



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**TESIS:**

**“SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS  
ETANÓLICOS DE *Plantago major* (LLANTÉN) Y *Punica granatum* L.  
(GRANADA)”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Presentado por:**

**SOLEDAD REYNA LLOCLLE HUAYHUA**

**ASESORES:**

**Mg. Fabricio Monteagudo Montenegro**

**Mg. Cecilia Ignacio Punín**

**Lima, Perú, Enero 2019**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a Dios porque está siempre conmigo, guiándome por el camino del bien; dándome sabiduría, fortaleza y humildad para continuar. También quiero dedicar a mis padres Alejandra y Leonardo; asimismo a mis hermanos: Lucia, German, Roxana, Yeni y Carmen por su constante apoyo a lo largo de estos años; porque siempre han depositado su entera confianza en cada reto que se me presentaba, son parte de mi inspiración y motivo de salir siempre adelante. A mis amigas y compañeros quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos años estuvieron siempre apoyándome a que este sueño se haga realidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis docentes de la Universidad Alas Peruanas por haber compartido sus conocimientos para poder desarrollarme como persona y profesionalmente.*

*A mis asesores por su colaboración durante la elaboración, redacción y culminación de la tesis.*

## ÍNDICE

<i>Dedicatoria</i> .....	<i>ii</i>
<i>Agradecimiento</i> .....	<i>iii</i>
<i>Índice general</i> .....	<i>iv</i>
<i>Índice de tablas</i> .....	<i>vii</i>
<i>Índice de figuras</i> .....	<i>viii</i>
<i>Resumen</i> .....	<i>ix</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>x</i>
<i>Introducción</i> .....	<i>xi</i>

### CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la situación problemática.....	12
1.2. Formulación del problema.....	13
1.2.1. Problema general.....	13
1.2.2. Problemas específicos.....	13
1.3. Objetivos de la investigación.....	14
1.3.1 Objetivo general.....	14
1.3.2 Objetivos específicos.....	14
1.4. Justificación e Importancia de la investigación.....	15
1.4.1. Justificación de la investigación.....	15
1.4.2. Importancia de la investigación.....	16
1.5. Limitaciones del estudio.....	16

### CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.....	17
2.1.1. A nivel nacional.....	17
2.1.2. A nivel internacional.....	20
2.2. Bases teóricas.....	23
2.2.1. Especies medicinales.....	23
2.2.1.1. Principios fitoquímicos.....	23
2.2.1.2. Actividad antibacteriana.....	27
2.2.1.3. Sinergismo.....	29

2.2.1.4. <i>Plantago major</i> L.(Llantén) .....	30
A. Clasificación taxonómica .....	31
B. Descripción Botánica .....	31
C. Hábitat.....	33
D. Componentes fitoquímicos .....	33
E. Usos medicinales .....	35
2.2.1.5. <i>Punica granatum</i> L.(Granada) .....	35
A. Clasificación taxonómica .....	35
B. Descripción Botánica .....	36
C. Hábitat.....	36
D. Componentes fitoquímicos .....	37
E. Usos medicinales .....	41
2.2.2. Extracción de compuestos activos .....	41
2.2.3. Bacterias .....	44
2.2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
2.2.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	50
2.2.4. Métodos de estudio de la sensibilidad antibacteriana .....	54
2.3. Definición de términos básicos .....	56

### **CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES**

3.1. Formulación de hipótesis .....	58
3.1.1. Hipótesis general .....	58
3.1.2. Hipótesis específicas .....	58
3.2. Identificación de variables .....	59
3.3. Operacionalización de variables .....	60

### **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

4.1. Tipo y Nivel de investigación .....	61
4.1.1. Tipo de investigación .....	61
4.1.2. Nivel de investigación .....	61
4.2. Método y Diseño de la investigación .....	62
4.2.1. Método de la investigación.....	62

4.2.2. Diseño de la investigación .....	62
4.3. Población y Muestreo de la investigación.....	62
4.3.1. Población.....	62
4.3.2. Muestra.....	62
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	62
4.4.1. Técnicas .....	62
4.4.2. Instrumentos .....	63
4.4.3. Procedimientos .....	63

## **CAPÍTULO V: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

5.1. Resultados de la investigación .....	71
---	----

## **CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

6.1. Discusión de Investigación.....	77
--------------------------------------	----

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
---------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>82</b>
------------------------------	-----------

<b>FUENTES DE INFORMACIÓN.....</b>	<b>83</b>
------------------------------------	-----------

<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>
--------------------	------------

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01:	Clasificación taxonómica del <i>Plantago major</i> L.....	30
Tabla N° 02:	Composición fitoquímica del <i>Plantago major</i> L.....	34
Tabla N° 03:	Clasificación taxonómica de la <i>Punica granatum</i> L.....	35
Tabla N° 04:	Constituyentes principales de la <i>Punica granatum</i> L....	38
Tabla N° 05:	Comparación fitoquímica de la pulpa y cáscara de la... <i>Punica granatum</i> L.	39
Tabla N° 06:	Composición fitoquímica <i>Punica granatum</i> L.....	39
Tabla N° 07:	Composición nutricional <i>Punica granatum</i> L.....	40
Tabla N° 08:	Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i> ...	47
Tabla N° 09:	Clasificación taxonómica de <i>Listeria monocytogenes</i> ..	52
Tabla N° 10:	Identificación de variables.....	59
Tabla N° 11:	Operacionalización de variables.....	60
Tabla N° 12:	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de.... <i>Plantago major</i> L. frente a bacterias patógenas	71
Tabla N° 13:	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de..... <i>Punica granatum</i> L. frente a bacterias patógenas	72
Tabla N° 14:	Actividad sinérgica antibacteriana de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. y <i>Punica granatum</i> L. frente a bacterias patógenas.	73
Tabla N° 15:	Comparación de los extractos etanólicos de <i>Plantago</i> . <i>Major</i> L. y <i>Punica granatum</i> L. frente a bacterias patógenas.	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01:	Estructura química de la aucubina.....	24
Figura N° 02:	Estructura química de los flavonoides.....	26
Figura N° 03:	Estructura química del ácido elágico.....	27
Figura N° 04:	<i>Plantago major</i> L. (llantén.....	33
Figura N° 05:	<i>Punica granatum</i> L. (granada).....	37
Figura N° 06:	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
Figura N° 07:	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	51
Figura N° 08:	Procedimiento de la extracción del vegetal.....	66
Figura N° 09:	Determinación de la actividad antibacteriana.....	69
Figura N° 10:	Diagrama de flujo del sinergismo antibacteriano....	70

## RESUMEN

En la actualidad existen investigaciones de especies medicinales con diversos efectos terapéuticos reportados de manera independiente; pero se hallan pocos estudios sobre la combinación de dos extractos vegetales que evidencie si existe un efecto sinérgico antibacteriano. **Objetivo:** Determinar el sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. **Metodología:** Se realizó el estudio analítico para hallar la actividad antibacteriana por separado de los extractos etanólicos al 7%, 6% y 5%, luego se realizó la mezcla (1:1) del *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada); evaluando su actividad a las concentraciones antes mencionadas, por lo cual se utilizó el método Kirby Bauer y col. Modificado. **Resultados:** Para el extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) en concentraciones de 7%, 6% y 5% frente a *Staphylococcus aureus*, se obtuvo en promedio halos inhibitorios de 10 mm, 10 mm y 8 mm respectivamente; y frente a *Listeria monocytogenes* a iguales concentraciones se obtuvo 8 mm de halos de inhibición para cada una de ellas. Con respecto al extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) a iguales concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* se obtuvo un promedio de 12 mm, 10 mm y 8 mm de halos de inhibición y frente a *Listeria monocytogenes* 14 mm, 12 mm y 8 mm respectivamente. Para la mezcla de los extractos etanólicos del llantén y la granada al 7%, 6% y 5%, presentó halos de inhibición de 8 mm, 8 mm y 9 mm respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*; dichos resultados fueron similares a *Listeria monocytogenes*; ya que se obtuvo 8 mm de halos de inhibición en cada una de las concentraciones. **Conclusión:** Los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) asociados no presentaron efecto sinérgico antibacteriano puesto que no existe diferencia significativa de los resultados obtenidos de forma individual.

**Palabras claves:** *Plantago major* L. (llantén), *Punica granatum* L. (granada), extracto, sinergismo, efecto antibacteriano.

## ABSTRACT

Currently, there are investigations of medicinal species with different therapeutic effects reported independently; but there are few studies on the combination of two plant extracts that show if there is a synergistic antibacterial effect. **Objective:** To determine the antibacterial synergism of the ethanolic extracts of *Plantago major* L. (plantain) and *Punica granatum* L. (pomegranate) against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Methodology:** The analytical study was carried out to find the antibacterial activity separately from the ethanolic extracts at 7%, 6% and 5%, then the mixture (1: 1) of the *Plantago major* L. (plantain) and *Punica granatum* L. (pomegranate); evaluating its activity at the aforementioned concentrations, for which the method Kirby Bauer et al. Modified. **Results:** For the ethanolic extract of *Plantago major* L. (plantain) in concentrations of 7%, 6% and 5% against *Staphylococcus aureus*, inhibitory halos of 10 mm, 10 mm and 8 mm respectively were obtained; and against *Listeria monocytogenes* at the same concentrations, 8 mm of halos of inhibition were obtained for each one of them. Regarding the ethanolic extract of *Punica granatum* L. (pomegranate) at equal concentrations against *Staphylococcus aureus*, an average of 12 mm, 10 mm and 8 mm of inhibition halos was obtained and against *Listeria monocytogenes* 14 mm, 12 mm and 8 mm respectively. For the mixture of the ethanol extracts of plantain and pomegranate at 7%, 6% and 5%, it presented halos of inhibition of 8 mm, 8 mm and 9 mm respectively against *Staphylococcus aureus*; these results were similar to *Listeria monocytogenes*; since 8 mm of inhibition halos were obtained in each of the concentrations. **Conclusion:** The ethanolic extracts of *Plantago major* L. (plantain) and *Punica granatum* L. (pomegranate) associated did not present synergistic antibacterial effect since there is no significant difference of the results obtained individually.

**Key words:** *Plantago major* L. (plantain), *Punica granatum* L. (pomegranate), extract, synergism, antibacterial effect.

## INTRODUCCIÓN

El Perú es un país con una gran diversidad de especies vegetales con propiedades medicinales, las cuales son importantes porque brindan al ser humano la posibilidad de tener una alternativa para prevenir o curar una determinada enfermedad, por este motivo los vegetales y sus metabolitos secundarios son una fuente prometedora para proporcionar compuestos bioactivos potencialmente terapéuticos.

El uso indiscriminado de medicamentos como es el caso de los antimicrobianos, ha conllevado la aparición y propagación de la resistencia bacteriana. Actualmente existe un interés creciente por descubrir y desarrollar nuevas formas terapéuticas para combatir las enfermedades, pero la mayoría son estudios individuales de extractos vegetales con actividad terapéutica y se habla muy poco sobre el sinergismo de dos especies vegetales que ayuden a potenciar su efecto. (1)

Entre los extractos de recursos vegetales que poseen compuestos fitoquímicos con actividad antibacteriana comprobada encontramos a *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada); cuyas investigaciones anteriores informan que han sido utilizadas frente a diversos microorganismos patógenos; asociados al desarrollo de infecciones bacterianas.

Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo determinar el sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Descripción de la situación Problemática

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS); el 80% de la población de los países en desarrollo recurre a distintos recursos medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades médicas por ser un medio más saludable y accesible. (2) El Perú, considerado como uno de los países con mayor biodiversidad del mundo, ha realizado importantes aportes de especies y variedades, muchas de ellas han sido investigadas durante largos años, descubriendo sus múltiples utilidades en el tratamiento y prevención de enfermedades. (3)

En la actualidad, la proliferación de las infecciones bacterianas se ha extendido, convirtiéndose en una preocupación generalizada que constituye un elemento de riesgo para la comunidad; este hecho preocupa porque los microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; son causantes de diversas patologías y pueden desencadenar intoxicaciones e infecciones con capacidad letal, ocasionando problemas de salud en la población de riesgo,

cuyas posibilidades de rehabilitarse son limitadas, por este motivo se buscan fuentes naturales que impidan el desarrollo bacteriano. (4)

La mayoría de los estudios biológicos y fitoquímicos se reportan de manera individual; por consiguiente, la falta de estudios sobre el efecto sinérgico de especies vegetales para mejorar sus propiedades terapéuticas se ha convertido en uno de los temas predominantes en el sector salud. En los últimos años se están investigando nuevos métodos y técnicas que permitan mezclar los extractos de especies medicinales, para combatir eficazmente a microorganismos patógenos. (5)

Investigaciones realizadas individualmente demuestran las propiedades terapéuticas antibacterianas de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica Granatum* L. (granada) estos recursos vegetales son utilizadas para combatir diversos microorganismos patógenos, las cuales al ser mezcladas pueden ejercer una acción potente mediante un efecto sinérgico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. (6)

## **1.2. Formulación del Problema**

### **1.2.1. Problema General**

- ✓ ¿Existe sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a cepas tipificadas?

### **1.2.2. Problemas específicos**

- ✓ ¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115?

- ✓ ¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115?
- ✓ ¿Cuál de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) presenta mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115?
- ✓ ¿Presenta sinergismo antibacteriano los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) al 7%, 6% y 5% de concentración frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115?

### **1.3. Objetivos de la Investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

- ✓ Determinar el sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a cepas tipificadas.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- ✓ Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico *Punica granatum* L. (granada) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

- ✓ Comparar cuál de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) presenta mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ Determinar el sinergismo antibacteriano en los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) al 7%, 6% y 5% de concentración frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

## **1.4. Justificación e Importancia de la Investigación**

### **1.4.1. Justificación de la Investigación**

La medicina tradicional ha sido utilizada desde la antigüedad para la terapia y prevención de diversas enfermedades. Actualmente el empleo de especies medicinales se ha incrementado; justificado en muchas ocasiones por motivos económicos y disminución de efectos tóxicos graves muy comunes en sustancias químicamente puras.

También se sabe que la medicina contemporánea utiliza formulaciones basadas en la asociación de extractos de drogas vegetales como remedio efectivo para curar diversas enfermedades. (7)

Se ha evidenciado mediante antecedentes que *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) poseen compuestos activos con propiedades fitoterapéuticas, demostrando que impiden el crecimiento bacteriano, dichos estudios son reportados en forma individual y escasamente sobre sus asociaciones para mejorar su actividad terapéutica; esto motivó a evaluar el sinergismo que pueda presentar estas

especies vegetales, para impedir el desarrollo de bacterias patógenas como son *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, causantes de infecciones bacterianas y comprobar su uso popular.

Por lo expuesto; el presente estudio brinda un aporte de conocimiento que sirve como antecedente para futuras investigaciones, las mismas que beneficiarán a la población y contribuirán como una alternativa en la medicina natural.

#### **1.4.2. Importancia de la Investigación**

El Perú, presenta una variedad de especies vegetales, que la creencia popular y ancestral las acepta como terapéuticas, basadas solamente en la cultura empírica, por ello se considera importante conocer el efecto antibacteriano de las especies vegetales para ver un posible efecto sinérgico.

La presente investigación tiene gran importancia porque se buscó potenciar el efecto antibacteriano mediante el sinergismo de dos extractos etanólicos como son *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada); basándonos en sus propiedades fitoterapéuticas validadas científicamente. Asimismo, la realización de esta investigación sirve como base científica para continuar con estudios posteriores dirigidos a patologías asociadas a las infecciones bacterianas que son causadas por *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. (8)

#### **1.5. Limitaciones de la investigación**

- ✓ No existe suficiente información científica sobre estudios relacionados con la actividad sinérgica antibacteriana de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada).

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

##### 2.1.1. A nivel Nacional

**Romero J. Villegas S**, EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LA CÁSCARA DE *Punica granatum* (GRANADA) Y *Syzygium aromaticum* (CLAVO DE OLOR) SOBRE *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* Y *Vibrio cholerae*. Perú, **2017**. Tesis para optar el título profesional de licenciado en Biología-Microbiología y Parasitología en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Presentó como objetivo determinar el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de las flores de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y de la cáscara de *Punica granatum* L. (granada) sobre los microorganismos mencionados. La obtención de los extractos se realizó por maceración con etanol de 96°. Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizaron tres

concentraciones 30%, 20% y 10% empleando el Método de difusión en agar. Los resultados demostraron que el extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* presentó en promedio halos de inhibición de 20 mm (30 %), 15 mm (20%) y 13 mm (10%) frente a *Staphylococcus aureus*; 9.77 mm (30%), 9.11 mm (20%) y 7 mm (10%) halos de inhibición frente a *Pseudomona aeruginosa*; 13 mm (30%), 11 mm (20%), 9 mm (10%) halos de inhibición frente a *Vibrio cholerae*. El extracto etanólico de *Punica granatum* presentó en promedio halos de inhibición de 15.22 mm (30%), 15 mm (20%) y 12.45 mm (10%) frente a *Staphylococcus aureus*; 17 mm (30%), 14 mm (20%) y 9.44mm (10%) frente a *Pseudomona aeruginosa*; 16.33 mm (30%), 10 mm (20%) y 8.66 mm (10%) frente a *Vibrio cholerae*. Por lo que se concluye que los extractos etanólicos de la granada y clavo de olor presentan efecto antimicrobiano frente a cepas de *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Peudomona aeruginosa*, siendo la especie más sensible *Staphylococcus aureus*.(9)

**Crisanto A. Reaño C**, EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Plantago major* (LLANTÉN) FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomona aeruginosa*; POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO Y MACRODILUCIÓN. Perú, **2016**. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico en la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Presentó como objetivo evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Plantago major* L. (llantén). Para la obtención del extracto etanólico; se seleccionó y se secó las hojas en un panel por un espacio de 20 días a temperatura ambiente para luego tritarlo y proceder a realizar la maceración etanólica, utilizando 7 kg de materia prima molida

en 7 litros de etanol por 7 días, donde se concentró el extracto a temperatura ambiente por 3 días. Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo por el método de difusión en agar. Los resultados demostraron que el extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) presentó en promedio halos de inhibición de 20.3 mm y 20 mm a las concentraciones de 12% y 6% respectivamente sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En conclusión, el extracto etanólico de *Plantago major* (llantén); presenta actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* mientras que para *Pseudomona aureginosa* no resultó activo. (10)

**Bernal R. Rodríguez I. Salazar M**, EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Punica granatum* SOBRE LA VIABILIDAD DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomona aureginosa* IN VITRO. Perú, **2014**. Tesis para optar el título profesional de licenciado en Microbiología y Parasitología en la Universidad Nacional Trujillo. El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de las cáscaras de *Punica granatum* L. (granada) frente a los patógenos mencionados. La obtención del extracto se realizó por maceración en alcohol (70°). Para la evaluación de la parte microbiológica se emplearon tres concentraciones 12.5%, 6.25% y 3.25% utilizando el método de difusión en agar en pozo. En la lectura de los resultados se observó en promedio halos inhibitorios de 21 mm (12.5%), 17 mm (6.25%) y 14 mm (3.25%) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, también mostró halos inhibitorios de 18mm (12.5%), 14 mm (6.25%) y 12 mm (3.25% frente a *Pseudomona aureginosa*. Por lo que se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* L. tiene actividad antibacteriana sobre las bacterias gram positivas y gram

negativas; y que a mayor concentración se incrementa el tamaño de los halos de sensibilidad. (11)

### **2.1.2. A nivel Internacional**

**Borja V**, EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DEL *Plantago major* (LLANTÉN), EXTRACTO DE *Matricaria chamomilla* (MANZANILLA) Y LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO DE MANZANILLA Y LLANTÉN COMPARADO CON CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE *Porphyromona gingivalis*. Ecuador, **2017**. Tesis para optar el título de cirujano dentista en la Universidad Central del Ecuador. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano de los extractos de llantén y manzanilla; y la asociación de los mismos sobre cepas de *Porphyromona gingivalis*. La preparación de ambos extractos se realizó por maceración en alcohol etílico (70°). Para la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en agar. La actividad antibacteriana de los tres extractos frente a *Porphyromona gingivalis*; mostraron en promedio halos de sensibilidad de 10.20 mm para el extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla), 12.47mm para el extracto de *Plantago major* (llantén), y 16,47mm para el extracto combinado de manzanilla y llantén. Por lo tanto, se llegó a la conclusión que no existe efecto antibacteriano sinérgico entre los extractos etanólicos de llantén y manzanilla. (12)

**Rahnemoon P. Sarabi M. Javanmard M. Bostan A**, PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE *Punica granatum* L. (GRANADA). Irán, **2016** Estudio realizado por la Academia mundial de ciencia, ingeniería y tecnología. Presentó como objetivo determinar la

actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la cáscara de la granada frente a microorganismos transmitidos por alimentos. Para la obtención del extracto etanólico se llevó a cabo el secado de las muestras a sombra por ocho días posteriormente fueron llevados a estufa y se realizó la preparación del extracto por maceración con alcohol de 70°. En la determinación antibacteriana se preparó dos concentraciones 7% y 5% y se empleó el método difusión en agar, utilizando el medio de cultivo Müller Hinton. Los resultados demostraron actividad antibacteriana del extracto etanólico de las cáscaras de *Punica granatum* L. obteniendo en promedio halos de inhibición de 15 mm (7%) y 12 mm (5%) frente a *Listeria monocytogenes*; 14.0 mm (7%) y 12.0 mm (5%) frente a *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto; se concluye que el extracto etanólico de las cáscaras de *Punica granatum* L. posee actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* PTCC 1764 y *Listeria monocytogenes* PTCC1997. (13)

**Abdollahzadeh S. Mashour R. Mortazavi H**, ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFÚNGICAS DEL EXTRACTO DE *Punica granatum* CONTRA PATÓGENOS ORALES. Irak, **2012**. Estudio realizado por el Departamento de microbiología y medicina oral de la Universidad de Ciencias Médicas de Teherán. Presentó como objetivo demostrar la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico de cáscaras de *Punica granatum* L. (granada) frente a *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*. Para la obtención del extracto se utilizó la maceración etanólica. En la evaluación de la actividad antibacteriana se usó el método de difusión en agar, y se preparó a diferentes concentraciones 1.2 % (12 mg/mL), 0.8% (8 mg/mL), 0.4% (4 mg/mL). Los resultados obtenidos

demonstraron una inhibición efectiva de las cepas analizadas; presentó en promedio halos de sensibilidad de 10mm (1.2%), 10mm (0.8%) y 8mm (0.4%) frente a *Streptococcus mutans*; 16mm (1.2%), 12mm (0.8%) y 8mm (0.4%) frente *Staphylococcus aureus*; 14mm (1.2%), 12mm (0.8%) y 12mm (0.4%) frente a *Staphylococcus epidermidis*; mientras que para *Candida albicans* en todas las concentraciones presentó 8 mm de halos de inhibición. Por lo que se concluye que el extracto etanólico de *Punica granatum* L. tiene efecto antimicrobiano y antifúngico frente a *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Candida albicans*. (14)

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Especies medicinales**

Son aquellos que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. (15)

Las especies medicinales se utilizan desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (16)

Según la Organización Mundial de la Salud, los medicamentos herbarios abarcan las hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de esos elementos, y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. (16)

#### **2.2.1.1. Principios fitoquímicos**

Son sustancias que se ubican en las diferentes partes u órganos de los recursos vegetales, cumplen una función fisiológica o nutritiva en el organismo. (17)

Son componentes purificados que tienen funciones terapéuticas comprobadas científicamente, pueden encontrarse: en la corteza, en la raíz se sitúan en mayor cantidad, también se presentan en las flores, semillas, frutos o en toda la planta. Los principios activos pueden ser diversos en una sola especie; esto se debe a diversos factores como son: la época del

año, características del suelo, los componentes químicos contenidos o sometidos de la especie vegetal. (18)

### A. Los glucósidos o Heterósidos

Son productos que resultan del metabolismo secundario de las especies vegetales y se producen por la aglutinación de un azúcar con otras moléculas orgánicas, esta fracción es llamado glúcido y la otra parte es el aglucón que posee las propiedades farmacológicas. Investigaciones realizadas sobre *Plantago major* L. han revelado que el glucósido aucubina es el principio activo de mayor relevancia; en el proceso de catabolismo de esta sustancia por hidrólisis se forma un dialdehído que actúa como bactericida ya que desnaturaliza las proteínas de ciertos microorganismos.(19) ( Figura N° 1).

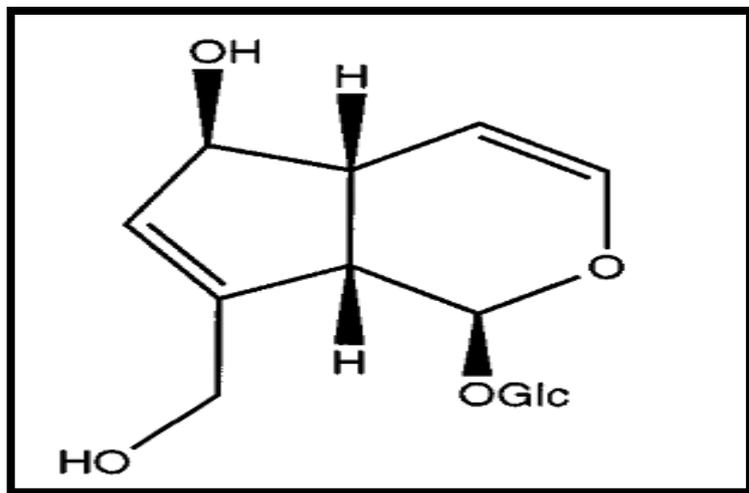


Figura N° 1: Estructura química de la aucubina

Fuente:<http://www.elsevier.es/pt-revista-offarm-4-articulo/llanten-mayor-13029365>

## B. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos con estructuras hidroxiladas, de bajo peso molecular, contienen un grupo cetona con dos anillos aromáticos (bencénicos); están extensamente distribuidos entre las plantas sobre todo en las partes aéreas como son las flores, hojas y frutos. Diversos estudios describen que los flavonoides se encuentran en las hojas de *Plantago major* L. y en las cáscaras de *Punica granatum* L. Uno de los principales efectos atribuidos a los flavonoides es la actividad antibacteriana. Dentro de los flavonoides podemos distinguir a los isoflavonoides, catequinas, neoflavonoides, chalconas, flavonoles, antocianinas y las auronas.

Como características principales de estos compuestos, es que presentan solubilidad en agua y etanol. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente, en un estudio de sus propiedades de solubilidad. (20) (Figura N° 2)

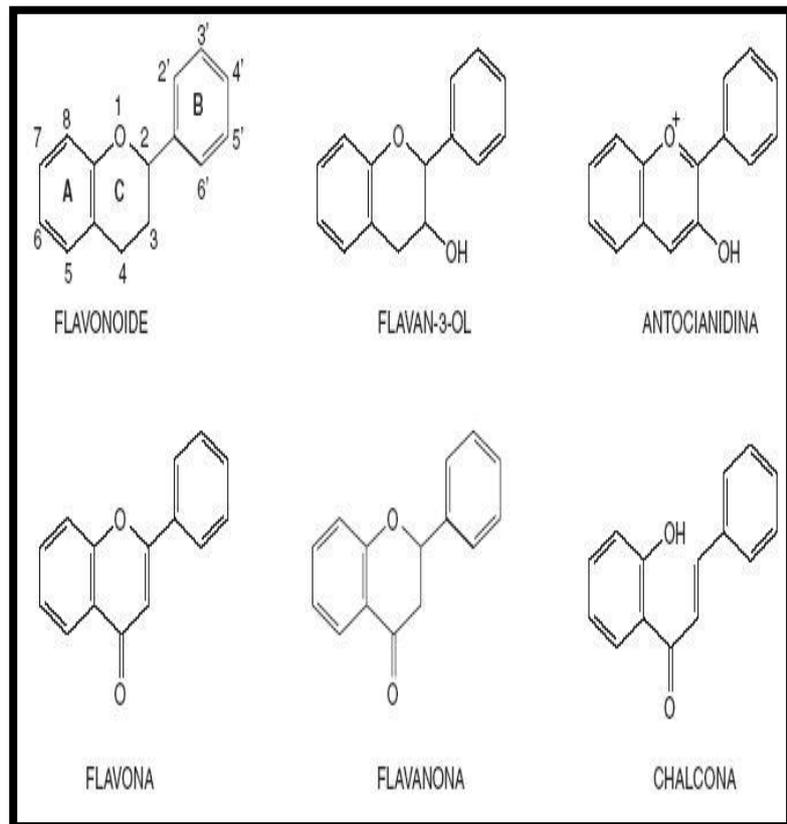


Figura N° 2: Estructura química de los flavonoides

Fuente: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S140599402006000800004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140599402006000800004)

### C. Taninos:

Son compuestos polifenólicos, un poco complejos de origen vegetal, hidrosolubles, de sabor agrio y amargo; las plantas acumulan taninos particularmente en hojas, corteza y tronco, esto las protege de ataques por virus e inhiben el crecimiento de microorganismos. (21)

En el interior de los vegetales; los taninos se encuentran en las vacuolas celulares combinadas con alcaloides, proteínas, etc. El ácido elágico es un elagitanino que está presente en el metabolismo de los recursos vegetales, su principal característica es

su capacidad antimicrobiana, antioxidante, antimutagénica, anticarcinogénica. (22) (Figura N° 3)

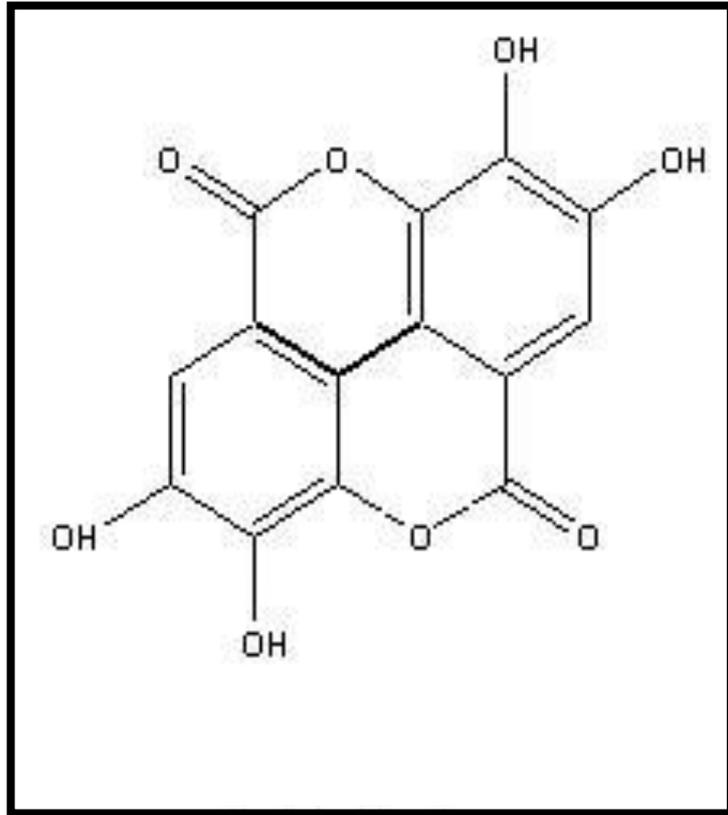


Figura N° 3: Estructura química del ácido elágico

Fuente: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952013000200006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000200006)

### 2.2.1.2. Actividad antibacteriana de las especies medicinales

Actualmente existe la necesidad de investigar nuevos componentes antibacterianos con diferentes estructuras químicas, porque uno de los grandes obstáculos que confrontamos es el desarrollo de infecciones bacterianas ocasionadas por microorganismos patógenos que están produciendo resistencia bacteriana asimismo, el sinergismo de los

extractos vegetales con actividad antibacteriana podrían tener la capacidad de eludir los mecanismos de resistencia actuales, de esta manera representan una alternativa de tratamiento para las enfermedades infecciosas. (23)

El mecanismo exacto de la acción antibacteriana de las especies vegetales y sus derivados aún no está claro; existen algunas hipótesis que implican:

- ✓ La alteración de la pared celular
- ✓ Perturbación de la permeabilidad de la membrana coherente a su propagación y un incremento de la fluidez ocasionado la inhibición de las enzimas introducidas en la membrana.
- ✓ La destrucción del sistema de transporte de electrones
- ✓ Interrupción de la membrana
- ✓ Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los componentes fenólicos a las proteínas de membranas, seguida de la participación de la bicapa lipídica. (24) (25)

El posible mecanismo de acción de los flavonoides puede ser debido a su capacidad para formar complejos con las paredes celulares bacterianas con proteínas extracelulares solubles. (26)

Los flavonoides que no presentan grupos hidroxilos en sus  $\beta$  –anillos son más activos contra las bacterias patógenas y este hallazgo apoya la idea de que su objetivo es la membrana microbiana.

Sin embargo, diversos autores han encontrado también el efecto contrario es decir a mas hidroxilación, mayor es la actividad antibacteriana. Por lo tanto, es seguro decir que no hay previsibilidad clara para el grado de hidroxilación y la toxicidad para los microorganismos. (27)

### **2.2.1.3. Sinergismo**

Se denomina sinergismo al incremento del efecto causado por la administración simultanea de dos o más extractos vegetales.(28)

Es más habitual en la terapia de las enfermedades, administrar dos fármacos cuyas acciones combinadas pueden producir efectos mayores en intensidad o duración que los causados por cada medicamento dosificado en forma individual.

#### **a) Tipos de sinergismo**

- ✓ **De adición:** Es producido cuando dos metabolitos activos implicados tienen actividad por si solos; y se adiciona cuando ambos están presentes produciendo un efecto que es la totalidad de los individuales. Para que esto ocurra deben ser agonistas (actúen en el mismo receptor) y tienen que tener el mismo efecto. (29)
- ✓ **De potenciación:** La combinación tiene una acción mayor que la suma de resultados de las acciones individuales de cada metabolito activo. Para que esto suceda deben ser: no

agonistas (actúen en diferentes receptores) y no producir el mismo efecto. (30)

- ✓ **De facilitación:** Se da cuando un metabolito inactivo puede aumentar cualitativamente o cuantitativamente la respuesta de otro metabolito que si tiene actividad. Se incrementa los efectos terapéuticos de un metabolito activo por la asistencia de otro que no tiene los mismos efectos farmacológicos. (31)

#### **b) Ventajas del sinergismo**

El sinergismo es fundamental en la farmacoterapia por los siguientes efectos:

- ✓ La mayor acción terapéutica de la mezcla permite aminorar las dosis de los fármacos y también una disminución de sus efectos adversos.
- ✓ Puede disminuirse y evitarse los efectos secundarios colaterales al administrarse dosis menores de ambos
- ✓ Puede aliviar la rapidez de inicio y prolongarse los efectos (32)

#### **2.2.1.4. *Plantago major* L. (llantén)**

##### **A. Generalidades**

*Plantago major* L. también conocida como llantén es una hierba continua, que se encuentra en zonas templadas y cálidas, sus nombres populares son: llantén mayor, llantén común o llantén grande; es un recurso vegetal fácil de localizar, es

considerada una maleza. Existen especies relacionadas como son *Plantago lanceolata* y *Plantago psyllium*. (33)

## B. Clasificación taxonómica

Tabla N° 1

### Clasificación taxonómica del *Plantago major* L. (llantén)

Taxonomía	
División:	Magnoliophyta
Clase :	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Fabales
Familia	<i>Plantaginaceae</i>
Genero	<i>Plantago</i>
Especie	<i>Plantago major</i> L.

Fuente: Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa 2018

## C. Descripción botánica:

Es una especie vegetal permanente que se desarrolla aproximadamente; en seis o siete meses.

Nacen a orillas del suelo en forma de roseta y van creciendo verticalmente. El llantén mayor tiene una altura entre los 15 cm a 30 cm, sin embargo; su extensión varía y depende del lugar de origen o su hábitat. Su tallo es un rizoma pequeño de color amarillo, el cual puede medir hasta 15 cm de altura en un recurso vegetal adulto, sus raíces son blancas y de tamaño uniforme, surgen del tallo subterráneo. (33)

El llantén posee hojas ovaladas, que son de color verde claro y se van uniendo al tallo por medio de un largo pecíolo, tienen aproximadamente 50 cm de longitud y un ancho de 20 cm esto es posible en especies adultas.

Presentan un margen denticulado, y una inervación paralela con tres u ocho venas. Los pecíolos son uniformes, lisos y miden alrededor de 15 cm. (34)

Además, presenta una inflorescencia tipo espiga, donde su mitad superior está recubierta de flores pequeñas, estas presentan un color café verdoso; su corola es ambar y pequeña (unos 3mm de diámetro), las anteras son de color lila, al comienzo y luego se convierten al color amarillo. Los pedúnculos florales son la parte más extensa y van naciendo del mismo lugar de donde se arrancan los pecíolos. (34)

Es polinizada por el viento, su fruto tiene la forma de una pequeña cápsula que cuando está maduro libera las semillas que alberga, presentan una forma ovalada, un tamaño muy pequeño, un ligero sabor amargo y se localiza de 8 a 16 semillas por cápsula. (35) (Figura N° 4).



Figura N° 4: *Plantago major* L. (llantén)

Fuente: <https://biotrendies.com/plantas/llanten>

#### **D. Hábitat**

*Plantago major* L. (llantén) crece de manera silvestre o cultivado en tierra húmeda a la orilla de ríos o pantanos; cualquier tipo de clima hasta en el límite de las heladas, requiere de suelos con bastante materia orgánica y buen drenaje. Se propaga por sus semillas y crece durante todo el año. (36)

#### **E. Composición fitoquímica:**

El compuesto activo más importante es la aucubina, se localiza en mayor concentración en las hojas y se cree que es responsable del efecto antimicrobiano de la planta; porque altera las proteínas de diversos microorganismos. También contiene otros metabolitos activos, entre las cuales

se encuentran los flavonoides y taninos y se detallan a continuación en la tabla N° 2. Además, contiene vitamina C, vitamina K y minerales como son: Mg, Ca, Mn y Fe. (10) (13) (37-38)

**Tabla N°2**  
**Composición fitoquímica de *Plantago major* L.**  
**(llantén)**

Metabolitos secundarios	Componentes		(%)
Terpenos	Geniposio		0.005
	metiltósido		0.004
	Linalol		0.05
Alcaloides	Plantagonina		0.08
	Indicaína		0.09
	Noscapina		0.096
Compuestos fenólicos	Glucósidos	Catapol	1.1
		Aucubina	2.4
	Azucares Reductores	Xilosa	39.7
		Arabinosa	13.1
		Galactosa	0.3
		Ác.galacturónico	6.7
	Flavonoides	Rutina	3.01
		Plantaginina	2.01
		Luteolina	0.85
		Quercetina	1.02
	Ácidos fenólicos	Ácido gálico	2.59
		Ácido caféico	3.22
		Ácido. Silícico	1.0
	Taninos		4.0
	Otros	Mucílagos	

Fuente: Elaboración propia 2018

## F. Usos medicinales

Las hojas del llantén contienen sustancias con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, inmunoestimuladoras, astringentes, antidiarréicas, ayuda en casos de disentería y amebiasis, inhibe la acidez de la secreción gástrica, tiene propiedades cicatrizantes, también en infecciones respiratorias como son faringitis bronquitis, entre otras. (38)

### 2.2.1.4. *Punica granatum* L. (granada)

#### A. Generalidades

La granada es una especie vegetal antigua mencionada en muchos escritos porque era muy requerida por su buen sabor y sus propiedades medicinales, es la fruta del granado, árbol de la familia de las Punicáceas que crece en zonas tropicales y subtropicales. (39)

#### B. Clasificación taxonómica

Tabla N° 3

#### Clasificación taxonómica de la *Punica granatum* L. (granada)

Taxonomía	
División :	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden :	Fabales
Familia :	Punicaceae
Género :	<i>Punica</i>
Especie :	<i>Punica granatum</i> L.

Fuente: Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa 2018

### **C. Descripción botánica**

La granada es un árbol pequeño de unos seis metros de alto, caducifolio es muy fuerte a condiciones de sequía. Posee hojas opuestas, brillantes, largas, enteras, de 2 cm de ancho y 3 a 7 cm de largo. Sus flores tienen 3 cm de diámetro, son de color rojo resplandecientes, tienen alrededor de cinco pétalos (las plantas cultivadas tienen más de cinco). (40) Su fruto, en botánica es llamada balausta; es una baya de forma globular, tiene una corteza dura y fibrosa, con un tamaño similar al de una naranja grande; en la parte interior existe subdivisiones con varios lóbulos que contienen abundantes semillas, con forma de prisma y están revestidas con una cubierta, denominada sarcotesta, tiene pulpa roja anaranjada muy carnosa, jugosa, comestible, ligeramente dulce-ácida y están separados por telas membranosas. Su cáscara es astringente y se emplea en medicina y curtiduría, mientras que la corteza de su raíz es útil para erradicar parásitos intestinales. (40) (Figura N° 5).

### **D. Hábitat**

La granada es originaria de Oriente y de las regiones mediterráneas; pero su cultivo está extendido en países con climas tropicales, subtropicales y áridas. Su área de distribución es la misma que el naranjo y el olivo y florece de mayo a junio.

En el Perú se cultiva en Ica, Arequipa, Lima, La Libertad, Tacna, Moquegua y Lambayeque. (41)



Figura N° 5: *Punica granatum* L. (granada)

Fuente:<https://disfrutarconelhuertoyeljardin.blogspotcom/2014>

### **E. Composición fitoquímica**

La granada presenta una cantidad de compuestos orgánicos de alto valor biológico. Dependiendo de la parte del fruto (corteza o piel, membranas carpelares, arilos y semillas) la composición varía de forma considerable; tal como se muestran en la tabla N° 4. La corteza y las membranas carpelares representan el 50% de masa total de la granada, el otro 50% consiste en el conjunto de los arilos, el 80% representa la parte carnosa donde se contiene el zumo y un 20% a la semilla o parte leñosa. (42)

Investigaciones recientes manifiestan que las cáscaras de la granada tienen un buen potencial

como un suplemento para la salud. Científicos en China del Instituto de Higiene y Medicina Ambiental demostraron que la cáscara ofrece mayores rendimientos en compuestos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas a comparación de la pulpa como se observa a continuación en la tabla N° 5. (43)

**Tabla N° 4**  
**Constituyentes principales de *Punica granatum***  
**L. (granada)**

Partes de la planta	Constituyentes principales
Pericarpio (piel + arilos)	Punicalaginas, compuestos fenólicos, ácido gálico, flavanonas, antocianidinas, quercetina y rutina.
Aceite de semillas	Esteroles, ácidos grasos, ácido elágico, ácido púnico.
Zumo	Aminoácidos, ácido caféico, minerales, rutina, Antocianos, ácido elágico, ácido ascórbico, glucosa, ácido gálico, quercetina, catequinas.
Extracto de hojas	Glicósidos de flavonas incluido apigenina y luteolina, taninos (punicalolina y punicalina ).
Extracto de flores	Ácido maslínico, triterpenoides, ácido gálico, ácido ursólico y otros constituyentes sin identificar.
Extracto de las raíces y corteza	Taninos (punicalina y punicalagina) y numerosos alcaloides.

Fuente:<https://adene.es/wpcontent/uploads/2016/04/granado.pdf>

**Tabla N° 5**

**Comparación fitoquímica de la pulpa y la cáscara de *Punica granatum* L. (granada)**

<b>Composición fitoquímica</b>	<b>Pulpa %</b>	<b>Cáscara %</b>
Compuestos fenólicos	2.4	25
Flavonoides	1.7	5.9
Proantocianidinas	0.5	1.1
Vitamina C	0.099	0.085

Fuente: Elaboración propia 2018

También se conoce de varios compuestos fitoquímicos; los cuales han sido agrupados de manera general, como se detalla a continuación en la tabla N° 6. (42-45)

**Tabla N° 6**

**Composición fitoquímica de *Punica granatum* L. (granada)**

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Componentes</b>	<b>Porcentaje</b>	
Terpenos	Ácido ursólico	0.6	
Alcaloides	Peletierina	0.6	
Compuestos fenólicos	Polifenoles	8.7	
	Flavonoide	5.9	
	Flavanoles	Proantocianidinas	1.1
		Catequinas	2.2
	Ácidos fenólicos	Ácido gálico	0.089
		Ácido elágico	2.9
		Ácido clorogénico	0.021
		Ácido cumarínico	0.047
		Azucres totales	8.1
	Taninos		19.47
	Punicalaginas	3.1	

Fuente: Elaboración propia 2018

Entre los componentes nutricionales de la granada predominan agua, carbohidratos, calcio y fósforo; lo cual se detalla a continuación en la tabla N° 7.

**Tabla N° 7**

**Composición nutricional de *Punica granatum*  
L. (granada)**

Componentes	Contenido por cada 100 g
Agua (g)	80.00
Proteína (g)	0.50
Grasa (g)	0.10
Carbohidratos (g)	18.30
Ceniza (g)	0.50
Niacina (mg)	1.56
Riboflavina (mg)	0.04
Tiamina (mg)	0.09
Hierro (mg)	0.30
Calcio (mg)	10.00
Fósforo (mg)	38.00

Fuente:<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC25/10granada.htm>

El ácido elágico es considerado un quelante; esto le permite unirse a un gran número de componentes como los radicales libres. Las características antimicrobianas se vinculan de

manera general con base a su estructura fenólica y con la capacidad de los componentes presentes en la granada para inactivar las adhesiones de las enzimas, bacterias y el transporte de proteínas, porque se juntan con los polisacáridos, teniendo como efecto el cambio de la morfología de los microorganismos, todo esto va a depender de la cepa bacteriana o fúngica con la que este en contacto. (46)

## **F. Usos medicinales**

La granada es una excelente fuente de vitamina C y ácido fólico, una característica principal es su elevado contenido en polifenoles, el zumo se utiliza como antiséptico. La piel de la fruta y la corteza del tronco se usa como antihelmínticos, astringentes. La corteza de la fruta es abundante en taninos, se emplea como terapia para la diarrea, enfermedades dérmicas, por sus propiedades antibacterianas favorecen la cicatrización. Además, posee propiedades antioxidantes, antivirales, cardiovasculares, antidiabética y antiinflamatoria. (47)

### **2.2.2. Extracción de compuestos activos**

Es el desprendimiento de una mezcla de sustancias por disolución de cada compuesto valiéndose de varios disolventes donde constantemente se consiguen dos elementos: el extracto (disolución extraída en su solvente) y el residuo. Para favorecer la disolución, la especie vegetal tiene que ser molida de esta forma se desintegran sus células absorbiendo el líquido de extracción, el solvente llega sin inconvenientes y disuelve las sustancias que están en la droga. Son limpiadas y sacadas

de las fracciones celulares a través de un procedimiento llamado lavado celular. (48)

#### **2.2.5.1. Extractos etanólicos**

Son extractos, que se obtienen por maceración utilizando como disolvente el etanol a partir de la materia prima desecada de un recurso vegetal y luego eliminar el solvente por un medio físico. Para mejorar las condiciones del extracto deseado y eliminar algunos de sus componentes; el producto obtenido es inducido a determinadas operaciones. (49)

##### **A. Obtención por maceración**

Se fundamenta en remojar el material vegetal debidamente fraccionado en etanol o agua, hasta que este penetre y disuelva las partes divisibles, verificando oportunamente la temperatura y tiempo del proceso. Es una extracción simple, para evitar posibles reacciones se debe proteger de la luz al conjunto de la sustancia y el solvente, también se recomienda que la maceración se realice a temperaturas de 15°C a -20°C, el tiempo de maceración es variado, las diversas farmacopeas sugieren tiempos que oscilan entre cuatro a diez días con agitación esporádica (3 veces al día). La ventaja de esta extracción es producir un extracto con una concentración uniforme, sin embargo; resulta muy trabajoso ya que para lograr un mejor rendimiento se requiere más tiempo. (50)

Existen dos métodos de maceración conforme a la temperatura:

✓ **Maceración en frío:** Consiste en sumergir el recurso vegetal a macerar en un disolvente adecuado y dejarlo a una determinada cantidad de tiempo para transmitir al líquido características de la especie vegetal macerada. El periodo de maceración es de una semana a más dependiendo del recurso vegetal que se coloca a macerar. La ventaja del etanol es que logra extraer todas las propiedades de la sustancia de manera íntegra sin modificarla en lo más mínimo. Su desventaja es que requiere de periodos de tiempos más largos para obtener una extracción adecuada. (51)

✓ **Maceración en calor:** El proceso que se sigue en este tipo de maceración es parecido a la extracción en frío; solo que puede haber una variación del procedimiento en la obtención de la maceración.

El tiempo de maceración es un poco diferente; porque al utilizar el calor se aligera el proceso conociendo que tres meses de maceración en frío equivale a 2 semanas de maceración con calor; esto es común en hierbas medicinales. La desventaja es que no logra extraer totalmente puro los metabolitos del vegetal y regularmente destruye algunas propiedades; es decir se ven afectados los compuestos termolábiles por la temperatura, no obstante, el tiempo de maceración disminuye favorablemente. (52)

**B. Tipos de extracto:** Según la concentración de principio activo y su consistencia puede ser:

- ✓ **Extractos fluidos:** En estos extractos la concentración de los metabolitos es similar a la concentración del recurso vegetal original. La consistencia es líquida. (53)
- ✓ **Extractos blandos:** Poseen una concentración del compuesto activo mayor a la sustancia original, presentan una consistencia semisólida, son poco estables, difíciles de manejar y no se utilizan. (53)
- ✓ **Extractos secos:** Son aquellos que presentan una consistencia seca, sólida y son fácilmente pulverizados, se obtienen por volatilización del solvente y desecación del residuo. No deben presentar humedad mayor del 5%, so preparados bastantes estables y de fácil manipulación. (53)

### 2.2.3. Bacterias

Son microorganismos unicelulares que presentan diversos diseños que incluyen hélices, barras, y esferas; poseen un tamaño aproximado de 0.5 y 5  $\mu\text{m}$ . Son procariotas y no tienen núcleo ni orgánulos internos, contienen información genética, sistemas de producción de energía y sistemas biosintéticos necesarios para su desarrollo y reproducción. (56) (57)

Existen dos tipos de bacterias en función de su pared celular:

- ✓ **Bacterias Gram positivas:** Su pared celular está conformada mayoritariamente por peptidoglucano (90%); este el principal componente que nos ayuda a diferenciarlas de las Gram negativas, porque debido al grosor que este revestimiento le proporciona al teñirlo

con la Tinción Gram; logra mantener en el interior de la célula la coloración azul oscuro o cristal violeta. Presentan un tipo natural de organización bacteriana, debido a la estructura de su envoltura nuclear que constituye su principal característica química. Además del peptidoglicano, tienen otros compuestos en su pared celular que se muestran embebidos como los polisacáridos ácidos, entre ellos encontramos a los ácidos teicoicos que se exhiben en pequeñas cantidades. (58)

- ✓ **Bacterias Gram negativas:** Su pared celular está conformada por dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática), otra externa (el espacio periplasmático, donde se acondiciona una capa de un compuesto denominado peptidoglicano (o mureína) cumple una función trascendental en la pared celular de la bacteria porque provee de fuerza y contrarresta la presión osmótica del citoplasma, también se localizan diversas proteínas las más fundamentales son las porinas que constituyen canales por donde circulan ciertas sustancias; que no se sitúan en la membrana citoplasmática. Al someterlas a la tinción Gram aparecen teñidas de rosa-fucsia. (59)

#### **2.2.3.4. *Staphylococcus aureus***

##### **A. Características generales**

Es un microorganismo Gram positivo, inmóvil, no tiene cápsula, no forman esporas, tiene una dimensión aproximada de 0.8 a 1.5 micras de diámetro, presenta forma de coco, dispuestos en racimos, en cadenas o en parejas, es inmóvil y

algunas cepas producen una cápsula externa mucosa que incrementa su capacidad para producir infecciones. Tienen un metabolismo anaerobio facultativo, son oxidasa negativa, coagulasa y catalasa positiva, son muy resistentes a condiciones ambientales adversas como son el calor y la desecación y pueden desarrollarse en medios con elevada salinidad (7.5% NaCl). Luego de 18 a 24 horas de incubación forma colonias de consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada debido a un pigmento carotenoide, de bordes enteros, lisas brillantes y elevadas. Son bacterias saprofitas de la piel y las mucosas, su reservorio son los humanos, mamíferos, aves, alimentos y agua. (60) (Ver figura N° 6)

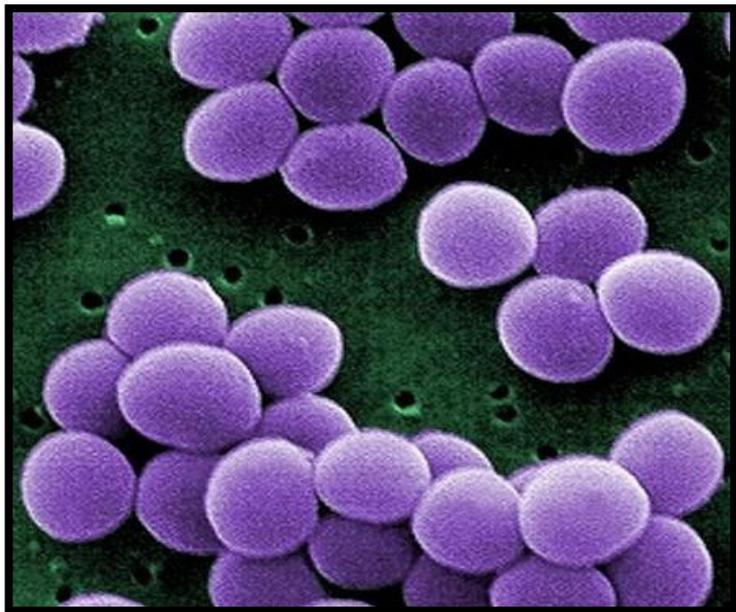


Figura N° 6: *Staphylococcus aureus*

Fuente:<http://www.foodscienceavenue.com/2018/01/staphylococcus-aureus-toxin.html>

## B. Clasificación Taxonómica

Tabla N° 8

### Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*

Taxonomía	
Reino:	Bacteria
Filo:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden :	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i>
Nombre común	<i>Staphylococcus aureus</i> (61)

## C. Patogenia y epidemiología:

Alrededor del 30% de la población es portadora de *Staphylococcus aureus* de forma esporádica y un 20% en las fosas nasales, también puede colonizar otras zonas como la piel y el tracto gastrointestinal. Cuando se rompe la integridad de las barreras mecánicas pueden alcanzar tejidos más profundos y ocasionar infección siendo considerado un fenómeno complicado donde se combinan las causas de virulencia microbiana con la disminución de las defensas del huésped. La transmisión se ocasiona principalmente por la administración oral de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas. También se ocasiona por contacto con personas, animales o elementos infestados, por inoculación accidental a través de agujeros o cortes

con elementos contaminados y mordeduras de animales. (61)

Actualmente el incremento de la incidencia de *Staphylococcus aureus* de procedencia social en algunos países; así como su reciente inclusión y diseminación en los policlínicos ha creado la necesidad de hacer una evaluación precoz y considerar nuevas estrategias terapéuticas. (62)

#### **D. Principales enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus***

##### **✓ Toxiinfección alimentaria por estafilococos:**

Esta bacteria crece en los alimentos, produciendo toxinas bacterianas proteicas denominadas enterotoxinas estafilocócicas y no pueden ser destruidas porque desarrollan termoresistencia, de tal manera que la Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE) se ocasiona por el consumo de alimentos donde están presentes los tóxicos como la mayonesa, los pasteles con crema y productos horneados. (63)

La posibilidad de un brote se incrementa, cuando los individuos que manipulan los alimentos, presentan infecciones en la piel contaminando los alimentos poco cocinados o los expuestos a la temperatura ambiental. Los

síntomas empiezan de forma imprevista produciendo náuseas, vómitos, dolor de cabeza, diarrea y fiebre, en ciertos casos, resulta letal, principalmente en niños, ancianos o personas debilitadas por enfermedades crónicas. (63)

✓ **Infecciones cutáneas.**

Puede causar infecciones dérmicas en aquellos individuos que tienen tendencia a herirse o tienen una piel deshidratada.

Se manifiestan de formas diferentes:

- La foliculitis provoca los molestos forúnculos, son muy dolorosos, el bulto se llena de pus e incrementa su magnitud hasta que explota.
- El impétigo es contagioso, ocurre con mayor regularidad en los niños pequeños afectando la cara, las manos o los pies. (64)
- La dermatitis exfoliativa afecta fundamentalmente a lactantes y niños, originando una erupción cutánea, acompañada de aumento de la temperatura corporal y a veces ampollas, cuando esta revienta, la capa superior de piel se desprende y queda una superficie roja y rugosa que parece una quemadura.
- La celulitis puede producirse en cualquier zona del cuerpo, causa enrojecimiento e hinchazón, llagas y

supuraciones; pero es más usual en las piernas. (65)

✓ **Síndrome del Shock Tóxico estafilocócico (SST)**

Las mujeres con antecedentes de colonización vaginal por estafilococos y que utilizan tampones u otros mecanismos en la vagina tienen mayor riesgo de padecer una SST, porque potencian la productividad de la exotoxina o simplifican su entrada en el torrente sanguíneo. Además; no sólo afecta a las mujeres, también los hombres y los niños pueden desarrollar el SST a través de una lesión en la piel o durante una cirugía.

**2.2.3.5. *Listeria monocytogenes***

**A. Características generales**

Son bacterias Gram positivas con forma de bacilos y pueden medir de 0.5 a 2 micras de longitud y 0.4 a 0.5 de diámetro, anaerobio facultativo, catalasa positiva no forma espora, ni tiene cápsula. Es un microorganismo psicótrofo muy resistentes al calor, se desarrolla en un amplio rango de temperatura (entre -18°C y 45°C), aunque también se multiplica en temperaturas de refrigeración (0° y 4°C), con un pH aproximado entre 3.3 y 9.6, tolerando concentraciones de sal al 20%. Tienen movilidad entre 20° y 25°C, esto se debe a la presencia de cuatro flagelos que están situados en la zona

periférica, a temperaturas de 37°C no son móviles.  
(67) (Figura N° 7)

Desde el punto de vista clínico; esta bacteria es la más importante de su especie porque está relacionado con los alimentos, la mayoría de infecciones causadas por este patógeno se debe a los serotipos 4b, 1/2a, 1/2b. Otras especies de Listerias son denominadas apatógenas (*L. innocua* y *grayi*) mientras que *L. welshimeri*, *L. seligeri*, *L. ivanovii* rara vez ocasionan enfermedades en los humanos. (68)

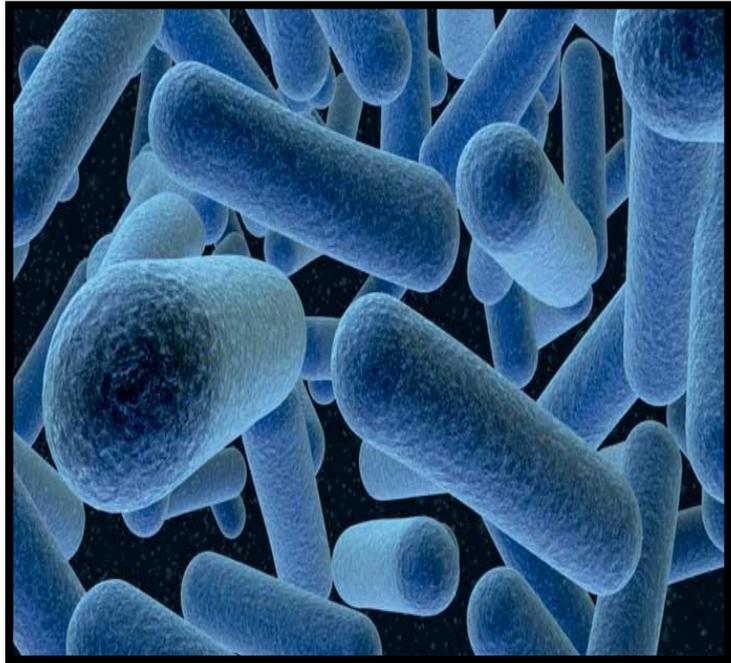


Figura N° 7: *Listeria monocytogenes*

Fuente: <https://www.foodsafety.experts.com/algemeen/motsoaledi-warns-outbreak-deadly-listeria-bacteria/2013>

## B. Clasificación Taxonómica

Tabla N° 9

### Clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes*

Taxonomía	
Reino :	<i>Bacteria</i>
Filo	Fermicutes
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Listeriaceae</i>
Especie	<i>Monocytogenes</i>
Nombre común	<i>Listeria monocytogenes</i> (67)

## C. Patogenia y epidemiología

Esta bacteria es muy abundante en la naturaleza, los principales reservorios son el suelo, agua, forraje y el tracto gastrointestinal de peces, aves y mamíferos incluyendo del hombre. Debido a su distribución, contamina habitualmente los alimentos en el proceso de su fabricación. Según los informes epidemiológicos comprometen a los alimentos que son el vehículo más frecuente para la transmisión de la listeriosis humana. (69)

El 12% de los manipuladores de alimentos son portadores de este microorganismo; la incidencia de la listeriosis en humanos es inferior, pero tiene un potente impacto en la salud pública que se puede contrastar con enfermedades de transmisión

alimentaria como: campilobacteriosis y salmonelosis.

Las pacientes con sistema inmunitario bajo, geriátricos, embarazadas, recién nacidos, pacientes tratados con corticoides son vulnerables a esta bacteria. En el caso de las gestantes se debe elaborar una terapia adecuada para prevenir sucesos fatales y evitar la amnionitis e infección fetal. (70)

#### **D. Principales enfermedades causadas por *Listeria monocytogenes***

La listeriosis se presenta como epidemia o de manera eventual, se da por el uso prolongado de la refrigeración y la industrialización de los alimentos, produce una variedad de síntomas como son: fiebre y diarrea parecidos a los originados por otras bacterias transmitidas en los alimentos, según la persona y la zona del cuerpo que ha sido afectada pero esta infección raras veces es diagnosticada. Los síntomas en personas con listeriosis invasiva; es decir cuando ya la bacteria ha invadido más allá de los intestinos dependen de la persona si está gestando o no. (71)

- ✓ Mujeres embarazadas: Presentan dolores musculares, fiebre, fatiga y otros síntomas similares al de la gripe, además esta infección puede ocasionar parto prematuro, aborto espontáneo, infecciones mortales en el neonato, y muerte fetal.
- ✓ Otras personas además de las mujeres gestantes: Presentan los signos

mencionados anteriormente incluyendo rigidez en el cuello, confusión pérdida del equilibrio, fiebre, convulsiones y dolor de cabeza. (72)

Este microorganismo pasa por la vía vena umbilical, afectando al feto, donde se dispersa y perjudica diversos órganos; ocasionando la septicemia fetal que resulta complementaria a la infección de la madre por *Listeria monocytogenes* que origina placentitis. Las lesiones más frecuentes son la necrosis focal, los granulomas miliares (en timo, ganglios, médula ósea) y la meningitis. (73)

#### **2.2.4. Método de estudio de la sensibilidad antibacteriana**

##### **A. Métodos de difusión en agar**

Se basan en el descenso del desarrollo bacteriano, mediante la difusión de los constituyentes activos en un medio sólido y se evidencia con la presencia de halos de inhibición; esto permite realizar de un modo más rápido la determinación del efecto inhibitorio de bacterias frente a diversos antimicrobianos de manera eficaz y simultánea. (74)

##### **✓ Método de antibiograma disco-placa**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Kirby, Bauer y colaboradores es un método que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos. El fundamento de esta evaluación es establecer en

forma cuantitativa el efecto de un conjunto de sustancias ensayadas individualmente sobre bacterias que son separadas de procesos infecciosos. Es la relación de la concentración del extracto necesario para inhibir una cepa bacteriana y el halo inhibitorio; en una placa de agar con un medio de cultivo conveniente y sembrado uniformemente con el microorganismo a experimentar; sobre la cual se coloca un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro con una dosis o medida frecuente del extracto. Cuando el disco embebido con el concentrado se coloca en contacto con la zona húmeda del agar, el filtro asimila agua y el antibiótico o sustancia se difunde en el agar, produciendo un gradiente de concentración. Luego de la incubación (18-24 horas), se observa halos de inhibición alrededor de los discos. (75)

### 2.3. Definición de términos básicos

- ✓ **Sinergismo:** Es el incremento del efecto originado por la mezcla de dos o más fármacos; cuyas acciones combinadas pueden ocasionar efectos de mayor intensidad o duración que los ocasionados por cada sustancia cuando es administrado por separado. (28)
- ✓ **Antimicrobianos:** Se refiere a un conjunto de compuestos que tienen la capacidad de eliminar o reducir la proliferación de microbios
- ✓ **Extracto:** Es el desprendimiento de una mezcla de sustancias por disolución de cada compuesto valiéndose de varios disolventes. (48)
- ✓ **Foliculitis:** Es la infección de los folículos pilosos, el bulto suele llenarse de pus y aumenta de tamaño; hasta que revienta.
- ✓ **Fitoquímico:** está constituido por sustancias activas que se hallan en un recurso vegetal y presentan propiedades benéficas para la salud.
- ✓ **Bacteriemia:** es la invasión de bacterias en el torrente sanguíneo las cuales se pueden expandir a otras partes del cuerpo produciendo abscesos.
- ✓ **Listeriosis:** Es una infección ocasionada por consumir alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* que se origina por el uso excesivo de la refrigeración, conservación e industrialización de los mismos. (71)
- ✓ **Inóculo:** Referido a los microorganismos patógenos transferidos por cultivo. (76)
- ✓ **Medio de cultivo:** Son una combinación de compuestos nutritivos en concentraciones adecuadas y en óptimas condiciones físicas, permiten el desarrollo de los microorganismos. (77)

- ✓ **Agar:** Es un compuesto solidificante, utilizado para la producción de medios de cultivo, deben estar libres de todo microorganismo contaminante para facilitar la identificación, crecimiento y desarrollo de otros microorganismos. (78)
- ✓ **Enterotoxinas:** Son toxinas liberadas por microorganismos (exotoxina), que actúa sobre la mucosa intestinal produciendo la secreción masiva de líquidos a la luz del intestino; seguido de la diarrea. (79)
- ✓ **Halos de inhibición:** Es la zona inhibitoria que aparece alrededor de un disco de sustancia en el que no hay desarrollo bacteriano, en una placa de agar inoculada con la bacteria. (80)
- ✓ **Patógeno:** Que origina o desarrolla una enfermedad. (81)
- ✓ **Amnionitis:** Infección afecta el líquido amniótico y las membranas que lo sostienen, puede ir acompañada de un rompimiento prematuro de las membranas o con el saco amniótico completo. (82)

## CAPÍTULO III

### HIPÓTESIS Y VARIABLES

#### 3.1. Formulación de hipótesis

##### 3.1.1. Hipótesis general

- ✓ Existe sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a cepas tipificadas.

##### 3.1.2. Hipótesis secundarias

- ✓ El extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) a diferentes concentraciones modifican la actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
  
- ✓ El extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) a diferentes concentraciones modifican la actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

- ✓ El extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) presenta mayor efecto antibacteriano que el extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ Los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) al 7%, 6% y 5% de concentración presentan sinergismo antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115

### 3.2. Identificación de Variables

Tabla N° 10

#### Identificación de variables

<b>Variable independiente</b>	Concentración de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada)
<b>Variable dependiente</b>	Actividad antibacteriana
	Efecto sinérgico antimicrobiano

Fuente: Elaboración propia 2018

### 3.3. Operacionalización de las variables

Tabla N° 11

#### Operacionalización de Variables

<b>Variable Independiente</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Unidad de medida</b>
Concentración de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada)	Sustancias concentradas que se obtienen de una planta por diversos procedimientos.	Concentración	7	%
			6	
			5	
<b>Variable Dependiente</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Unidad de medida</b>
Actividad antibacteriana	Capacidad inhibitoria del crecimiento de bacterias	Halo de inhibición	Diámetro del halo de inhibición	mm
Efecto sinérgico antibacteriano	Efecto producido por la mezcla de dos extractos, mayor al obtenido por cada uno de ellas.	Halo de inhibición		

Fuente: Elaboración propia 2018

## CAPÍTULO IV

### METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.1. Tipo y nivel de la investigación

##### 4.1.1. Tipo de investigación

- ✓ **Analítica:** Porque establece una relación entre las dos variables dependiente e independiente
- ✓ **Longitudinal:** Porque la variable dependiente de estudio se mide en diversos momentos.
- ✓ **Prospectivo:** Porque las recolecciones de los datos correspondientes de los hechos fueron obtenidos una vez iniciada la investigación.

##### 4.1.2. Nivel de investigación

- ✓ **Explicativo:** Porque tiene causa y efecto, se realiza una acción.

## 4.2. Método y diseño de la investigación

### 4.2.1. Método de la investigación

- ✓ **Deductivo:** Porque va de lo general a lo específico

### 4.2.2. Diseño de la investigación

- ✓ **Experimental:** Porque se manipuló la variable independiente en situaciones controladas.

## 4.3. Población y muestra de la investigación

### 4.3.1. Población

- ✓ *Plantago major* L.(llantén) procedente del departamento de Arequipa, de la provincia de Camaná, del distrito de Mariscal Cáceres San José.
- ✓ *Punica granatum* L. (granada) procedente del departamento de Arequipa, de la provincia de Camaná, del distrito de Mariscal Cáceres San José.

### 4.3.2. Muestra

- ✓ Extracto etanólico de hojas de *Plantago major* L.(llantén).
- ✓ Extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* L. (granada).

## 4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

### 4.4.1. Técnicas

- ✓ **La maceración:** Es un proceso de extracción entre compuestos de diferentes estados físicos de sólido-líquido, donde los metabolitos secundarios de interés se localizan en la materia sólida, ya que estos poseen solubilidad y se debe emplear un líquido que permita su extracción. (50)

- ✓ **Método de difusión de Agar Kirby Bauer:** Se utilizar este método para evaluar el sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a bacterias tipificadas; ya que es una técnica estandarizada. (75)
- ✓ **Observación directa:** Consiste en anotar los datos clave de la observación en las fichas de análisis de datos. (83)

#### 4.4.2. Instrumentos:

- ✓ **Fichas de recolección de datos:** En el cual se registrarán los resultados que se obtengan de las concentraciones de los extractos frente a las cepas tipificadas para la evaluación microbiológica. (Anexo N° 02)

#### 4.4.3. Procedimientos

##### A. Recolección de la muestra

- ✓ *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) se recolectó en el departamento de Arequipa, provincia de Camaná, distrito de Mariscal Cáceres, San José.
- ✓ Haciendo uso de una pala y de una hoz pequeña se recolectó el fruto de *Punica granatum* L. (granada) y las hojas de *Plantago major* L. (llantén).
- ✓ La cantidad que se recolectó de cada especie botánica fue de 2 kilogramo del fruto de *Punica granatum* L. (granada) y de hojas de *Plantago major* L. (llantén). (9)

##### B. Certificación botánica

- ✓ Se realizó en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa para su clasificación taxonómica. (Anexo N° 03 y 04)

### **C. Obtención de la muestra**

- ✓ Una vez seleccionada se procedió a lavar con agua destilada las hojas de *Plantago major* L. (llantén) y los frutos de *Punica granatum* L. (granada) con características homogéneas y libres de daño físico.
- ✓ Con el fruto de *Punica granatum* L. (granada) se procedió a separar la cáscara de la parte comestible (semillas y arilo) en un recipiente adecuado luego se llevó a desecar en una estufa a 37°C por 72 horas, luego se realizó la molienda en un molino manual, seguidamente se realizó el tamizaje.
- ✓ Con las hojas de *Plantago major* L. (llantén) también se llevó a desecar en una estufa a 37°C por 4 días, se hizo la molienda en un mortero, luego se realizó el tamizaje. (10) (Figura N° 8)

### **D. Preparación del extracto etanólico**

- ✓ Se realizó en el centro de control analítico de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; el extracto se obtuvo por maceración donde se empleó 100 gr de la muestra *Punica granatum* L. (granada) en 200 ml de etanol de 96°, dejándose macerar por 10 días y agitándolo todos los días. De igual manera se realizó con las hojas de *Plantago major* L. (llantén). (Anexo N° 04)
- ✓ Luego el extracto obtenido se filtró tres veces primero con papel filtro Whatmann N° 41, un segundo filtrado con el N° 2 y por último un tercer filtrado con papel N° 1 obteniéndose un extracto purificado.
- ✓ Posteriormente fueron concentrados en estufa a temperatura ambiente por 5 días para la evaporación

del alcohol hasta obtener un extracto sólido de 15 gr de cada una de ellas y se guardaron en frascos color ámbar estériles por refrigeración. (84)

A partir del extracto obtenido, se realizaron las concentraciones al 7%, 6% y 5% para cada especie vegetal, utilizando como diluyente dimetilsulfóxido.

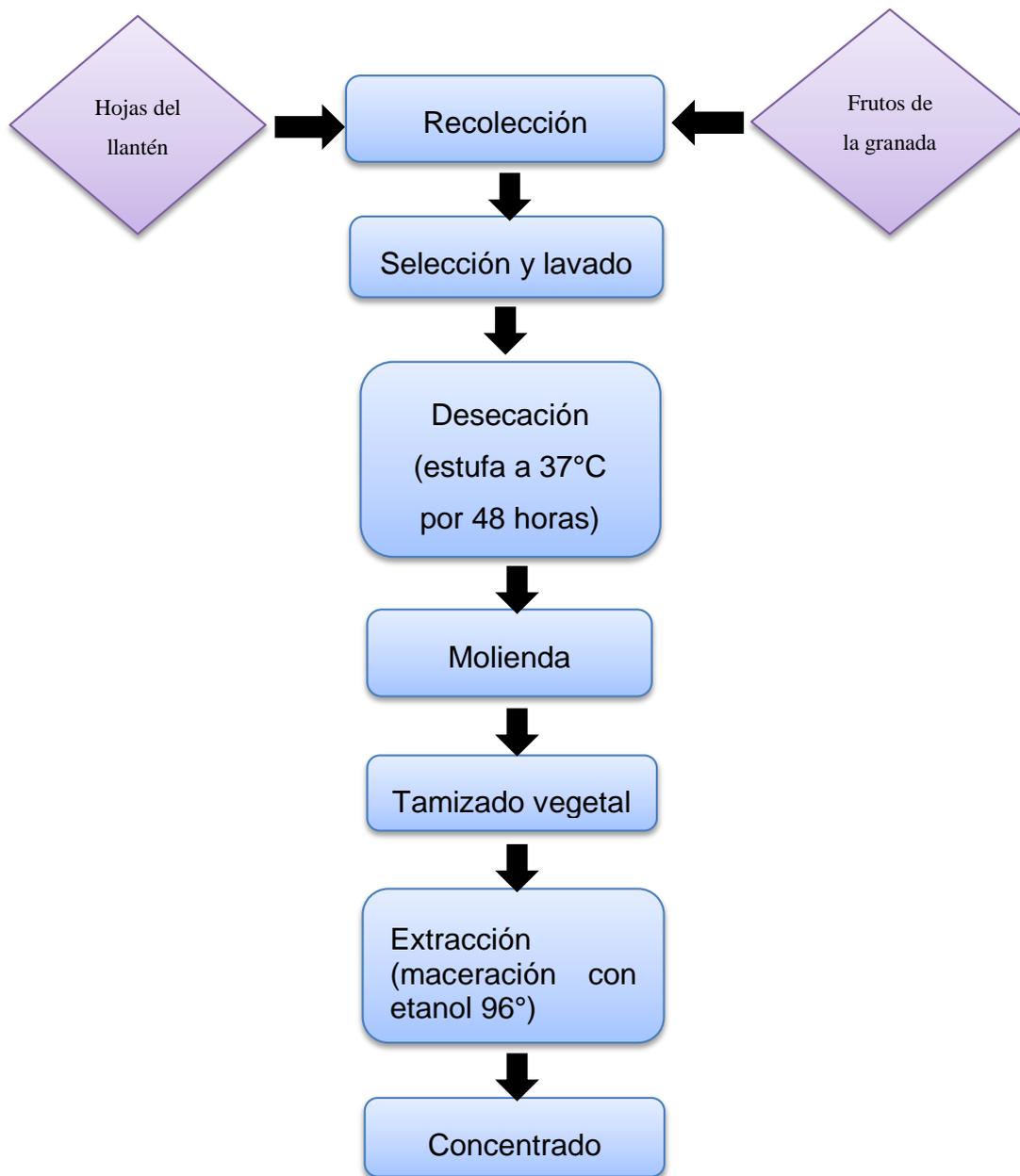


Figura N° 8: Procedimiento de la extracción del vegetal

Fuente: Elaboración propia 2018

## E. Determinación microbiológica *in vitro* por el Método de Kirby Bauer.

El procedimiento se realizó en el laboratorio microbiológico BIOEN LAB S.A.C. (Ver Anexo N° 06)

- ✓ Se trabajó con cepas estándar ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ Primero se preparó la suspensión del inóculo donde se seleccionó de 3 a 5 colonias con un asa de siembra (Asa de kohl) y se transfirió a un tubo de ensayo con 5 ml de Caldo Soya Trypticasa. Posteriormente se incubó en la estufa a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar la turbidez 0.5 de la escala de Mac Farland y se obtuvo una suspensión que contiene aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UCF/ml.
- ✓ Dentro de los 15 minutos; después de ajustar la turbidez de la suspensión, se realizó la inoculación de las placas y se sumergió un hisopo estéril en ella, fue girado varias veces y se presionó firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Luego se inoculó la superficie de una placa con Agar Plate Count de manera uniforme, pasándola en varias direcciones tanto para *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Se esperó de 3 a 5 minutos, antes de aplicar los discos; para la absorción del exceso de la humedad superficial. (85)
- ✓ Luego se realizó la aplicación de los discos a las placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; Se colocaron en cada placa agar Plate Count tres discos de papel filtro (Wathman) N°3 de 6 mm de diámetro previamente esterilizados en

autoclave a (121 °C por 15'), impregnados con el extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada). Las placas fueron invertidas y puestas a temperatura de  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para su incubación. (86)

- ✓ Después de 24 horas de incubación; se realizó la lectura de las placas e interpretación de los resultados, cada placa fue examinada y se procedió a medir las zonas de inhibición expresada en milímetros con la ayuda de un Vernier. (86)

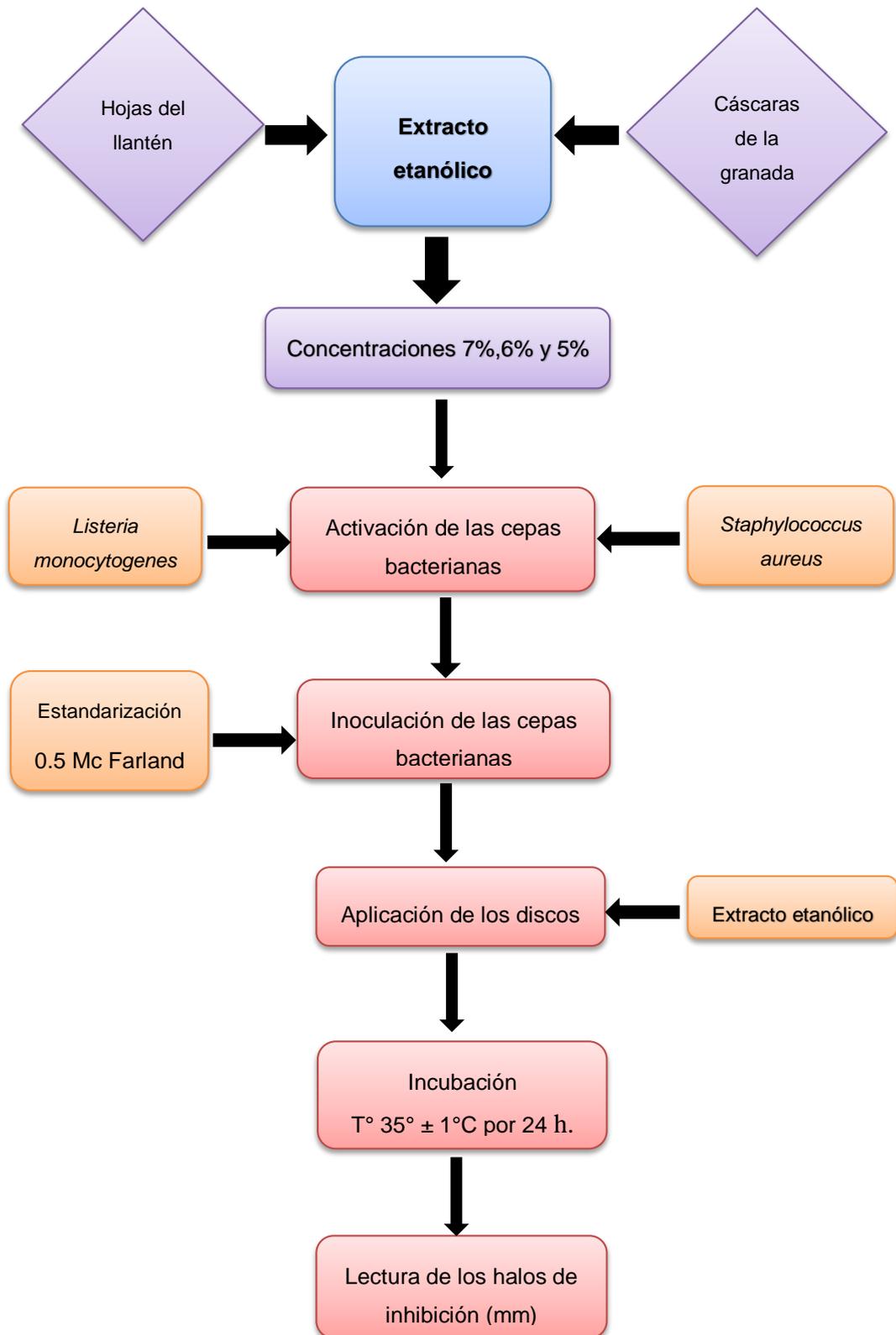


Figura N° 9: Diagrama de flujo de la Evaluación Microbiológica  
Fuente: Elaboración propia 2018

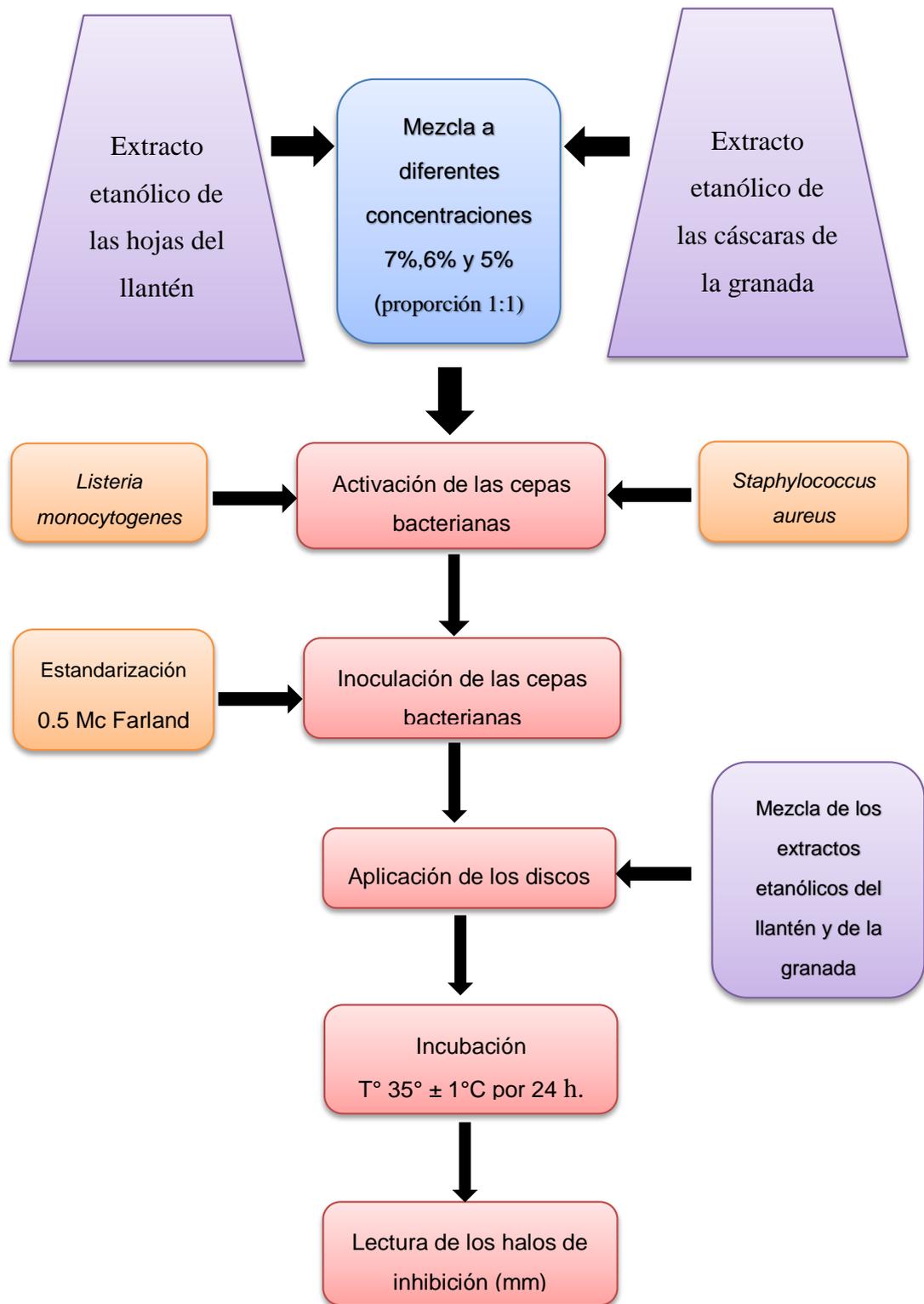


Figura N° 10: Diagrama de flujo del Sinergismo antibacteriano  
 Fuente: Elaboración propia 2018

## **CAPÍTULO V**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

#### **5.1. Resultados de la investigación**

La actividad antimicrobiana y el efecto sinérgico de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 se realizaron mediante el método de difusión en agar, utilizando discos de 6 mm impregnados con el extracto, las muestras que presentan esta medición no evidencian efecto antimicrobiano y los datos obtenidos en el presente estudio se especifican a continuación:

**TABLA N° 12**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
*Plantago major* L. (LLANTÉN) FRENTE A BACTERIAS  
PATÓGENAS.**

<b>Cepas</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>				<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115</b>			
<b>Concentraciones del extracto etanólico (%)</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>				<b>Halos de inhibición (mm)</b>			
	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>7</b>	10.0	10.0	10.0	10.0	8.0	8.0	8.0	8.0
<b>6</b>	10.0	10.0	10.0	10.0	8.0	8.0	8.0	8.0
<b>5</b>	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

Fuente: Elaboración propia 2018

n: número de ensayos microbiológico

$\bar{x}$  : Promedio

En la Tabla N° 12 se observa que el extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) presenta actividad antibacteriana, a concentraciones de 7%, 6% y 5% presentó halos de inhibición de 10.0 mm, 10.0 mm y 8.0 mm respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*. Asimismo, se muestra que frente a *Listeria monocytogenes* obtuvo un promedio de 8.0 mm de halos de inhibición en todas las concentraciones. (Anexo 08 y 09)

**TABLA N° 13**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
*Punica granatum* L. (GRANADA) FRENTE A BACTERIAS  
PATÓGENAS.**

<b>Cepas</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>				<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115</b>			
<b>Concentraciones del extracto etanólico (%)</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>				<b>Halos de inhibición (mm)</b>			
	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>7</b>	12.0	12.0	12.0	12.0	14.0	14.0	14.0	14.0
<b>6</b>	10.0	10.0	10.0	10.0	12.0	12.0	12.0	12.0
<b>5</b>	8.0	8.0	8.0	8.0	12.0	12.0	12.0	12.0

Fuente: Elaboración propia 2018

n: número de ensayos microbiológico

$\bar{x}$  : Promedio

En la Tabla N° 13 se observa que el extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) presenta actividad antibacteriana a concentraciones de 7%, 6% y 5%, presentando un promedio de halos de inhibición de 12.0 mm, 10.0 mm y 8.0 mm respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*. Se demuestra que frente a *Listeria monocytogenes* a las concentraciones mencionadas anteriormente tuvo un promedio de 14.0 mm, 12.0 mm y 12.0 mm respectivamente. determinando que el extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) al 7% es más sensible que al 6% y 5%. (Anexo 10 y 11)

**TABLA N° 14**

**EFEECTO SINÉRGICO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Plantago major* L. (LLANTÉN) Y *Punica granatum* L. (GRANADA) FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS.**

<b>Cepas</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>				<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115</b>			
<b>Concentraciones del extracto etanólico (%)</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>				<b>Halos de inhibición (mm)</b>			
	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>7</b>	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
<b>6</b>	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
<b>5</b>	9.0	9.0	9.0	9.0	8.0	8.0	8.0	8.0

Fuente: Elaboración propia 2018

n: número de ensayos microbiológico

$\bar{x}$  : Promedio

En la Tabla N° 14 se observa que los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) a diferentes concentraciones; combinados en proporción 1:1 presentó en promedio 8.0 mm de halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, no se puede decir que existe efecto sinérgico antibacteriano; debido a que no se evidencia potenciación de los extractos al comparar por separado la actividad antibacteriana. (Anexo 12 y 13)

**TABLA N° 15**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Plantago major* L. (LLANTÉN) Y *Punica granatum* L. (GRANADA) FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS.**

Extractos Etanólicos		<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	<i>Listeria monocytogenes</i> 19115
		$\bar{x}$ de halo de inhibición en mm	$\bar{x}$ de halo de inhibición en mm
Llantén	7%	10.0	8.0
	6%	10.0	8.0
	5%	8.0	8.0
Granada	7%	12.0	14.0
	6%	10.0	12.0
	5%	8.0	12.0
Llantén y granada	7%	8.0	8.0
	6%	8.0	8.0
	5%	9.0	8.0

Fuente: Elaboración propia 2018

$\bar{x}$  : Promedio

En la Tabla N° 14 se observa la comparación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén), *Punica granatum* L.(granada) y de la combinación de *Plantago major* (llantén) y *Punica granatum* L. (granada), donde el extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) al 7% de concentración presentó en promedio 12.0 mm de halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* demostrando mejor actividad antibacteriana que el extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) y que la combinación de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L.(granada).

Asimismo, el extracto etanólico de *Punica granatum* L.(granada) al 7% de concentración presentó en promedio 14.0 mm de halos de inhibición frente a *Listeria monocytogenes*; evidenciando mejor actividad antibacteriana que el extracto de etanólico de *Plantago major* L. (llantén) y que la combinación de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L.(granada).

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

#### 6.1. Discusión de Investigación

Las especies vegetales *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) poseen efectos farmacológicos que generan gran interés en la medicina natural sobre todo por su actividad antibacteriana; es por ello que motivó a determinar el efecto sinérgico de dichos extractos frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, que son bacterias de importancia médica consideradas como principales causantes de infecciones bacterianas.

Con respecto a la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) a diferentes concentraciones (7%, 6% y 5%) presentó efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; esto se le atribuye a los diversos compuestos fitoquímicos como son los flavonoides y glucósidos que se encuentran principalmente en las hojas; asimismo considerando que las bacterias en estudio son Gram positivas, estas ofrecen menor resistencia en comparación con las bacterias Gram negativas que tienen la particularidad de poseer una membrana de fosfolípidos y polisacáridos que sirve de barrera de defensa frente a la acción de antimicrobianos; dichos resultados obtenidos son corroborados por

**Crisanto A. y Reaño C.** (10) en donde también evaluaron la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Plantago major* L. (llantén) frente a *Staphylococcus aureus* obteniendo un halo de inhibición de 20 mm al 6%; estos resultados son relativamente mayores; pudiendo deberse a que el recurso vegetal fue proveniente de la selva del Perú (Loreto) y considerando que las referencias teóricas han demostrado que los factores ambientales como son suelo, clima, temperatura, flora asociada influyen en la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios de las plantas, pudiendo ser una de las razones de la diferencia de los resultados.

El extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* L. (granada); a diferentes concentraciones (7%, 6% y 5%) también presentó efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; dichos resultados son similares a la investigación de **Romero J. y Villegas S.** (9) quienes evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* L. (granada), logrando obtener un halo de inhibición de 15.22 mm (30 %), 15.0 mm (20 %) y 12.45 mm (10 %) frente a *Staphylococcus aureus*; confirmándose el poder antibacteriano a diferentes concentraciones del presente recurso, estos resultados pueden atribuirse a la presencia de taninos y flavonoides que se encuentran en mayor cantidad en la cáscara de esta fruta;

De igual manera el estudio realizado por **Bernal R, Rodríguez I. y Salazar M.** (11) quien analizó la actividad anteriormente mencionada con el extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* L. se obtuvo como promedio halos de inhibición de 17 mm frente a *Staphylococcus aureus*; comparando con la presente investigación el extracto etanólico de *Punica granatum* L. presentó en promedio halos de inhibición de 12 mm (7%), 10 mm (6%) y 8.0 mm (5%) frente a *Staphylococcus aureus*; demostrando que los principios activos presentes en la cáscara de la granada, son solubles en alcohol y agua

y por lo tanto pueden extraer metabolitos con polaridad intermedia y alta.

Asimismo, en la investigación realizada por **Rahnemoon P, Sarabi M, Javanmard M.** y **Bostan A.** (13) se determinó las propiedades antimicrobianas del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* L. (granada) en diferentes cepas, entre ellas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Se utilizó extracto alcohólico (etanol 70°) mediante la técnica de difusión en disco presentando promedios de halos de sensibilidad de 15 mm (7%) y 12.0 mm (5%) frente a *Listeria monocytogenes* y 14 mm (7%), 12.0 mm (5%) frente a *Staphylococcus aureus*. Del mismo modo en el estudio realizado por **Abdollahzadeh S, Mashour R, Mortazavi H.** (14) también se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* L. y se observó que al 1.2%, 0.8% y 0.4% de concentración presentó halos de sensibilidad de 16.0 mm, 12.0 mm y 8.0 mm respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados de ambos estudios coinciden con los obtenidos en la presente investigación donde el extracto etanólico (96°) de *Punica granatum* L. (granada) presentó en promedio halos de sensibilidad de 14.0 mm (7 %) y 12.0 mm (5%) frente a *Listeria monocytogenes*; 12.0 mm (7%) y 8.0 mm (5%) frente a *Staphylococcus aureus*; obteniéndose resultados positivos; esto puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos como son taninos y flavonoides que le confieren su poder antibacteriano frente a estas bacterias gram positivas; también evidencia que el efecto antibacteriano es directamente proporcional a la concentración.

**Borja V.** (16) realizó el efecto inhibitorio de la mezcla de extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Porphyromona gingivalis*; utilizando el método de difusión en agar y se observó halos de sensibilidad de 10.20 mm para el extracto de *Matricaria chamomilla* (manzanilla), 12.47mm para el extracto de *Plantago major* L. (llantén), y 16,47mm

para el sinergismo de los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y de *Matricaria chamomilla* (manzanilla); la combinación de los extractos etanólicos fue menor a los obtenidos de forma individual y por lo tanto no existe efecto sinérgico. Estos resultados tienen relación con los obtenidos en la presente investigación porque *Plantago major* L. (llantén) presentó en promedio halos de inhibición de 10.0 mm frente a *Staphylococcus aureus* y 8.0 mm frente a *Listeria Monocytogenes*; mientras que *Punica granatum* L (granada) presentó en promedio 12.0 mm de halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y 14.0 mm halos de inhibición frente a *Listeria Monocytogenes*; la combinación de los extractos alcohólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L (granada). en proporción 1:1 presentaron en promedio 8.0 mm de halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; sin embargo se puede decir que no existe efecto sinérgico antibacteriano; debido a que no se evidencia potenciación de los extractos al comparar por separado la actividad antibacteriana, esto puede deberse a diversos factores como son la incompatibilidad de los extractos debido a una interacción entre los metabolitos presentes lo que ocasionaría que la concentración de los compuestos fitoquímicos disminuyan en los extractos conjuntos. Por lo tanto comparando con el estudio realizado por Borja V. tampoco existe efecto sinérgico antibacteriano en la presente investigación.

## CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) asociados no presentaron sinergismo antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ El extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) a diferentes concentraciones mostraron halos de inhibición; por lo tanto, se evidenció su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ El extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) a diferentes concentraciones presentaron halos de inhibición; por lo tanto, se evidenció su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ El extracto etanólico de *Punica granatum* L. (granada) a diferentes concentraciones presentó mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- ✓ Los extractos etanólicos de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) no presentaron efecto sinérgico al 7%, 6% y 5% de concentración frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda continuar con las investigaciones sobre el efecto sinérgico antibacteriano de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada) frente a otras bacterias, incluyendo también otros efectos como el antimicótico o antiviral para así encontrar nuevas alternativas para la prevención de enfermedades y a partir de ahí desarrollar formulaciones con propiedades terapéuticas importantes para la salud.
- ✓ Realizar estudios cromatográficos identificando individualmente los componentes activos que actúan sobre las bacterias.
- ✓ Continuar con la investigación del sinergismo antibacteriano del extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada), utilizando otros métodos de extracción otros solventes y a diferentes concentraciones y proporciones.
- ✓ Ampliar la investigación para la determinación antibacteriana adicionando CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y CMB (Concentración Mínima Bactericida) del extracto etanólico de *Plantago major* L. (llantén) y *Punica granatum* L. (granada).
- ✓ Realizar estudios sobre el sinergismo de especies medicinales con la finalidad de garantizar la asociación de varias plantas; porque existen probabilidades de sinergia por descubrir.

## FUENTES DE INFORMACIÓN.

1. Cordies L, Machado L. Combinación de antimicrobianos. [en línea]. 1998.Enero [Citado 10 de julio de 2018];8(1):101-104  
Disponibile en: [http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8\\_1\\_98/act14198.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act14198.htm)
2. OMS. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales [Internet]. WHO. [citado 7 de julio de 2018].  
Disponibile en:  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
3. Huamantupa I, Cuba M, Urrunaga R, Paz E, Anaya N, Callalli M, et al. Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. [en línea] 2012. Febrero [citada: 2018 julio 15];18(3):283-291. Disponibile en:  
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/439>
4. Pérez F, Rodríguez F, León M y Malca G. Mezcla de extractos de plantas medicinales: ¿sinergismo o reacción química? [en línea] 2010.Enero [Citada:2018 junio 25];21(1):239-242.  
Disponibile en:[https://www.researchgate.net/publication/314212230\\_Mezcla\\_deeextractos\\_de\\_plantas\\_medicinales\\_sinergismo\\_o\\_reaccion\\_quimica\\_n](https://www.researchgate.net/publication/314212230_Mezcla_deeextractos_de_plantas_medicinales_sinergismo_o_reaccion_quimica_n)
5. OPS OMS. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Pan Am Health Organ World Health Organ [en línea]. 2015 [citado: 2018 octubre 01]  
Disponibile en:  
[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es)

6. Martínez M, Durán M, Pacheco O, Bonilla H, Guerrero J, Villarreal Á, et al. Enfermedades infecciosas. [en línea];2016 [citado: 2018 junio 22]; (02):69.

Disponible en:

[www.hosusana.gov.co/.../PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf](http://www.hosusana.gov.co/.../PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf)

7. Da Silva S, Oliveira G, Días R, Martins M, Representaciones y usos de las plantas medicinales en mayores. [en línea];2012. [citado: 2018 agosto 7];20(4):9.

Disponible en: [http://www.scielo.br/pdf/rlae/v20n4/es\\_19.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rlae/v20n4/es_19.pdf)

8. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades de transmisión alimentaria. [en línea].2017. [citado: 2018 octubre 01]

Disponible en [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/)

9. Romero J. Efecto inhibitorio in vitro de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* (granada) y *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* [Tesis para optar el título profesional de licenciado en Biología-Microbiología y Parasitología] La Libertad-Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2017 [citado 2018 junio 24]. Disponible en:<http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1248/BC-TES-TMP-80.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

10. Crisanto A. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Plantago major* (llantén) frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en disco [Tesis para optar el título de químico farmacéutico]. Iquitos-Perú. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2015. Disponible en: [http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3877/Crisanto\\_Tesis\\_Titulo\\_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3877/Crisanto_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

11. Bernal R, Haro I, Castillo M. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y

*Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”. [en línea]; 2014. Agosto [citado:2018 junio 7];(1):23-31.

Disponible en:

<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/639>

12. Valverde B, Carolina V. Efecto inhibitorio del extracto de llantén (*Plantago major* L), extracto de manzanilla (*Matricaria Chamomilla*) y la combinación del extracto de manzanilla y llantén comparado con la clorhexidina sobre cepas de *Porphyromona gingivalis*. [Tesis para optar el grado de cirujano dentista]. Quito-Ecuador. Universidad Central del Ecuador; 2017 [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/12747>

13. Rahnemoon P, Sarabi M, Javanmard M, Bostan A, Propiedades antimicrobianas del extracto de cáscara de *Punica granatum* (granada). Estudio realizado por la Academia mundial de ciencia, ingeniería y tecnología [en línea]; 2016 [citado: 2018 junio 22]. 10(10).

Disponible en: <https://waset.org/publications/10005586/phenolic-compounds-andantimicrobial-properties-of-pomegranate-punica-granatum-peel-extracts>.

14. Abdollahzadeh S. Mashour R. Mortazavi H, Actividades antibacterianas y antifúngicas del extracto de *Punica granatum* contra patógenos orales. Estudio realizado por el Departamento de microbiología y medicina oral de la Universidad de Ciencias Médicas de Teherán. [en línea] 2012. [citada :2018 julio 05];8(1):1-6. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184731/table/t1-jod-8-1-001/?report=objectonly>

15. Figueroa Y. Mlavé A. Cordero J. Constituyentes químicos de las hierbas y especias: Efectos sobre la salud humana. Universidad de Oriente. Monaguas-Venezuela. [en línea] 2013. Enero [citado 2018 junio 24]; 13(1):1-16 Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg13001>

16. Heisler E. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña [en línea]. 2015 julio [citado: 2018 junio 21];(14) (39) :(4 pp.)  
Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/eg/v14n39/revision5.pdf>
17. Aguilera S. Validación de seis fitofármacos: ajeno, nogal, pasionaria, salvia, sábila y jengibre en pacientes adultos de diecinueve a setenta años de edad en Quito, junio – agosto de 2010. [Disertación de grado previa a la obtención del título de licenciada en enfermería]. Quito-Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador 2010. [citado: 2018 junio 21] Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5252/T-PUCE-5478.pdf>
18. Vieyley J. Macedo Ceja M. Farmacognosia: Breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. [en línea]. Rev Biomed 2004; 15:123- 136 [Internet]. [citado: 2018 julio 11]. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb041527.pdf>
19. Valencia E. Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva Valdiviana. [Tesis de Grado para optar al Título de Químico Farmacéutico]. Valencia-Chile. Universidad Austral de Chile; 2013. [Citado: 2018 junio 25]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcv152v/doc/fcv152v.pdf>
20. Limón D. Díaz A. Mendieta L. Luna F. Zenteno E. Guevara J. et al. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. Mensaje Bioquímico. 3 de marzo de 2010; XXXIV:143-154. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259344548\\_LOS\\_FLAVONOIDES\\_MECANISMO\\_DE\\_ACCION\\_NEUROPROTECCION\\_Y\\_EFECTOS\\_FARMACOLOGICOS](https://www.researchgate.net/publication/259344548_LOS_FLAVONOIDES_MECANISMO_DE_ACCION_NEUROPROTECCION_Y_EFECTOS_FARMACOLOGICOS)
21. Rodríguez P. Utilización de taninos enológicos y virtudes de roble para mejorar y estabilizar el color de los vinos tintos. [Trabajo de fin de

carrera en el Dpto. de Nutrición, de Tecnología de alimentos y Bromatología]. España. Universidad de Murcia; 2006 [citado :2018 julio 11].

Disponible en: <https://digitum.um.es/jspui/bitstream/10201/19994/1/Utilizaci%C3%B3n%20de%20taninos%20enol%C3%B3gicos%20y%20virtudes%20de%20roble%20para%20mejorar%20y%20estabilizar%20el%20color%20de%20los%20v.pdf>

22. Álvarez J. Tanino: La revolución enológica. Mito o realidad. [en línea]; 2007. Mayo-junio. [citado: 2018 junio 22]. (2)2-15. Disponible en: [www.acenologia.com/aeb/pdf/info\\_taninos\\_jmalvarez.pdf](http://www.acenologia.com/aeb/pdf/info_taninos_jmalvarez.pdf).

23. García C. Actividad antibacteriana de extractos de vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. (Tesis doctoral para obtener el grado de Doctor en ciencias agropecuarias). México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2006. [Citado: 2018 agosto 20].

Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=13743>.

24. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales selectas del Perú. *Journal Ethnopharmacol.* [en línea]; 2003 [citado: 2018 agosto 20]; 88 (2-3): 199-204.

Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963143>

25. Cowan M. Productos de plantas como agentes antimicrobianos.. *Clin Microbiol Rev.* [en línea]; 1999. [citado: 2018 agosto 21]; Octubre; 12(4):564-82.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515903>

26. De Souza E, Stamford T, Lima E, Trajano V, Filho J. Eficacia antimicrobiana de las especias: un enfoque para su uso en sistemas de la conservación de alimentos. *Braz Arch Biol Technol Scielo.* [en línea]; 2005. [citado: 2018 agosto 21]; Julio; 48(4): 549-558.

Disponible en:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132005000500007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132005000500007).

27. Soto H. Efecto antibacteriano y antifúngico comparativo de los extractos acuosos del *Zea mays* L. (maíz morado), *Rubus glaucus* (mora andina); *Opuntia soherensii* (ayrampo) y diseño de un gel de limpieza cutánea [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014. [citado: 2018 agosto 21].  
Disponible en: [cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3888](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3888)
28. Nanzi A. Las Plantas para la Salud: La sinergia, el nuevo rumbo de los fitomedicamentos. *Las Plantas para la Salud*. [en línea]; 2012. Octubre. [citado 21 de junio de 2018]. 12(S1)43. Disponible en: <https://lasplantasparalasalud.blogspot.com/2012/10/la-sinergia-el-nuevo-rumbo-de-los.html>
29. Tripathi KD. *Farmacología En Odontología: Fundamentos* [en línea]. 1ª Ed. España: Médica Panamericana; 2008. 532p. [citado: 2018 julio 2] Disponible en: <https://www.casadellibro.com/libros-ebooks/kd-tripathi/136428>
30. Martínez J. Chavez O. Efecto sinérgico antibacteriano in vitro del extracto acuoso del ajo (*allium sativum* L.) y del extracto etanólico de las hojas de carqueja (*baccharis trimera* L.) en cepas *Escherichia coli* 0104:H4. [Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico y bioquímico]. Lima-Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2017. [citado 13 de julio de 2018]. Disponible en: [http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/1878/TESIS\\_MARTINEZ%20GOMEZ%20Y%20CHAVEZ%20LLANOS.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/1878/TESIS_MARTINEZ%20GOMEZ%20Y%20CHAVEZ%20LLANOS.pdf?sequence=3&isAllowed=y).
31. Mendez K. Efecto sinérgico in vitro de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare* sobre *Escherichia coli*. [Tesis para obtener

el grado académico de bachiller en medicina]. Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo;2016. [citado:2018 agosto 22]. Disponible en: [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/8097/M%C3%A9ndezC%C3%A9pida\\_K.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/8097/M%C3%A9ndezC%C3%A9pida_K.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

32. Mohammad F, Rawaa S. Efecto sinérgico de extractos de *Thymbra spicata* L. con antibióticos contra *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiples fármacos y *Klebsiella pneumoniae*. Irán J. Basic Med Sci. [en línea];2016. [citado: 2018 agosto 22]. Noviembre: 19 (11): 1193 – 1200. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126220/>
33. Blanco-Ulate B, Saborío A, Garro-Monge G. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor). [en línea];2008. Mayo. [citado: 2018 junio 6]; 21(2):25. Disponible en: [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/107](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/107).
34. Huamaní M, Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. [tesis para optar el título de químico farmacéutico]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos;2005. [citado:2018 julio 12]. Disponible en: [http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880033/determinacion-de-la-actividad-antifungica-contracandida-albica\\_X89AK3e.pdf](http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880033/determinacion-de-la-actividad-antifungica-contracandida-albica_X89AK3e.pdf)
35. Reyes K. Elaboración de crema cicatrizante a base de romero (*Rosmarinus officinalis*) y llantén (*Plantago major*). [Trabajo de titulación previo a la obtención de título de bioquímica farmacéutica]. Machala-Oro- Ecuador. Universidad Técnica de Machala; 2014. [Citado :2018 julio 11]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1426/7/CD00284TESIS.pdf>.
36. Arguedas E. Valeria S. Comparación cualitativa del *Plantago major* con manejo agrícola y *Plantago major* silvestre. Universidad de

Iberoamérica. San José, Costa Rica. [Internet]. [citado 12 de julio de 2018].

Disponible en:

<https://unibe.ac.cr/revistafarmacia/wpcontent/uploads/2018/06/%E2%80%9CComparaci%C3%B3n-cualitativa-del-Plantago-mayor-con-manejo-agr%C3%ADcola-y-Plantago-mayor-silvestre.-%E2%80%9C.pdf>

37. Jamilah J. Sharifa A. Sharifah N. Análisis GC-MS de diversos extractos de la planta *Plantago* mayor utilizada como medicina tradicional. [en línea]; 2012. Enero. [Citado:2018 julio 12];15(67-70). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/268392813\\_GCMS\\_Analysis\\_of\\_Various\\_Extracts\\_from\\_Leaf\\_of\\_Plantago\\_mayor\\_Used\\_as\\_Traditional\\_Medicine](https://www.researchgate.net/publication/268392813_GCMS_Analysis_of_Various_Extracts_from_Leaf_of_Plantago_mayor_Used_as_Traditional_Medicine)
38. García M. Coto T. Soto G. Pazos L. Toxicidad subcrónica y prueba de irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de *Plantago* mayor [en línea]; 2003. Marzo. [citado: 2018 julio 17];51(3):635-638. Disponible en Toxicidad sub crónica y prueba de la irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de *Plantago* mayor (Plantaginaceae),
39. La Granada, una de las frutas más apreciadas desde la antigüedad [Internet]. Zumo de granada. 2013 [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en: <https://zumodegranada.com/la-granada-degustar-una-de-las-frutas-mas-apreciadas-desde-la-antigüedad/>
40. Rodríguez J. Etnobotánica de la sierra Baza. El granado (*Punica granatum*). [en línea]; 2018.Julio. [citado 12 de julio de 2018]; 229.Disponible en: <http://www.sierradebaza.org/index.php/mapa-web/82-principal/fichas-tecnicas/fichas-flora/970-punica-granatum>
41. Cárdenas C. Efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas *Punica granatum* L. sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* in vitro [Tesis para optar el grado de Biólogo-Microbiólogo].

Trujillo-Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 2013. [citado: 2018 junio 25].

Disponible en:  
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3168/Cardenas%20Aguilar%20Cesar%20Eduardo.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

42. Vásquez F. Condiciones óptimas de extracción de antocianinas de la cáscara de la granada variedad wonderful. [Informe final en ingeniería de industrias alimentarias]. Universidad Le Cordon Bleu. Lima-Perú; 2016 [citado 2018 julio 12]. Disponible en: <http://repositorio.ulcb.edu.pe/bitstream/handle/ULCB/29/INFORME%20FINAL%202015-%20F.%20VASQUEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
43. Stephen D. Extracto de cáscara de granado tiene más potencial como suplemento. Food Navigator. [en línea]; 2008. [citado 12 de julio de 2018];(1)(10pp). Disponible en:  
<https://www.foodnavigator.com/Article/2006/03/06/Pomegranate-peel-extract-has-more-potential-as-supplement>
44. Spilmont M, Léotoing L, Davicco M, Lecbeque P, Miot-Noirault M, et. al. Extracto de cáscara de Granada previene la pérdida ósea en un modelo preclínico de osteoporosis y estimula diferenciación osteoblástica in vitro. *Nutrients*. [en línea]; 2015. [citado: 2018 julio 14];7(11)9265-9284. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/11/5465/htm>
45. Ayala R. Extracto de cáscara de granada como antimicrobiano y potenciador antioxidante en germinados de alfalfa. [Tesis para optar el grado en maestría en ciencias]. Hermosillo-México. Centro en Investigación y Desarrollo A.C; 2014. [citado: 2018 julio 14]. Disponible en:  
<https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/271/1/AYALA-SOTO-RE14.pdf>
46. De la Cruz R, Rodríguez R, Contreras J, Aguilar C, La granada: Fuente de potentes agentes bioactivos Departamento de Investigación en

Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila. Ciencia Cierta. [en línea];2011. Enero-marzo. [citada:2018 junio 29].25. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC25/10granada.htm>.

47. López O, López A, Palou E. Granada (*Punica granatum* L.) una fuente de antioxidantes de interés actual. [ en línea]; 2010. Enero. [citado: 2018 julio 12]. 4(1)61-73. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Lopez-Mejia-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Lopez-Mejia-et-al-2010.pdf)
48. Yachachin S. Caracterización fisicoquímica del extracto expectorante de ajo (*Allium sativum* L.), kión (*Zingiber officinales* L), eucalipto (*Eucaliptus globulus* L.) y linaza (*Linum usitatissimum* L.). [Tesis para optar el Título profesional de ingeniero agroindustrial]. Tarma –Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú; 2013. [Citado: 2018 julio 01]. Disponible en: <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1969/Yachachin%20Espinoza.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
49. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas [Tesis para obtener el título de ingeniero químico]. Bogotá-Colombia. Universidad Nacional de Colombia; 2010. [Citado: 2018 junio 4]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2010.pdf>
50. Bastidas Y. Llacuas L. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las flores de la especie vegetal mastuerzo (*Tagetes patula* L.) frente al crecimiento del microorganismo *penicillium* sp.[Tesis para optar el título profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias].Huancayo-Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú; 2016. [Citado: 2018 junio 29]. Disponible en: [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/619/TIA\\_04.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/619/TIA_04.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

51. Caballero C. Soria D. Elaboración de licor de sauco en barricas de madera de castaño en el laboratorio de Agroindustrias Utea-Abancay. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo]. Apurímac-Perú. Universidad Tecnológica de los Andes;2017. [Citado: 2018 julio 3]. Disponible en: <http://repositorio.utea.edu.pe/bitstream/handle/utea/44/TesisElaboraci%C3%B3n%20de%20licor%20de%20Sauco.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
52. Carrión A. García C. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. [Tesis previa a la obtención del Título de Bioquímica y Farmacéutica]. Cuenca-Ecuador. Universidad de Cuenca;2010 [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
53. Guerra A. Obtención caracterización y evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos fluidos blandos y secos, así como las tinturas del rizoma y fronda de la calahuala (*Phlebodium pseudoauerium*) a nivel de laboratorio. [Tesis que para obtener el título de Ingeniero químico]. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala; 2005. [Citado: 2018 julio 4]. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0951\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf).
54. Barón M. Inactivación por *Listeria monocytogenes* en condiciones isotérmicas en un medio ácido. [Trabajo de fin de grado]. Colombia. Universidad Politécnica de Cartagena; 2018. [Citado: 2018 octubre 01]. Disponible en: <http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/6737/tfg-bar-ina.pdf?sequence=1>
55. Centro Nacional de Epidemiología. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades infecciosas Informe anual. [en línea]. España; 2016. [Citado: 2018 octubre 01]. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=12/12/2017-05863fc4dd>; URL: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd->

servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-infecciosas/renave  
enfermedades/pdf\_2017/RENAVE\_INFORME\_ANUAL\_2015.pdf

56. Ulloa M. Enfermedades transmitidas por los alimentos en Chile: agentes causantes y factores contribuyentes asociados a brotes ocurridos durante el año 2013. [Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos]. Chile Universidad de Chile;2016. [Citado: 2018 octubre 01].

Disponible en:

<http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>.

57. Romero J. Presencia de bacterias Gram positivas en músculo de pescado con importancia comercial en la zona del Caribe mexicano. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso. Col. Villa Quietud, Coyoacán México.D.F. México;2011. [Citado: 2018 octubre 01].

Disponible en:<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v82n2/v82n2a19.pdf>.

58. Zapata E. Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica in vitro del extracto hidroalcohólico de *Cestrum hediondinum* Dun (Hierba Santa) en bacterias patógenas. Gram negativas, Gram positivas y hongos. Tesis presentada para optar el título profesional de: Biólogo Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa -Perú 2017 [Internet]. [citado 25 de junio de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/4531/Bizamie.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

59. *Staphylococcus aureus*. Instituto Nacional de Higiene y trabajo. BDATA BIOZ Actualizado a 23 de septiembre de 2012 [en línea]. [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en:<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>

60. Fernández A García A Pérez M Blazquez M. Staphylococcus aureus.[en línea]. 1ª Ed. España. Universidad de Salamanca;2003. [citado: 2018 agosto 6]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?isbn=1326806912>
61. Hurtado M. Microbitos G. Staphylococcus aureus, S. epidermidis, y S. saprophyticus. [en línea]. microbitos blog. 2011 [citado 28 de junio de 2018].  
Disponible en: <http://microbitosblog.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/>
62. Zendejas G, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, Staphylococcus Aureus. [en línea];2014, Junio. [citado: 2018 julio 12];25(3):15. Disponible en: [www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf)
63. García J. Prevalencia de Staphylococcus aureus en manipuladores de alimentos en el área de producción (cocina caliente y fría, pastelería, carnes), de una empresa privada, Tumbaco – 2012. [en línea]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Bioanálisis licenciatura en Microbiología clínica y aplicada. Quito-Ecuador.2012. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12084/TEISIS%20NATHALI%20GARCIA%20CARDENAS.pdf?sequence=1>
64. Pahissa A. Infecciones producidas por Staphylococcus aureus. [en línea]1ª Ed. España:ICG Marge S.L;2009 [citado: 2018 agosto 6] Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?isbn=8492442271>
65. Rady childrens. Hospital San Diego. Infecciones por estafilococos [en línea]. 2018 [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.rchsd.org/health-articles/infecciones-por-estafilococos>.
66. Síndrome de shock tóxico (TSS) - Enfermedades infecciosas [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es->

pe/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/s%C3%ADndrome-de-shock-t%C3%B3xico-tss

67. Instituto Nacional de Seguridad de Higiene en el trabajo. Listeria monocytogenes BDTABIO. 2017. (actualizado a 15 de julio de 2016) [en línea]. [citado 12 de julio de 2018]. disponible en: <http://www.insht.es/riesgosbiologicos/contenidos/fichas%20de%20agentes%20biologicos/fichas/listeria%20monocytogenes%202017.pdf>
68. López V. Suárez M. Chico I. Navas J. Martínez J. Listeria monocytogenes en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? [en línea]; 2010, Octubre-Diciembre. [citado 2018 julio 12]; 38: 224-234: 11. Disponible en: [www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325).
69. Fernández M. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia Control Microbiológico de Listeria monocytogenes. en alimentos para consumo destinado a lactantes 2016. Sevilla-España [Internet]. [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65117/FERNANDEZ%20GONZALEZ%2C%20M%20PAZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
70. Sánchez J, Serrano S, Marfil R, Jodral M. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino. Fundamentos de seguridad alimentaria. [en línea]. 1ª Ed; Díaz de Santos S.A.España;2011.[citado: 2018 agosto 7].  
Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?isbn=8479785667>
71. OMS. Listeriosis [en línea]. WHO. 2018 [citado 1 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>
72. U.S.A. Listeriosis. Centro para el control de y la Prevención de Enfermedades. [en línea]; 2017 [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/symptoms.html>

73. Larguia M. Simposio sobre Listeriosis. Septicemia perinatal por *Listeria monocytogenes*.1980. Bol. A. N. de Medicina. [en línea]. [citado 12 de julio de 2018]. 58(2) Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29321/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29321/Documento_completo.pdf?sequence=1)
74. Laboratorio Microbiología. Microbiología general y bucal. [en línea]. [citado 16 de julio de 2018]. Disponible en: [http://campus.usal.es/~micromed/Practicas\\_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html](http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html)
75. Ramírez L. Castaño D. Metodologías Para Evaluar in Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal. [en línea]; 2009. Agosto. [citado: 2018 julio 2]; (42):263-268.  
Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
76. The Free Dictionary. USA. Inocúlo [citado 10 de julio de 2018]. Disponible en: <https://es.thefreedictionary.com/inocul%c3%b3>
77. Doménech A. Medios de cultivo. Semin Microbiol. 1 bloque:5. [en línea] [citado el 10 de julio del 2018]. Disponible en: [www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/comagric/.../presen3.pps](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/.../presen3.pps)
78. Casado C. Torrico G. Medina M. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología; [en línea];2012. [citado: 2018 julio 4];42. Disponible en: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/.../medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-pdf>.
79. Enterotoxina. [en línea]. Medline Plus. Enciclopedia Médica;2014 [citado 10 de julio de 2018]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002352.htm>
80. Halo de inhibición [en internet]. Los diccionarios y las enciclopedias sobre el Académico;2015. [citado 10 de julio de 2018]. Disponible en: [http://www.esacademic.com/dic.nsf/es\\_mediclopedia/11114/halo](http://www.esacademic.com/dic.nsf/es_mediclopedia/11114/halo)

81. Patógeno. [en línea]. Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario;2013. [citado 12 de julio de 2018]. Disponible en: <http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=pat%C3%B3geno>
82. Amnionitis [en línea]. Diccionario del embarazo. Guía del Niño;2015. [citado: 10 de julio 2018].  
Disponible en: <https://www.guiadelnino.com/salud/diccionario-del-embarazo/amnionitis>
83. Ojalvaro G. Método de observación directa. [en línea];2014. [citado:2018 agosto 22];1(2). Disponible en: <https://prezi.com/vlbfbiuekx3y/metodo-de-observacion-directa/>
84. Purca T. Efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre la flora salival. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. [Citado 2018 julio 17]. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3092/Purca\\_pt.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3092/Purca_pt.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3092/Purca\\_pt.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3092/Purca_pt.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
85. Prat S. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. [Lima]: Universidad Inca Garcilazo De La Vega; 2010. [Citado 2018 julio 5]  
Disponible en: [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/man\\_suscep.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_suscep.pdf)
86. Vicente M. Bacterias aisladas con mayor frecuencia y perfil de resistencia antibiótica en cultivos y antibiogramas de muestras procedentes de la unidad de cuidados intensivos –Clínica Arequipa 2015. [Tesis para optar el Título profesional de: médico cirujano]. Arequipa-Perú. Universidad Nacional de San Agustín; 2016. [Citado: 2018 julio 5]

Disponible en:

<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3502/MDvicama.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

# ANEXOS

## ANEXO 01

### SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Plantago major* (LLANTÉN) Y *Punica granatum* L. (GRANADA)

Problema	Objetivo	Hipótesis	Tipo y nivel de investigación	Método y diseño de la investigación	Variables	Población y muestra
<p><b>Problema general:</b></p> <p>¿Existe sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) frente a cepas tipificadas?</p> <p><b>Problemas específicos:</b></p> <p>¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> L. (llantén) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115?</p> <p>¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> L. (granada) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115?</p> <p>¿Cuál de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) presenta mayor actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115?</p> <p>¿Presenta sinergismo antibacteriano los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 7%, 6% y 5% de concentración frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115?</p>	<p><b>Objetivo general:</b></p> <p>Determinar el sinergismo antibacteriano de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) frente a cepas tipificadas.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <p>Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> L. (llantén) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p> <p>Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico <i>Punica granatum</i> L. (granada) a diferentes concentraciones frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p> <p>Comparar cuál de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) presenta mayor efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p> <p>Determinar el sinergismo antibacteriano en los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 7%, 6% y 5% de concentración frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p>	<p><b>Hipótesis general</b></p> <p>Existe sinergismo antibacteriano en los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) frente a cepas tipificadas.</p> <p><b>Hipótesis específicas</b></p> <p>El extracto etanólico de <i>Plantago major</i> L. (llantén) a diferentes concentraciones modifican la actividad antibacteriana frente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p> <p>El extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> L. (granada) a diferentes concentraciones modifican la actividad antibacteriana frente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p> <p>El extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> L. (granada) presenta mayor efecto antibacteriano que el extracto etanólico de <i>Plantago major</i> L. (llantén) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115.</p> <p>Los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) al 7%, 6% y 5% de concentración presentan sinergismo antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115</p>	<p><b>Análítica:</b></p> <p>Establece la relación entre las dos variables</p> <p><b>Longitudinal:</b></p> <p>porque la variable dependiente se medirá en varios momentos.</p> <p><b>Prospectivo</b></p> <p>porque se recolectará los datos después de iniciada la investigación.</p> <p><b>Nivel de investigación:</b></p> <p>Explicativo: tiene causa y efecto y se realiza una acción.</p>	<p><b>Método de la investigación</b></p> <p><b>-Deductivo</b></p> <p>Porque va de lo general a lo específico.</p> <p><b>Diseño de la investigación:</b></p> <p><b>- Experimental</b></p> <p>Porque se manipulará la variable independiente y pueden ser controlados.</p>	<p><b>Variable Independiente(x)</b></p> <p>x:Concentración de los extractos etanólicos</p> <p>Indicadores</p> <p>x1: Concentración de los extractos al 7%, 6% y 5%</p> <p><b>Variable Dependiente (y)</b></p> <p>y:Actividad antibacteriana</p> <p>y:Efecto sinérgico antibacteriano.</p> <p>Indicadores</p> <p>y1: diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano expresado en mm</p>	<p><b>Población</b></p> <p><i>Plantago major</i> L. (llantén) y <i>Punica granatum</i> L. (granada) procedentes del departamento de Arequipa provincia de Camaná distrito de Mariscal Cáceres San José.</p> <p><b>Muestra</b></p> <p>Extractos etanólicos de hojas de <i>Plantago major</i> L. (llantén) y cáscara de <i>Punica granatum</i> L. (granada)</p>

**ANEXO 02**

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

<b>Cepas</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>				<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115</b>			
<b>Concentraciones del extracto etanólico (%)</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>				<b>Halos de inhibición (mm)</b>			
	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>n</b>			<b><math>\bar{x}</math></b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>7</b>								
<b>6</b>								
<b>5</b>								

n: número de ensayos microbiológico

$\bar{x}$  : Promedio

## ANEXO 03



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



### CONSTANCIA 020- 2018-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de tallos, hojas y flores de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Plantago major L.* de la familia PLANTAGINACEAE de nombre común "LLANTEN". Dichas muestras fueron obtenidas de los campos de San Jose, distrito de Mariscal Cáceres, provincia de Camana, Departamento de Arequipa proporcionadas por la Srta. Soledad Reyna Llocle Huayhua de la universidad Alas peruanas .

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA  
CLASE: MAGNOLIOPSIDA  
ORDEN: FBALES  
FAMILIA: PLANTAGINACEAE  
GENERO: *Plantago*  
ESPECIE: *Plantago major L.*

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 6 de Julio del 2018

  
Bigo. Leoncio Mariño Herrera  
DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense* (HUSA)



## ANEXO 04



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



### CONSTANCIA 019- 2018-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de tallos, hojas y flores de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Punica granatum* L. de la familia PUNICACEAE de nombre común "GRANADA". Dichas muestras fueron obtenidas de los campos de San José, distrito de Mariscal Cáceres provincia de Camana, Departamento de Arequipa proporcionadas por la Srta. Soledad Reyna Llocle de la Universidad Alas Peruanas.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: FBALES

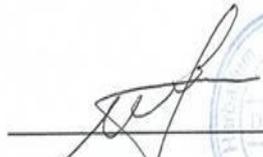
FAMILIA: PUNICACEAE

GENERO: Punica

ESPECIE: *Punica granatum* L.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 6 de Julio del 2018

  
Blgo. Leoncio Mariño Herrera  
DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense* (HUSA)

## ANEXO 05



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



*EL DIRECTOR DEL CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA:*

### CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN PROCESO DE ANÁLISIS

*A la Srta. SOLEDAD REYNA LLOCLLE HUAYHUA, quien fue partícipe de la realización de los siguientes análisis: **EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE PLANTAGO MAJOR (LLANTÉN) Y EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CÁSCARA DE PUNICA GRANATUM L. (GRANADA) con fecha 24 de Julio del presente, en nuestro Laboratorio de Fisicoquímica del Centro de Control Analítico – CENPROFARMA.***

*Se expide el presente documento a solicitud de la interesada, para los fines que estime por conveniente.*

*Lima, 17 de Agosto del 2018.*

**OF Gustavo Guerra Brizuela**  
Director del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR23289



## ANEXO 06



# BIOEN LAB S.A.C.

## CONSTANCIA

El Gerente General de la empresa BIOEN LAB S.A.C., con RUC 20551506640, dedicada a ensayos y análisis técnicos, deja constancia que:

Se recepcionó las muestras de los extractos etanólicos de *Plantago major* (llantén) y *Punica granatum L.* (granada), entregada por la señorita Soledad Reyna Llocle Huayhua, Bachiller de la Universidad Alas Peruanas, Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con las que se realizaron ensayos microbiológicos de actividad antimicrobiana según protocolo de la Bachiller (método utilizado: Kirby Bauer y col. modificado) con las cepas *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 15 de agosto del 2018

BIOEN LAB S.A.C.  
  
NEIL E. AZABACHE VENEGAS  
GERENTE GENERAL



## ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS INFORME N° 1001-2018

### 1. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

**Nombre:** Soledad Reyna Llocle Huayhua  
**Universidad:** Alas Peruanas  
**Facultad:** Medicina Humana y Ciencias de la Salud  
**Escuela Profesional:** Farmacia y Bioquímica

### 2. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

**Ingrediente activo:** Extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén)  
Extracto etanólico de *Punica granatum L.* (Granada)  
**Diluyente:** Dimetilsulfóxido (DMSO)  
**Cantidad recibida:** 02 frascos de vidrio x 15 gramos cada uno  
**Cepas utilizadas para enfrentamiento:**  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
*Listeria monocytogenes* ATCC 19115  
**Fecha de análisis:** 14 de agosto del 2018  
**Fecha de reporte:** 15 de agosto del 2018

### 3. MÉTODO DE ANÁLISIS:

Evaluación microbiológica *in vitro*. Método de difusión en agar por discos

**3.1 Medio de cultivo:** Agar Plate Count (PCA)  
**3.2 Inóculo:** 0,5 Mc Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL)  
**3.3 Discos:** Papel filtro Whatman N°3, de 6 mm de diámetro  
**3.4 Repeticiones:** Tres  
**3.3 Tiempo de incubación:**  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , en aerobiosis.

### 4. DATOS DEL ENSAYO

4.1. Concentraciones de extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén). Según protocolo recibido, volumen final 1000  $\mu\text{L}$ .

CONCENTRACION (%)	EXTRACTO ETANÓLICO (mg)	DILUYENTE ( $\mu\text{L}$ )
7	70	1000
6	60	1000
5	50	1000

  
Blgo. Néil Azabache V.  
C.B.P 4001



# BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 2 de 4

4.2. Concentraciones de extracto etanólico de *Punica granatum L.* (Granada). Según protocolo recibido, volumen final 1000 µL.

CONCENTRACION (%)	EXTRACTO ETANÓLICO (mg)	DILUYENTE (µL)
7	70	1000
6	60	1000
5	50	1000

4.3. Concentraciones de mezcla de extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén) + *Punica granatum L.* (Granada). Según protocolo recibido, volumen final 1000 µL.

CONCENTRACION (%)	EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Plantago major</i> (Llantén) (µL)	EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Punica granatum</i> (Granada) (µL)
5	500	500
6	500	500
7	500	500

## 5. CONTROLES:

Muestra	Medio de cultivo	Resultado
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	APC	Crecimiento
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	APC	Crecimiento
Sin sembrar (control del medio)	APC	No hubo crecimiento
Discos con DMSO	APC + <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	No hubo halo
Discos con DMSO	APC + <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	No hubo halo

## 6. RESULTADOS

6.1. Evaluación microbiológica *in vitro* de extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 n	7%	6%	5%
1	8,0	8,0	8,0
2	8,0	8,0	8,0
3	8,0	8,0	8,0

n= número de repeticiones.

  
Bigo. Neji Azabache V.  
C.B.P 4001

Av. Guardia Civil 1041. Los Inkas E-302. Santiago de Surco. Tlf: 257-2174. E-mail: [neilazabache@gmail.com](mailto:neilazabache@gmail.com)  
Celular: 944-936145



<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 n	7%	6%	5%
1	10,0	10,0	8,0
2	10,0	10,0	8,0
3	10,0	10,0	8,0

n= número de repeticiones.

**Método utilizado:** Kirby Bauer y col. modificado.

**6.2. Evaluación microbiológica *in vitro* de extracto etanólico de *Punica granatum L.* (Granada). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).**

<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 n	7%	6%	5%
1	14,0	12,0	12,0
2	14,0	12,0	12,0
3	14,0	12,0	12,0

n= número de repeticiones.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 n	7%	6%	5%
1	12,0	10,0	8,0
2	12,0	10,0	8,0
3	12,0	10,0	8,0

n= número de repeticiones.

**Método utilizado:** Kirby Bauer y col. modificado.

  
.....  
**Blgo. Néjl Azabache V.**  
C.B.P 4001



6.3. Evaluación microbiológica *in vitro* de mezcla de extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén) + *Punica granatum* (Granada). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 n	7%	6%	5%
1	8,0	8,0	8,0
2	8,0	8,0	8,0
3	8,0	8,0	8,0

n= número de repeticiones.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 n	7%	6%	5%
1	8,0	8,0	9,0
2	8,0	8,0	9,0
3	8,0	8,0	9,0

n= número de repeticiones.

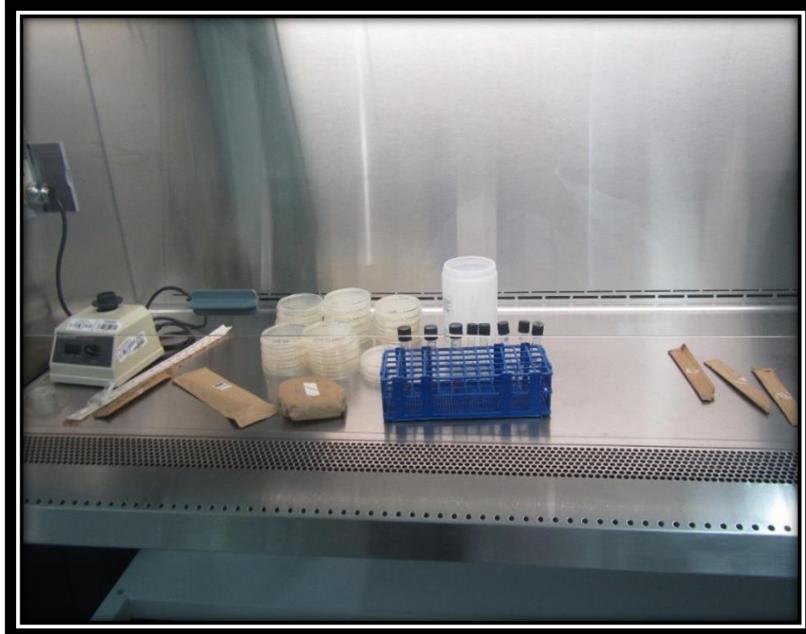
**Método utilizado:** Kirby Bauer y col. modificado.

  
Blgo. Neji Azabache V.  
C.B.P 4001

**ANEXO 07**

**FIGURA N° 10:**

**PREPARACIÓN DEL MATERIAL MICROBIOLÓGICO**



**FIGURA N° 11:**

**EXTRACTOS**



ANEXO 08

FIGURA N° 12:

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Plantago major* L. (Llantén) FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



7 %



6 %



5 %

Al 7% y 6% presentó en promedio 10.0 mm de halos de inhibición y al 5% presentó en promedio 8.0 mm de halos de inhibición

ANEXO 09

FIGURA N° 13

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Plantago major* L. (Llantén) FRENTE A *Listeria monocytogenes* ATCC 19115



7 %



6 %



5 %

Al 7%, 6% y 5% presentó en promedio 8 0 mm de halos de inhibición

ANEXO 10

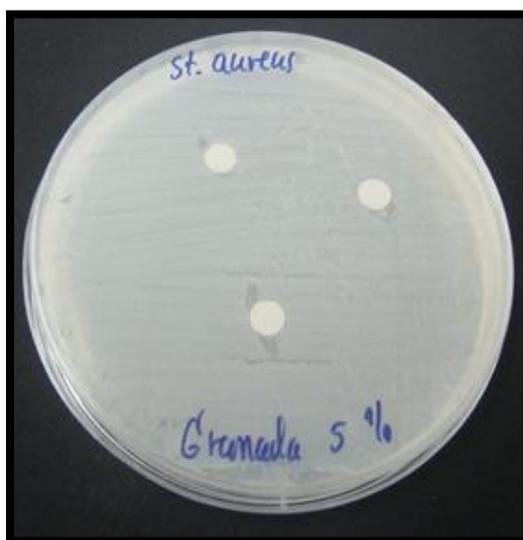
FIGURA N° 14

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
*Punica granatum* L. (GRANADA) FRENTE A *Staphylococcus*  
*aureus* ATCC 25923



7 %

6 %



5 %

Al 7% presentó en promedio 12.0 mm de halos de inhibición, al 6% se observó un promedio de 10.0 mm de halos de inhibición y al 5% 8.0 mm de halos de inhibición.

ANEXO 11

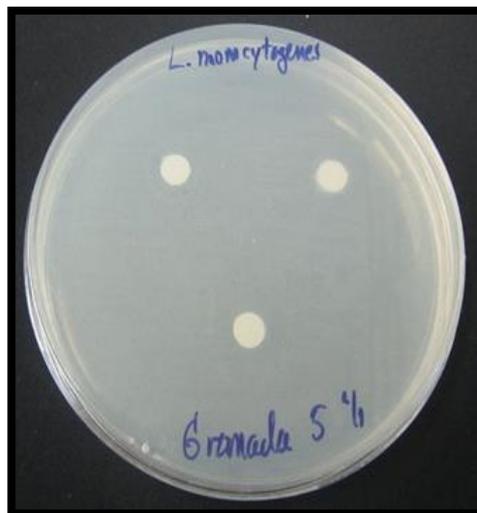
FIGURA N° 15

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Punica granatum* L. (GRANADA) FRENTE A *Listeria monocytogenes* ATCC 19115



7 %

6 %



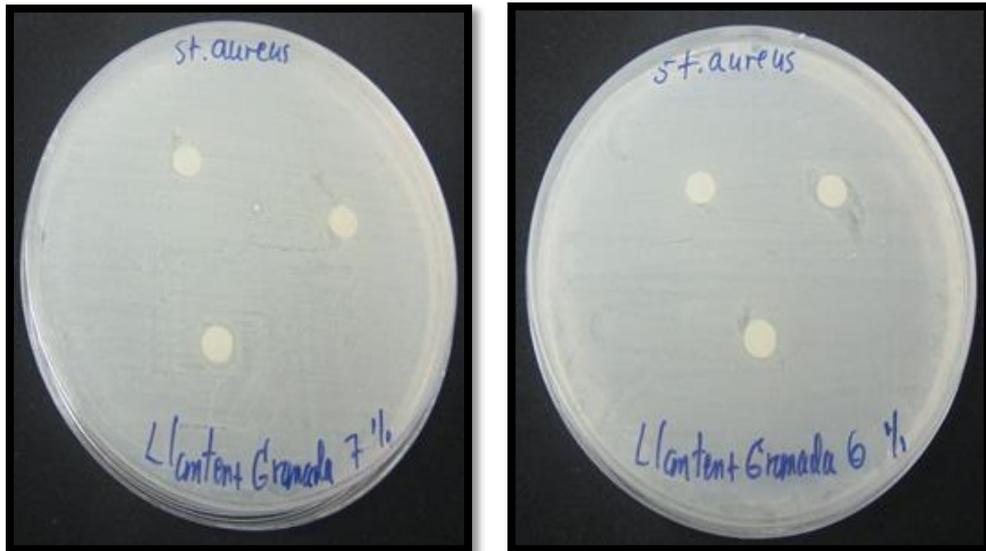
5 %

Al 7% presentó en promedio 14.0 mm de halos de inhibición, al 6% y 5% se observó un promedio de 12.0 mm de halos de inhibición.

ANEXO 12

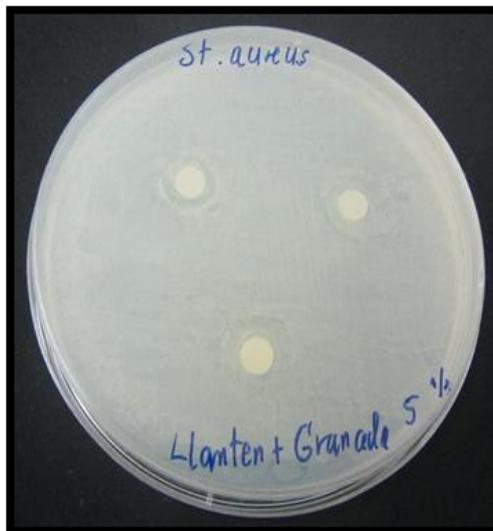
FIGURA N° 16

**SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS  
ETANÓLICOS DE *Plantago major* L. (LLANTÉN) Y *Punica  
granatum* L. (GRANADA) FRENTE A *Staphylococcus  
aureus* ATCC 25923**



7 %

6 %



5 %

Al 7% y 6% presentó en promedio 8.0 mm de halos de inhibición, al 5% presentó en promedio 9.0 mm de halos de inhibición.

ANEXO 13

FIGURA N° 17

SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS  
ETANÓLICOS DE *Plantago major* L. (LLANTÉN) Y *Punica  
granatum* L. (GRANADA) FRENTE A *Listeria monocytogenes*  
ATCC 19115



7 %



6 %



5 %

Al 7%, 6% y 5% se observó en promedio 8.0 mm de halos inhibitorios.



## ANEXO 14

	N	Media	Desviación estándar	Error estandar	95% de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Halos de inhibición en milímetros a la cc 7%	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	10,000	0000	0000	10,000	10,000	10,00	10,00
	Extr. Etanólico de <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	14,000	0000	0000	14,000	14,000	14,00	14,00
	Extr. Etanólico de <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	12,000	0000	0000	12,000	12,000	12,00	12,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) + <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) + <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
Total	18	10,000	2,37635	56011	8,8183	11,1817	8,00	14,00	
Halos de inhibición en milímetros a la cc 5%	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	12,000	0000	0000	12,000	12,000	12,00	12,000
	Extr. Etanólico de <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,0
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) + <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) + <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	9,000	0000	0000	9,000	9,000	9,00	9,00
Total	18	9,3333	1,94029	45733	8,3685	10,2982	8,00	12,00	
Halos de inhibición en milímetros a la cc 6%	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	10,000	0000	0000	10,000	10,000	10,00	10,00
	Extr. Etanólico de <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	12,000	0000	0000	12,000	12,000	12,00	12,00
	Extr. Etanólico de <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	10,000	0000	0000	10,000	10,000	10,00	10,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) + <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
	Extr. Etanólico de <i>Plantago major</i> (llantén) + <i>Punica granatum L</i> (granada) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	8,000	0000	0000	8,000	8,000	8,00	8,00
Total	18	9,3333	1,53393	36115	8,5705	10,0951	8,00	12,00	

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadratica	F	Sg
Halo de inhibición en milímetros (mm) a la cc de 7%	Entre grupos	96,000	5	19,200		
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	96,000	17			
Halo de inhibición en milímetros (mm) a la cc de 5%	Entre grupos	64,000	5	12,000		
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	64,000	17			
Halo de inhibición en milímetros (mm) a la cc de 619,200%	Entre grupos	40,000	5	8,000		
	Dentro de grupos	,000	12	,000		
	Total	40,000	17			

Los resultados obtenidos fueron analizados a partir de ANOVA de efectos fijos con medidas repetidas (tres veces) |y se obtuvo un nivel de confianza de  $P=0.003$  ( $P<0.05$ ).