

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TESIS

Título:

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE
PLANTAS FRENTE A CEPAS MULTIRESISTENTES

AUTOR:

Bach. JUAN MANUEL SÁNCHEZ SILVANO

ASESORES:

Mgr. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE
MSc. KARINA FABIOLA MENDOZA ARIAS

IQUITOS - PERÚ

2018

TESIS

**Título: “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE PLANTAS FRENTE A CEPAS
MULTIRESISTENTES”**

AUTORIZACIÓN DE LOS ASESORES

La Mgr. Jessy Patricia Vásquez chumbe, MSc. Karina Fabiola Mendoza Arias, asesores de la investigación:

INFORMAN:

Que, el Bachiller JUAN MANUEL SÁNCHEZ SILVANO, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo contenido en el informe final de tesis titulada "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PLANTAS FRENTE A CEPAS MULTIRESISTENTES" y considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el Jurado Calificador, a tal efecto para la obtención del título de ingeniería en Industrias Alimentarias.

AUTORIZAMOS: Al citado Bachiller a presentar el Trabajo Final de Carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo así con la normativa vigente que regula los Grados y Títulos de la Facultad de Industrias Alimentarias en la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.



Mgr. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE



MSc. KARINA FABIOLA MENDOZA ARIAS

MIEMBROS DEL JURADO

Tesis aprobada en la Sustentación Pública el 19 de Marzo del 2018 por el Jurado nombrado por la Dirección de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en Industrias para optar por el Título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



Ing. Littman Gonzales Rios

Presidente



Ing. Juan Alberto Flores Garzatúa

Miembro Titular



Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong

Miembro Titular



Ing. Felix Humberto Cabrera Sánchez

Miembro Suplente

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en
Industrias Alimentarias

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, siendo las 12:00 horas del día 19 de Marzo de 2018, en las instalaciones del Departamento Académico de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, ubicado en la calle Nauta 5ta. Cuadra de esta ciudad, se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PLANTAS FRENTE A CEPAS MULTIRESISTENTES" presentado por el Bachiller **JUAN MANUEL SÁNCHEZ SILVANO**, con el asesoramiento de doña **Jessy Patricia Vásquez Chumbe** y doña **Karina Fabiola Mendoza Arias**.



Estando el Jurado Calificador conformado por los siguientes miembros, según Resolución Decanal N° 087-FIA-UNAP-2018, del 05 de Marzo de 2018.

Ing° LITTMAN GONZALES RÍOS	:	Presidente
Ing° JUAN ALBERTO FLORES GARAZATÚA	:	Miembro Titular
Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG	:	Miembro Titular
Ing° FELIX HUMBERTO CABRERA SÁNCHEZ	:	Miembro Suplente

Siendo las 13:40 horas del mismo día, se dio por concluida la sustentación, habiendo sido CALIFICADA con la nota de 16.0 y el calificativo de NOV. BUENO, estando el bachiller apto para obtener el Título Profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias.

El Jurado Calificador alcanzará al sustentante, si el caso lo requiere, las correcciones u observaciones presentadas.


LITTMAN GONZALES RÍOS
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
CIP 35193
Presidente


Juan Alberto Flores Garazatúa
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP 11620
Miembro Titular


Henry Vladimir Delgado Wong
Químico Farmacéutico
C.Q.F.F. N° 12492
Miembro Titular


Felix Humberto Cabrera Sánchez
Ingeniero en Industrias Alimentarias
CIP 11162
Miembro Suplente



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mi madre LUCÍA SILVANO DE SÁNCHEZ, por su incansable esfuerzo para brindarme la educación y darme aliento cada día para alcanzar mis metas.

A mi Familia compuesta por mi Esposa RUTH LIDIA DELGADO FAUSTINO, y mi Hijo JUAN MATTIAS SÁNCHEZ DELGADO, mis 2 amores que llenan de alegría mi vida y son mi razón para trabajar y salir adelante para darles lo mejor.

AGRADECIMIENTO

A Dios, porque todas las cosas suceden por su voluntad y él me permitió tener la vida hasta aquí para alcanzar este objetivo.

Al Grupo REINMARK S.R.L. representado por el M.V. ROBERT TINOCO ROMERO, por su decidido apoyo a la ciencia, por financiar el trabajo de investigación, por brindar sus instalaciones para la ejecución de los análisis y por permitirme realizar la tesis mientras realizaba mis actividades normales como trabajador de la institución. Verdaderamente el País necesita más empresas así para generar más conocimiento e impulsar el desarrollo.

A mis asesores la Mgr JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE, MSc. KARINA FABIOLA MENDOZA ARIAS y MSc., por impartirme sus conocimientos de forma desinteresada en la realización de este trabajo de investigación.

A mi Cuñado el Dr. JORGE ARMANDO AYARZA RENGIFO, por sus valiosos consejos y apoyo en la investigación.

A mi Amigo y compañero MSc. RAFAEL SEGUNDO VELA PAREDES, por su invaluable apoyo en el análisis estadístico de la investigación.

A todo el grupo humano del Laboratorio BIOSERVICE S.R.L., quienes me apoyaron de diferentes maneras en la ejecución de los análisis en especial a la M.V STHEPANE LOVON SERRANO y M.V. JORGE RODRIGUEZ BAYLON, por todas las facilidades brindadas.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AUTORIZACIÓN DE LOS ASESORES	¡Error! Marcador no definido.
MIEMBROS DEL JURADO	¡Error! Marcador no definido.
ACTA DE SUSTENTACIÓN	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTO	7
ÍNDICE DE CONTENIDOS	8
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	17
1.1 RESISTENCIA BACTERIANA	17
1.2 EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS	19
1.3 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES	21
1.4 ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO	24
1.4.1 <i>Genipa americana</i> , “Huito”	24
1.4.2 <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre”	27
1.4.3 <i>Citrus jambhiri</i> “Toronja”,	30
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	32
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1. Desarrollo de la investigación	33
4.2. Material vegetal	33
4.3. Cepas microbiológicas evaluadas	33
4.4. Análisis fisicoquímicos de las muestras	38

4.5.	Materiales y equipos de laboratorio	39
5.6.	Metodología utilizada	40
5.6.1	Obtención De Los Extractos Etanólicos	40
	Descripción del proceso de obtención de los extractos etanólicos	41
5.6.2.	Evaluación De La Actividad Antibacteriana	42
	CAPITULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
6.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	44
6.2.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS	45
6.3.	RESULTADOS PRUEBA DE DISCO DIFUSIÓN – MÉTODO DE KIRBY & BAUER	51
6.4.	Porcentaje De Inhibición De Los Extractos Estudiados	59
	CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	63
	CAPÍTULO VIII. RECOMENDACIONES	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Información Taxonómica del Huito, <i>Genipa americana</i>	24
Tabla 2.- Información Taxonómica del Jengibre, <i>Zingiber officinale</i>	27
Tabla 3.- Principales componentes del aceite esencial del Jengibre, <i>Zingiber officinale</i>	29
Tabla 4.- Información Taxonómica de la Toronja, <i>Citrus jambhiri</i>	30
Tabla 5.- Pruebas Bioquímicas para las cepas en estudio.....	34
Tabla 6.- Identificación Molecular Por Secuenciamento Gen 16s	35
Tabla 7.- Antibiograma para Cepa de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	36
Tabla 8.- Antibiograma para Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Tabla 9.- Antibiograma para Cepa de <i>Escherichia coli</i>	37
Tabla 10.- Antibiograma para Cepa de <i>Salmonella entérica</i>	37
Tabla 11.- Antibióticos de referencia usados para cada cepa en estudio	38
Tabla 12.- Clasificación de la actividad antimicrobiana según porcentaje de inhibición	43
Tabla 13.- Características fisicoquímicas de las materias primas	44
Tabla 14.- Parámetros de operación del sistema de destilación fraccionada...	46
Tabla 15.- Características fisicoquímicas de los extractos filtrados	47
Tabla 16.- Características fisicoquímicas de los extractos etanólicos obtenidos	48
Tabla 17. - Rendimiento de la materia prima.....	49
Tabla 18.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a <i>Staphylococcus saprophyticus</i> expresados en milímetros	51
Tabla 19.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> expresados en milímetros.....	52
Tabla 20.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a <i>E. Coli</i> expresados en milímetros	54
Tabla 21.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a <i>Salmonella entérica</i> expresados en milímetros	55

Tabla 22.- Análisis de varianza para los ensayos microbiológicos	58
Tabla 23.- Porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos respecto al antibiótico de referencia	59
Tabla 24.- Cuadro de interpretación de los porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. -Dianas de antibióticos vs mecanismos de resistencia, tomado de la referencia (19).....	18
Figura 2.- Esquema general de la técnica de macrodilución en caldo para la determinación de la MIC, tomado de la referencia (40).....	23
Figura 3. Área de distribución del árbol de <i>Genipa americana</i> , Tomado de la referencia (45).....	25
Figura 4. Estructuras químicas de los metabolitos secundarios de <i>Genipa americana</i> , Tomado de la referencia (47)	26
Figura 5.Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios del Jengibre, <i>Zingiber officinale</i> , Tomado de la referencia (53)	29
Figura 6. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios de <i>Citrus jambhiri</i> , Tomado de la referencia (58).....	31
Figura 7. Esquema general de identificación de las cepas en estudio	35
Figura 8. Flujograma para la obtención de los extractos etanólicos de las muestras.....	40
Figura 9. Curva de temperatura interna del extracto de Huito vs tiempo	47
Figura 10. Halos de inhibición de los extractos frente a <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	52
Figura 11.- Halos de inhibición de los aceites frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i>	53
Figura 12.- Halos de Inhibición de los aceites esenciales frente a <i>E. Coli</i>	55
Figura 13. Halos de inhibición de los extractos frente a <i>Salmonella entérica</i> ...	56
Figura 14.- Gráfico comparativo de los halos de inhibición de los 3 extractos .	57

Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de plantas frente a cepas multiresistentes

RESUMEN

Se determinó la actividad antibacteriana de extractos etanólicos del “Huito”, *Genipa americana*, “Toronja”, *Citrus Jambhiri* y el “Jengibre”, *Zingiber officinale*, frente a cepas bacterianas resistentes. Las cepas evaluadas fueron: *Salmonella entérica*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, las mismas que fueron aisladas y caracterizadas de casos clínicos del Laboratorio Bioservice S.R.L. Para determinar la sensibilidad de cada cepa se practicó un antibiograma usando 18 tipos de antibióticos reportando cada cepa resistencia al menos a 10 antibióticos. La obtención de los extractos etanólicos de los frutos se realizó por maceración y para concentrarlos se instaló un sistema de destilación fraccionada el cual permitió separar el solvente a baja temperatura sin destruir los compuestos activos de los frutos. Para la determinación de la actividad antimicrobiana, se aplicó el método de disco difusión de Kirby & Bauer, usando como control positivo el antibiótico correspondiente a cada cepa bacteriana. La concentración de extracto en cada disco preparado fue de 20 ul. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *Genipa americana* es efectivo frente a todas las cepas evaluadas, con mayor acción antimicrobiana frente a *Staphylococcus saprophyticus*, los extractos de *Citrus jambhiri* y *Zingiber officinale* no mostraron actividad alguna. *Genipa americana* posee compuestos activos que pueden ser extraídos y procesados por la industria farmacéutica para la síntesis de nuevos antimicrobianos que ayuden en la lucha contra la resistencia bacteriana.

Palabras claves: Extractos etanólicos, *Genipa americana*, *Citrus Jambhiri*, *Zingiber officinale*, actividad antibacteriana.

Antibacterial activity of ethanolic extracts of plants against multi-resistant strains

ABSTRACT

It was determined the antibacterial activity of ethanol extracts of "Huito", *Genipa americana*, "Toronja", *Citrus Jambhiri* and "Ginger", *Zingiber officinale*, against resistant strains.

The strains evaluated were *Salmonella entérica*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, which were isolated and characterized from clinical cases of the Bioservice Laboratory S.R.L. To determine the sensitivity of each strain, an antibiogram was performed using 18 types of antibiotics, each strain reporting resistance to at least 10 antibiotics. The extraction of the ethanolic extracts of the fruits was done by maceration and to concentrate them a fractional distillation system was installed which allowed to separate the solvent at low temperature without destroying the active compounds of the fruits. For the determination of the antimicrobial activity, the diffusion disc method of Kirby & Bauer was applied, using as a positive control the antibiotic corresponding to each bacterial strain. The concentration of extract in each disc prepared was 20 ul. The results showed that the ethanolic extract of *Genipa americana* is effective against all strains evaluated, with greater antimicrobial action against *Staphylococcus saprophyticus*. Extracts of *Citrus jambhiri* and *Zingiber officinale* did not show any activity. *Genipa americana* has active compounds that can be extracted and processed by the pharmaceutical industry for the synthesis of new antimicrobials that help in the fight against bacterial resistance.

Key words: Ethanol extracts, *Genipa americana*, *Citrus Jambhiri*, *Zingiber officinale*, antibacterial activity.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana ha existido desde tiempos muy antiguos, aún antes de la aparición de los antibióticos (1) y actualmente constituye un serio problema de salud pública que afecta a la población mundial (2). De acuerdo con la OMS, cada año se reportan, 480,000 personas que presentan Tuberculosis multirresistente, y la resistencia bacteriana empieza a complicar también la lucha contra el VIH y el paludismo (3).

En el año 2017, el centro de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos reportó el fallecimiento de una mujer a causa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a 26 tipos de antibióticos, entre ellos, todos los aminoglucósidos y polimixinas, incluyendo la tigeciclina que es un antibiótico desarrollado para contrarrestar a las bacterias resistentes (4). En América Latina, según los datos del programa Sentry (programa mundial de vigilancia de resistencia) los principales problemas de resistencia que se reportan son los Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* multiresistentes que incluyen resistencia a carbapenems, *E. coli* y *Klebsiella* con altas tasas de resistencia a β lactámicos y con producción de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), resistencia de *S. aureus* a oxacilina, quinolonas y otros grupos, *Enterobacter* y otras enterobacterias como *Serratia sp.* y *Citrobacter sp.* productoras de β lactamasas. Los grados de resistencia varían según el país y las condiciones de los hospitales (5).

En el Perú, en el año 2013, se detectó la primera cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems, las infecciones por esta cepa tienen una mortalidad casi siempre superior al 30 % y su hallazgo señaló la llegada de este mecanismo de resistencia al país(6). En el año 2017, se reportó 9 casos de *Klebsiella sp.*, resultando en la muerte de 5 de los pacientes afectados (7). Adicional a estos casos existen otros reportes aislados de bacterias resistentes en Perú(8)(9). Como respuesta el Instituto Nacional de Salud (INS), ha elaborado el Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos, en el cual se detallan las acciones a tomar para detener el avance de la resistencia bacteriana en el país entre los cuales figura la investigación de nuevos compuestos antimicrobianos (10). El informe *Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*, publicado por la Organización Mundial de la Salud revela la falta de investigaciones que desarrollen nuevos antibióticos para combatir la amenaza de la resistencia a bacteriana y que la mayoría de los nuevos antibióticos en desarrollo constituyen una solución a corto plazo dado que son solo versiones mejoradas de los ya existentes y las bacterias no tardarán en desarrollar mecanismos de resistencia a esos antibióticos (11).

En este contexto los compuestos de origen vegetal surgen como alternativa para combatir la resistencia bacteriana. Se tiene conocimiento muchos de los metabolitos secundarios de las plantas exhiben un poder antimicrobiano muy potente comparable a los antibióticos usados en la terapias clínicas, de los cuales se podrían extraer los compuestos activos para el desarrollo de nuevos antibióticos (12). La amazonia peruana como poseedora de una diversidad biológica inmensa se constituye como una fuente de estos compuestos activos. El Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) reporta la existencia de aproximadamente 7, 000 especies vegetales, de las cuales más de 1000 de ellas son consideradas medicinales (13).

Entre las especies con actividad antimicrobiana se tiene al Huito, *Genipa americana* que es rico en compuestos terpénicos y alcaloides y no presenta datos de toxicidad (14), la toronja, *Citrus jambhiri* que es una especie poco estudiada y cuya cáscara es rica en aceites esenciales generalmente con actividad antimicrobiana (15), se tiene también al Jengibre, *Zingiber officinale* cuyo principal compuesto activos son los zingiberenos y gingeroles lo que le confieren propiedades analgésicas, antipiréticas y antimicrobianas entre otras (16).

Es por ello que el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *genipa americana*, *Citrus jambhiri* y *Zingiber officinale*, brindando así una alternativa de industrialización de estos frutos cultivados en la selva peruana.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 RESISTENCIA BACTERIANA

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural el cual le proporciona al microorganismo la capacidad de reproducirse en concentraciones mayores del fármaco que se administra al paciente en dosis terapéuticas. (17)

La resistencia a los antimicrobianos puede ser natural o intrínseca y adquirida. La resistencia natural es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular. Esto se sustenta en el hallazgo de bacterias resistentes a los antibióticos en lugares aislados del exterior durante al menos 4 millones de años, así como el descubrimiento de genes de resistencia a betalactámicos, tetraciclina y vancomicina en ADN bacteriano de hace 30, 000 años (1).

La resistencia adquirida se refiere a un cambio en la composición genética de la bacteria la cual le permite resistir a la acción de un antimicrobiano al cual fue sensible anteriormente. Puede ser un fenómeno temporal cuando está condicionada por factores de su medio o permanente cuando se produce una mutación o a la adquisición de material genético externo a través de los plásmidos integrones y transposones (2).

1.1.1 Mecanismos de la Resistencia Bacteriana

Los mecanismos de la resistencia bacteriana son variados, entre los principales tenemos:

1. Producción de enzimas que destruyen el antimicrobiano antes de que alcance su blanco modifican su estructura de manera que no posea la misma acción.
2. Modificación de la pared celular haciéndola impermeable de forma que impida el ingreso del antimicrobiano a la célula bacteriana

3. Alteración del blanco de acción de forma que ya no permite la acción del antimicrobiano
4. Expulsión del antimicrobiano mediante bombas de eflujo antes que este alcance su blanco.
5. Alteración de las rutas metabólicas específicas para que el antimicrobiano no pueda provocar su efecto (18).

Los mecanismos de la resistencia bacteriana se pueden entender mejor si se analizan desde la perspectiva del mecanismo de acción de los antibióticos, en términos generales, los antibióticos necesitan alcanzar su diana o blanco de acción, en una concentración suficiente y durante el tiempo adecuado, para poder inhibir el crecimiento o causar la muerte bacteriana.

En la figura 1, se muestran las dianas o blancos de acción de los antimicrobianos y los mecanismos de resistencia de las bacterias:

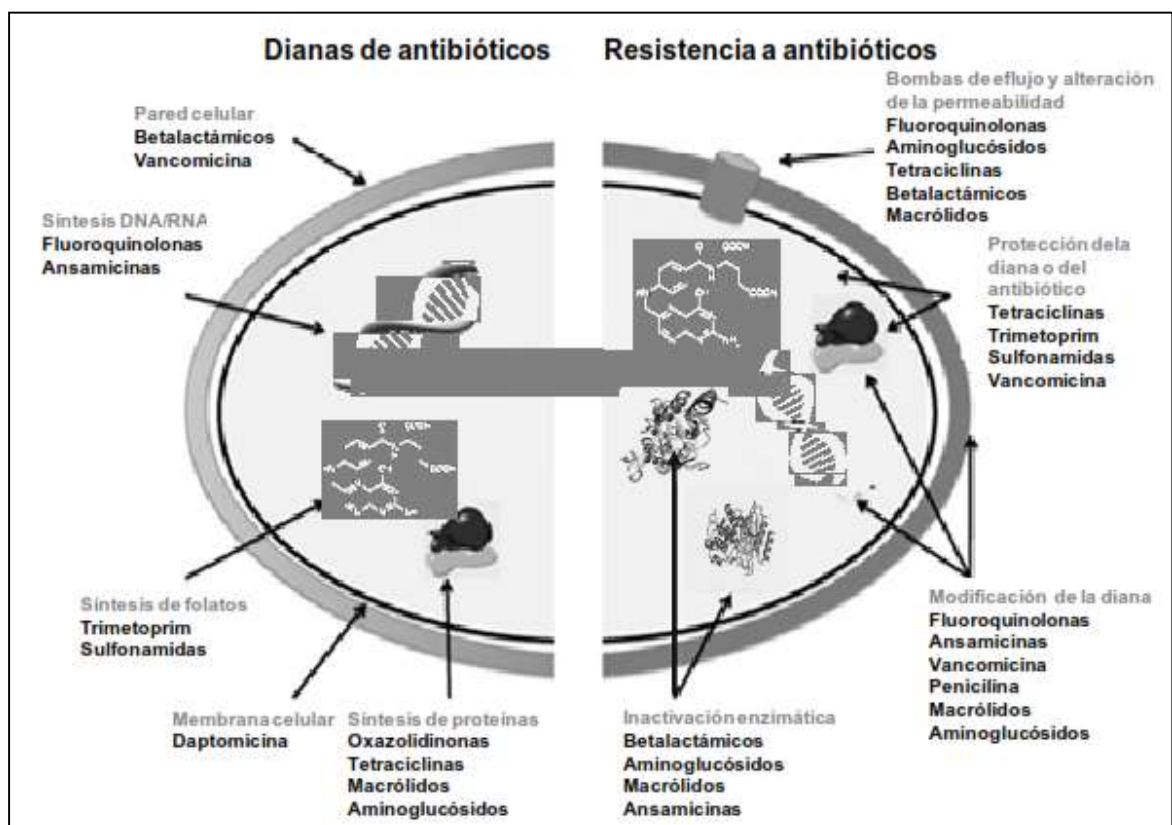


Figura 1. -Dianas de antibióticos vs mecanismos de resistencia, tomado de la referencia (19)

1.1.2 RESISTENCIA BACTERIANA Y ALIMENTOS

La resistencia a los antimicrobianos alcanza a los alimentos mediante los animales de consumo. En estos animales los antibióticos se utilizan con 3 fines: terapéutica, profiláctica y como promotores de crecimiento. Múltiples trabajos destacan el impacto de la resistencia bacteriana en la salud humana y su vinculación con aislamientos de procedencia animal. Se describe el incremento en la resistencia a las quinolonas en patógenos como *Escherichia coli* y *Campylobacter sp.*, tanto de origen animal como humano, efecto que se atribuye al amplio consumo de dichos fármacos en la profilaxis y la terapéutica animal (19).

Diversos estudios han reportado la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos, como cefalosporinas, ciprofloxacina, eritromicina entre otros, en canales de aves, cerdos y vacuno (20) (19).

Otro factor asociado a la diseminación de la resistencia bacteriana en el hombre es la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal. Múltiples trabajos de investigación han determinado la presencia de residuos de antibióticos en carnes de animales de consumo, así como en la leche fresca y pasteurizada (21)(22)(23)(24).

Asimismo, se ha observado que estos residuos son estables durante del tratamiento térmico y su procesamiento tecnológico. En algunos casos reducen su actividad biológica, pero en general permanecen activos dentro del alimento (25)(26)(27).

1.2 EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS

Los extractos son productos obtenidos a partir de material vegetal desecado, el cual es sometido a extracción por un disolvente y luego evaporado total o parcialmente. Pueden ser de consistencia sólida, líquida o intermedia (28).

Existen métodos variados para obtener estos extractos, pero en general todos están basados en la operación unitaria denominada extracción sólido - líquido y la resultante de este procedimiento es el sólido agotado (que viene a ser el material vegetal) y el extracto conformado por el disolvente y las sustancias

disueltas en él (29). Entre los principales métodos de obtención tenemos: Percolación, Decocción, Maceración, Digestión y la Infusión (28). El método usado en este trabajo fue la maceración, el cual consistió en poner a reposo la muestra en soluciones de alcohol por un período determinado de tiempo (30).

1.2.1 COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS EN LAS PLANTAS

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos divididos en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios están conformados por los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, están presentes en todas las plantas y son necesarios para los procesos de fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte entre otros. Mientras que los metabolitos secundarios no poseen una función definida en las plantas (31)(32).

Diversos estudios demuestran que los metabolitos secundarios identificados en plantas poseen propiedades antimicrobianas, aunque no se conoce con certeza los mecanismos por los cuales se lleva a cabo y los componentes responsables del efecto informado (33)(34)(12).

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar en:

Terpenos: También denominados isoprenoides, son los responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas, mientras mayor sea la cantidad de oxígeno en la molécula, mayor será su aroma. Estos compuestos se forman a partir del isopreno (unidad de 5 átomos de carbono); pueden contener desde una hasta ocho unidades. Entre los terpenos tenemos las hormonas, pigmentos o aceites esenciales (35).

Compuestos fenólicos: presentan hidroxilas y anillos aromáticos, en las formas simples o de polímeros, que les confiere el poder antioxidante, pueden estar en formas libres o complejas a azúcares y proteínas. Entre ellos, se destacan los flavonoides, biflavonoides los ácidos fenólicos, los taninos, los tocoferoles, ligninas, etc (36).

Glicósidos: Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo

hidroxilo. Entre ellos tenemos las Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

Alcaloides: Son compuestos cíclicos que poseen por lo menos un átomo de nitrógeno en su anillo. En su mayoría un poseen carácter alcalino, pues la presencia del átomo de nitrógeno representa un par de electrones no compartidos. Los alcaloides se sintetizan en el retículo endoplasmático, concentrándose, en a continuación, en los vacuolos y, por lo tanto, no aparecen en las células jóvenes. Entre los alcaloides podemos citar la codeína, morfina, solanina entre otros (32).

1.3 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS NATURALES

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía.

La técnica de difusión es la más utilizada para evaluar la capacidad antimicrobiana de las plantas, asimismo es la recomendada por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos, la cual está basada en el método propuesto por Kirby & Bauer (37).

La técnica de dilución comprende las técnicas de macro y micro dilución en caldo y proporcionan resultados cuantitativos lo cual permite determinar la concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible.

El método de bioautografía es una variante de la difusión en agar y nos permite conocer la fracción del compuesto responsable del efecto antimicrobiano, generalmente se realiza luego de haber determinado la actividad antimicrobiana del extracto de forma cualitativa y cuantitativa (38).

1.3.1 MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN KIRBY & BAUER

El fundamento de este método consiste en colocar en la superficie de una placa de agar Muller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo en estudio, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antimicrobianos. Tan pronto el disco impregnado en antimicrobiano se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el disco de papel filtro absorbe agua y el antimicrobiano se difunde por el agar de forma radial, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (39).

El método de disco difusión estandarizado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS) se realiza mediante los siguientes pasos:

1. Seleccionar las colonias
2. Preparar una suspensión del inóculo
3. Estandarizar la suspensión del inóculo
4. Inocular la placa
5. Colocar discos de antimicrobiano
6. Incubar la placa
7. Medir las zonas de inhibición
8. Interpretar los resultados

(40).

1.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

Para esta determinación se utilizan las variantes del método de dilución. En el presente trabajo se aplicó la técnica de macrodilución en caldo. Esta se realiza en tubos de hemólisis, preparando diluciones sucesivas del antibiótico en caldo. Es importante agregar el doble de la concentración deseada del antimicrobiano

en los tubos, dado que al agregar la suspensión bacteriana, la concentración del antimicrobiano se reducirá a la mitad (40).

El procedimiento general del método se muestra en la figura 2.

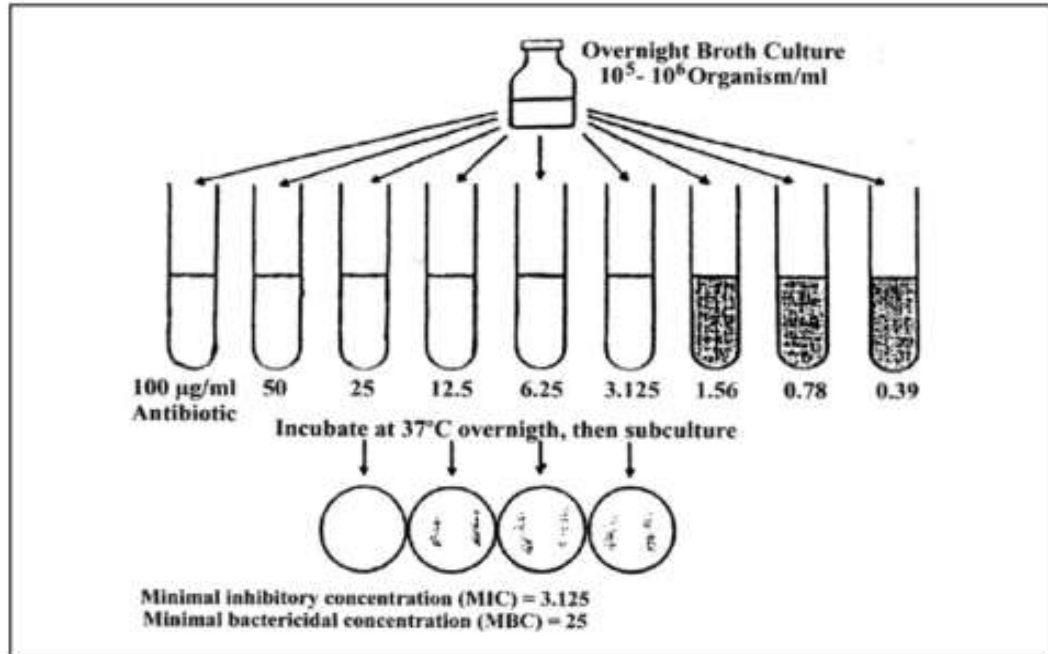


Figura 2.- Esquema general de la técnica de macrodilución en caldo para la determinación de la MIC, tomado de la referencia (40)

1.4 ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

1.4.1 *Genipa americana*, “Huito”

Nombres comunes: Huitol. Witu (shuti). Acuicho (huayraya): Caruto. Chibará, Chipará. Genipa, Genipapo. Granada, Ana (machiguenga, asháninka, nomachiguenga); Guanapay. Huitoc, Huitu, Huito sua, Huito de agua, Isso (piro) Jagua, Janipa (cocama), Jave (yagua) Jigua, Juaraavuro (ocaina); Jidoro (huitoto), Lana, Launa, Totumillo. Bilito Cafeciilo denta, Xagua, Mayagua, Guaricha, etc (41).

Tabla 1.- Información Taxonómica del Huito, *Genipa americana*

Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnolidae
Superorden	Asteranae
Orden	Gentianales
Familia	Rubiaceae
Género	Genipa
Especie	Americana

Tomado de la referencia (42)

Descripción Botánica

Árbol de 10 a 15 metros y a veces hasta 20 de altura y 30 a 80 centímetros de diámetro. Tronco generalmente recto, corteza áspera, bien adherida, color verde plomizo, ramificaciones verticiladas abundantes, con las ramas inferiores generalmente horizontales. Las hojas concentradas en el ápice de las ramas, oblongo-lanceoladas, opuestas, glabras en ambas caras; las estípulas son interpeciolares triangulares grises con el ápice muy agudo. Lado superior verde oscuro y brillante. Flor con cáliz tubuloso color verde y corola color blanco a amarillo, vellosa, ligeramente perfumada.

Fruto comestible y muy apreciado; baya subglobosa, de 8 a 10 cm de longitud y de 6 a 7 cm de diámetro, amarillenta cuando madura, de cáscara blanda, rugosa, amarillo-pardo que contiene pulpa aromática, también blanda, envolviendo numerosas semillas (43)(44).

Distribución

El árbol de Huito se originó probablemente en la Cuenca Amazónica y fue esparcido a través de los Trópicos Americanos por los seres humanos en tiempos pre-históricos. Hoy en día, los árboles de huito crecen naturalmente a lo largo de ambas costas en México un poco al norte del Istmo de Tehuantepec y del istmo a través de la América Central y a través del norte de la América del Sur hasta Paraguay y el norte de Argentina (45).

En el Perú este fruto se distribuye entre los departamentos de Amazonas, Cajamarca, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco y San Martín (43).



Figura 3. Área de distribución del árbol de *Genipa americana*, Tomado de la referencia (45)

Metabolitos Secundarios encontrados en *Genipa americana* (Huitto)

El “Huitto”, *Genipa americana*, se caracteriza químicamente por la presencia de iridoides: El genipín, ácido genipínico, ácido genípico, gardendiol shanzhisídeo entre otros; y monoterpenoides: ganipacetal y genipaol.

Se ha determinado que el ácido genípico y genipídico inhiben el crecimiento de algunas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, del hongo trichophyton mentagrophytes y del alga *Chlorella* y del protozooario *Tetrahymena gelleii*.

Asimismo, se ha reportado la presencia de altas cantidades de ácidos carboxílicos (butírico, 2-metilbutírico y hexanoico) y 2- y 3-butanoato de metilo, linalol y limoneno (44).

En el año 2006, se describieron 32 nuevos constituyentes volátiles, componentes del aroma de *genipa americana*, además de los componentes ya descritos anteriormente (46).

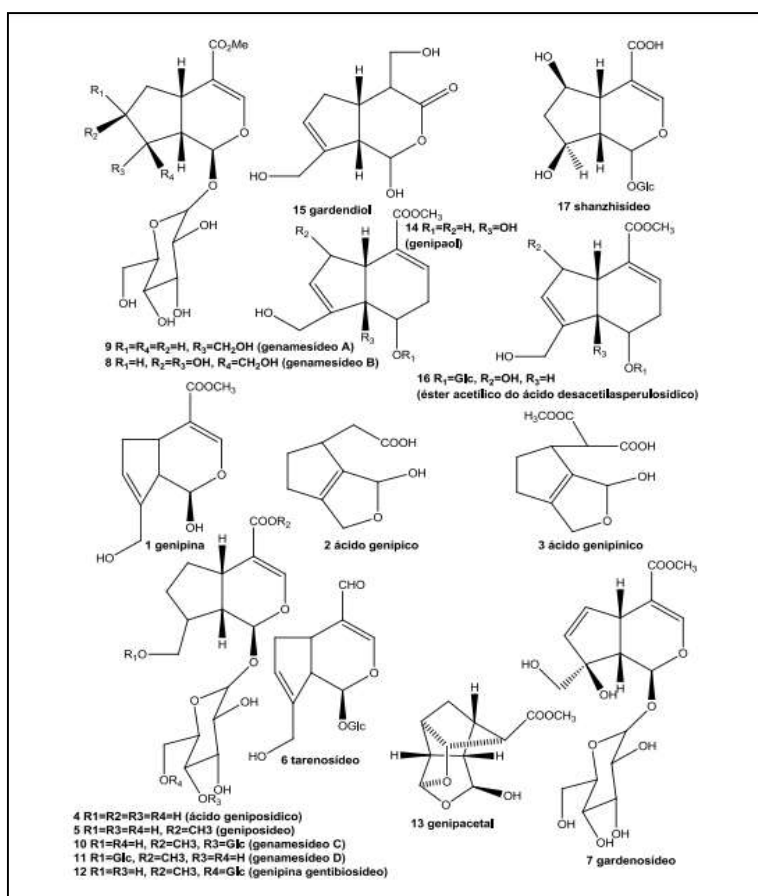


Figura 4. Estructuras químicas de los metabolitos secundarios de *Genipa americana*, Tomado de la referencia (47)

Usos tradicionales

Es usado como abortivo, en alopecia, contra la anemia, como antidiarreico, anti disentérico, antiinflamatorio vaginal, antipirético, contra el asma, como astringente, contra el cáncer uterino, para la caspa, como cicatrizante, para la dermatosis, como diurético, estimulante, contra la hemorragia, en hidropesía, como laxante, para males respiratorios y como reconstituyente (43).

1.4.2 *Zingiber officinale* “Jengibre”

Nombres comunes : Ajengibre (Cuba), jengibre dulce (Puerto Rico), gengembre, gengibre (Antillas Francesas), ingwer (Alemania), gengembre (Francia), ginger (Inglaterra), gengibre, gengivre, mangaratiá (Portugal), Jengibreg (China) y kión (Perú) (48).

Tabla 2.- Información Taxonómica del Jengibre, *Zingiber officinale*

Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnolidae
Superorden	Lilianaes
Orden	Zingiberales
Familia	Zingiberaceae
Género	Zingiber
Especie	Officinale

Tomado de la referencia (49).

Descripción Botánica

El Jengibre, *Zingiber officinale* tiene una altura que varía de 0.30 a 1.20 m. la planta se forma de un rizoma secundario subterráneo del cual parten vástagos aéreos en posición oblicua cubiertos por las vainas envolventes de las hojas, se

colocan en posición horizontal en la parte inferior y oblicuamente en la parte superior con lo cual aprovechan la mayor cantidad de luz.

Los rizomas del Jengibre, son tallos monopodiales que llegan a medir hasta 0.5 m de largo, achatados, enteros o divididos como los dedos de las manos, el volumen y peso de los rizomas varían según las condiciones ecológicas y a los métodos de cultivo (50).

Distribución

El Jengibre, *Zingiber officinale* es originario de las zonas tropicales del sureste asiático, exactamente del área Indomalaya al sur de Asia. Naturalizada en Jamaica, África, en las Indias occidentales, México y en la Florida. No se conoce al estado silvestre y su cultivo es muy antiguo, especialmente en China, en Europa fue conocido desde la antigüedad por griegos y romanos (48).

Crece en todas las regiones tropicales del mundo. Las variedades más caras y de mayor calidad generalmente proceden de Australia, India y Jamaica, mientras que las más comercializadas se cultivan en China y Perú (50).

El cultivo de Jengibre en Perú está muy difundido en toda la Amazonia sobre todo en el departamento de Junín (43) (48).

Metabolitos secundarios encontrados en *Zingiber officinale* (Jengibre)

Se ha reportado la presencia de los siguientes componentes en el rizoma de *Zingiber officinale*: Alcaloides, lactonas, aceites, glicósidos cardiotónicos, triterpenos, quinonas, resinas, taninos, flavonoides, azúcares reductores, antocianidinas; no conteniendo saponinas, esteroides, cumarinas ni catequinas. (48).

Asimismo una investigación realizada el año 2007 estudió la composición química del aceite esencial de *Zingiber officinale* según el tamaño de partícula reportando un alto contenido de compuestos monoterpénicos oxigenados tales como geranial (11.6-14.0%), neral (9.7- 10.4%), borneol (3.6-4.0%), geraniol (1.2-3.5%), citronelol (2.0-2.89%) y linalool (2.0-2.4%); seguido por hidrocarburos sesquiterpénicos como a-zingibereno (7.7- 8.4%), b-sesquifelandreno (3.8-4.5%), b-bisaboleno (3.5- 4.0%), E,E-a-farneseno (3.2-

3.6%) y α -curcumeno(2.8- 3.3%); los hidrocarburos monoterpénicos como canfeno (5.4-6.4%), mirceno (1.2-4.5%) y α -pineno (1.8-2.3%); y relativamente bajo contenido de los compuestos sesquiterpenos oxigenados (51).

Un estudio realizado en Perú, el año 2001 sobre el *Zingiber officinale* determinó la siguiente composición química del Jengibre usando la cromatografía de gases:

Tabla 3.- Principales componentes del aceite esencial del Jengibre, *Zingiber officinale*

Sustancia	PM	Porcentaje
a-zingibereno	204	22.22
Ar-curcumeno	204	13.11
b-sesquifelandreno	204	9.44
Teraniol	154	3.33
b-mirceno	136	1.47
Citral	152	1.25
Geranial	152	1.10
No Identificado		48.048

Tomado de la referencia (52).

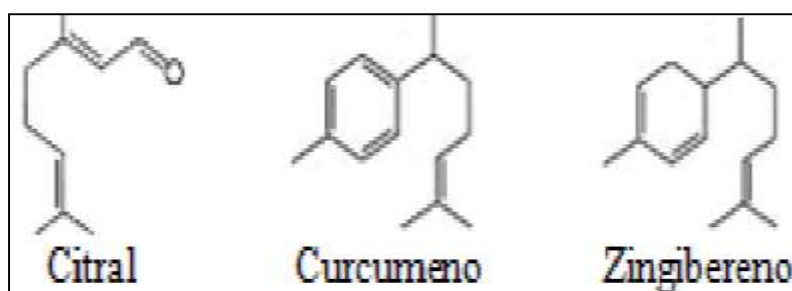


Figura 5.Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios del Jengibre, *Zingiber officinale*, Tomado de la referencia (53)

Usos tradicionales

Es usado para tratar el reumatismo, la tos seca, tiene propiedad antidiarreica. También es usado como condimento en la cocina (43).

Presenta propiedad carminativa, antiulcerosa, antiespasmódica, colagoga, protector hepático, expectorante y laxante. Se le considera estimulante, rubefaciente y diaforético, utilizándose cuando hay mala circulación y calambres (48).

1.4.3 Citrus jambhiri “Toronja”,

Nombre común: Limón áspero, limón del mazoe, oranje del lambhiri, ruigosa del limón, lambhiri, jamburi, citronelle, jatti khatti India (54).

Tabla 4.- Información Taxonómica de la Toronja, *Citrus jambhiri*

Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnolidae
Superorden	Rosanae
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	Citrus
Especie	Jambhiri

Tomado de la referencia (55)

Descripción botánica

Es un árbol alto y muy ramificado, provisto de abundantes espinas, los frutos son elipsoidales tienen cascara dura y rugosa, amarilla, y pulpa escasa y acida.

El limón rugoso, “Toronja”, es uno de los más importantes portainjertos de especies de cítricos, cultivado para este fin en la India, Estados Unidos, Sudáfrica y Australia (54).

Usos Tradicionales

En la India los frutos se utilizan como verduras. Adicionalmente los frutos se utilizan ocasionalmente como un sustituto de limón (54).

Metabolitos secundarios presentes en *Citrus jambhiri* L.

Se ha identificado la presencia de los siguientes compuestos en la cascara de toronja: hesperidina, tangeretina, naringina (5,6, 7, 8,4 Pentametoxiflavona) nobiletina, eriocitrina, rutina, neohesperidina y otros 11 flavonoides. Asimismo se detectó la presencia de limonina y nomilina (56)(57).

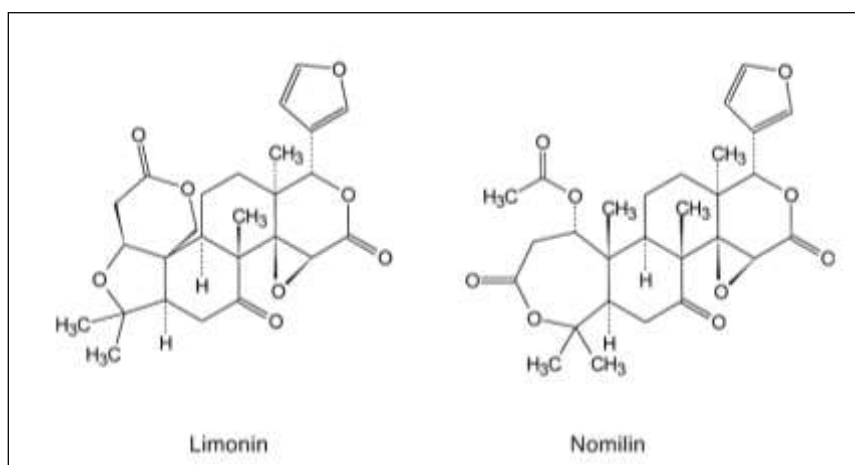


Figura 6. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios de *Citrus jambhiri*, Tomado de la referencia (58)

Se ha reportado que los compuestos Limonina y Nomilina inhiben la actividad de la proteasa del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) ejerciendo una actividad retroviral y que ésta no está influenciada por la diferencia estructural entre estos 2 compuestos (58).

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

a. **Objetivo General.**

- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de plantas frente a cepas multiresistentes.

b. **Objetivos Específicos.**

- Evaluar las características Físico-químicas de las especies *Citrus jambhiri*, “Toronja” *Genipa americana*, “Huito” y *Zingiber officinale*, “Jengibre”.
- *Obtener los extractos etanólicos de las especies Citrus jambhiri, “Toronja” Genipa americana, “Huito” y Zingiber officinale, “Jengibre”.*
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos obtenido de *Citrus jambhiri*, “Toronja”; *Genipa americana* “Huito”; y *Zingiber officinale*, “Jengibre” frente a *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos obtenido de *Citrus jambhiri*, “Toronja”; *Genipa americana* “Huito”; y *Zingiber officinale*, “Jengibre” frente a *Staphylococcus saprophyticus* multiresistente.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos obtenido de *Citrus jambhiri*, “Toronja”; *Genipa americana* “Huito”; y *Zingiber officinale*, “Jengibre” frente a *Escherichia coli* multiresistente.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos obtenido de *Citrus jambhiri*, “Toronja”; *Genipa americana* “Huito”; y *Zingiber officinale*, “Jengibre” frente a *Salmonella enterica* multiresistente.

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Desarrollo de la investigación

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en los laboratorios de control de calidad de la planta de producción de la empresa REINMARK S.R.L. Ubicada en la en la Asociación de pequeños avicultores El Dorado Mz L Lt 04, Distrito de Puente Piedra y los análisis microbiológicos se realizaron en las instalaciones de la empresa Laboratorio BIOSERVICE S.R.L ubicado en la Av. Nicolás de Piérola 1228, Villa María del Triunfo. Ambos lugares están localizados en el Departamento Lima – Perú.

4.2. Material vegetal

Los frutos de “Toronja”, *Citrus jambhiri*. “Huito”, *Genipa americana* fueron obtenidos de fundo PIR, ubicado en el km 2.5 de la carretera Zungarococha, distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto con ubicación Latitud 03°50'01"S Longitud 73°21'46"W

Los Rizomas del “Jengibre”, *Zingiber officinale* del sembrío de propiedad del Sr. Roberto Apolinario Gaspar ubicado en el centro poblado de Sanibeni, Distrito de Satipo, Provincia de Satipo Departamento de Junín, Latitud: 11°15'21"S y Longitud 74°34'22"W.

Después de colectados, los frutos fueron puestos en cajas de madera y trasladados a la ciudad de Lima a las instalaciones de la empresa REINMARK S.R.L. para ser procesados y analizados.

4.3. Cepas microbiológicas evaluadas

Todas las cepas bacterianas fueron aisladas de casos clínicos del Laboratorio Bioservice S.R.L, las cuales fueron caracterizadas e identificadas. Los resultados de la identificación se muestran en las tablas N°5 y N°6, el flujo general para aislar y caracterizar las cepas se muestran en la figura 7.

Tabla 5.- Pruebas Bioquímicas para las cepas en estudio

Prueba Bioquímica	Cepas en estudio			
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tinción de Gram	-	-	+	-
Catalasa	+		+	+
Oxidasa	-		+	+
Fermentación de azúcares	Glucosa (+) Sacarosa (+) Lactosa (+)	Glucosa (+) Sacarosa (+) Lactosa (-)	Glucosa (+) Sacarosa (+) Lactosa (+)	Glucosa (-) Sacarosa (-) Lactosa (-)
MEDIO SIM	Sulfhidrilo (-) Indol (+) Motilidad (+)	Sulfhidrilo (+) Indol (-) Motilidad (+)		Sulfhidrilo (-) Indol (-) Motilidad (+)
Citrato	-	+		
Producción de ureasa	-	-		
Rojo de metilo	+	+		
Voges Proskauer	-	-		
Licuefacción de gelatina			+	
Reducción de nitratos			+	
Lia	+	+		
Manitol sal			+	

Tabla 6.- Identificación Molecular Por Secuenciamento Gen 16s

Código Muestra	ID ADN	Código Secuencia	Identificación Molecular
174-17	34	34	<i>Salmonella enterica</i>
174-17	35	35	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
174-17	36	36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
174-17	37	37	<i>Escherichia coli</i>

Tomado de los reportes de análisis de Bioservice S.R.L.

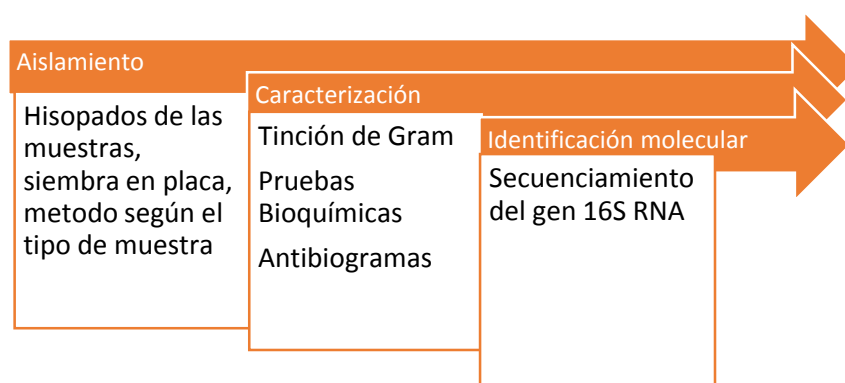


Figura 7. Esquema general de identificación de las cepas en estudio

Las cepas testeadas fueron seleccionadas según la resistencia a los antibióticos que mostraron al momento de realizar el antibiograma de rutina, los resultados de los antibiogramas practicados a cada cepa se muestran en las tablas 7, 8,9 y 10. La tabla 11 muestra los antibióticos que se utilizaron como referencia en cada prueba, los cuales se seleccionaron por el mayor diámetro del halo de inhibición frente a las cepas en estudio.

Tabla 7.- Antibiograma para Cepa de *Staphylococcus saprophyticus*

ANTIBIOGRAMA - TABLA I			ANTIBIOGRAMA - TABLA II		
Código de Muestra: 1170-001	Halo Inh (mm)	Cond	Código de Muestra: 1170-001	Halo Inh (mm)	Cond
Ciprofloxacina	0	R	Clortetraciclina	10	R
Norfloxacina	0	R	Levofloxacina	0	R
Enrofloxacina	0	R	Sulfato de Colistina	0	R
Amoxicilina	25	S	Levofloxacina + Colistina	12	R
Florfenicol	8	R	Ciprofloxacina + Amoxicilina	0	R
Doxiciclina	9	R	Norfloxacina + Amoxicilina	0	R
Oxitetraciclina	0	R	Ciprofloxacina + Doxiciclina	10	R
Fosfomicina sódica	19	S	Fosfomicina + Trimetropin	0	R
Sulfatrimetropin	0	R	Enrofloxacina + Amoxicilina	0	R

Cond: Condición: - **R:** Resistente. - **I:** Intermedio -**S:** Sensible

Tabla 8.- Antibiograma para Cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

ANTIBIOGRAMA - TABLA I			ANTIBIOGRAMA - TABLA II		
Código de Muestra: 1519-001	Halo Inh (mm)	Cond	Código de Muestra: 1519-001	Halo Inh (mm)	Cond
Ciprofloxacina	0	R	Clortetraciclina	11	R
Norfloxacina	0	R	Levofloxacina	0	R
Enrofloxacina	0	R	Sulfato de Colistina	16	S
Amoxicilina	0	R	Levofloxacina + Colistina	10	R
Florfenicol	0	R	Ciprofloxacina + Amoxicilina	0	R
Doxiciclina	12	R	Norfloxacina + Amoxicilina	0	R
Oxitetraciclina	0	R	Ciprofloxacina + Doxiciclina	11	R
Fosfomicina sódica	11	R	Fosfomicina + Trimetropin	10	R
Sulfatrimetropin	0	R	Enrofloxacina + Amoxicilina	0	R

Tabla 9.- Antibiograma para Cepa de *Escherichia coli*

ANTIBIOGRAMA - TABLA I			ANTIBIOGRAMA - TABLA II		
Código de Muestra: 0709-001	Halo Inh (mm)	Cond	Código de Muestra: 0709-001	Halo Inh (mm)	Cond
Ciprofloxacina	15	R	Clortetraciclina	12	R
Norfloxacina	30	S	Levofloxacina	10	R
Enrofloxacina	30	S	Sulfato de Colistina	32	S
Amoxicilina	0	R	Levofloxacina + Colistina	12	R
Florfenicol	20	S	Ciprofloxacina + Amoxicilina	0	R
Doxiciclina	10	R	Norfloxacina + Amoxicilina	0	R
Oxitetraciclina	15	I	Ciprofloxacina + Doxiciclina	9	R
Fosfomicina sódica	23	S	Fosfomicina + Trimetropin	32	S
Sulfatrimetropin	30	S	Enrofloxacina + Amoxicilina	10	R

Tabla 10.- Antibiograma para Cepa de *Salmonella enterica*

ANTIBIOGRAMA - TABLA I			ANTIBIOGRAMA - TABLA II		
Código de Muestra: 1499-001	Halo Inh (mm)	Cond	Código de Muestra: 1499-001	Halo Inh (mm)	Cond
Ciprofloxacina	24	S	Clortetraciclina	10	R
Norfloxacina	0	R	Levofloxacina	8	R
Enrofloxacina	0	R	Sulfato de Colistina	16	S
Amoxicilina	0	R	Levofloxacina + Colistina	21	S
Florfenicol	0	R	Ciprofloxacina + Amoxicilina	10	R
Doxiciclina	14	R	Norfloxacina + Amoxicilina	11	R
Oxitetraciclina	0	R	Ciprofloxacina + Doxiciclina	11	R
Fosfomicina sódica	0	R	Fosfomicina + Trimetropin	0	R
Sulfatrimetropin	0	R	Enrofloxacina + Amoxicilina	0	R

Cond: Condición: - **R:** Resistente. - **I:** Intermedio -**S:** Sensible

Tabla 11.- Antibióticos de referencia usados para cada cepa en estudio

Cepa bacteriana	Antibiótico de referencia	Concentración del antibiótico
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Amoxicilina	20 ug
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sulfato de Colistina	10 ug
<i>E. coli</i>	Sulfato de Colistina	10 ug
<i>Salmonella enterica</i>	Ciprofloxacina	5 ug

4.4. Análisis fisicoquímicos de las muestras

Para caracterizar la materia prima se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos:

Determinación de Acidez

Se determinó el valor de acidez de la materia prima según la metodología de la **NTP 203.070**, “Determinación de la acidez de productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales” revisada el año 2012 (59).

Determinación de la densidad relativa

Para la determinación de la densidad relativa de los frutos en estudio se aplicó la metodología de la **NTP 203.069**, “Determinación de la densidad relativa de productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales” revisada el año 2012 (60).

Determinación de sólidos solubles

Para la determinación de los sólidos solubles se aplicó el método de la **NTP 203.072** “Determinación de sólidos solubles en productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales” revisada el año 2012 (61).

Determinación de Potencial de Hidrógeno (pH)

La determinación de pH de los frutos se realizó según la metodología de la AOAC 2016 (62).

4.5. Materiales y equipos de laboratorio

- ✓ Equipo de destilación fraccionada
- ✓ Microscopio
- ✓ Balanza digital
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Vórtex
- ✓ Cámara fotográfica digital
- ✓ Incubadora
- ✓ Contador de Colonias
- ✓ Cabina de Seguridad
- ✓ Micropipeta monocal
- ✓ Micropipeta monocal
- ✓ Refractómetro
- ✓ PH-metro
- ✓ Agitador Magnético
- ✓ Baño maría
- ✓ Autoclave vertical
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Hidróxido de Sodio en perlas
- ✓ Agar Muller Hinton
- ✓ Agar Soya Trypticase (TSA)
- ✓ Agar Mac Conkey
- ✓ Agar Xilosa Lisina Desoxicolato XLD
- ✓ Agar Cetrimide
- ✓ Agua destilada
- ✓ Alcohol etílico rectificado

5.6. Metodología utilizada

5.6.1 Obtención De Los Extractos Etanólicos

FLUJO DE OPERACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

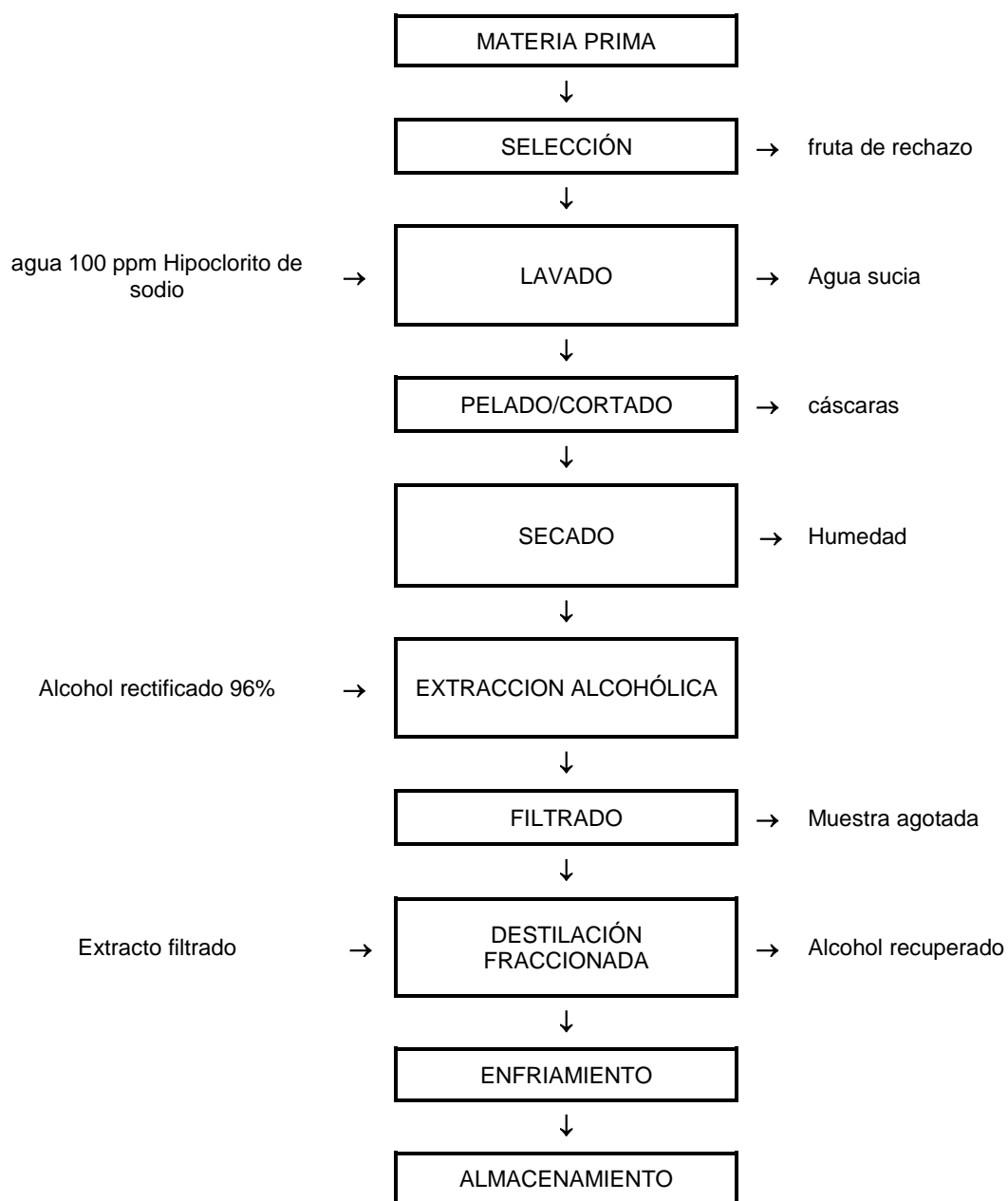


Figura 8. Flujograma para la obtención de los extractos etanólicos de las muestras.

Descripción del proceso de obtención de los extractos etanólicos

1) Lavado

Esta operación se realizó para separar las impurezas del material vegetal, se aplicó el desinfectante cloro a 100 ppm para eliminar la carga microbiana.

2) Pelado/cortado

La operación de pelado se realizó para el caso de la toronja, puesto que la parte usada del fruto es la cascara. En el caso del Jengibre y el huito se utilizó el fruto completo y se procedió a cortarlos en partes finas.

3) Secado

El material vegetal lavado y cortado se colocó en estufa a 60 °C por 72 horas, para eliminar toda la humedad presente.

4) Extracción alcohólica

Esta operación consiste en macerar el material vegetal en alcohol etílico por 4 días, según la farmacopea americana. Es necesario que se use frascos acaramelados para evitar la acción de la luz solar sobre el material en extracción.

5) Filtrado

Esta operación se realiza para separar el material vegetal del extracto obtenido. Se realiza en 2 partes, primero se filtra con gasa estéril para retener los sólidos de mayor tamaño y luego se filtra usando papel filtro cualitativo de manera que se obtiene un extracto filtrado libre de partículas sólidas.

6) Destilación fraccionada

Esta operación se realiza para separar el alcohol de los compuestos activos del material vegetal. Se realizó con un aparato de destilación montado en el laboratorio con piezas de fabricación nacional. Se eligió la destilación fraccionada porque nos permite separar con eficiencia el alcohol etílico.

7) Enfriado

En esta operación se retira el matraz de destilación del baño maría, y se lo expone al ambiente protegiendo el matraz con papel aluminio para evitar el contacto con la luz solar.

8) Almacenado

El extracto obtenido se coloca en envases acaramelados y bien cerrados para evitar su degradación por acción de la luz solar.

5.6.2. Evaluación De La Actividad Antibacteriana

A. Preparación de los discos de sensibilidad

Los discos de sensibilidad se prepararon usando papel Whatman N° 3 y empleando un perforador. Los discos se esterilizaron en autoclave a 121 °C en 15 libras de presión por 15 minutos.

Se dejó enfriar y luego en la cabina de bioseguridad se agregaron a los discos 20 ul de los extractos etanólicos preparados, luego se dejó secar en estufa a 37 °C por 24 h.

B. Desarrollo de la prueba de sensibilidad - Método de difusión en agar (Kirby & Bauer)

1. Preparación del Inóculo

Preparación de las bacterias: Se procedió a preparar los medios de cultivo para cada bacteria en estudio los cuales son: Agar XLD para *Salmonella*. Agar TSA para *Staphylococcus*, Agar Mac Conkey para *E. coli* y Agar Cetrimide para *Pseudomonas*. Seguidamente se sacó de refrigeración los viales de las bacterias en estudio y con la ayuda de una asa se sembró por estría en cada placa según la bacteria. Se incubó durante 18 horas y se obtuvieron las colonias frescas para preparar el inóculo.

Selección de colonias: se seleccionaron 4 ó 5 colonias que presentaban una mejor morfología en cuanto a forma y tamaño.

Suspensión del inóculo: Utilizando una ansa se tomó las colonias seleccionadas y se disolvieron en un tubo con solución salina, se ajustó la turbidez de la suspensión a 0.5 en la escala de MC Farland por comparación visual con el estándar.

2. Inoculación de la placa:

Una vez ajustado la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces presionando firmemente la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para remover el exceso, luego se Inoculó en la superficie seca de la placa Mueller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

Aplicación de los discos: transcurrido 15 minutos de la inoculación de la placa, se procedió a colocar los discos preparados en la placa con la ayuda de una pinza estéril, se coloca también el disco del antibiótico de referencia. Luego se llevó a incubación a 35 °C por 16-18 horas.

5.6.3. Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando un vernier sobre un fondo negro. Una vez obtenido el diámetro de inhibición de los discos se procedió a calcular el porcentaje de inhibición respecto al antibiótico de referencia:

$$\% \text{ de inhibición: } \frac{\text{Diámetro de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro de inhibición del antibiotico de referencia}} \times 100$$

Para evaluar los porcentajes de inhibición de los extractos se utilizó la tabla de clasificación de actividad antimicrobiana proporcionada por el IMET (2007)(63)

Tabla 12.- Clasificación de la actividad antimicrobiana según porcentaje de inhibición

Actividad antimicrobiana	Porcentaje de inhibición
Inactivo	< 40 %
Poco activo	40 – 50 %
Moderadamente activo	51 – 57 %
Buena actividad	> 76%

Tomada de la referencia (63)

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para comprobar las variaciones y las interacciones entre los factores de estudio. Para evaluar las diferencias encontradas entre los promedios se realizó el Test de comparación múltiple (Tukey) a 5% de significancia. Para ello se utilizó el paquete estadístico ExpDes.pt en el ambiente R versión 3.3.1 (R CORE TEAM, 2016)

CAPITULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La tabla 13, nos muestra las características fisicoquímicas de las materias primas. Las características medidas fueron: El pH, Total de sólidos disueltos, densidad y acidez, los cuales son los principales parámetros de calidad para los frutos.

Tabla 13.- Características fisicoquímicas de las materias primas

Muestra	Ph	Sólidos Disueltos (°Brix)	Densidad (20°C)	Acidez
Toronja	2.156 ± 0.19 ^c	7.2 ± 0.84 ^b	1.0321 ± 0.003 ^b	6.792 ± 0.33 ^a
Huito	3.452 ± 1.54 ^b	15.84 ± 1.56 ^a	1.0598 ± 0.008 ^a	1.89 ± 0.12 ^b
Jengibre	6.192 ± 0.33 ^a	6.375 ± 2.49 ^c	1.0216 ± 0.002 ^c	0.15 ± 0.047 ^c

Promedio ± desvío padrón, (n = 7); Nota: Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa (p<0.05) entre las medias determinadas utilizando la prueba de Tukey.

De la tabla 13 se observa existen diferencias significativas entre las variables medidas (p<0.05) asimismo se observa que el menor valor de pH y acidez de los 3 frutos lo posee la Toronja, estas 2 variables son importantes para la supervivencia de los microorganismos. Los mayores valores de Sólidos y Densidad los posee el Huito. Se observa también en la tabla que los valores de Sólidos y Densidad están directamente relacionados, en los 3 frutos cuando se reportó un valor alto de solidos esto se repitió en el valor de densidad.

La "Toronja", posee buenas características fisicoquímicas para un antibacteriano pero esto es solo referencial, debido a que la parte usada en la toronja es la cáscara y sus valores fisicoquímicos medidos solo nos sirve para tener una idea del estado de madurez del fruto.

El "Huito" presenta un pH intermedio entre los 2 extractos en estudio, entre la toronja y el Jengibre posee el más alto valor de sólidos solubles y densidad.

El “Jengibre” presenta un pH cercano a la neutralidad, el valor de sólidos y densidad es el más bajo de los 3 extractos en estudio de la misma manera posee un bajo valor de acidez.

Granados (2013) (64) reporta para el “Huito” un pH de 3.5, y un valor de sólidos de 14.3 los cuales no difieren significativamente de los valores reportados en el cuadro 8 para el huito.

Swapnil (2014) (65) realizó la caracterización fisicoquímica de la “Toronja” reportando un valor de pH de 3, Sólidos 8.2 y densidad relativa 1.037.

Aparecida(2013) (66) reporta un valor de pH de 6.33 y de acidez 1.36 para el Jengibre; el valor de pH y acidez son concordantes con lo reportado por la bibliografía.

En los tres frutos se observa que las características fisicoquímicas encontradas en los frutos son similares a los reportados en la bibliografía.

De los 3 frutos analizados, el que presenta mejores características para ser aplicado como un antimicrobiano es el “Huito”, debido a que posee el valor de pH más ácido y un contenido de sólidos totales mayor que el “Jengibre”.

6.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Luego de caracterizar la materia prima se realizó el procedimiento para obtener los extractos, primero se desecó la materia prima luego se realizó la maceración de las muestras, se filtró y finalmente se realizó la destilación fraccionada para separar el alcohol y obtener los extractos etanólicos.

6.2.1 PROCESO DE DESTILACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Para obtener un extracto concentrado se montó un sistema de destilación fraccionada para recuperar el solvente utilizado. Como fuente de calor se utilizó un sistema de baño maría porque en pruebas preliminares se observó que el extracto alcohólico hierve con violencia cuando se le calienta directamente con la llama del mechero de bunsen.

Tabla 14.- Parámetros de operación del sistema de destilación fraccionada

Parámetro	Huito	Toronja	Jengibre
Temperatura de baño maría	100 °C	98°C	99°C
Temperatura interna del extracto	79 °C	65° C	72 °c
Temperatura de cabezal	68 °C	76°C	78°C
Tiempo total de destilación	149 min.	100 min.	125 min.

La temperatura interna del extracto registrada en la tabla 14, corresponde a la temperatura que alcanza el extracto en el equilibrio y está influenciada por el tipo de extracto y el tiempo que dura la destilación. Se puede observar que el extracto de huito registró una temperatura y tiempo mayor durante la destilación que los extractos de “Toronja” y “Jengibre”. Al tener un mayor tiempo en la destilación también dio lugar a que la temperatura interna del extracto se eleve en mayor proporción que los otros 2 extractos.

Existe una relación directa entre el tiempo y la temperatura interna del extracto, a más tiempo en el destilador mayor será la temperatura interna del extracto, sin embargo se observó que esta no llega hasta 80 °C, lo cual nos garantiza la separación completa del alcohol usado en la maceración sin destruir los metabolitos secundarios de los frutos.

Se registró además en los tres extractos la variación de la temperatura interna del extracto respecto al tiempo, en la figura 9, se muestra la variación de la temperatura interna del extracto de huito respecto al tiempo. Solo se muestra la gráfica del extracto de “Huito” porque es el que alcanzó mayor tiempo y temperatura, y porque en el caso de la “Toronja” y “Jengibre” la curva es similar solo que con valores menores de tiempo y temperatura.

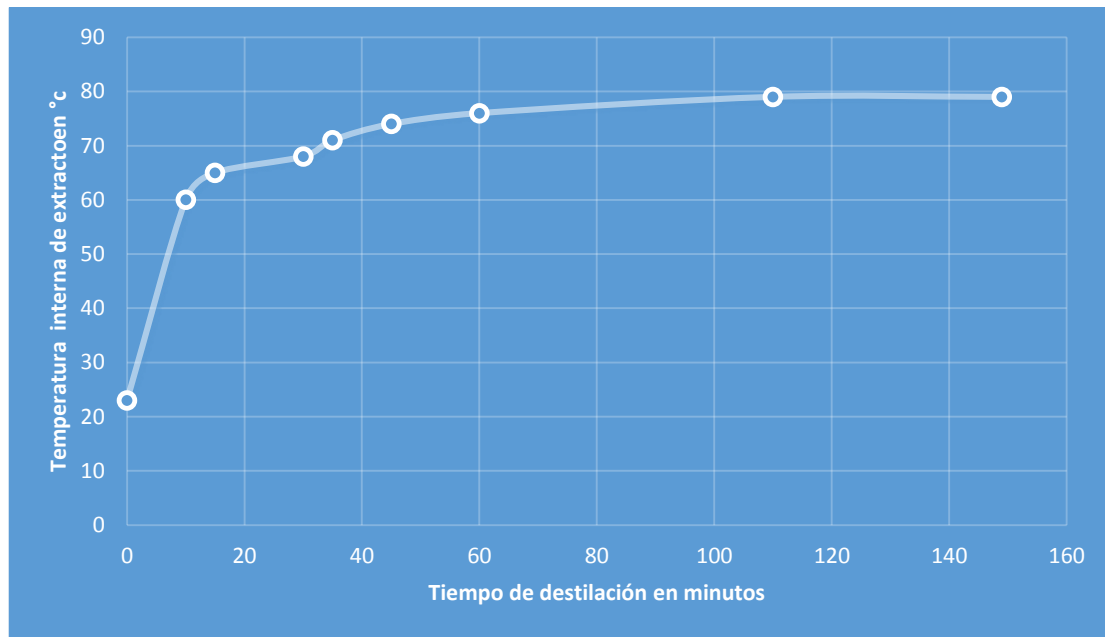


Figura 9. Curva de temperatura interna del extracto de Huito vs tiempo

Se observa en la gráfica que el punto inicial de la temperatura del extracto es 23 °C la cual es la temperatura que adquiere el extracto estando a temperatura ambiente. (Se observó que los extractos adquieren la temperatura del ambiente) La temperatura asciende rápidamente en 10 minutos hasta 60 °C y luego va subiendo gradualmente hasta alcanzar la temperatura de equilibrio.

La tabla 15, nos muestra las características fisicoquímicas de los extractos filtrados (Paso N° 5 en el proceso)

Tabla 15.- Características fisicoquímicas de los extractos filtrados

Muestra	pH	SÓLIDOS DISUELTOS (°Brix)	Densidad (20°C)	Grado de alcohol
Toronja	5.56	22	0.8232	95%
Huito	4.50	29	0.8629	80%
Jengibre	7.14	22.5	0.8183	97%

Considerando que el alcohol utilizado para la maceración es de grado 97° se puede afirmar, observando el grado de alcohol de cada extracto, que la extracción se realizó con mayor eficiencia en el huito, puesto que posee el menor valor de alcohol

En todos los casos el valor de pH se elevó mientras que el valor de densidad de cada extracto descendió debido al bajo valor de densidad del alcohol, 0.8 en promedio, en general se observa que los extractos adquieren las características del alcohol etílico.

Morcillo (67), obtuvo extracto filtrado de jengibre aplicando el mismo método (la maceración) reportando un valor de pH de 6 y densidad 0.922, lo cual difiere de lo registrado en la presente investigación. Esta diferencia puede deberse al tipo de alcohol empleado en la maceración, puesto que en nuestra extracción se utilizó alcohol rectificado de grado 97° y Morcillo (67); no indica el tipo de alcohol que utilizó en su investigación. Otro factor que influyó fue el origen de los rizomas de *Zingiber officinale* pues al ser distintas zonas, sus características fisicoquímicas varían significativamente, este factor fue investigado por Loachamín (68), que demostró que los factores edafológicos y ambientales afectan las composición química de Hierba luisa y Jengibre.

De Toronja y Huito no se encontraron referencias sobre trabajos similares por lo cual no se puede ampliar en la discusión.

6.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS

Las características de los extractos etanólicos obtenidos se muestran en la tabla 16 y la tabla 17 muestra el rendimiento global de cada materia prima en el proceso de obtención de los extractos etanólicos.

Tabla 16.- Características fisicoquímicas de los extractos etanólicos obtenidos

Muestra	PH	SÓLIDOS DISUELTOS (°Brix)	Densidad	Grado de alcohol
Toronja	4.62	40	0.9468	0 %
Huito	3.33	29	1.1118	0 %
Jengibre	6.64	33	0.8117	0 %

Se observa que el valor de pH de la toronja experimentó un alza de 100% mientras que los valores de pH del Huito y el Jengibre permanecen dentro de los rangos de inicio, esto nos indica que el comportamiento de cada materia prima es distinto en todo el proceso de extracción.

Las variables de sólidos disueltos y Densidad experimentaron un incremento respecto a sus valores iniciales, esto nos indican cuanto se concentraron los extractos

En los 3 casos el grado de alcohol es cero, lo cual indica que la separación de alcohol es completa durante el proceso de destilación.

Tabla 17. - Rendimiento de la materia prima

Materia prima	Cantidad Usada (gr)	Rendimiento (%)
Toronja	144	10.42
Huito	572.5	8.73
Jengibre	445.38	5.16

El mayor rendimiento lo posee la Toronja, pese a que la parte utilizada son las cáscaras, el Huito y el Jengibre se utilizaron el fruto completo.

El extracto obtenido con el método de la maceración se puede definir como una oleorresina, según lo explica Peredo (69), el disolvente al entrar en contacto con la muestra vegetal, solubiliza el aceite esencial junto con otras sustancias como resinas y ceras, de manera que el extracto obtenido es una mezcla compleja integrada por el aceite esencial de la muestra y todos los compuestos solubles al solvente utilizado.

Balboa (70) obtuvo aceite esencial de cáscaras de *Citrus sinensis* (Naranja), diseñando su propio equipo de hidrodestilación, la temperatura del vapor a la cual llevó a cabo la extracción del aceite esencial fue de 94 °C, obteniendo un contenido de Limoneno mayor a 90%. De acuerdo a estos resultados podemos

concluir que los extractos obtenidos con nuestro sistema de destilación fraccionada contienen un alto porcentaje de compuestos activos propios de la muestra vegetal en estudio, dado que las temperaturas internas de los extractos de Huito, Toronja y Jengibre, a las cuales se llevan a cabo las destilaciones no sobrepasan los 80°C.

Durán *et al* (71), estudió el efecto del tiempo de destilación en la composición química del aceite esencial de *Lippia alba*, aplicando el método de hidrodestilación asistida por microondas. Determinó que el tiempo de destilación tiene influencia en la composición química del aceite esencial, observando que a mayor tiempo de destilación se incrementa el contenido de Carvona y Bicyclosesquifelandreno mientras que el contenido de Limoneno disminuye. El contenido de carvona encuentra su punto máximo a 75 minutos de destilación y luego al extenderse el tiempo de destilación, el contenido de carvona se reduce. Pese a que es una muestra vegetal muy diferente a nuestros frutos en estudio, podemos enfocarnos en el proceso de destilación y afirmar que el tiempo de destilación en las muestras vegetales no afecta a la calidad de aceite esencial, solo lo hacen variar en su composición química.

Se ha logrado obtener los extractos etanólicos de los 3 frutos en estudio, aplicando la técnica de maceración y concentrándolos con el sistema de destilación fraccionada, los parámetros de tiempo y temperatura de la destilación nos garantizan la riqueza de los extractos en compuestos activos y están aptos para la evaluación de la actividad antibacteriana.

6.3. RESULTADOS PRUEBA DE DISCO DIFUSIÓN – MÉTODO DE KIRBY & BAUER

Cada prueba se realizó por triplicado usando un antibiótico de referencia, el cual se eligió según los antibiogramas practicados a cada cepa bacteriana. Los diámetros de inhibición se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 18.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a *Staphylococcus saprophyticus* expresados en milímetros

Repeticiones	Toronja	Huito	Jengibre	Control Positivo (Amoxicilina)
Repetición 1	8	16	6	28
Repetición 2	8	18	10	32
Repetición 3	8	19	11	32
Promedio	8 R	17.67 R	9 R	30.66 S
Desviación estándar	0	1.52	2.64	2.30

Nota: Las letras mayúsculas, colocadas al final de cada promedio de los halos de inhibición indican la interpretación de los diámetros obtenidos. R= Resistente, I= Intermedio, S= Sensible

De la tabla 18 se observa que los 3 extractos reportaron inhibición frente a la cepa de *Staphylococcus saprophyticus*, el huito mostró un halo mayor a los otros dos extractos y un equivalente al 56 % en promedio del antibiótico de referencia.

Los halos de inhibición reportados indican que la cepa de *Staphylococcus saprophyticus* es resistente a la acción de los extractos etanólicos de acuerdo con las tablas de interpretación de los diámetros de inhibición del de acuerdo con las tablas de interpretación de los diámetros de inhibición emitidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés: Clinical and Laboratory Standard Institute)

La siguiente figura nos muestra una de las placas del experimento realizado.



Figura 10. Halos de inhibición de los extractos frente a *Staphylococcus saprophyticus*. En la figura 10, se observa los halos de inhibición formado por los 3 extractos. En este caso se usó 2 antibióticos, se tomó la amoxicilina como referencia porque mostró un radio mayor al de fosfomicina.

Tabla 19.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a *Pseudomona aeruginosa* expresados en milímetros

Repeticiones	Toronja	Huito	Jengibre	Control Positivo (Sulfato de colistina)
Repeticion 1	8	13	6.5	26
Repeticion 2	10	13	5	25
Repeticion 3	11	13	8	28
Promedio	9.66 R	13 S	6.5 R	26.33 S
Desviación Estándar	1.53	0	1.5	1.53

Nota: Las letras mayúsculas, colocadas al final de cada promedio de los halos de inhibición indican la interpretación de los diámetros obtenidos. R= Resistente, I= Intermedio, S= Sensible

En la tabla 19, se observa que los 3 extractos formaron un halo de inhibición frente a la cepa de *Pseudomona aeruginosa*, el Huito muestra un valor mayor que Toronja y Jengibre.

Los halos de inhibición reportados indican que la cepa de *Pseudomona aeruginosa* es resistente a la acción de los extractos etanólicos de Toronja y Jengibre y sensible al extracto de Huito, de acuerdo con las tablas de interpretación de los diámetros de inhibición emitidos por el CLSI (72).

La siguiente figura muestra una de las placas del experimento realizado:



Figura 11.- Halos de inhibición de los extractos etanólicos frente a *Pseudomona aeruginosa*.

En la figura mostrada no se observa con claridad el halo de inhibición formado por el extracto de Jengibre debido a que está muy pegado a la pared del disco, no obstante, al visualizarlo en el laboratorio se observó la formación de un pequeño halo de inhibición. Los demás halos de inhibición se visualizan con facilidad, en este caso no se utilizó un segundo antibiótico de referencia

Tabla 20.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a *E. Coli* expresados en milímetros

<i>Repeticiones</i>	<i>Toronja</i>	<i>Huito</i>	<i>Jengibre</i>	<i>Control Positivo (Sulfato de Colistina)</i>
<i>Repetición 1</i>	0	11	0	15
<i>Repetición 2</i>	0	10	0	16
<i>Repetición 3</i>	0	10	0	17
<i>Promedio</i>	0	10.33	0	16
<i>Desviación Estándar</i>	0	0.56	0	1

Los extractos de toronja y jengibre no mostraron efectividad frente a *E. coli* mientras que el extracto de huito reportó un halo de inhibición equivalente al 62 % en promedio del halo de inhibición del antibiótico en referencia.

Para la cepa *E. coli* no se tiene valores de referencia para clasificarlos como Resistente, Intermedio o Sensible, dado que las tablas emitidas por la CLSI (72) no lo registra, debido a que, probablemente no se estaba usando el sulfato de colistina como antibiótico para *E. coli* y que actualmente se haya comenzado a usarlo debido al incremento de la resistencia bacteriana. De todas formas, se observa que los extractos de Toronja y Jengibre no inhibieron el crecimiento de la cepa de *E. coli* y el halo reportado por el extracto de Huito es muy pequeño como para considerar que la cepa es sensible a este.

En la siguiente figura se muestra una de las placas del experimento de *E. Coli* frente a los 3 extractos en estudio.

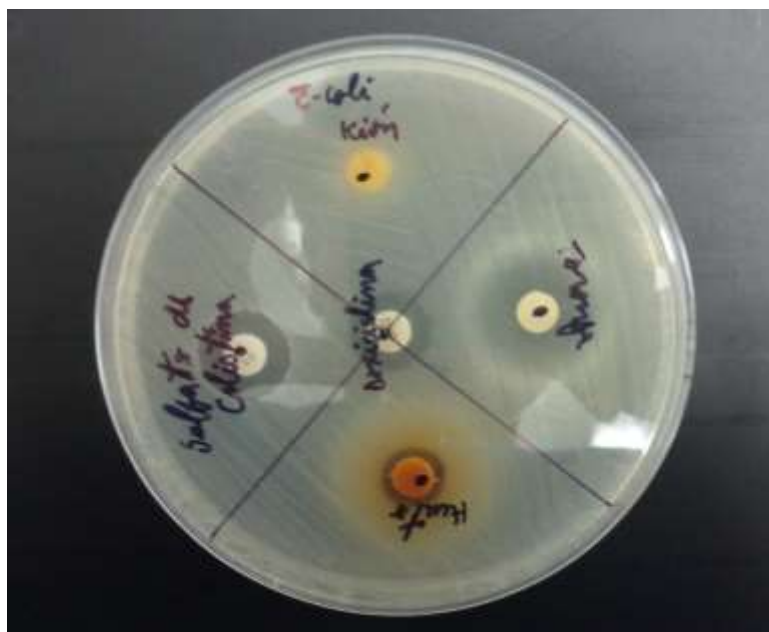


Figura 12.- Halos de Inhibición de los extractos frente a *E. Coli*

En la figura 12 se puede observar el halo de inhibición formado por el extracto etanólico de Huito; se observa una leve formación de halo de inhibición en el extracto de toronja, pero no logra inhibir por completo la formación de las colonias de *E. Coli* por lo cual se consideró como cero el halo de inhibición. El extracto de Jengibre, fue rebasado por completo por la cepa bacteriana. El antibiótico de referencia formó un halo de inhibición bien marcado, se observa también en el centro de la placa un disco de Doxiciclina, el cual se usó como segundo antibiótico de referencia pero al mostrar un halo menor al de sulfato de colistina fue descartado.

Tabla 21.- Diámetros de Inhibición de los extractos etanólicos frente a *Salmonella enterica* expresados en milímetros

Repeticiones	Toronja	Huito	Jengibre	Control Positivo (Ciprofloxacina)
Repetición 1	0	11	0	32
Repetición 2	0	11	0	29
Repetición 3	0	10	0	30
Promedio	0 R	10.66 R	0 R	30 S
Desviación Estándar	0	0.57	0	1.53

Los halos de inhibición de los 3 extractos etanólicos frente a *Salmonella enterica* presentan la misma tendencia que frente a *E. Coli*, los extractos de toronja y jengibre no reportaron ningún halo de inhibición mientras que el extracto de huito reportó un valor similar al que mostró frente a *E. Coli* equivalente al 35 % en promedio del halo de inhibición del antibiótico de referencia.

Los halos de inhibición reportados indican que la cepa de *Salmonella enterica* es resistente a la acción de los extractos etanólicos de Toronja, Huito y Jengibre, de acuerdo con las tablas de interpretación de los diámetros de inhibición emitidos por el CLSI (72).

En la siguiente figura se muestra una de las placas del experimento realizado:

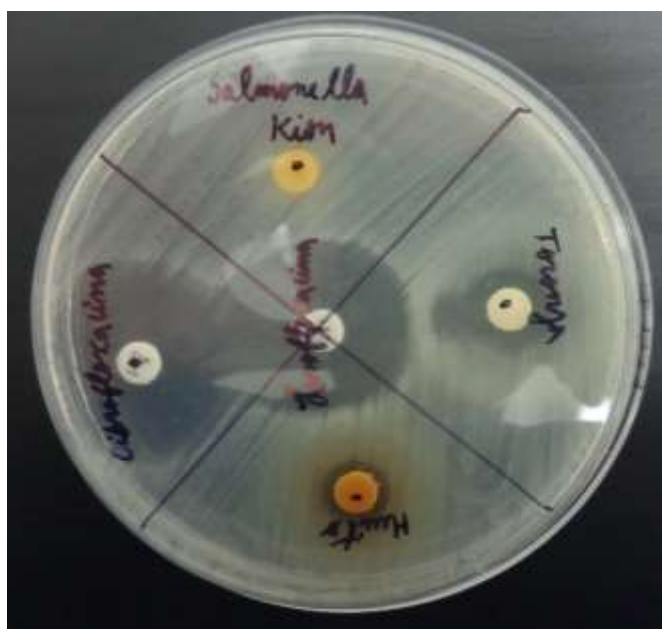


Figura 13. Halos de inhibición de los extractos etanólicos frente a *Salmonella enterica*

Nuevamente se observa un tenue halo de inhibición del extracto de toronja no obstante al verlo en la práctica se nota que la inhibición de la cepa no es completa, por esta razón se considera el halo de inhibición como cero. En el centro de la placa se observa un disco de levofloxacina, el cual fue colocado como segundo antibiótico de referencia, pero al formar un halo menor al de Ciprofloxacina fue descartado.

En los 3 casos se observó que el extracto de “Huito” ejerce una mayor actividad antibacteriana frente a las 4 cepas bacterianas, los extractos de “Toronja” y “Jengibre” muestran una nula acción frente a las cepas de *E. coli* y *Salmonella entérica* y una débil acción frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus saprophyticus*, esta situación descrita se puede visualizar mejor en la figura 14, donde se muestra el total de los experimentos realizados en función del halo de inhibición formado por cada uno de los extractos.

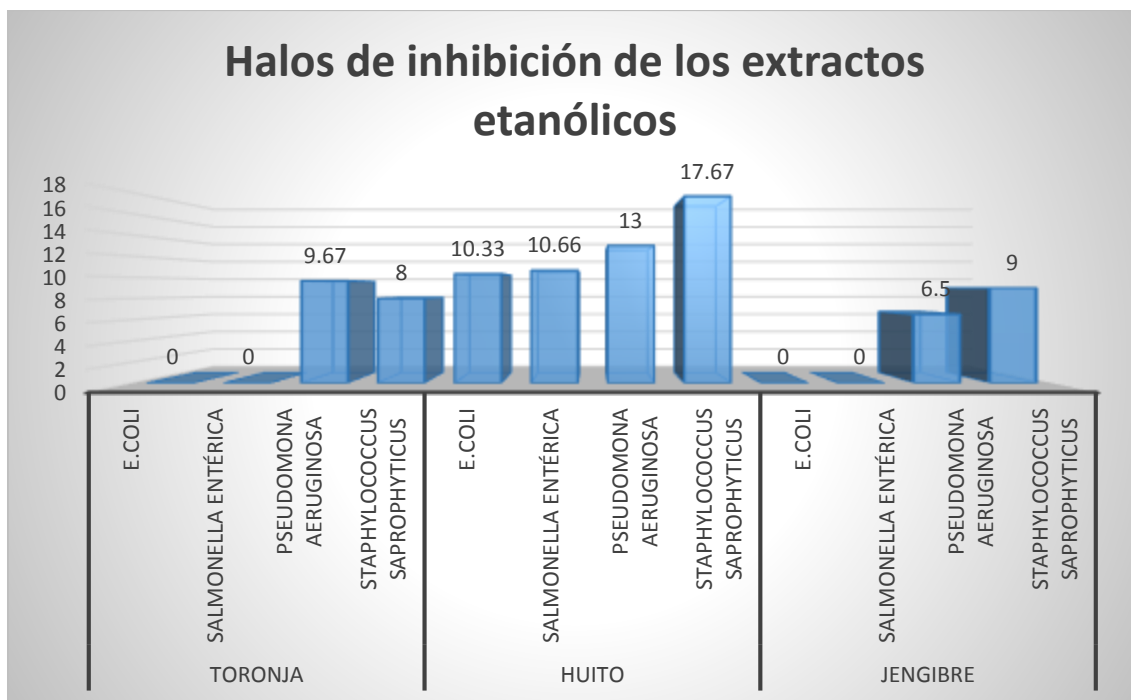


Figura 14.- Gráfico comparativo de los halos de inhibición de los 3 extractos etanólicos.

De la figura podemos observar que las cepas de *E. coli* y *Salmonella entérica* tienden a mostrar mayor resistencia a la acción de los extractos, puesto que frente al extracto de “Toronja” y “Jengibre” no se formó ningún halo de inhibición y frente a Huito formó un diámetro de 10 mm en promedio.

Lo mostrado en la figura 14 es corroborado por el análisis estadístico, el cual se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 22.- Análisis de varianza para los ensayos microbiológicos

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Toronja	0 ^{aB}	0 ^{bB}	0 ^{bA}	9.66 ± 1.53 ^{bA}
Huito	10.33 ± 0.56 ^{aC}	10.66 ± 0.57 ^{aBC}	17.67 ± 1.52 ^{aA}	13 ^{aB}
Jengibre	0 ^{bC}	0 ^{bC}	9 ± 2.64 ^{bA}	6.5 ± 1.5 ^{cB}

Promedio ± desvío padrón, (n = 3). Nota: Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa (p<0.05) entre las medias determinadas utilizando la prueba de Tukey. Las letras minúsculas representan las diferencias entre la variable fruto y las letras mayúsculas representan las diferencias entre la variable microorganismo.

Al realizar el análisis de varianza para los ensayos microbiológicos se observó que existen diferencias significativas (p <0.05) entre los resultados, considerando las 2 fuentes de variación, fruto y microorganismo.

De la Tabla 22, se puede observar que el extracto de Huito obtuvo los mejores resultados, analizando respecto a la variable microorganismo, en todos los casos el extracto de Huito inhibió el crecimiento de los microorganismos testeados. Se observa también que en todos los casos la cepa bacteriana *Staphylococcus saprophyticus* fue sensible a todos los extractos. Asimismo, el extracto de Toronja reportó un mayor halo de inhibición frente a *Pseudomona aeruginosa* que fue la cepa bacteriana que exhibió un mayor halo de inhibición que los otros extractos.

6.4. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ESTUDIADOS

De acuerdo a la lectura de los diámetros de inhibición de las placas, mostrados en las tablas 18,19, 20 y 21 se procedió a efectuar el cálculo del porcentaje de inhibición de los extractos respecto al antibiótico de referencia utilizado en cada caso según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro de inhibición del Antibiótico de referencia}} \times 100$$

Utilizando los valores medios en cada caso se obtuvo los porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos, los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 23.- Porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos respecto al antibiótico de referencia

	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Toronja	26.08%	36.73%	0%	0%
Huito	57.61%	49.37%	83.97%	35.21%
Jengibre	29.34%	24.69%	0%	0%

El extracto de toronja no mostró ninguna efectividad frente a *E. coli* y *Salmonella enterica*, frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus saprophyticus* mostró un porcentaje de inhibición bajo.

El extracto de Huito mostró efectividad frente a todas las cepas testeadas, el porcentaje más alto de inhibición se registró frente a *Staphylococcus saprophyticus* y el más bajo frente a *Salmonella enterica*.

El extracto de Jengibre exhibe el mismo comportamiento que el de Toronja, no mostró ninguna efectividad frente a *E. coli* y *Salmonella enterica*.

De acuerdo a la tabla 12, clasificación de la actividad antimicrobiana según porcentaje de inhibición, los porcentajes obtenidos se interpretan de la siguiente manera:

Tabla 24.- Cuadro de interpretación de los porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos

	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Toronja	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Huito	Buena actividad	Inactivo	Poco activo	Moderadamente activo
Jengibre	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo

Se observa que el extracto de toronja y jengibre son inactivos frente a las cepas testeadas, el extracto de Huito exhibe una buena actividad frente a *E. Coli* y una moderada actividad frente a *Staphylococcus saprophyticus*, es poco activo frente a *Pseudomona aeruginosa* e inactivo frente a *Salmonella enterica*.

Theanphong (73) estudió la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Citrus médica var. Sarcodactylis, aplicó la misma técnica de difusión de Kirby & Bauer, y usó la tetraciclina con antibiótico de referencia. Observó que el aceite esencial exhibe una actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, y es inactivo frente a *E. coli* y *Micrococcus luteus*.

Considerando que el *Citrus jambhiri* es un taxón híbrido de citrus médica (74) se puede hacer la comparación con nuestros extractos estudiados. En primera instancia hay que considerar que la tetraciclina es un antimicrobiano de carácter bacteriostático y la amoxicilina es bactericida, por esta razón es de esperar que forme un halo de inhibición mucho mayor que la tetraciclina. El diámetro del halo de inhibición del antibiótico de referencia influye de manera determinante en el cálculo de porcentaje de efectividad de los extractos. De esta manera se puede explicar por qué nuestro extracto de *Citrus jambhiri* no reporta actividad antimicrobiana. Adicional a ello las cepas testeadas exhiben resistencia a la doxiclina, el cual es un antibiótico de la familia de las tetraciclina por lo cual es evidente que nuestro extracto etanólico ha sido sometido a una prueba más “severa” que el aceite esencial de Theanphong (73).

Hamdan (57), trabajó en la determinación de la actividad biológica del extracto de la cáscara de Toronja, *Citrus jambhiri*, concluyendo que es rico en

compuestos terpénicos y flavonoides lo cual le confiere una actividad antioxidante y antiinflamatoria. En nuestro estudio observamos que pese a su riqueza en compuestos activos no logró inhibir de forma satisfactoria el crecimiento de las cepas testeadas por lo cual se puede concluir que el extracto de cáscaras de toronja no posee actividad antimicrobiana significativa frente a las bacterias resistentes testeadas.

Enriquez (48) realizó el tamizaje fotoquímico en rizomas de jengibre tomados de la ciudad de Chanchamayo, la zona geográfica es próxima al centro poblado de Sanibeni, lugar de donde se extrajo las muestras para nuestra investigación. Por esta razón se puede asumir que las muestras de jengibre son similares y poseen las mismas características fisicoquímicas y composición, tal como lo explica Loachamín (68), en su estudio sobre la influencia de los factores ambientales y el tipo de suelo en la composición química de Hierba Luisa y Jengibre.

Los resultados obtenidos por Flores(48) indican que el Jengibre de la zona de Chanchamayo presenta alcaloides, lactonas, aceites, glicósidos cardiotónicos, triterpenos, quinonas, resinas, flavonoides, taninos, azúcares reductores, antocianidinas, mucílagos y aminoácidos.

Chakotiya et al (75) informó sobre la actividad del extracto hidroalcohólico obtenido por percolación de *Zingiber officinale* frente a *Pseudomonas* formadora de películas, registrando un halo de actividad de hasta 27 mm, lo cual es muy superior a los 6.5 mm alcanzados por nuestro extracto, esto puede deberse a la diferente metodología de extracción y a la cepa de *Pseudomona* evaluada, ya que nuestra cepa demostró resistencia a 17 tipos de antibióticos lo cual indica que ya desarrolló mecanismos muy variados de resistencia lo cual lo hace más difícil de inhibir que la *Pseudomona* formadora de películas.

El único extracto que mostró efectividad frente a las cepas resistentes fue el extracto etanólico de *Genipa americana* en mayor medida frente a *E. coli*, respecto a esto, De Almeida (44) también reportó que el aceite esencial de este fruto inhibe el crecimiento de cepas resistentes, el diámetro de inhibición máximo registrado por Almeida fue de 12 mm frente a *Staphylococcus* resistente a meticiclina, pero hay que considerar que la cantidad de extracto usado en los discos de prueba fue 10 ul, la mitad de lo usado en nuestra investigación; esto

nos confirma que el extracto de huito posee una fuerte actividad antimicrobiana frente a cepas resistentes, lo cual lo hace una fuente potencial de extracción de compuestos activos para la industria farmacéutica. Su efectividad se explica en su riqueza de compuestos terpénicos y alcaloides.

La resistencia bacteriana como problema emergente en los últimos años debe ser combatida con la investigación de nuevos compuestos activos, es sabido que las plantas son una gran fuente de compuestos activos que son utilizados en la medicina tradicional. Nuestro estudio determinó que el extracto de *Genipa americana* posee actividad antimicrobiana frente a las cepas resistentes testeadas, lo cual lo convierte en un fruto promisorio en la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

1. Se determinó las características fisicoquímicas de los frutos de *Citrus jambhiri*, *Genipa americana* y *Zingiber officinale*, observándose que el fruto de *Genipa americana*, Huito, presenta las mejores características fisicoquímicas para ser aplicado como antibacteriano.
2. Se obtuvo extracto etanólico de *Citrus jambhiri*, *Genipa americana* y *Zingiber officinale*, en condiciones controladas determinándose sus características fisicoquímicas para la medición de su actividad antibacteriana.
3. Los extractos etanólicos de *Citrus jambhiri* y *Zingiber officinale* no exhibieron actividad antimicrobiana frente a ninguna de las cepas resistentes evaluadas excepto a *Staphylococcus saprophyticus* que fue la cepa que reportó sensibilidad a los 3 extractos etanólicos de las plantas.
4. El extracto de *Genipa americana*, “Huito” reportó buena actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus*, de acuerdo a las tablas de interpretación del IMET y la NCCLS.

CAPÍTULO VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Genipa americana*. Así también, evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso.
- Realizar el fraccionamiento del extracto etanólico de *Genipa americana* utilizando diferentes solventes como hexano, éter, etc. para evaluar el compuesto responsable del efecto antibacteriano.
- Investigar en los métodos de aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de *Genipa americana*, para su inclusión en productos farmacéuticos y alimenticios.
- Se recomienda realizar estudios sobre otros frutos amazónicos para determinar su actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas multiresistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015.
2. Calderón Rojas G, Aguilar Ulate L. Resistencia antimicrobiana. *Rev MÉDICA COSTA RICA Y CENTROAMÉRICA*. 2016;LXXVIII:757–63.
3. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. OMS. 2017 [cited 2018 Jan 18]. p. 1. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
4. Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Kallen A. Morbidity and Mortality Weekly Report - Pan-Resistant New Delhi Metallo-BetaLactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* — Washoe County, Nevada, 2016. Atlanta; 2017.
5. SADER HS. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica: ¿Cómo estamos? *Rev Chil infectología*. 2002;19:S5–13.
6. De Caso R, Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú Carbapenems resistant *Klebsiella pneumoniae*. First case of type KPC carbapenemase in Peru. 192 *Rev Soc Peru Med Interna*. 2013;26(4).
7. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-Gonzalez A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo: Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017;34(2):261–7.
8. Arias I, Meza A. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella*, *Shigela* y *Vibrio Cholerae*, Perú 1997-2002. Vol. 21, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. Instituto Nacional de Salud; 2002. 273-275 p.
9. Paz Rojas EL, Ponce de León Pandolfi D, Ponce Ramirez R. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Médica Peru*. 2008;25(3):140–7.
10. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos. Lima; 2017. 96 p.
11. World Health Organization. ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT. 2017.
12. Domingo D, Lopez-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Española Quimioter*. 2003;16(4):385–93.
13. Rengifo Salgado EL. Taller;La Amazonía: Aporte de la ciencia a su

- conocimiento y el estado de salud de su población" Iquitos: Instituto de Investigaciones para la Amazonía peruana - IIAP; 2010. p. 14.
14. Liliana E, Salgado R, Emilio G, Arana V, Vargas GE, O AH, et al. CATASTRO DE COMPUESTOS QUÍMICOS DE INTERÉS MEDICINAL EN ESPECIES VEGETALES AMAZÓNICAS. 1981;
 15. Aguilera Insaurralde LC, Figueredo G. Introducción a la Fruticultura. 127th ed. Ministerio de Agricultura y Ganadería Viceministerio de Agricultura Dirección de Educación Agraria, editor. Gobierno Nacional de Paraguay;
 16. Rehman R, Akram M, Akhtar N, Jabeen Q, Saeed T, Shah SMA, et al. Zingiber officinale Roscoe (pharmacological activity). J Med Plants Res. 2011;5(3):344–8.
 17. Errecalde JO. Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, editor. ROMA; 2004. 67 p.
 18. Cavalieri SJ, Harberk RJ, McCarter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sautter RL, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano. Marie B. Coyle, editor. Washington; 2009. 1-248 p.
 19. Puig Peña Yamila, Espino Hernández María, Leyva Castillo Virginia. Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. Panor Cuba y Salud. 2011;6(1):30–8.
 20. Medeiros MAN, Oliveira DCN de, Rodrigues D dos P, Freitas DRC de. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. Rev Panam Salud Pública. 2011;30(6):555–60.
 21. Estrella Chiriboga VP. ESTUDIO PILOTO SOBRE EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN PECHUGA DE POLLOS COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE AMBATO. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO; 2017.
 22. Noroña Bastidas GA. “DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN CARNE Y VÍSCERAS DE ORIGEN BOVINO QUE SE EXPENDEN EN LA CIUDAD DE QUITO.” UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO; 2017.
 23. Castillo Rengifo JM. “DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y CARGA MICROBIANA DE LA LECHE CRUDA, QUE SE EXPENDE EN LA CIUDAD DE IQUITOS, 2013.” Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.
 24. Fernandini Castillo CJ. “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN LECHE CRUDA OFERTADA AL PÚBLICO EN EL DISTRITO DE TRUJILLO – LA LIBERTAD.” UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO ORREGO; 2017.
 25. Espinosa Plascencia A, López Arvayo PJ, González Carrillo HH,

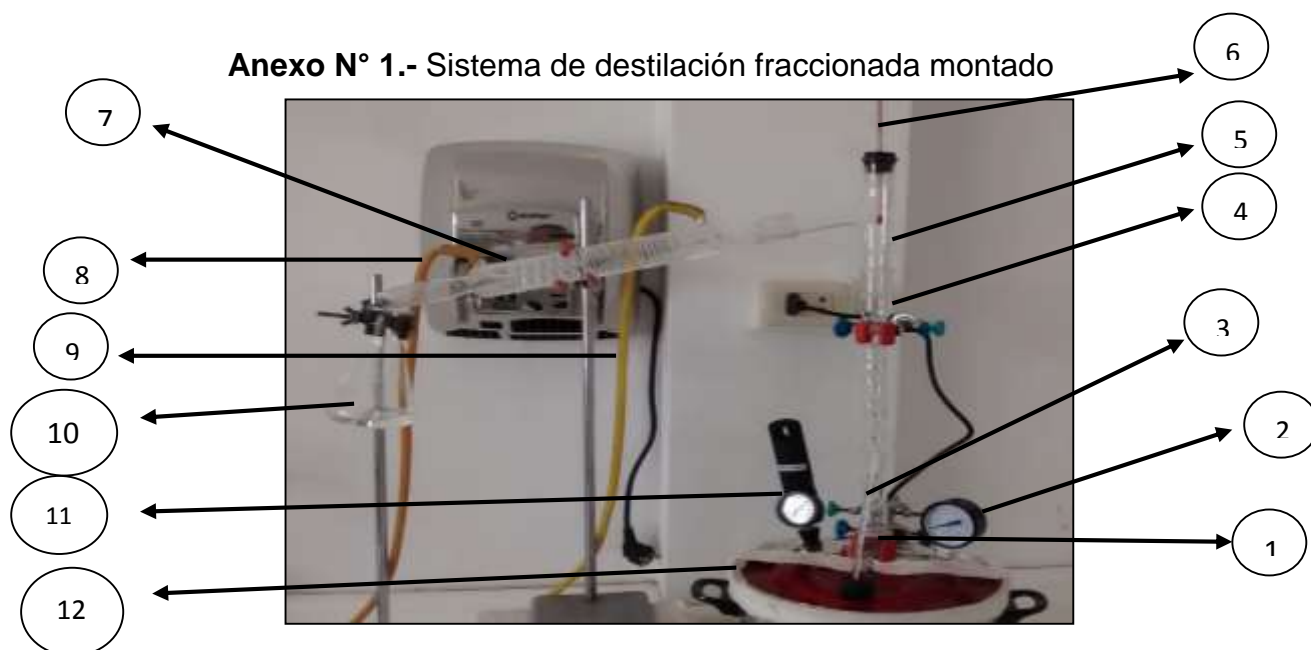
- Bermudez Almada M del C. EFECTO DEL CONGELADO Y COCINADO SOBRE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN CAMARÓN DE CULTIVO. *Rev Ciencias Biológicas y la Salud*. 2011;13(3):12–21.
26. Almada B, Del Carmen M, Hayamaí H, Carrillo G, Espinosa Plascencia A, Barbeitia GC, et al. Estabilidad de sulfametazina en carne y productos cárnicos de cerdo tratados térmicamente Stability of sulfamethazine in pork and thermally treated swine meat products. *Vet México Vet Méx*. 2004;35(352):91–100.
 27. Galindo Cobian JR. ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LA PERSISTENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE SOMETIDAS A TRATAMIENTOS TÉRMICOS. UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA; 1993.
 28. Carrión Jara AV, García Gómez CR. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES : DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA METÓDICA. UNIVERSIDAD DE CUENCA - ECUADOR; 2010.
 29. Ortuño Sánchez MF. MANUAL PRACTICO DE ACEITES ESENCIALES, AROMAS Y PERFUMES. PRIMERA EDICIÓN. AIYANA EDICIONES, editor. ESPAÑA; 2006. 276 p.
 30. Plantas D, Amazonas D, Gonzalez Villa AA. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANOLICOS. 2004;
 31. Vizzotto M, Krolow AC, Eva G, Weber B, Clima E, Pelotas T. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. *Minist da Agric Pecu e Abast*. 2010;1(316):16.
 32. Ávalos García Elena Pérez-Urria Carril A. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Ser Fisiol Veg*. 2009;2(3):119–45.
 33. Ruiz JR, Roque M. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CUATRO PLANTAS DEL NOR-ORIENTE PERUANO Antimicrobial activity of four plants from Peruvian north-east. *Cienc E Investig - UNMSM*. 2009;12(1):41–7.
 34. Correa Padrón FE. EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES COMO INHIBIDORES DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN PRODUCTOS CÁRNICOS. UNIVERSIDAD DE AZUAY; 2010.
 35. Espinosa Andrews H, García Márquez E, Gastélum Martínez E. LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y TECNOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN. *NANOBIO*. 2016;1:145.
 36. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(1):01–9.
 37. Ramirez C, Stella L, Castaño M, Stella Ramirez Profesor Asociado L, Marin Castaño D. METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. *Sci Tech Año XV*. 2009;42(42):263–8.

38. Sánchez-García E, Castillo-Hernández SL, García-Palencia P. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. Investig en plantas importancia médica. :77–100.
39. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas Bacteriol y Virol Médica. 2006;663–72.
40. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, M07-A09 2012 p. 48.
41. IIAP. HUITO [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 20]. Available from: <http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/CDinvestigacion/iiap/iiap2/CapituloIII-23.htm#TopOfPage>
42. Linnaeus C von. Tropicos _ Name - Genipa americana L. [Internet]. Trópicos.org. 2017 [cited 2017 Dec 13]. Available from: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=27900116>
43. Mejía K, Rengifo E. Plantas Medicinales de Uso Popular. 2nd ed. Agencia Española de Cooperación Internacional, editor. Iquitos: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONIA PERUANA; 2000. 286 p.
44. de Almeida D. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE Genipa americana L. (RUBIACEAE). Universidade Federral do Rio de Janeiro; 2008.
45. Francis JK. Genipa americana L. Dep Agric Nueva Orleans . 1993;5.
46. Pinto AB, Guedes CM, Moreira RFA, De Maria CAB. VOLATILE CONSTITUENTS FROM HEADSPACE AND AQUEOUS SOLUTION OF GENIPAP (GENIPA AMERICANA) FRUIT ISOLATED BY SOLID PHASE-EXTRACTION METHOD. FLAVOUR Fragr J. 2006;21:488–91.
47. Samara Ferreira A. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE Genipa americana L. (JENIPAPO). UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE; 2014.
48. Flores E, Vela P. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de Zingiber officinale Roscoe Jengibre; de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. Rev Médica Vallejana. 2008;5(1):50–64.
49. Linnaeus C. Tropicos _ Name - Zingiber officinale Roscoe [Internet]. Trópicos.org. 2017 [cited 2017 Dec 15]. p. 1. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/34500018>
50. Corado Arana FF. Evaluación del efecto de cuatro enmiendas orgánicas como fertilizante, en el rendimiento de Jengibre (Zingiber officinale) El Asintal Retalhuleu [Internet]. Universidad de San Carlos de Guatemala; 1991. Available from: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_1154.pdf
51. Leyva MA, Ferrada PJ, Martínez JR, Stashenko EE. RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE Zingiber

- officinale EN FUNCIÓN DEL DIÁMETRO DE PARTÍCULA. *Sci Tech*. 2007;33:187–1888.
52. Vázquez Ribeiro O, Alva A, Valles JM. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*). *Rev Amaz Investig Aliment*. 2001;1(1):38–42.
 53. Figuera Chacín J, Malavé Acuña ADC, Cordero Mendoza JJ, Méndez Natera Rafael Jesús. Constituyentes químicos de las hierbas y especias: Efectos sobre la salud humana Chemical constituents of herbs and spices: Effects on human health. *Rev Científica UDO Agrícola*. 2013;13(1):1–16.
 54. Palacios J. *Citricultura Moderna*. 1st ed. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1978. 409 p.
 55. Linnaeus C. *Tropicos* _ Name - *Citrus jambhiri* Lush. [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 16]. p. 1. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/50157616>
 56. Chaliha BP, Sastry GP, Rao PR. CHEMICAL EXAMINATION OF THE PEEL OF CITRUS JAMBHIRI LUSH. *Tetrahedron*. 1965;21:1441–3.
 57. Hamdan D, El-Readi MZ, Tahrani A, Herrmann F, Kaufmann D, Farrag N, et al. Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush. *Food Chem*. 2011;127(2):394–403.
 58. Battinelli L, Mengoni F, Lichtner M, Mazzanti G, Saija A, Mastroianni CM, et al. Effect of Limonin and Nomilin on HIV-1 Replication on Infected Human Mononuclear Cells. *Planta Med*. 2003;69:910–9013.
 59. NORMA TÉCNICA PERUANA. Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales. Determinación de la acidez. NTP 203.070 INSTITUTO NACIONAL DE CALIDAD (INACAL); 2012 p. 9.
 60. NORMA TÉCNICA PERUANA. Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales. Determinación de la densidad relativa. NTP 203.069 INSTITUTO NACIONAL DE LA CALIDAD (INACAL); 2012 p. 11.
 61. NORMA TÉCNICA PERUANA. Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales. Determinación de los sólidos solubles. 203.072 INSTITUTO NACIONAL DE LA CALIDAD (INACAL); 2012 p. 12.
 62. AOAC Official methods 981.12 pH of Acidified Foods. Association of Official Agricultural Chemists, 981.12 20th AOAC ; 2016 p. 2.
 63. IMET. Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana. *Essalud* 2007.
 64. Joel Fredy, Granados Mercado. Determinación de parámetros técnicos para elaborar *Genipa americana* (Huito) en almibar. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2013.
 65. Swapnil Y. C, C. R. H, Ruknuddin G, P.K. P. Pharmacognostical evaluation of *Citrus jambhiri* Lush. fruit. *Anc Sci Life*. 2014;34(2):96–9.

66. Aparecida Suman P, Leonel M. OBTENÇÃO DE VINAGRE A PARTIR DE MANDIOCA E GENGIBRE OBTATION ÓFVINEGAR FROM CASSAVA AND GINGER. *Energía Na Agric.* 2013;28(1):52–6.
67. María José. Morcillo Villaroel, Madeleine Nicole PM. Elaboración de fitofármaco a partir del extracto hidroalcohólico de dos especies de Jengibre. Universidad de Guayaquil; 2017.
68. Loachamin Suntaxi LN, Loayza Valarezo CM. Variación de la composición química de los aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y jengibre (*Zingiber officinale*) en función de las condiciones ambientales y del tipo de suelo de la zona de cultivo en las provincias de Loja, Azuay, Cañar, Oro y Zamora Chinchipe. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO CARRERA: BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES; 2016.
69. Peredo Luna HA, Palou García E, Lopez Malo A. ACEITES ESENCIALES : MÉTODOS DE EXTRACCIÓN. *TEMAS Sel Ing Aliment.* 2009;3(1):24–32.
70. Balboa Laura M. Obtención experimental de aceite esencial y subproducto a partir de cáscara de naranja(*Citrus sinensis*). Universidad Mayor de San Andrés; 2015.
71. Durán D, Monsalve LA, Martínez JR, Stashenko E. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia , y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Sci Tech.* 2007;XIII(33):435–8.
72. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. M100-S25 Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio; 2015 p. 240.
73. Theanphong O, Songsak T, Mingvanish W. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Sieber) Swingle Leaf. *Mahidol Univ J Pharm Sci.* 2008;35:1–4.
74. Mabblerley D. 01 - A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea.* 1997;7(2):167–72.
75. Chakotiya AS, Tanwar A, Narula A, Sharma RK. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. *Microb Pathog.* 2017;

ANEXOS



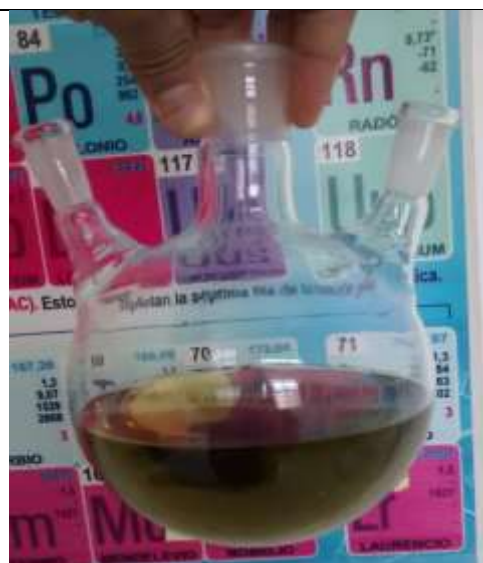
LEYENDA

1	Matraz de 3 entradas conteniendo el extracto a destilar
2	Manómetro para medición de presión interna del extracto durante la destilación
3	Termómetro de alcohol para medir la temperatura de cabezal
4	Columna de fraccionamiento tipo vigreux de 12 niveles y 30 cm de largo
5	Cabezal de destilación (pieza acodada de 75° de inclinación)
6	Termómetro de alcohol para medir temperatura de cabezal
7	Condensador para enfriar el alcohol recuperado
8	Manguera de alimentación del condensador
9	Manguera de descarga del condensador
10	Matraz de recogido de destilado (alcohol recuperado)
11	Termómetro electrónico para medir temperatura interna del extracto
12	Olla conteniendo agua desionizada que hace la función de baño maría

Anexo N° 2.- Obtención Del Extracto De Huito



Anexo N° 3.- Obtención Del Extracto De Toronja



Anexo N° 4.- Obtención Del Extracto De Jengibre



Anexo N° 5.- Cámara De Bioseguridad Donde Se Realizó Los Análisis Microbiológicos



Anexo N° 6 Discos comerciales de antibióticos

