



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

TESIS

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO
HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE CHIRIMOYA (*Annona
cherimola*) EN EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus
aureus* Y *Escherichia coli*”

PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:

QUIMICO FARMACEUTICO

BACHILLER: CARBAJAL TOVAR Jhohana María

ASESOR: Mg. DIAZ URIBE Julio

LIMA – PERU

2016

Dedicatoria

A Dios, A mis padres Juan y María y a mis hermanos Ángela y José, ya que tenerlos a mi lado me da las fuerzas y ganas de ser mejor cada día. A Miguel Ángel y a todos aquellos que me brindaron su más sincera amistad, y sus mejores deseos.

Agradecimientos

A mi querida Universidad Alas Peruanas.
A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por permitirme el uso de sus instalaciones. A la profesora Bertha Jurado, del área de farmacognosia y al profesor Nelson Bautista Cruz, del área de Microbiología, por las enseñanzas, apoyo incondicional y compromiso para esta tesis.

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*, a concentraciones de 25%, 50% y 75%; para poder determinar la actividad antibacteriana se utilizó el método de disco difusión (Kirby – Bauer), lo cual permitió medir la sensibilidad in vitro de los microorganismos, se utilizó como control positivo a la gentamicina 10µg; y como control negativo alcohol de 70°. Los resultados de la actividad antibacteriana revelaron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya a concentraciones de 25% y 50%, son inactivos frente a las cepas estudiadas, mientras que a concentración de 75%, mostro poca actividad frente a *Staphylococcus aureus* con 40% de porcentaje de inhibición; y una buena actividad frente a *Escherichia coli*, con 84% de porcentaje de inhibición.

Además se realizó el análisis fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico, el cual reveló la presencia de carbohidratos, compuestos fenólicos (taninos), aminoácidos libres y amino grupos, flavonoides, chalconas, auronas, catequina e isoflavona, triterpenoides y esteroides, naftoquinonas, antronas y antranonas, alcaloides, antocianinas y flavonoides catéquicos, saponinas, glicósidos y azúcares reductores; siendo los más importantes; los flavonoides, fenoles, taninos y glicósidos, ya que estos estarían relacionados con la actividad antibacteriana de las plantas.

Se concluye, que el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), a una concentración de 75%, es muy activo frente a *Escherichia coli*, mientras que para el *Staphylococcus aureus*, presenta poca actividad.

PALABRAS CLAVES: *Annona cherimola*, actividad antibacteriana, extracto hidroalcohólico, halo de inhibición, porcentaje de inhibición.

ABSTRACT

In this research the antibacterial activity in vitro of the alcoholic extract of the leaves of cherimoya (*Annona cherimola*) in the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, at concentrations of 25%, 50% and 75% is determined; to determine the antibacterial activity of the disk diffusion method (Kirby - Bauer) was used, which allowed to measure the in vitro susceptibility of microorganisms, was used as gentamicin 10 ug positive controls; and as a negative control 70 per cent alcohol. The results of antibacterial activity showed that the hydroalcoholic extract of leaves Chirimoya at concentrations of 25% and 50%, are inactive against these strains, whereas a concentration of 75%, against *Staphylococcus aureus* showed little activity with 40 % percent inhibition; and good activity against *Escherichia coli*, with 84% percent inhibition.

Moreover the preliminary phytochemical analysis of the hydroalcoholic extract, which revealed the presence of carbohydrates, phenolics (tannins), free amino acids and amino groups, flavonoids, chalcones, aurone, catechin and isoflavone, triterpenoids and steroids, naphthoquinones, anthrones and held antranonas alkaloids, anthocyanins and flavonoids catechists, saponins, glycosides and reducing sugars; It is the most important; flavonoids, phenols, tannins and glycosides, since these would relate to the antibacterial activity of plants.

It is concluded that the hydro-alcoholic extract of leaves of cherimoya (*Annona cherimola*) at a concentration of 75%, is highly active against *Escherichia coli*, while for *Staphylococcus aureus*, has little activity.

KEYWORDS: *Annona cherimola*, antibacterial activity, hydro-alcoholic extract, halo of inhibition percent inhibition.

ÍNDICE

CARATULA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	xi
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
1.1. Descripción de la Realidad Problemática.....	12
1.2. Formulación del Problema.....	14
1.2.1. Problema General.....	14
1.2.2. Problemas Específicos.....	14
1.3. Objetivos de la Investigación.....	14
1.3.1. Objetivo General.....	14
1.3.2. Objetivos Específicos.....	14
1.4. Hipótesis de la Investigación.....	15
1.4.1. Hipótesis General.....	15
1.4.2. Hipótesis Específicas.....	15
1.5. Justificación e Importancia de la Investigación.....	16
1.5.1. Justificación de la Investigación.....	16
1.5.2. Importancia de la Investigación.....	16

CAPITULO II: MARCO TEORICO.....17

2.1. Antecedentes de la Investigación.....	17
2.1.1. Antecedentes Nacionales.....	17
2.1.2. Antecedentes Internacionales	20
2.2. Bases Teóricas.....	24
2.2.1. Aspectos generales de <i>Annona cherimola</i> (chirimoya).....	24
2.2.1.1. Clasificación Taxonómica.....	24
2.2.1.2. Origen	24
2.2.1.3. Distribución geográfica	24
2.2.1.4. Descripción botánica.....	25
2.2.1.5. Usos tradicionales.....	27
2.2.1.6. Composición química.....	28
2.2.2. Bacterias.....	28
2.2.2.1. Tamaño.....	28
2.2.2.2. Morfología microscópica.....	29
2.2.2.3. Morfología macroscópica.....	30
2.2.2.4. Clasificación.....	31
2.2.2.5. Resistencia bacteriana.....	33
2.2.3. Descripción de la cepas a usar.....	34
2.2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.2.3.2. <i>Escherichia coli</i>	36
2.2.4. Antibióticos.....	38
2.2.5. Aminoglucósidos.....	39
2.2.6. Principios activos de plantas	41
2.3. Definición de Términos Básicos.....	43

CAPITULO III: METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.....47

3.1. Tipo de Investigación.....	47
3.2. Nivel de Investigación.....	47
3.3. Método de Investigación.....	47

3.4. Diseño de investigación.....	47
3.5. Población y Muestreo de la Investigación.....	47
3.5.1. Población Vegetal.....	47
3.5.2. Muestra Vegetal.....	48
3.5.3. Población Biológica.....	48
3.5.4. Muestra Biológica.....	48
3.6. Variables e Indicadores.....	49
3.7. Técnica e Instrumento de Recolección de Datos.....	50
3.7.1. Técnicas.....	50
3.7.2. Instrumentos.....	50
3.8. Procedimiento Experimental.....	51
3.8.1. Recolección de la muestra vegetal.....	51
3.8.2. Identificación de la muestra vegetal.....	51
3.8.3. Preparación, Secado y Molienda de la muestra vegetal.....	51
3.8.4. Obtención del extracto hidroalcohólico.....	51
3.8.5. Análisis Fitoquímico.....	52
3.8.6. Análisis Microbiológico.....	52
CAPITULO IV: PRESENTACION, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	57
4.1. Análisis e Interpretación de Resultados.....	57
4.1.1. Análisis Fitoquímico.....	57
4.1.2. Análisis Microbiológico.....	58
DISCUSION.....	64
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	68
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 01: Clasificación de la Actividad Antibacteriana según el porcentaje de inhibición.....	56
TABLA N° 02: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya.....	57
TABLA N° 03: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>), frente a los microorganismos ensayados.....	58
TABLA N° 04: Porcentaje de inhibición (en porcentaje) del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>), frente a los microorganismos ensayados.....	61
TABLA N° 05: Resumen General del Porcentaje de Inhibición Según la Clasificación de la Actividad Antibacteriana.....	63

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N° 01: Morfología bacteriana.....	30
GRAFICO N° 02: Comparación de las paredes celulares de bacterias gram (+) y gram (-).....	32
GRAFICO N° 03: Direcciones en el Sembrado del Inóculo sobre la superficie del Agar.....	54
GRAFICO N° 04: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>), frente a los microorganismos ensayados.....	59
GRAFICO N° 05: Porcentaje de inhibición (en porcentaje) del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>), frente a los microorganismos ensayados.....	61

INTRODUCCION

La búsqueda de compuestos bioactivos, presentes en los extractos de plantas, utilizados en la medicina tradicional; se han incrementado, con la posibilidad de dar tratamiento a diversas enfermedades.

Debido a que la resistencia frente a los diversos antibióticos utilizados comúnmente y la incidencia de las infecciones graves, constituyan un difícil y complejo problema de salud pública; se está buscando darles solución, encontrando nuevos metabolitos activos procedentes de fuente natural, para ser empleados en formulaciones terapéuticas; y más aún, sabiendo que la flora peruana nos ofrece grandes posibilidades de descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antibacteriana.

Por todo ello, el objetivo del presente trabajo es poder determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya (*Annona cherimola*) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, ya que se han reportado en diversos estudios, la actividad antibacteriana de otras especies del genero *Annona*; además que el uso tradicional más relevante de las hojas de chirimoya es como antidiarreico.

La metodología del estudio es, aplicada-cuantitativo, explicativo, analítico-experimental, el cual se desarrolló mediante el método de disco difusión (Kirby-Bauer), se observó el halo de inhibición, y se determinó el porcentaje de inhibición, para saber si tiene o no actividad antibacteriana el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya.

Así mismo los resultados obtenidos servirán como base para el inicio de muchas otras investigaciones sobre esta especie, que es muy poco estudiada sobre todo su capacidad antibacteriana, en nuestro país.

CAPITULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la Realidad Problemática:

En la actualidad la resistencia bacteriana es un problema de salud pública en incremento y de gran complejidad, que se viene observando a nivel mundial, después de la aparición de los antibióticos. En nuestro país, la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), realizaron estudios en la población en general¹, y encontraron que la proporción de prescripción antibiótica (PPA) en consulta externa en hospitales es de 40%, cifra similar a la encontrada en el estudio de ProVida en hospitales y centros de salud en 1995².

Un microorganismo de gran importancia es el *Staphylococcus aureus*, especie asociada con un mayor número de cuadros clínicos en humanos; el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en comunidad (SAMR-AC), involucran infecciones relativamente leves, localizadas en piel y tejidos blandos; sin embargo, casos de infecciones graves de partes blandas asociados a bacteriemia y neumonía, fueron posteriormente descritos y han sido responsables del aumento en la mortalidad, actualmente es considerada una enfermedad emergente, que involucra a países desarrollados y en desarrollo³.

Los microorganismos enteropatógenos como la *Escherichia coli* son causantes de una gran parte de muertes por enfermedades diarreicas agudas (EDA) representando el 29% a nivel nacional⁴. En un estudio donde se evaluaron 233 cepas aisladas en el laboratorio

del Hospital de Emergencias Pediátricas durante los meses de diciembre 1998 y abril de 1999, del total de muestras analizadas, se encontró que 17,16% de las cepas poseen el factor de virulencia característico de esta categoría. Los resultados obtenidos demuestran que un importante número de aislamientos de niños con diarrea, presentan *E. coli* enteroagregativa⁵.

Diversos estudios demuestran que existen muchas plantas medicinales con marcada actividad antibacteriana^{6, 7,8}, las cuales podrían ser alternativas frente al problema de resistencia a antibióticos usados tradicionalmente; de ahí la posibilidad de aislar nuevos principios activos, para la creación de nuevos medicamentos provenientes de fuente natural y no sintético.

El género *Annona* en Chiapas, México, está representado por 12 especies, las más comunes *Annona diversifolia* "papaya" y *Annona purpurea* "chincuya", las que son empleadas por indígenas y campesinos por sus propiedades antidiarreica, antiepatarral, antitusígena y para combatir piojos y chinches; un estudio de los extractos crudos, se evaluó y demostró su actividad antibacteriana frente a algunas cepas⁹.

En Cuba se emplea la *Annona squamosa* L. (anón) tradicionalmente como antidiarreico, antiespasmódico, antiinflamatorio y analgésico¹⁰. La Familia *Annonaceae* en el Perú posee 27 géneros y 236 especies¹¹; entre las especies del género *Annona*, tenemos a la *Annona cherimola* que cobra importancia, ya que se caracteriza por presentar numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química; en hojas, raíz, frutas y semillas¹².

Cabe formular la siguiente interrogante, por lo anteriormente expuesto.

1.2. Formulación del Problema:

1.2.1. Problema General

P.G.: ¿Tendrá actividad antibacteriana in vitro el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*) en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

1.2.2. Problemas Específicos

P.E.1.: ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentará compuestos con propiedades antibacterianas?

P.E.2.: ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentará halo de inhibición y porcentaje de inhibición bacteriana sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*?

P.E.3.: ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentará halo de inhibición y porcentaje de inhibición bacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli*?

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

O.G.: Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya (*Annona cherimola*) en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.3.2. Objetivos Específicos

O.E.1.: Determinar si el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentan compuestos con propiedades antibacterianas.

O.E.2.: Determinar el halo de inhibición y el porcentaje de inhibición bacteriana que produce el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.

O.E.3.: Determinar el halo de inhibición y el porcentaje de inhibición bacteriana que produce el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya sobre las cepas de *Escherichia coli*.

1.4. Hipótesis de la Investigación

1.4.1. Hipótesis General

H.G.: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), presenta actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.4.2. Hipótesis Específicas

H.E.1.: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presenta compuestos con propiedades antibacterianas.

H.E.2.: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presenta un halo de inhibición y porcentaje de inhibición semejante al producido por la Gentamicina sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.

H.E.3: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presenta un halo de inhibición y porcentaje de inhibición semejante al producido por la Gentamicina sobre las cepas de *Escherichia coli*.

1.5. Justificación e Importancia de la Investigación

1.5.1. Justificación de la Investigación

La resistencia bacteriana es un problema de salud, creciente y de gran complejidad; en este sentido, este tipo de estudios brinda la oportunidad de encontrar nuevos principios activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una materia prima más económica y natural; además resulta ser conveniente para validar el uso de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional.

1.5.2. Importancia de la Investigación

El estudio realizado tiene gran importancia, puesto que, en el ámbito académico, complementa y aumenta el nivel de conocimientos adquiridos previamente sobre la *Annona cherimola* (chirimoya); en el ámbito clínico, se podrá utilizar sus propiedades antibacterianas para la creación de nuevos fármacos, además también posee un valor social muy elevado; ya que se buscará el control de la resistencia a los antibióticos dentro de la población.

CAPITULO II:

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

2.1.1. Antecedentes Nacionales

Abadie Saenz Ricardo, Medina Olimar Ronald. Perú (2014). **“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE CEPAS AISLADAS DEL HARDWARE DE COMPUTADORAS DEL HOSPITAL CÉSAR GARAYAR IQUITOS”**, Se determinó la actividad antibacteriana de 6 extractos vegetales (*Alchornea triplinervia*, *Annona muricata*, *Averrhoa carambola*, *Brunfelsia grandifolia*, *Caraipa grandifolia* y *Cedrela odorata*) mediante la técnica de difusión en disco, y a aquellos que presentaron actividad se les determinó la CIM y CBM mediante la técnica de macrodilución en caldo. Ninguno de los extractos tuvo actividad frente a las cepas de *E. coli*; cuatro extractos tuvieron actividad frente a las cepas de *P. aeruginosa*, siendo los extractos de *Cedrela odorata* y *Alchornea triplinervia* los que tuvieron mayor actividad frente a esta bacteria, con CIM = 15.62 y 62.5 mg/ml, respectivamente; todos los extractos tuvieron actividad frente a las cepas de *S. aureus*, siendo los extractos de *C. odorata*, *A. triplinervia* y *Caraipa grandiflora*, los de mayor actividad con una CIM = 3.91 mg/ml para cada uno. Se obtuvieron prometedores resultados de actividad antibacteriana de los extractos en estudio frente a cepas intrahospitalarias, mayormente contra *S. aureus*¹³.

Alvarado Villanueva Verónica, Moromi Nakata Hilda, Perú (2010). **“PLANTAS MEDICINALES: EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE *Plantago major* L, *Erythroxyllum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* SOBRE BACTERIAS DE IMPORTANCIA ESTOMATOLÓGICA”**, El objetivo de la investigación fue comparar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales: *Plantago major* L. (llantén), *Erythroxyllum novogranatense var truxillense* (coca trujillo) y *Camellia sinensis* (té verde) mediante el método de difusión en agar con discos, sobre cinco cepas patrones de bacterias orales: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus*. ATCC 314, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Prevotella melaninogenicus* ATCC 25845 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de principios activos totales procedentes de las hojas secas de cada una de las plantas, mediante maceración alcohólica con alcohol etílico al 70 % y posterior evaporación del solvente con el empleo del rotavapor. Cada extracto se diluyó en alcohol etílico al 70 % en las concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL. Estas soluciones fueron comparadas con PerioAid® (clorhexidina 0,012 %) como control positivo y con alcohol etílico al 70 %, como control negativo. Al realizar las pruebas de sensibilidad in vitro, se obtuvieron los siguientes resultados: los tres extractos hidroalcohólicos en ambas concentraciones presentaron actividad antibacteriana mayor al alcohol etílico (5,8mm) y menor que el PerioAid® (22,0mm) sobre las cinco cepas bacterianas en estudio. La mayor actividad presentó el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* a 50 µg/mL, la menor actividad presento *Plantago major* a 25 µg/mL. Se concluye que los tres extractos hidroalcohólicos en las diluciones de 25 y 50

µg/mL presentaron actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*. El efecto antibacteriano aumentó con la concentración en *P. melaninogenica*, que fue la cepa más sensible y *A. viscosus* la menos sensible¹⁴.

Ruiz Julio, Roque Mirtha. Perú (2009). **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CUATRO PLANTAS DEL NOR-ORIENTE PERUANO.** Se investigó la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cuatro plantas del nor-oriente peruano: *Cassia reticulata* (planta entera), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Piper lineatum* (hojas), y *Terminalia catappa* (hojas). Las especies fueron recolectadas en el departamento de Cajamarca, excepto *Terminalia catappa* (Amazonas). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar. Los microorganismos utilizados fueron las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*; y los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporum canis*. De doce extractos investigados, ocho (67%) presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y uno (8%) frente a *Escherichia coli*. De doce extractos investigados, diez (83%) presentaron actividad significativa frente a *Candida albicans*, y seis (50%) contra *Microsporum canis*. Los extractos con la mejor actividad antimicrobiana fueron los tres extractos del *Piper lineatum*; el extracto hidroalcohólico de *Cassia reticulata* y el hidroalcohólico de *Terminalia catappa*¹⁵.

2.1.2. Antecedentes Internacionales

Souza Barboza TJ, Ferreira AF, et. al; Brasil (2015), con su investigación. **“LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Annona mucosa* (JACQ.) CULTIVADO IN VIVO Y OBTENIDO EN VITRO CULTURE”**, tiene por objetivo evaluar el potencial antibacteriano de los extractos de *A. mucosa* obtenidos por técnicas in vitro y también cultivadas en condiciones in vivo; ya que la *Annona mucosa* ha producido sustancias como las acetogeninas y alcaloides que muestran actividad antimicrobiana. Segmentos de plántulas fueron inoculadas en diferentes medios de cultivo que contienen el picloram auxina y citoquinina, la kinetina a diferentes concentraciones. Los caldos obtenidos se usaron para producir cultivos en suspensión de células. Los materiales se sometieron a extracción de metanol y posterior fraccionamiento en hexano y diclorometano. La actividad antimicrobiana contra 20 cepas de relevancia clínica se evaluó por el método de microdilución en concentraciones bactericidas mínimas inhibitorias y mínimos. Los extractos mostraron actividad antimicrobiana selectiva, al inhibir el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus thuringiensis* a diferentes concentraciones. La actividad antibacteriana de material obtenido a través de procedimientos biotecnológicos de *A. mucosa* se informa en este estudio por primera vez¹⁶.

Da Silva Jeferson, Cerdeira Cláudio, Chavasco Juliana, et al. Brasil (2014). **“IN VITRO DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE *Bidens pilosa* Linné Y *Annona crassiflora* Mart. CONTRA OXACILINA RESISTENTE *Staphylococcus aureus* (ORSA)”**; en este estudio, nueve extractos de *Bidens pilosa* (raíz, tallo, flor y hojas) y *Annona*

crassiflora (cáscara de la fruta, tallo, hojas, semillas y pulpa) se obtuvieron con etanol: agua (7:3, v/v) y la actividad antibacteriana in vitro fue evaluado a través de dos métodos: difusión y microdilución caldo de agar, contra *S. aureus* (ORSA) cepas resistentes a oxacilina y en contra *S. aureus* ATCC6538. Los extractos de *B. pilosa* y *A. crassiflora* inhibieron el crecimiento de la ORSA aislada por ambos métodos. Las hojas de *B. pilosa* presentan diámetros de la zona de inhibición, significativamente más altos que clorhexidina 0,12% y contra ORSA, y los extractos fueron más activos frente a *S. aureus* ATCC ($p < 0,05$). Paralelamente, las pruebas de toxicidad mediante el método MTT y tamizaje fitoquímico se evaluaron y tres extractos (*B. pilosa*, raíces y hojas, y *A. crassiflora*, semillas) no evidencia toxicidad. Se observó la presencia de alcaloides variables, flavonoides, taninos y saponinas, a pesar de que había una ausencia total de antraquinonas. Por lo tanto, los extractos de las hojas de *B. pilosa* revelaron buena actividad anti-ORSA y no presentan toxicidad¹⁷.

Guedes da Silva Almeida Jackson, De Souza Araújo Camila, et al. Brasil (2014). **“LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICOS DE *Annona vepretorum* Mart (ANNONACEAE)”**; el efecto antibacteriano se evaluó por el método de microdilución. El contenido de fenoles totales de extracto de etanol (Av-EtOH) fue 76.60 ± 5.57 mg / g de equivalente de ácido. El contenido de flavonoides fue 194.50 ± 11.72 mg equivalentes catequina / g de extracto de hexano. El extracto EtOH exhibió buena actividad antioxidante (IC= $98.87 \pm 11,24$ mg/ml) en el método DPPH. Los extractos mostraron actividad citotóxica y

antibacteriana contra la mayoría de las células ensayadas y microorganismos¹⁸.

Hitzschky Fernandes Gustavo, Alves Mourão Jozeanne, Maria Ângelo Ângela, et al. Brasil (2010). **“EFECTO ANTIBACTERIANO (IN VITRO) DE *Moringa oleífera* Y *Annona muricata* FRENTE A BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS”**; los efectos antibacterianos de extractos acuosos y etanólicos de semillas de moringa (*Moringa oleífera*) y vainas de guanábana (*Annona muricata*) en la concentración de 1: 5 y 1:10 en el volumen 50, 100, 150 y 200 uL se examinaron frente a *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* (aislado a partir del organismo y el medio ambiente acuático) y *Salmonella Enteritidis*. Actividad antibacteriana (inhibición zona > 13 mm) contra *S. aureus*, *V. cholerae* y *E. coli* aislado del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, se detectó en los extractos acuosos y etanólicos de moringa; *E. coli* aislada de peces tilapia, *Oreochromis niloticus*, era sensible al extracto etanólico de moringa. Los extractos acuosos de guanabana mostraron un efecto antibacteriano frente a *S. aureus* y *V. cholerae*, pero la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de esta planta no se demostró¹⁹.

Vilaça Costa Emmanoel, Belém Pinheiro Maria, et al. Brasil (2009). **“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTILEISHMANIA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Annona foetida* (ANNONACEAE)”**; el aceite esencial de las hojas de *Annona foetida* fueron obtenidos por hidrodestilación; los resultados obtenidos en la evaluación de

la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *A. foetida*, mostraron actividad antimicrobiana significativa contra 5 de los 11 microorganismos ensayados, mostrando una fuerte actividad contra *Candida albicans* y *Rhodococcus equi*, ambas con valores de CIM de 60 mg L⁻¹. Para *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, el aceite esencial mostró actividad con valores de CIM de 200, 600 y 200 mg L, respectivamente. Los resultados obtenidos para el aceite esencial contra *C. albicans* y *R. equi* estaban cerca de los resultados que se muestran por los fármacos de referencia, que indica que este aceite es una fuente natural de compuestos biológicamente activos²⁰.

Vieira Rabêlo Suzana, Matiuzzi da Costa Mateus, Cunha Libório Rafael, Guedes da Silva Almeida Jackson. Brasil (2009). “**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANAS DE ATEMOIA EXTRACTOS (*Annona cherimoya* Mill. X *A. squamosa* L.)**”. el objetivo de este estudio fue cuantificar los niveles de fenoles totales y flavonoides, así como la evaluación de las actividades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos de los tallos y hojas de atemoya (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), que pertenece a la familia Annonaceae. La evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos fue analizada contra 10 cepas de bacterias. Los extractos etanólicos de tallos y de metanol de las hojas demostraron ser activos contra cepas de *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*²¹.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Aspectos generales de *Annona cherimola* (Chirimoya)

2.2.1.1. Clasificación Taxonómica²²

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Magnoliidae
Orden	: Magnoliales
Familia	: Annonaceae
Género	: <i>Annona</i>
Especie	: <i>Annona cherimola</i>

2.2.1.2. Origen

El lugar de origen de *Annona cherimola* es aún indefinido, la gran variabilidad de anonas en Mesoamérica y Sur América ha hecho difícil determinar certeramente su origen. Puede ser de las tierras altas de Mesoamérica o de la región andina de Ecuador. La evidencia biológica a favor de la segunda región, basada en que crece en estado espontáneo formando bosques naturales en Los Andes, es dudosa ya que las especies de *Annona* tienden a naturalizarse fácilmente. Los datos arqueológicos que parecen indicar a América del Sur como área de origen son muy escasos e inseguros, mientras que la evidencia histórica se inclina por Mesoamérica²³.

2.2.1.3. Distribución geográfica

La familia Annonaceae comprende cerca de 2 500 especies agrupadas entre 130 y 140 géneros^{24, 25};

constituidos por árboles y arbustos, distribuidos en las regiones tropicales de América, Asia, y Madagascar^{26,27}.

La *Annona cherimola*, es la única altamente adaptada a condiciones tropicales y sub-tropicales, el resto solo puede lograr un crecimiento más eficiente en condiciones tropicales; constituye parte de la flora natural en Centro América y América del Sur, situados entre los 1500 y 2 000 msnm; forma parte de la flora nativa de algunos países como Colombia, Perú, Ecuador y las Islas del Caribe¹².

En el Perú existen cerca de 1600 hectáreas de plantaciones de chirimoya distribuidas en las serranías de Lima, Cajamarca, Ancash, Piura, Lambayeque, Huánuco las que concentran la mayor producción¹⁵.

En Lima, las zonas en donde se producen esta deliciosa fruta son en los pueblos de San Mateo de Otao – Cumbe y Callahuanca, ambas ubicadas en la provincia de Huarochirí; así como en la localidad de Huanangui, ubicado en el distrito de Leoncio Prado, provincia de Huara²⁸.

2.2.1.4. Descripción Botánica²³

Annona cherimola, es un árbol pequeño, que alcanza hasta ocho metros de altura y de copa abierta. De las ramillas cilíndricas y grisáceas brotan hojas alternas, ovadas a elípticas, suaves y de 10 a 20cm de largo por 4 a 8cm de ancho, oscuras en el lado superior y con pubescencia fina en la cara inferior. Las hojas se renuevan una vez al año.

Las flores aparecen solitarias o en grupos de dos a tres, opuestas a las hojas, en las ramillas jóvenes o en las axilas formadas por las hojas caídas en las ramas viejas. Son de posición pendiente, de péndulos cortos y curvos.

El perianto se compone de tres sépalos triangulares de unos 5mm de largo y de dos series de pétalos insertos en un receptáculo ancho y carnoso. Los pétalos externos son largos, de cerca de 2.5cm de longitud, linear-oblongos y carnosos, triangulares en corte transversal; los internos muy cortos, de 1.5 a 2.5mm de largo.

Los estambres y carpelos son muy numerosos y están insertos en espiral en el receptáculo, cuya porción inferior, más prominente y en forma de disco, está ocupada por los estambres. Cada uno de estos se compone de dos tecas largas, unidas por un conectivo de color anaranjado en el ápice. Los carpelos forman un cono en el ápice del receptáculo; cada pistilo tiene un ovulo y termina en un estilo sencillo. Los carpelos están separados y solo se unen por la base.

Uno a dos días de la fertilización, los pétalos caen y se inicia el desarrollo del fruto. El receptáculo se alarga y los carpelos fecundados, cada uno con una semilla, alcanzan la madurez de 6 a 10 meses después de la floración. El número de carpelos fecundados en una flor determina el tamaño y forma del fruto.

La porción comestible del fruto son los carpelos desarrollados, soldados en la madurez formando un sincarpio. Al centro del fruto queda el receptáculo,

que adquiere la forma de un cono muy agudo y que por estar constituido principalmente por haces vasculares es más duro que el resto del fruto, del que se separan en la madurez. Del receptáculo salen los haces vasculares hacia los carpelos, en los cuales se ramifican profusamente. Los carpelos consisten principalmente de parénquima, relleno de almidón en las primeras etapas del fruto y que cambia a azúcar conforme avanza la maduración. Hay también haces vasculares finos, células con aceite y una epidermis interna gruesa que rodea las células que ocupan las semillas.

Las semillas de la chirimoya son aplanadas, elípticas vista de frente, de 1.5 a 2cm de largo por 1cm de ancho, de color castaño claro o negro.

2.2.1.5. Usos tradicionales

En medicina tradicional destaca su uso como antidiarreico al utilizar sus hojas en infusión y el fruto en consumo directo; como antiparasitario (antihelmíntico) al emplear en infusión las hojas, dos vasos en ayunas²⁹.

El uso popular que se le dio a las semillas de chirimoya en Costa Rica hace algún tiempo atrás, fue la decocción de estas semillas, especialmente de aquellas especies que se encontraban sembradas a mayor altitud; servía para la eliminación de “piojos” (ectoparásitos generalmente ubicados en el cuero cabelludo)³⁰.

En México; esta especie se usa popularmente para tratar la diarrea, tanto en los estados del centro de la República Mexicana, como en Michoacán y Veracruz.

Aunque también se le usa en otros padecimientos gastrointestinales como infección intestinal, vómito, flatulencias, úlceras, y, además, como purgante.

2.2.1.6. Composición química

Diferentes estudios han mostrado que las hojas, corteza, semillas y raíz de *Annona cherimola* poseen compuestos activos como ciclopéptidos, heptapéptidos, alcaloides y acetogeninas con notable efecto citotóxico en líneas celulares tumorales y en larvas de *Ceratitis capitata* y *Aedes aegypti*, atribuyéndose esta propiedad a su capacidad inhibitoria del transporte de electrones a nivel del complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) mitocondrial¹².

2.2.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría es de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. Las bacterias integran el reino procarionta³¹.

2.2.2.1. Tamaño

El tamaño de las bacterias oscila entre las 0.5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm . Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0.4 y 2 μm . Solo son visibles entonces, al microscopio óptico o microscopio electrónico. Para observarlas

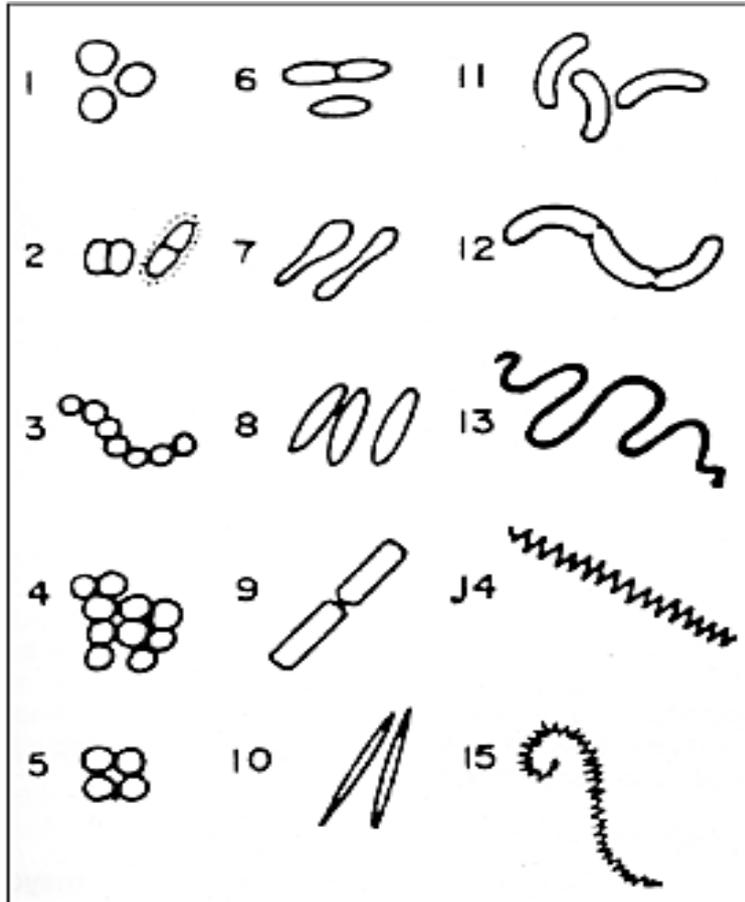
con el microscopio óptico se usa el objetivo de inmersión (100X), sumergiendo esta lente en una gota de aceite (aceite de inmersión) en el preparado a observar³¹.

2.2.2.2. Morfología Microscópica

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular.

Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esférica u ovalada), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral); dentro de estas últimas se encuentran: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*. Los espirilos varían en el número de vueltas, desde pocas (*Borrelia*) a muchas (*Treponema*). Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (*Corynebacterium*). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (*Vibrio cholerae*)³¹.

GRAFICO N° 01: Morfología bacteriana



Leyenda: 1. cocos; 2. diplococo; 3. cocos en cadenas; 4. cocos en racimos; 5. Cocos entetradas; 6. Cocobacilos; 7. Bacilos; 8. Bacilos bordes redondeados; 9. bacilos bordes rectos; 10. Bacilos fusiformes; 11, 12. Bacilos curvos; 13 al 15. Espiroquetas.

Fuente:<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiyEstructuraBacteriana.pdf>.

2.2.2.3. Morfología Macroscópica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Existen excepciones como *M. tuberculosis*, que requiere para su desarrollo de dos a ocho semanas de incubación³¹.

2.2.2.4. Clasificación

- Gram-positivas

La gruesa pared celular de las bacterias grampositivas está constituida principalmente por peptidoglicano. Se cree que ésta gruesa capa de peptidoglicano es la determinante de que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram. Sin embargo, estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico: polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática. En este último caso se denomina ácido lipoteicoico. Tanto los ácidos teicoicos como los

lipoteicoicos, tienen la función de estabilizar la pared celular. Además, los ácidos teicoicos tienen un rol en la virulencia de estos microorganismos, porque actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped.

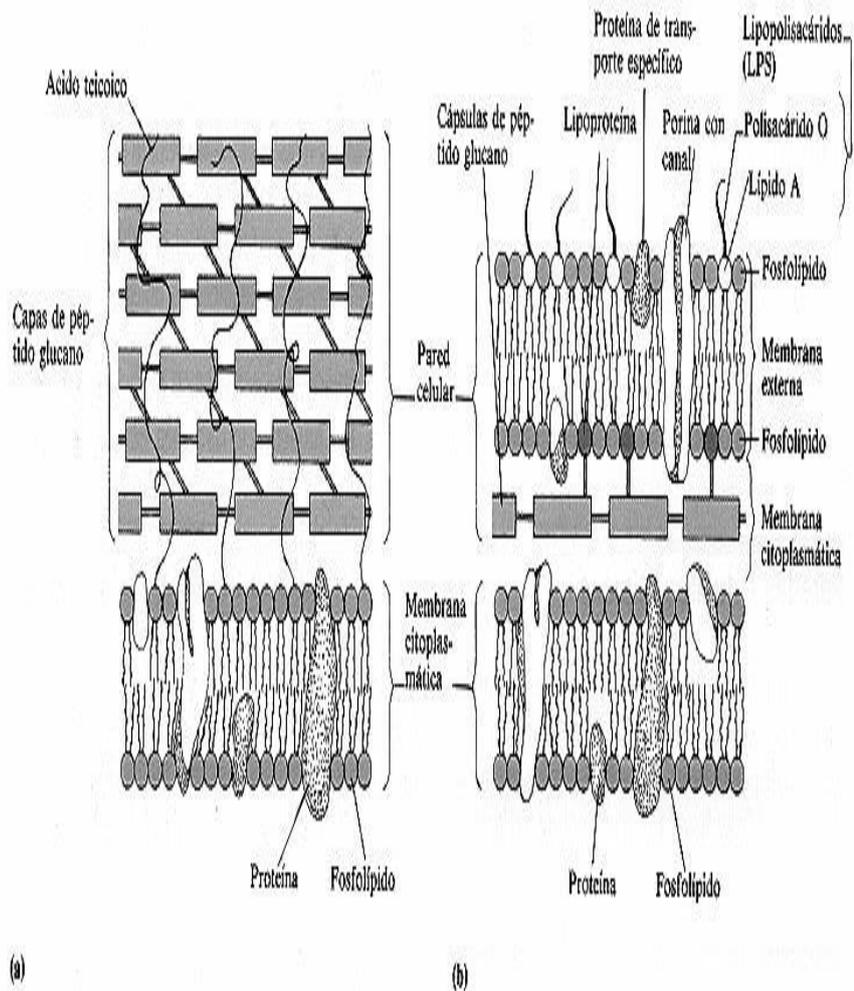
La superficie externa del peptidoglicano de las bacterias grampositivas está generalmente cubierta de proteínas. Los diferentes grupos de bacterias grampositivas y las diferentes especies difieren en la composición de sus proteínas y de ácidos teicoicos; ésto es útil para la clasificación serológica y la identificación bacteriana³¹.

- Gram-negativas

La pared de las bacterias gramnegativas al microscopio electrónico se puede observar tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de

peptiglicano y la membrana externa. Esta última, exclusiva de las bacterias gramnegativas, es una bicapa lipídica que difiere de otras membranas por su capa externa, que está constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Además del LPS, la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano³¹.

GRAFICO N° 02: Comparación de las paredes celulares de bacterias gram (+) y gram (-)



Legenda: Gram-positivas (a) y Gram-negativas (b).
Fuente: http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/57/caphtm/cap0402.htm.

2.2.2.5. Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico³².

- Mecanismos de Resistencia³²

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, a saber:

- Inactivación del antibiótico. Se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico. Son ejemplos de esta la producción de B-lactamasa, B-lactamasa de amplio espectro, eritromicina estereasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloramfenicol, lincosamidas y estreptograminas.
- Alteración del sitio blanco del antibiótico. En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc.
- Barreras de permeabilidad. Incluye tres componentes básicos: La estructura de la membrana externa de la bacteria; Las porinas. Canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular.; Características fisicoquímicas del antimicrobiano. En el caso de los medicamentos hidrofílicos (imipenem) requieren presencia de

porinas para su transporte al interior de la célula. Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.

2.2.3. Descripción de las Cepas a Usar

2.2.3.1. *Staphylococcus aureus*

- Clasificación científica de *Staphylococcus aureus*

Dominio : Bacteria

Filo : Firmicutes

Clase : Cocci

Orden : Bacillales

Familia : Staphylococcaceae

Género : *Staphylococcus*

Epíteto Especifico: *Staphylococcus aureus*

Autor : Rosenbach 1884

- Descripción

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas³³.

- Diagnóstico

Los datos clínicos y epidemiológicos son fundamentales para orientar el diagnóstico microbiológico, así como la sospecha del agente etiológico causante de la infección, por lo que se requiere del aislamiento y la identificación de *S. aureus* a partir de muestras clínicas. Entre dichas muestras se encuentra en la sangre, tejidos, líquidos

normalmente estériles, aspirados de abscesos, las cuales al ser teñidas con la tinción de Gram permiten observar la forma y agrupación, así como una respuesta inflamatoria con la presencia de leucocitos polimorfonucleares³³.

- **Medios de cultivos**

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. *S. aureus* se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5%)³³.

- **Epidemiología**

S. aureus es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, bacteria oportunista que forma parte de la microflora humana: poco después del nacimiento, los neonatos son colonizados por *S. aureus*, los sitios de colonización incluyen el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel y, a veces, el tracto gastrointestinal. También puede contaminar la vestimenta y la ropa de cama. La

colonización más frecuente por *S. aureus* es la mucosa nasal, el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o el portador. Es más frecuente la colonización en el hospital, especialmente en pacientes con hemodiálisis, diabéticos tipo 1, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados con VIH y adictos a las drogas³⁴⁻³⁶.

- **Patogenia**

Entre 20 y 50% de la población mundial es portadora de

S. aureus en fosas nasales y 30% de forma permanente en piel y tracto gastrointestinal. Cuando las barreras mecánicas se rompen, esta bacteria puede alcanzar los tejidos más profundos y producir enfermedad. Los pacientes con infecciones por *S. aureus* suelen infectarse con la misma cepa que coloniza sus fosas nasales, la colonización también permite la transmisión entre individuos del hospital como en la comunidad³³.

2.2.3.2. Escherichia coli

- **Clasificación científica de *Escherichia coli***

Dominio : Bacteria

Filo : Proteobacterias

Clase : Gammaproteobacteria

Orden : Enterobacteriales

Familia : Enterobacteriaceae

Género : *Escherichia*

Epíteto Específico: *Escherichia coli* (*E. freundii*)

Autor : Migula 1895

- **Descripción**

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu

Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea³⁷.

- **Epidemiología**

La Organización Mundial de Salud (OMS) ha reportado la ocurrencia de 3362 casos de infecciones por *E. coli* enterohemorrágica O104:H4; en total 16 países informaron casos y el 96,8 % (3254/3362) corresponden a Alemania. Del total de casos, el 25 % (823/3362) corresponden a casos de Síndrome Urémico Hemolítico. La tasa de letalidad general es del 1% y la letalidad por SHU 3 %³⁸.

- **Patogenia**

Es capaz de ocasionar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente severas, debido a que posee componentes de patogenicidad tales como las adhesinas, en especial en los pilis que aglutinan glóbulos rojos y hemolisinas, frecuente en la pielonefritis, por una endotoxina ligada al lípido A, de naturaleza pirógena, y también por citotoxinas que actúan sobre la adenilciclase, similar al *Vibrio cholerae*.

Los componentes de patogenicidad son proteínas de membrana termoresistentes y no antigénicas, que le confieren a *Escherichia coli* la capacidad de invadir células epiteliales³⁹.

- **Clasificación**

Se distinguen seis cepas según su capacidad patógena (virotipos): *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD)³⁷.

2.2.4. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio, suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano⁴⁰.

- **Clasificación y mecanismo de acción⁴⁰**

En la práctica diaria, las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, las que los clasifica según su mecanismo de acción, y al tener en cuenta la coloración de Gram y las que los agrupa según su estructura química.

Según el efecto que ejerzan sobre la bacteria pueden ser:

- a) Bacteriostáticos: aquéllos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento.
- b) Bactericidas: poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica irreversible.

Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican como:

- a) Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.
- b) Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad.
- c) Fármacos que inhiben la síntesis proteica.
- d) inhibición de la traducción y transcripción del material genético.
- e) Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.

2.2.5. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos permanecen como una clase de antimicrobianos de uso habitual y eficaz en la práctica clínica. A pesar de que existen diversos mecanismos de resistencia continúan siendo activos frente a gran parte de los bacilos gramnegativos aerobios. En la actualidad, aunque pueden utilizarse en monoterapia en las infecciones urinarias, se utilizan fundamentalmente en combinación con betalactámicos en infecciones graves por bacilos gramnegativos⁴¹.

- **Mecanismo de acción**

La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo⁴¹.

- **Espectro de actividad⁴¹**

Los aminoglucósidos muestran actividad bactericida frente a bacilos gramnegativos aerobios, entre ellos, Enterobacteriaceae y los bacilos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* La asociación con antimicrobianos que actúan sobre la pared bacteriana (penicilina, cefalosporina, monobactam, carbapenem, glucopéptido) muestra una actividad sinérgica frente a diversos microorganismos. Diversos estudios in vitro y en animales han demostrado sinergia antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, estreptococos del grupo viridans, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Listeria monocytogenes*. Su actividad frente a bacterias grampositivas incluye estafilococos, enterococos y estreptococos y reside, fundamentalmente, en la sinergia que exhiben asociados a betalactámicos y glucopéptidos. Son activos frente a *S. aureus* sensible a meticilina, pero no frente a la mayoría de cepas resistentes a meticilina.

- **Gentamicina**

Aminoglucósido de administración parenteral, tópica y uso oftálmico. Tiene efecto concentración dependiente, efecto post-antibiótico prolongado y acción sinérgica con antibióticos betalactámicos. Posee un espectro antimicrobiano principalmente frente a bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus*, *Serratia*) y tiene actividad frente a ciertas bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*). En combinación con antibióticos betalactámicos es eficaz en infecciones producidas por *E. fecalis* y *Streptococcus sp.*

2.2.6. Principios activos de plantas⁴²

Los principios activos se clasifican, según su estructura química, en grupos:

- Productos resultantes del metabolismo primario (procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción): Glúcidos, lípidos, derivados de aminoácidos.
- Productos derivados del metabolismo secundario (no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizadas como defensa, adaptación, etc): son los más importantes como principios activos: Heterosidos, Polifenoles, Terpenoides, Alcaloides.
 - a. Heterosidos: Los glucósidos o heterósidos son compuestos que están formadas por 2 partes: una es un azúcar (p.e. glucosa) y la otra de no-azúcar o aglucona, aglicón o genina. El enlace entre ambas es hidrolizable y debe romperse para que se active el compuesto; esta

ruptura es catalizada por fermentos que contiene la misma planta. Se clasifican de acuerdo a las características estructurales de la parte no-azúcar o aglicón, tal y como se muestra en la tabla. Su nombre termina en -ósido, aunque algunos mantienen su nombre tradicional acabado en -ina (por ejemplo, digitoxina). Los más importantes son los antraquinónicos, los cianogénicos, los cardiotónicos y los cumarínicos. También los fenólicos, ya que es en este grupo en el que se encuentra la salicilina, precursora del ácido acetil salicílico, o aspirina.

b. Polifenoles: Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas. De todos ellos, los que tienen mayor interés farmacológico son dentro del grupo de los flavonoides: flavonas, flavonoles y flavanonas y sus correspondientes heterósidos y los antocianósidos. Muchos de ellos presentan actividad sobre el sistema vascular como por ejemplo el rutósido o los citroflavonoides, llamados así por haber sido aislados en especies pertenecientes al género Citrus.

c. Terpenoides: Los terpenoides están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C₅).

d. Alkaloides: Grupo de productos naturales de mayor interés en la farmacognosia. Dentro de este grupo se encuentran sustancias tóxicas incluso a bajas dosis. El primer alcaloide aislado fue la morfina (Sertürner 1805). En 1819 se le dio el nombre de alcaloides debido a su naturaleza básica. Debido a su gran complejidad, aunque comenzaron a aislarse en el siglo XIX, la determinación de su estructura fue posterior.

2.3. Definición de Términos Básicos

Agar: Agar o agar-agar es una gelatina vegetal de origen marino. Esta gelatina es un polisacárido sin ramificaciones obtenidos de la pared celular de varias especies de algas de los géneros Gelidium, Euchema y Gracilaria entre otros.

Antibiótico: Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.

Bioseguridad: Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.

Cepa: Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

Colonia: Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.

CMI: Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 -24 horas de incubación.

Disco de Sensibilidad: Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.

Escala: Esquema por medio del cual se puede medir alguna propiedad.

Escala de Mc. Farland: Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.

Esterilización: Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.

Estudio: Investigación detallada que se realiza con el fin de descubrir algo.

Ética: Parte de la Filosofía que trata de la moral y de las obligaciones del hombre.

Extracto: Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.

Halo de inhibición: zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento

bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen

Inactivo (I): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.

Incubación: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.

Inóculo: Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.

In vitro: Expresión que se designa a las reacciones fisiológicas que se estudian en el laboratorio, fuera del organismo.

Medio de Cultivo: Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.

Medicina Tradicional: Conjunto heterogéneo de ideas sobre la enfermedad, de procedimientos, diagnósticos y, sobre todo, de medidas terapéuticas, que constituyen el contenido de las medicinas conocidas también conocidas como “Autóctonas”, “Populares”.

Morbilidad: Tasa de enfermedad; relación entre personas sanas y enfermas de una comunidad.

Mortalidad: Expresión del número de defunciones en una población de riesgo durante un año.

Planta: Organismo vivo que crece sin poder moverse, en especial el que crece fijado al suelo y se nutre de las sales minerales y del anhídrido carbónico que absorbe por las raíces o por los poros de las hojas.

Principio Activo: Cualquier constituyente de un fármaco que confiere una propiedad medicinal.

Protocolo: Plan explícito y detallado de un experimento, procedimiento o prueba.

Resistente (R): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.

Sensible (S): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.

UFC: Unidad formadora de colonias

CAPITULO III:
METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1. Tipo de Investigación

Aplicada – Cuantitativo

3.2. Nivel de Investigación

Explicativo: Porque se busca explicar la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya (*Annona cherimola*) en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

3.3. Método de Investigación

Analítico – Sintético

De Laboratorio

De Casos

3.4. Diseño de Investigación

Experimental

3.5. Población y Muestreo de la Investigación

3.5.1. Población Vegetal

Constituida por el conjunto de árboles de *Annona cherimola* “Chirimoya”, distribuidos en un terreno, ubicada en el distrito de San Jerónimo de Surco de la Provincia de Huarochirí en el Departamento de Lima; ubicado a unos 2.008 msnm.

3.5.2. Muestra Vegetal

460g de hojas de *Annona cherimola*. Para la recolección de la muestra vegetal se tuvo en cuenta los siguientes factores: hábitat de la planta, hora de recolección.

Criterios de Inclusión

- Hojas en buen estado.
- Hojas jóvenes.

Criterios de Exclusión

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

3.5.3. Población Biológica

El estudio se realizó con cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.5.4. Muestra Biológica

El número de colonias que se empleó para la preparación del inóculo bacteriano fue de 3 a 5 colonias de tamaño aproximado.

Criterios de Inclusión

- Cepas que reúnan las características microscópicas y bioquímicas del microorganismo.

Criterios de Exclusión

- Cepas contaminadas.
- Cepas que no coincidían con el fenotipo del microorganismo.

3.6. Variables e Indicadores

Variable Independiente (X):

VARIABLE (X)	DIMENSIONES	INDICADORES
X: Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>).	Compuestos con propiedades antibacterianas.	Flavonoides, Fenoles, Taninos Glicósidos.
	Concentración del extracto	cc. 25%
		cc. 50%
		cc. 75%

Variable Dependiente (Y):

VARIABLE (Y)	DIMENSIONES	INDICADORES
Y: Crecimiento de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Tamaño de halo de inhibición	Diámetro de inhibición en mm
	Porcentaje de inhibición (grado de sensibilidad)	Inactivo <40%
		Poco activo 40-50%
		Moderadamente activo 51-75%
		Buena actividad >76%

3.7. Técnica e Instrumento de Recolección de Datos

3.7.1. Técnica

Prueba de sensibilidad antimicrobiana⁴⁵

3.7.2. Instrumento

- Método de disco difusión (Kirby-Bauer)⁴³

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa).

Fundamento: El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, 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.

3.8. Procedimiento Experimental

3.8.1. Recolección de la muestra vegetal

La muestra se recolectó de una chacra, ubicada en el distrito de San Jerónimo de Surco, Provincia de Huarochirí, Departamento de Lima; a 2.008 msnm, a horas de la mañana del mes de diciembre de 2015, tomándose en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. **(Ver Anexo 01 y 02)**

3.8.2. Identificación de la muestra vegetal

La muestra fue identificada y clasificada taxonómicamente en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos **(Ver Anexo 03)**.

3.8.3. Preparación, Secado y Molienda de la muestra vegetal

Una vez identificada y seleccionada la materia prima, fue llevada al laboratorio, se pesó y se procedió al lavado con agua destilada, se aceleró el secado con la ayuda de una estufa, manteniendo la temperatura a 45°C, una vez secas las hojas se fraccionaron, para ser pulverizadas con un molino de mano, obteniéndose 165 gramos de polvo fino; el cual fue envasado en un frasco ámbar de boca ancha, siendo conservado en un lugar fresco y seco, para su posterior uso. **(Ver Anexo 04)**.

3.8.4. Obtención del extracto hidroalcohólico

La extracción se realizó por maceración, donde a los 165 gramos de polvo fino, obtenidos de la molienda, se le añadió 850 ml de etanol / agua (70:30 v/v), y se dejó macerar por 7 días, agitándose por 5 min, 2 veces al día; después se procedió a filtrar, obteniéndose 460ml de extracto hidroalcohólico,

La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente con la ayuda de una estufa, manteniendo la temperatura a 40°C, durante 2 días; obteniéndose 80ml de extracto hidroalcohólico concentrado, siendo almacenados en frascos ámbar, para la realización del ensayo fitoquímico y microbiológico. **(Ver Anexo 05)**

3.8.5. Análisis Fitoquímico

Se realizó la marcha fitoquímica (Análisis cualitativo), con 1ml de extracto hidroalcohólico concentrado, diluido en 8ml de una solución de agua: alcohol (30:70); siguiendo el método descrito en Métodos de Estudios de Productos Naturales. Perú, por Olga Lock⁴⁴. **(Ver Anexo 06 y 07)**

3.8.6. Análisis Microbiológico

a. Preparación de las concentraciones

Se realizó los cálculos respectivos, para obtener concentraciones de 25%, 50% y 75% de extracto hidroalcohólico. Se partió teniendo en cuenta que se obtuvieron 80ml de extracto hidroalcohólico concentrado, donde se sabe que contiene 460gr de hojas de chirimoya. Se tomaron 0.26ml, 0,17ml y 0.085ml de extracto concentrado, para ser diluidos cada uno con 2ml de agua destilada estéril, obteniendo así soluciones al 75%, 50% y 25% respectivamente. **(Ver Anexo 08)**

b. Preparación de los discos de sensibilidad

Los discos se prepararon utilizando papel Whatman N° 03, y utilizando un perforador convencional.

Una vez obtenido los discos fueron esterilizados en la autoclave a 121 °C con presión de 15 libras por 15min.

Una vez esterilizados los discos se procedió a colocar 10ul

de las soluciones de 25%, 50% y 75%, con la ayuda de una micro pipeta, las cuales se dejaron secar a T° ambiente por 12 horas. **(Ver Anexo 08)**

c. Prueba de sensibilidad, según LORES (1976), MITSCHER (1972), INS⁴⁵

Preparación del inóculo

- Se preparó el medio agar Tripticasa de Soya (TSA) en placas Petri para el cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, los cuales fueron incubados en una estufa a 37 °C por 24 horas.
- Una vez obtenido los cultivos, se procedió a seleccionar de 4 a 5 colonias aisladas bien definidos, y con el mismo tipo morfológico, los cuales fueron suspendidas en 4ml de solución salina, hasta alcanzar una turbidez, entre 0,5 Mc. Farland; se comparó con un estándar, usando fondo blanco, con líneas negras. **(Ver Anexo 09)**

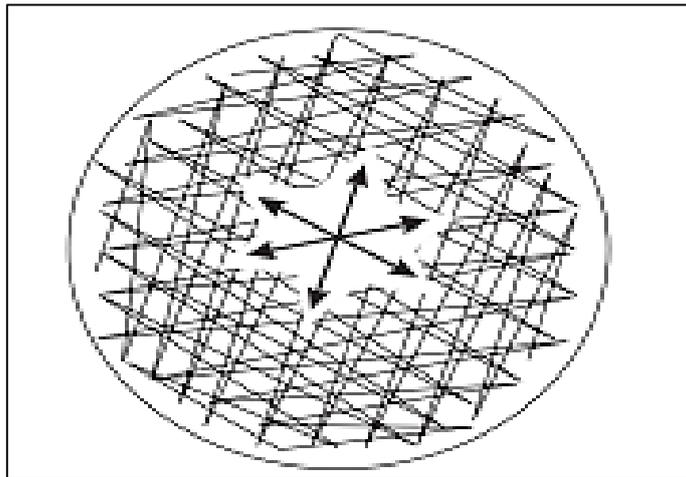
Inoculación de las placas

- Después de 15 minutos al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces y presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.
- Se inoculo la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo **(Grafico N° 03)**. Antes de colocar los

discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

(Ver Anexo 09)

GRAFICO N° 03: Direcciones en el Sembrado del Inóculo sobre la superficie del Agar



FUENTE: Instituto Nacional de Salud

Aplicación de los discos

- Se colocó los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez

que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

- Se colocó en cada placa un disco de cada concentración de extracto hidroalcohólico de 25%, 50% y 75%; un disco de control positivo de gentamicina; y un disco de control negativo, en este caso fue alcohol de 70°. Se hizo el procedimiento por duplicado, tanto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. **(Ver Anexo 09)**

Incubación

- Incubar las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- Después del tiempo de incubación recomendado, 24h, se examinó cada placa y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. **(Ver Anexo 09)**

Lectura de las Placas e Interpretación de Resultados

- Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla. Se tubo precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. **(Ver Anexo 10)**

Se aplicó la siguiente fórmula, para convertir las mediciones de los halos de inhibición, en porcentajes de inhibición.

Porcentaje de inhibición:

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

TABLA N° 01: Clasificación de la Actividad Antibacteriana según el porcentaje de inhibición

Actividad Antibacteriana	Porcentaje de Inhibición
Inactivo	< 40%
Poco activo	40% a 50%
Moderadamente activo	51% a 75%
Buena actividad	>76%

Fuente: IMET – EsSalud 2007⁴⁵

CAPITULO IV:

PRESENTACIÓN, ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis e Interpretación de Resultados

4.1.1. Análisis Fitoquímico

TABLA N° 02: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (**Ver Anexo 07**)

Metabolitos Secundarios	Pruebas	Resultados
Carbohidratos	Rtvo. Molish "A"	+++
	Rtvo. Antrona	+++
Compuestos Fenólicos (Taninos)	FeCl ₃	+++
	Rtvo. Gelatina	+
Aminoácidos libres y Amino grupos	Rtvo. Ninhidrina	+++
Flavonoides, chalconas, auronas, catequina e isoflavona	Rtvo. Shinoda	++
Triterpenoides y Esteroides	Rtvo de Lieberman-Burchardat	++
Naftoquinonas, Antronas y Antranonas	Rtvo. Borntrager	++
Alcaloides	Rtvo. Dragendorff	+++
	Rtvo. Mayer	+++
Antocianinas y Flavonoides catéquicos	Rtvo. Rosenheim	++
Saponinas	Espuma	+++

Glicósidos	Rtvo. Vainillina	+++
Azúcares reductores	Rtvo. Fehling A + Rtvo. Fehling B	+++

(+++) Abundante; (++) Moderado; (+) Leve; (0) Ausente

Fuente: Elaboración propia

4.1.2. Análisis Microbiológico (Ver Anexo 08, 09 y 10)

Análisis Descriptivo de la Actividad Antibacteriana in vitro del Extracto Hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*) a concentraciones de 25%, 50% y 75%; por el método de disco difusión a las 18 horas.

Diámetro de Inhibición:

- Los diámetros promedios de los halos de inhibición en el crecimiento bacteriano in vitro de los extractos hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya, por el método de disco difusión, se detallan en la **TABLA N° 03** y **GRAFICO N° 04** en las que se aprecian las diferentes concentraciones.

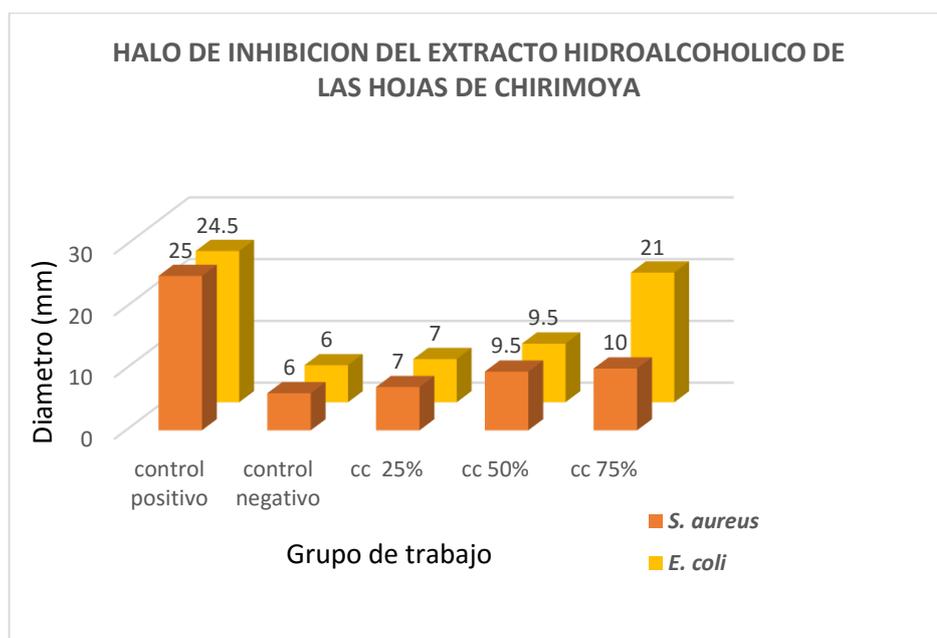
TABLA N° 03: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), frente a los microorganismos ensayados

Grupo de Trabajo	Microorganismos	
	<i>Staphylococcus aureus</i> X (mm)	<i>Escherichia coli</i> X(mm)
Control positivo Gentamicina 10 µg	25.00	24.50
Control negativo Alcohol 70°	6.00	6.00
cc 25%	7.00	7.00
cc 50%	9.50	9.50
cc 75%	10.00	21.00

Se indica los promedios del halo de inhibición frente a los microorganismos ensayados

Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N° 04: Promedio del diámetro del halo de inhibición (en milímetros) del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), frente a los microorganismos ensayados



Fuente: Elaboración propia

En el **GRAFICO N° 04**. Se muestra el promedio de diámetro del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), frente a los microorganismos ensayados a las 18 horas.

- Para el grupo control positivo (Gentamicina 10 µg): se aprecia un halo de inhibición de 25.00 mm, frente a *Staphylococcus aureus* y un halo de inhibición de 24.50 mm, frente a *Escherichia coli*.
- Para el grupo control negativo (Alcohol 70°): los diámetros del halo de inhibición se mantienen constante (6 mm), tanto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Para el grupo de concentración al 25% de extracto hidroalcohólico de hojas de chirimoya: los diámetros del halo de inhibición se mantienen constante (7 mm) en ambos microorganismos.
- Para el grupo de concentración al 50% de extracto hidroalcohólico de hojas de chirimoya: los diámetros del halo de inhibición se mantienen constante (9.5 mm) en ambos microorganismos.
- Para el grupo de concentración al 75% de extracto hidroalcohólico de hojas de chirimoya: se observa un diámetro del halo de inhibición de 10 mm, frente a *Staphylococcus aureus* y un diámetro del halo de inhibición de 21mm, frente a *Escherichia coli*.

Porcentaje de inhibición:

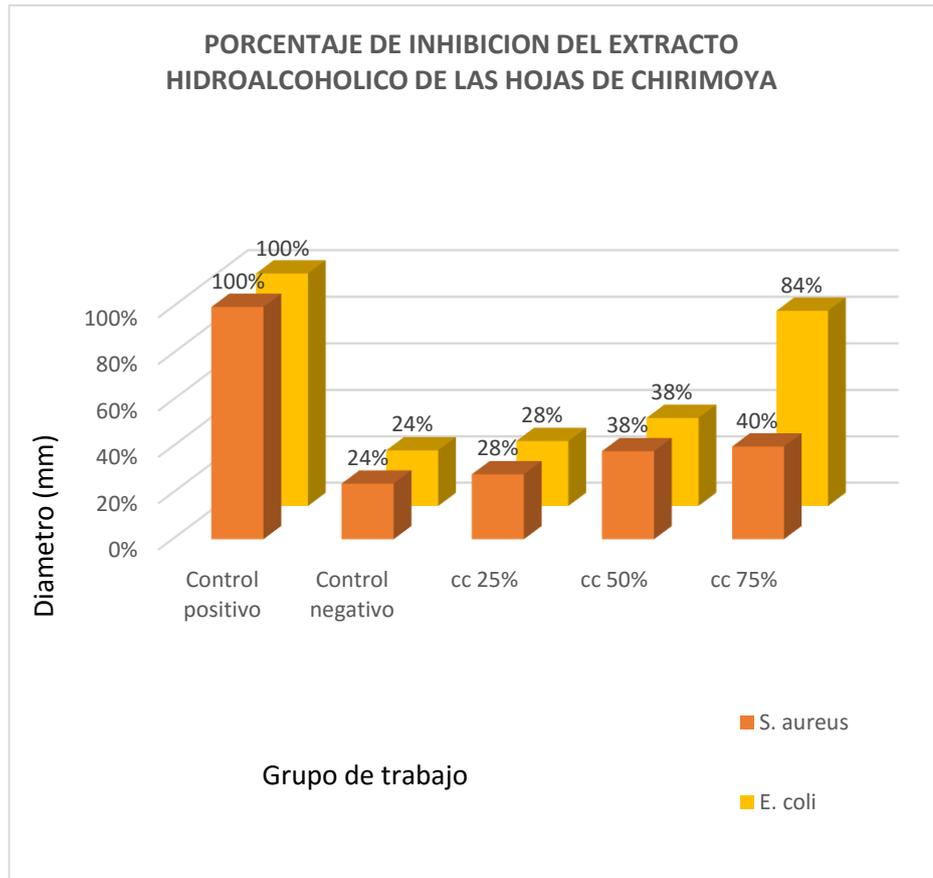
TABLA N° 04: Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), frente a los microorganismos ensayados

Grupo de Trabajo	Microorganismos	
	<i>Staphylococcus aureus</i> %	<i>Escherichia coli</i> %
Control positivo Gentamicina 10 µg	100%	100%
Control negativo Alcohol 70°	24%	24%
cc 25%	28%	28%
cc 50%	38%	38%
cc 75%	40%	84%

Se indica los porcentajes de inhibición frente a los microorganismos ensayados

Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N° 05: Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), frente a los microorganismos ensayados



Fuente: Elaboración propia

En el **GRAFICO N° 05**. Se muestra el porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*), frente a los microorganismos ensayados.

- El mayor porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*: 40% de porcentaje de inhibición a concentración al 75%.
- El mayor porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli*: 84% de porcentaje de inhibición a concentración al 75%.

Clasificación de la Actividad Antibacteriana

TABLA N° 05: Resumen General del Porcentaje de Inhibición Según la Clasificación de la Actividad Antibacteriana

Concentración de extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya (<i>Annona cherimola</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Porcentaje	Clasificación	Porcentaje	Clasificación
cc al 25%	28%	I	28%	I
cc al 50%	38%	I	38%	I
cc al 75%	40%	P	84%	B

I= Inactivo; P= Poco Activo; M= Moderadamente Activo; B= Buena Actividad
Fuente: Elaboración propia

DISCUSION

El tamizaje fitoquímico, realizado al extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya, mostró que hay presencia de carbohidratos, compuestos fenólicos (taninos), aminoácidos libres y amino grupos, flavonoides, chalconas, auronas, catequina e isoflavona, Triterpenoides y Esteroides, Naftoquinonas, Antronas y Antranonas, Alcaloides, Antocianinas y Flavonoides catéquicos, Saponinas, Glicósidos y Azúcares reductores.

La actividad antibacteriana podría deberse a la presencia de flavonoides, fenoles, taninos y glicosidos ya que según Cowan (1999), estos y otros compuestos como las quininas, terpenos, alcaloides y aceites esenciales son responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas, interfiriendo en la síntesis de la pared celular; en la especie *Annona mucosa*, Souza Barboza TJ (2015)¹⁶, muestra que, ha producido sustancias como las acetogeninas y alcaloides que poseen actividad antimicrobiana. Además, el extracto acuoso del género *Annona muricata*, Poma. E (2011)¹⁴, se evidencia presencia de carbohidratos, compuestos polifenólicos, flavonoides, esteroides libres, saponinas y alcaloides. Así mismo otra especie como *A. crassiflora*, Da Silva Jeferson (2014)¹⁷, inhibió el crecimiento de la ORSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Oxacilina), y el tamizaje fitoquímico mostro la presencia de alcaloides variables, flavonoides, taninos y saponinas. Los extractos acuosos de *A. muricata* mostraron un efecto antibacteriano frente a *S. aureus* y *V. cholerae*, Hitzschky Fernandes Gustavo (2010)¹⁹.

El análisis antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*) se realizó mediante el método de disco difusión (Kirby-Bauer,1966), con cepas referenciales de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATTC 25922.

La mejor actividad antibacteriana se presentó con una concentración al 75% del extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya, siendo el halo

de inhibición para *E. coli* 21.00 mm y para *S. aureus* 10.00 mm, presentando así, buena actividad para *E. coli* y poco activo para *S. aureus*.

El extracto hidroalcohólico a concentración de 25% y 50%, mostraron inactividad, frente a los microorganismos estudiados.

Se describe en un estudio que los extractos etanólicos de tallos y de metanol de las hojas de Atemoya (*A. cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), Vieira Rabêlo Suzana (2009)²¹, demostraron ser activos contra cepas de *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; esto podría deberse a los extractos etanólicos y metanólico, el cual hicieron que aumente su actividad frente a los microorganismos ya mencionados.

CONCLUSIONES

- Se determinó en el extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya, la presencia de carbohidratos, compuestos fenólicos (taninos), aminoácidos libres y amino grupos, flavonoides, chalconas, auronas, catequina e isoflavona, triterpenoides y esteroides, naftoquinonas, antronas y antranonas, alcaloides, antocianinas y flavonoides catéquicos, saponinas, glicósidos y azúcares reductores; siendo los más importantes; los flavonoides, fenoles, taninos y glicósidos, por la actividad antibacteriana que presentan.
- El halo de inhibición y porcentaje de inhibición bacteriana que produce el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya, en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus*, fue mejor a 75% de concentración del extracto, obteniéndose un halo de inhibición de 10.00mm y un porcentaje de inhibición de 40%; demostrando así que tiene poca actividad antibacteriana, a diferencia de la gentamicina que presenta un halo de inhibición de 25.00mm y porcentaje de inhibición de 100%.
- El halo de inhibición y porcentaje de inhibición bacteriana que produce el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya, en el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli*, fue mejor a 75% de concentración del extracto, obteniéndose un halo de inhibición de 21.00mm y un porcentaje de inhibición de 84%; demostrando así que tiene buena actividad antibacteriana; muy semejante a la gentamicina que presenta un halo de inhibición de 25.00mm y porcentaje de inhibición de 100%.

RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación con el extracto de Chirimoya (*Annona cherimola*), utilizando otros métodos de extracción.
- Se recomienda continuar con la investigación sobre otras partes de la especie vegetal estudiada o del género *Annona*, con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre su actividad antimicrobiana.
- Determinar la actividad antibacteriana de Chirimoya (*Annona cherimola*), con otros métodos, como el método por saca bocado.
- Desarrollar estudios toxicológicos de Chirimoya (*Annona cherimola*).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Perú, Ministerio de Salud, Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Evaluación de la situación de los medicamentos en el Perú. Lima: MINSA; 1997.
2. Perú, Ministerio de Salud. Evaluación de sistemas de suministro de medicamentos e insumos esenciales. Servicio de Medicinas Pro Vida. Lima: Proyecto 2000, MINSA; 1996.
3. Carmona Edgar, Sandoval Seyzo, García Coralith. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. Col Med. 2007; 38(2): 149-158.
4. Instituto Nacional de Salud. Reporte de las Principales Enfermedades Infecciosas en el Perú. Lima. Boletín Informativo INS, 2007; 15 pp.
5. ARIAS B, Isabel et al. *Escherichia coli* enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. Rev. Perú. med. exp. salud pública. 2004, 21(3):176-178.
6. Alvarado Villanueva Verónica, Moromi Nakata Hilda; Plantas medicinales: Efecto antibacteriano in vitro de *Plantago major L*, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. Odont SanMar. 2010; 13(2): 21-25
7. Ruiz Q Julio R., Roque A Mirtha. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriental peruano. Cien e Invest. 2009; 12(1): 41-47
8. Cruz Carrillo Anastasia, Rodríguez N. Natalia., Eduardo Rodríguez Carlos. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. U.D.CA Act. & Div. Cient. 2010. 13 (2): 117-124.
9. Cazares Luna, Lorena M. y Gonzalez Esquinca, Alma R. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia Safford* y *Annona purpurea Mociño & Sessé ex Dunal*. Polibotánica. 2008, (25): 120-125.

10. Victoria Amador María, Morón Rodríguez Francisco, et al. Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. Rev cubana plant med. 2006. 11(1).
11. León Blanca y Monsalve Christian. *Annonaceae* endémicas del Perú. Perú Biol. 2006. 13(2): 35s - 41s.
12. González Vega, María Esther. Chirimoya (*Annona cherimola miller*), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. Cul Tro. 2013. 34(3): 52-63.
13. Abadie Saenz Ricardo, Medina Olimar Ronald. Actividad antibacteriana de extractos vegetales sobre cepas aisladas del hardware de computadoras del Hospital César Garayar Iquitos, UNAP; 2014.
14. Alvarado Villanueva Verónica, Moromi Nakata Hilda. Plantas medicinales: efecto antibacteriano in vitro de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica, Odontol. Sanmarquina 2010; 13(2): 21-25.
15. Ruiz Julio, Roque Mirtha. Perú (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-oriental peruano. Ciencia e Investigación 2009; 12(1): 41-47.
16. Souza Barboza, Ferreira, et al. Antimicrobial activity of *Annona mucosa* (Jacq.) grown in vivo and obtained by in vitro culture. Braz J Microbiol. Jul 2015. 46(3):785-9.
17. Da Silva Jeferson, Cerdeira Cláudio, Chavasco Juliana, et al. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* LINNÉ and *Annona crassiflora* MART. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. 2014. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 56(4):333-340,
18. Guedes da Silva Almeida Jackson, De Souza Araújo Camila, et al. Atividade Antioxidante, Citotóxica e Antimicrobiana de *Annona vepretorum* MART(ANNONACEAE). 2014. 36(edição especial): 258-264.

19. Hitzschky Fernandes Gustavo, Alves Mourão Jozeanne, Angelo Ângela Maria, et al. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. 2010. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 52(3):129-132.
20. Vilaça Costa Emmanoel, Belém Pinheiro Maria, et al. Antimicrobial And Antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). 2009. Quim. Nova, 32(1): 78-81.
21. Vieira Rabêlo Suzana, Matiuzzi da Costa Mateus, Cunha Libório Rafael, Guedes da Silva Almeida Jackson. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). 2009. 36(edición especial): 265-271.
22. Ministerio de agricultura y ganadería. Cultivo de la Annona (*Annona cherimola*, Mill), Costa Rica: 2007
23. León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. San José, C.R., IICA, 445 p.
24. Walter, J. W. Contributions for the Gray Herbarium. Pollen, Morphology, phytogeography and Phylogeny of the Annonaceae. Edit. Reed C., Rollins and K. Roby. 1971. 202 p.
25. Mabberley, D. J. The plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1990, 707 p.
26. Henosos, G. J.; Perez, M.; De Oteyra, M.; Ruiz, A.; Nieto, A. y Farvé, J. M. The Spanish Germoplasm Bank of Chirimoya (*Annona cherimolia* Mill). Ecuador. Acta Horticultura, 1999, vol. 497, p. 201-212.
27. Murillo, A. J. Las Annonáceas de Colombia. Biota colombiana. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. 2011, p. 49-58.
28. Ministerio de agricultura y riego. Lima concentra cerca del 40% de la producción de chirimoya en el país, Lima-Perú. 2015.
29. Mogrovejo Martha. La Chirimoya (*Annona cherimola*). Med nat. [en línea] 2009 agosto 13 [fecha de acceso 01 de noviembre de 2015]. Disponible en <http://mednaturesagradafamilia.blogspot.pe/2009/08/lachirimoya.html>

30. Zamora, N. 1993. Flora arborescente de Costa Rica. Cartago, Editorial Tecnológica de Costa Rica, 262 p.
31. Pírez M., Mota M. Morfología y estructura bacteriana. Temas de bacteriología y virología médica. [en línea], [fecha de acceso 01 de noviembre de 2015] Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
32. Otto Alberto Sussmann P, Lorenzo Mattos, Andrés Restrepo. Resistencia bacteriana. [en línea], [fecha de acceso 01 de noviembre de 2015] Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>.
33. Cervantes García Estrella, García González Rafael, Salazar Schettino Paz María. Características generales del *Staphylococcus aureus*. [publicación periódica en línea], 2014 febrero [citada 2015 noviembre 1] 61 (1), [aproximadamente 13pp.] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
34. Von Eiff EC, Becker K, Machka K, Stammer H. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. N Engl J Med. 2001; 344: 11-16.
35. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAlliser SK, McQuillan G, McDougal LK. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States 2001-2004. J Infect Dis. 197: 1226-1234.
36. Crench CB 2nd, Talbot TR, Schaffner W. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* the way to wound is through the nose. J Infect Dis. 2006; 193 (2): 169-71. Epub 2005 Dec 15.
37. Rodríguez Angeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mex. 2002; 44:464-475.

38. Brote de Síndrome Hemolítico Urémico por *E. coli* enterohemorrágico O104:H4 en Alemania 2011. Bol Epidemiol. (Lima).2011; 20 (23): 461 - 462.
39. Le, J. et al. Infecciones del Aparato Urinario durante el Embarazo, Annal of pharmacotherapy. Oct; 38 (10): 1692-1701; 2004.
40. Lilliam Cordiés Jackson, Looney Andrés Machado Reyes, Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta médica. 1998;8(1):13-27.
41. Palomino Julián, Pachón Jerónimo. Aminoglucósidos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21(2):105-15
42. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Tema 6. Los principios activos de las plantas medicinales y aromáticas. [en línea], [fecha de acceso 01 de noviembre de 2015] Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf>
43. R. Taroco, V. Seija, R. Vignol. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de bacteriología y virología médica. [en línea] 2008 [fecha de acceso 01 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
44. Lock O. Métodos de Estudios de Productos Naturales. Perú: Fondo Editorial; 1994.
45. Sacsquispe, R. Velásquez, J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud, Serie de Normas Técnicas N° 30; Lima – 2002.

ANEXOS

ANEXO 01:

UBICACIÓN DE SAN JERONIMO DE SURCO - HUAROCHIRI



ANEXO 02:

RECOLECCION DE MUESTRA VEGETAL

Foto 01: Chacra de Chirimoya



Foto 02: Hojas y Frutos de Chirimoya

Foto 03: Recolección de Hojas de Chirimoya



CONSTANCIA DE LA MUESTRA VEGETAL



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA N° 277-USM-2015

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas) recibida de **Jhohana María CARBAJAL TOVAR**; alumna de la Universidad Alas Peruanas de la Fac. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha sido estudiada y clasificada como: ***Annona cherimola* Miller** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: MAGNOLIALES

FAMILIA: ANNONACEAE

GENERO: *Annona*

ESPECIE: *Annona cherimola* Miller

Nombre vulgar: "chirimoya"
Determinado por Mag. María Isabel La Torre.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 11 de diciembre de 2015



Haydee Montoya Terreros
Dra. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 04:

PREPARACION, SECADO Y MOLIENDA DE LA MUESTRA VEGETAL



Foto 04: Pesaje de hojas de Chirimoya



Foto 05 y 06: Lavado de las hojas de Chirimoya



Foto 07, 08 y 09: Secado y fraccionamiento de hojas de Chirimoya



Foto 10 y 11: Molienda de hojas secas de Chirimoya



Foto 12: Almacenamiento de polvo fino de hojas de Chirimoya

ANEXO 05:

OBTENCION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO



Foto 13: Pulverizado de hojas y Alcohol 70°



Foto 14: Se agregó 850ml de alcohol de 70°



Foto 15: Maceración con solución hidroalcohólica



Foto 17 y 18: Primera y segunda filtración del extracto hidroalcohólico



Foto 16: Almacenamiento por 7 días, agitación 2 veces al día



Foto 19: Volumen final de extracto hidroalcohólico, 460ml



Foto 20 y 21: Concentración del extracto hidroalcohólico, 80ml



Foto 22: Almacenamiento del extracto hidroalcohólico

ANEXO 06:

PROTOCOLO DE TAMIZAJE FITOQUIMICO SEGÚN OLGA LOCK

Técnica Operatoria: Se determinó la presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de hojas de chirimoya, mediante ensayos de identificación cualitativa.

1. Identificación de carbohidratos (Azúcares):

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Molish "A", (alfa naftol 2% en alcohol), agitar + H₂SO₄ por las paredes ----- **(+) anillo color violeta.**

2. Identificación de carbohidratos (Azúcares):

Gotas de MP + gotas Rtvo. Antrona (Antrona en H₂SO₄ conc al 2%) ---- **(+) color verde.**

3. Identificación de compuestos fenólicos (Taninos):

Gotas de MP + gotas de Cl₃Fe (Sol al 1% en agua o alcohol) ---- **(+) color verde o azul.**

4. Identificación de Taninos:

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Gelatina ----- **(+) pp. denso blanco.**

5. Identificación de aminoácidos libres y amino grupos:

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Ninhidrina (0.1% en etanol) ----- **(+) color violáceo** (calentar en algunos casos)

6. Identificación de Flavonoides, chalconas, auronas, catequina e isoflavona:

Gotas de MP + magnesio metálico + gotas de HCl conc (Rtvo. Shinoda) ----- **(+) color rojo**

7. Identificación de triterpenoides y esteroides:

MP en cloroformo + gotas de Rtvo. De Lieberman- Burchardat ----- **(+) color verde, azul o naranja.**

8. Identificación para naftoquinonas, antronas y antranonas:

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Borntrager (gotas de NaOH 5%) ----- **(+) color rojo**

9. Identificación de Alcaloides:

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Dragendorff ---- **(+) pp rojo ladrillo**

10. Identificación de Alcaloides:

Gotas de MP + Rtvo. Mayer ----- **(+) pp blanco**

11. Identificación de antocianinas y flavonoides catéquicos:

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Rosenheim (Sol. Yodo Yodurada) ----- **(+) rojo oscuro**

12. Identificación de saponinas:

1gr de MP en polvo + 10ml de agua destilada. Agitar fuertemente ----- **(+) producción de espuma por 15 min de 0.5 a 1cm**

13. Identificación de glicósidos:

Gotas de MP + gotas Rtvo. Vainillina + ácido sulfúrico (0.5ml) ----- **(+) color violáceo en anillo de interfase.**

14. Identificación de azúcares reductores:

Gotas de MP + gotas de Rtvo. Fehling A + gotas de Rtvo. Fehling B ----- **(+) pp. rojo ladrillo (llevar a baño maria)**

ANEXO 07:

**PROCEDIMIENTO DE ANALISIS FITOQUIMICO PARA EL EXTRACTO
HIDROALCOHOLICO DE HOJAS DE CHIRIMOYA**



Foto 23: Dilución del extracto concentrado



Foto 24: Preparación de las muestras



Foto 25: Reactivos usados

1. Identificación de carbohidratos (Azucares):



Foto 26: (+++) anillo color violeta

2. Identificación de carbohidratos (Azucares):



Foto 27: (+++) color verde

3. Identificación de compuestos fenólicos (Taninos):

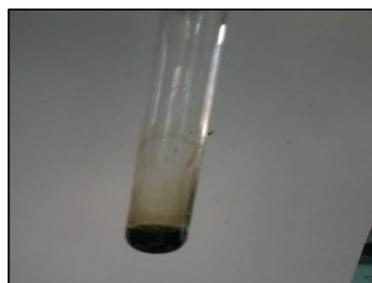


Foto 28: (+++) color verde

4. Identificación de Taninos:

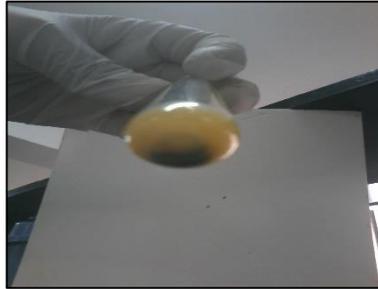


Foto 29: (+) pp denso blanco

5. Identificación de aminoácidos libres y amino grupos:



Foto 30: (+++) color violáceo

6. Identificación de Flavonoides, chalconas, auronas, catequina e isoflavona:



Foto 31: (++) color rojo

7. Identificación de triterpenoides y esteroides:

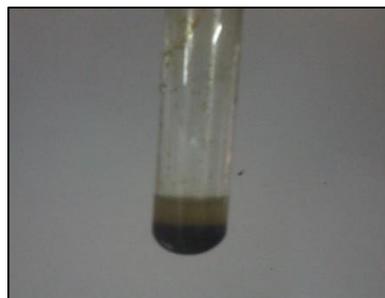


Foto 32: (++) color verde

8. Identificación para naftoquinonas, antronas y antranonas:



Foto 33: (++) color rojo

9. Identificación de alcaloides



Foto 34: (+++) pp rojo

10. Identificación de Alcaloides:



Foto 35: (+++) pp blanco

11. Identificación de antocianinas y flavonoides catéquicos:



Foto 36: (++) rojo oscuro

12. Identificación de saponinas:



Foto 37: (+++) producción de espuma por 15min de 0.5 a 1cm

13. Identificación de glicósidos:

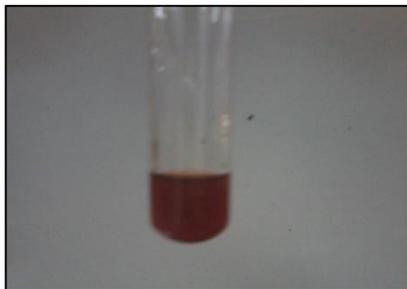


Foto 38: (+++) color violáceo en anillo de interfase

14. Identificación de azúcares reductores:



Foto 39: (+++) pp rojo ladrillo



Foto 40: Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya

ANEXO 08:

ANALISIS MICROBIOLÓGICO. PREPARACION DE CONCENTRACIONES EN DISCOS

PREPARACION DE CONCENTRACIONES:

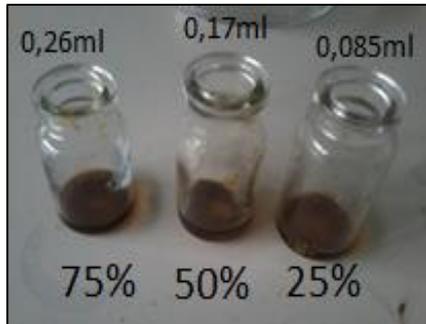


Foto 41: alícuotas de extracto concentrado



Foto 42: alícuotas de extracto concentrado + 2ml de agua destilada estéril

PREPARACION DE LOS DISCOS:



Foto 43: Materiales para inyección en discos



Foto 44: Discos estériles



Foto 45: Inyección de soluciones a los discos

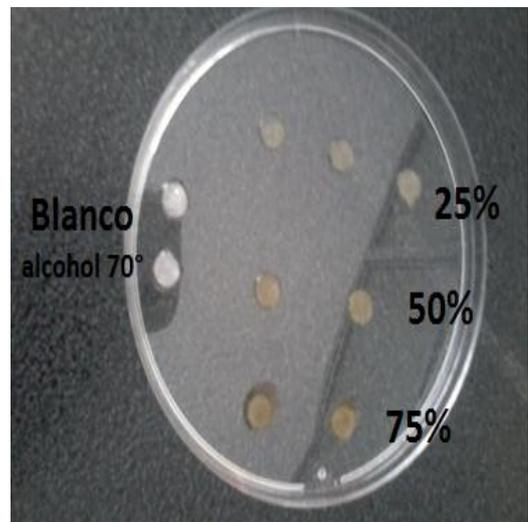


Foto 46: Discos inyectados

ANEXO 09:

ANALISIS MICROBIOLÓGICO

PREPARACION DEL INOCULO



Foto 47: Agar Tripticasa de Soya (TSA) en placas Petri para el cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.



Foto 48: Ajuste a la escala de 0,5 Mc. Farland



Foto 49: Inóculos de *E. Coli* y *S. aureus*

INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

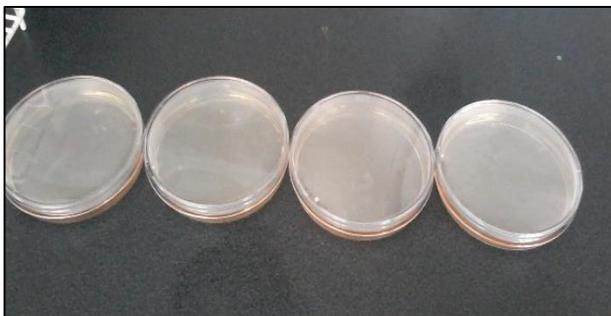


Foto 50: Placas con agar Mueller Hinton



Foto 51: Preparación de materiales para inculo



Foto 52: Inoculación en superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones

APLICACIÓN DE LOS DISCOS



Foto 53: Aplicación de discos, en placa.



Foto 54: Aplicación de discos, en placa con *E. Coli* y *S. aureus*

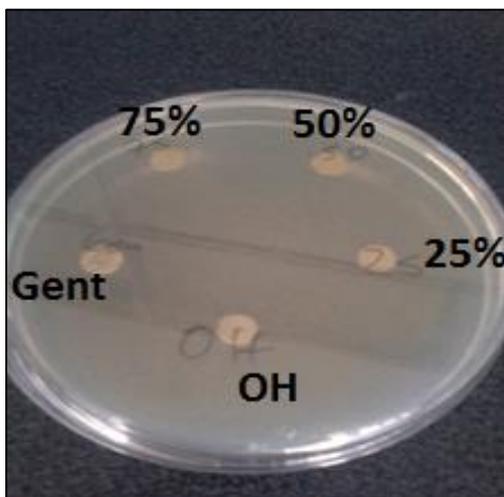


Foto 55: Rotulación de placa

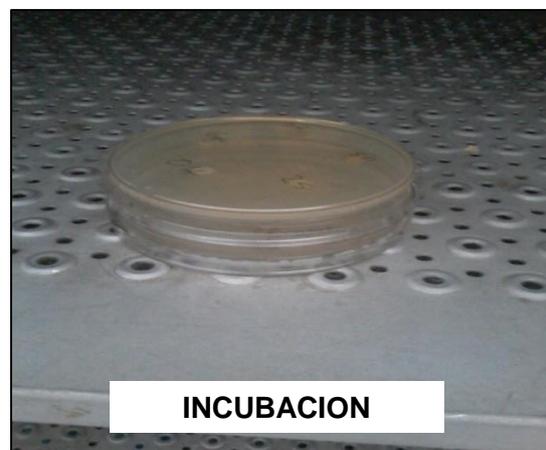


Foto 56: Incubación de placas en posición invertida a 35°C

ANEXO 10:

LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Foto 57: Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*) frente a *Staphylococcus aureus*

Foto 58: Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (*Annona cherimola*) frente a *Escherichia coli*



MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título del Proyecto de Tesis: “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE CHIRIMOYA (*Annona cherimola*) EN EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*”

Bachiller: CARBAJAL TOVAR, Jhohana María

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
<p>P.G.: ¿Tendrá actividad antibacteriana in vitro el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>) en el crecimiento de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>O.G.: Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de chirimoya (<i>Annona cherimola</i>) en el crecimiento de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>H.G.: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>), presenta actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Tipo de Investigación:</p> <p>Aplicativo Cuantitativo</p>	<p>Método de Investigación:</p> <p>Análítico – Sintético De Laboratorio De Casos</p>	<p>Variable Independiente (X) X: Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>).</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Compuestos con propiedades antibacterianas. • Concentración del extracto <p>Variable Dependiente (Y) Y: Crecimiento de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i></p> <p>Dimensiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tamaño de halo de inhibición • Porcentaje de inhibición (grado de sensibilidad) 	<p>Población vegetal: conjunto de árboles de <i>Annona Cherimola</i> “Chirimoya”, distribuidos en un terreno, ubicada en el distrito de San Jerónimo de Surco-Huarocharí-Lima.</p> <p>Muestra vegetal: 460g de hojas de <i>Annona cherimola</i></p> <p>Población biológica: cepas bacterianas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>Muestra biológica: la preparación del inóculo bacteriano será de 3 a 5 colonias de tamaño aproximado.</p>
<p>Problemas específicos</p> <p>P.E.1.: ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentará compuestos con propiedades antibacterianas?</p> <p>P.E.2.: ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentará halo de inhibición y porcentaje de inhibición bacteriana sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>?</p> <p>P.E.3.: ¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentará halo de inhibición y porcentaje de inhibición bacteriana sobre las cepas de <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>Objetivos específicos</p> <p>O.E.1.: Determinar si el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presentan compuestos con propiedades antibacterianas.</p> <p>O.E.2.: Determinar el halo de inhibición y el porcentaje de inhibición bacteriana que produce el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>O.E.3.: Determinar el halo de inhibición y el porcentaje de inhibición bacteriana que produce el extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya sobre las cepas de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Hipótesis específicas</p> <p>H.E.1.: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presenta compuestos con propiedades antibacterianas.</p> <p>H.E.2.: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presenta un halo de inhibición y porcentaje de inhibición semejante al producido por la Gentamicina sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>H.E.3: El extracto hidroalcohólico de las hojas de Chirimoya presenta un halo de inhibición y porcentaje de inhibición semejante al producido por la Gentamicina sobre las cepas de <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Nivel de Investigación:</p> <p>Explicativo</p>	<p>Diseño de Investigación:</p> <p>Experimental</p>		