.**

Microorganismos ATCC	X DZI Extracto	X DZI Control	%AA

X ZDI: Porcentaje del diámetro de la zona de inhibición.

%A/A: Porcentaje de actividad antimicrobiana.

ANEXO N° 21: CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DE *Lupinus mutabilis sweet.*



**UNAP**

Herbarium Amazonense – AMAZ  
Centro de Investigación  
de Recursos Naturales

**CONSTANCIA N° 014-2017-AMAZ-UNAP**

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

**HACE CONSTAR:**

Que, las muestra botánicas presentadas por el Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD, fueron verificadas y determinadas en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

N° de Herbarium	Nombre común	Nombre Científico	Familia
42787	"guisador"	<i>Curcuma longa</i> L.	ZINGIBERACEAE
42788	"choclo"	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	FABACEAE

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos 03 de mayo del 2017

Atentamente,

  
Bigo. RICHARD HUARANCA ACOSTA  
Coordinador del Herbarium AMAZ  
CIRNA-UNAP



ANEXO N° 22: CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DE *Physalis angula* L.y  
*Morinda citrifolia* L.



UNAP

Herbarium Amazonense - AMAZ  
Centro de Investigación de Recursos Naturales

## CONSTANCIA N° 54

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

**CERTIFICA:**

Que, las muestras botánicas presentadas por el Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD; fueron verificados e identificados en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

N° de Herbarium	Nombre común	Nombre Científico	Familia
41031	"morera"	<i>Morus alba</i> L.	MORACEAE
33677	"bolsa mullaca"	<i>Physalis angulata</i> L.	SOLANACEAE
35565	"amor seco"	<i>Bideres pilosa</i> var. pilosa	ASTERACEAE
25747	"sacha huaca"	<i>Clibadium remotiflorum</i> O.E. Schulz.	ASTERACEAE
37472	"guanabana"	<i>Annona muricata</i> L.	ANNONACEAE
36683	"palta"	<i>Persea americana</i> Miller var. americana	LAURACEAE
37760	"chacrana"	<i>Psychotria viridis</i> Ruiz & Pav.	RUBIACEAE
41032	"noni"	<i>Morinda citrifolia</i> L.	RUBIACEAE

Se expide el presente certificado al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 14 de Agosto del 2012

Atentamente,

Blga. FELICIA DIAZ JARAMA M.  
Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP

