



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA.

**TÍTULO: ANÁLISIS DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DEL FRUTO DEL NANCITE VERDE Y
MADURO (*Byrsonima crassifolia*) SOBRE LAS CEPAS DE *Escherichia
coli*, Y *Staphylococcus aureus* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN
AGAR.**

Autores:

Bra. Aryenny Guadalupe Gaytán Espinoza.

Bra. Jessie Normaris Ramos Miranda.

Tutora:

PhD. MSc. Carla Martínez Algaba

Asesor:

Lic. Rolando Barillas.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Dedicatoria

A Dios,

¡A ti Señor, me acojo, no quede yo nunca defraudado! Sal 31,2. Por ser mi guía, mi luz y mi fuerza de cada paso que doy en mi vida, por bendecirme para poder alcanzar cada meta como persona y como profesional.

A mi mamá,

Por ser el motor de mi vida, por ser todo lo que soy hoy en día gracias a ella. Por sus consejos, sus regaños, su apoyo incondicional; por tanto amor para conmigo y celebrar juntas cada felicidad y logro.

A mi papá,

Por haber sido un gran ejemplo para mí de amor, perseverancia y constancia en todo lo que uno hace, por motivarme siempre a alcanzar cada meta que me propuse y por haber creído tanto en mí.

A mi compañera,

Por ser una gran amiga y compañera de monografía, por tus consejos, palabra de aliento y confianza y todo el apoyo brindado durante estos años de estudios.

Aryenny Guadalupe Gaytán Espinoza.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Dedicatoria

A Dios,

Por ser el inspirador y proveedor de sabiduría durante este proceso, tan importante para mi vida profesional.

A mis padres,

Ligia Miranda y Norberto Ramos por el amor, dedicación y sacrificio el cual ha sido mi inspiración para alcanzar mis metas.

A mi compañera,

De tesis, Aryenny Gaytán por ser incondicional y acompañarme en este proceso de cumplir uno de nuestro sueño más anhelado.

Jessia Normaris Ramos Miranda.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Agradecimientos

A nuestros Padres,

Gracias a ellos por apoyarnos en lo largo de nuestros estudios, su paciencia, su amor y la enseñanzas de la vida que han hecho lo mejor de nosotras y principalmente por regalarnos y enseñarnos el don de la educación.

Al Doctor Cristián Hernández,

Por ser una de las primeras personas en confiar en nosotras y motivarnos a creer como estudiantes y profesional, por hacernos ver nuestras capacidades y habilidades y transmitir sus conocimientos.

Al Lic. Rolando Barillas,

Gracias por su gran paciencia, ganas de enseñarnos y aceptar emprender este reto con nosotras. Por su apoyo científico y humano, por estar siempre dispuesto a colaborar con nosotras y compartir sus conocimientos y enseñanzas.

A la Doctora Yaneth Mora,

Muchas gracias por todo su apoyo que sin el no hubiera sido posible, por sus valiosos consejos, su dedicación y cariño para con nosotras.

A la Doctora Carla Martínez,

Por su colaboración como nuestra tutora y confiar en nosotras, por su dedicación, enseñanzas y esmero en nuestro trabajo

***Aryenny Guadalupe Gaytán Espinoza,
Jessia Normaris Ramos Miranda.***

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Carta Aval del Tutor

Msc. Sara Negaresh
Coordinador de la Carrera Química Farmacéutica
Departamento de Química
UNAN Managua

Estimado Msc. Negaresh:

Me permito presentar a usted el informe final de la monografía: “Determinación de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar, realizado laboratorio de la UNAN-Managua, Noviembre 2017 a Diciembre 2018”. Realizado por las bachilleras: Aryenny Guadalupe Gaytán Espinoza y Jessie Normaris Ramos Miranda.

Así mismo, certifico haber dirigido y supervisado el arduo trabajo realizado con dedicación, empeño, por las bachilleras, esperando su pronta programación para pre defensa y defensa.

Aprovecho la ocasión para saludarle y presentarle a usted mis respetos y consideración.

Firmo la presente en Managua el 23 de Mayo del 2019.

PhD. MSc. Carla Martínez Algaba
Doctora en Farmacia
Tutora

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Resumen

Actualmente los seres humanos usan plantas medicinales para curar o prevenir algunas enfermedades como lo es el nancite, utilizado empíricamente para afecciones de la piel o gastrointestinales esto sin tener bases científicas en el país que verifiquen la acción que ejerce al organismo.

Por lo antes expuesto, realizar investigaciones de plantas que poseen metabolitos secundarios que pudieran brindar efectos farmacológicos, son gran importancia sobre todo los antimicrobianos, por la resistencia bacteriana ha crecido en los últimos años por distintas causas. Por ende, descubrir nuevas sustancias capaces de combatir diferentes tipos de bacterias a dosis más bajas es un tema de relevancia.

El presente trabajo se realiza con el objetivo de investigar si el extracto etanólico del fruto verde y maduro de nancite (*Byrsonima crassifolia*) posee acción antimicrobiana ante dos tipos de cepas de referencia *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; dichos extractos son realizados por el método de maceración y extraídos por rotavaporación. Luego se realizó métodos de sensibilidad bacteriana; macrodilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitorias (CMI) y difusión en agar para definir la concentración mínima bactericida (CMB).

Aplicando la metodología en estudio se definió que el extracto etanólico del fruto verde posee mayor actividad antimicrobiana obteniendo una CMI de 0.78 mg/mL frente a la cepa de ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*. Al evaluar la CMB de ambos extractos se obtiene que de la misma forma, el del fruto verde frente a la cepa de ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*, presenta mayor actividad bactericida en todas las concentraciones en estudio.

Palabras claves: *Byrsonima Crassifolia*, *Extracto etanólico*, *Concentración mínima inhibitoria (CMI)*, *concentración mínima bactericida (CMB)*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*.

Índice

Dedicatoria	i	
Agradecimientos	ii	
Carta aval del tutor	iii	
Resumen	iv	
Dedicatoria	2	
Resumen	6	
CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES		
1.1. Introducción	1	
1.2. Planteamiento del Problema.....	3	
1.3. Justificación.....	5	
1.4. Objetivos	6	
1.4.1. Objetivo general	6	
1.4.2. Objetivos específicos.....	6	
CAPÍTULO II: MARCO TEORICO.		7
2.1. Antecedentes.	8	
2.2. Marco teórico.	10	
2.2.1. Especie vegetal: (<i>Byrsonima crassifolia</i>).....	10	
2.2.1.1. Descripción general.....	10	
2.2.1.2. Distribución geográfica	10	
2.2.1.3. Descripción botánica	10	
2.2.1.4. Taxonomía.....	11	
2.2.1.5. Composición química del fruto	11	
2.2.1.6. Usos medicinales.....	12	
2.2.1.7. Farmacología.....	13	
2.2.2. Extracto etanólico.....	14	
2.2.3. Maceración.....	14	
2.2.4. Concepto de antimicrobiano:	14	
2.2.5. Clasificación según su mecanismo de acción.....	14	

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

2.2.6.	Métodos de resistencia	15
2.2.7.	Método de Difusión En Agar o Método Kirby Bauer	16
2.2.8.	Método De Dilución en caldo o Macro dilución	16
2.2.9.	Turbidez	18
2.2.10.	Microorganismos patógenos	18
2.2.10.1.	<i>Escherichia coli</i>	19
2.2.10.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.2.11.	Cepas ATCC	21
2.2.11.1.	Cepas de Referencia	22
2.2.12.	Hipótesis.....	23
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO.....		24
3.1.	Descripción del ámbito de estudio	25
3.2.	Tipo de Estudio	25
3.3.	Población y Muestra.....	26
3.3.1.	Población Vegetal	26
3.3.2.	Muestra Vegetal	26
3.3.2.1.	Criterios de Inclusión	26
3.3.2.2.	Criterios de Exclusión	26
3.3.3.	Variables y Operacionalización de las Variables	26
3.3.3.1.	Variable Independiente	26
3.3.3.2.	Variable Dependiente.....	27
3.3.4.	Materiales y Métodos.....	29
3.3.4.1.	Materiales.....	29
3.3.4.2.	Materiales para la recolección de información.....	30
3.3.4.3.	Materiales para procesar la información	30
3.3.4.4.	Métodos.....	31
3.3.4.4.1.	Procedimiento de recolección y preparación de la muestra	31
3.3.4.4.2.	Obtención y preparación del extracto.....	31
3.3.4.4.3.	Extracción del solvente por rotavapor.....	32
3.3.4.4.4.	Determinación de las Concentraciones Mínima Inhibitoria. (CMI).....	33
3.3.4.4.4.1.	Preparación de medios y suspensiones bacterianas:.....	33

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.4.4.2.	Lectura de Resultados:	33
3.3.4.4.5.	Determinación de las Concentraciones Mínima Bactericida (CMB)	34
3.3.4.4.5.1.	Preparación de Medios e Inoculación:	34
3.3.4.4.5.2.	Lectura de Resultados	35
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.		36
4.1.	Extractos de nancite verde y maduro.	37
4.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) en los extractos verde y maduro de nancite.	37
4.3.	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) en los extractos verde y maduro de nancite.	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....		48
5.1.	Conclusiones	49
5.2.	Recomendaciones.....	50
Bibliografía		51
ANEXOS.....		52
Anexos		

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Índice de Tablas	Pág.
Tabla N° 1. Homogenización de las muestras con solvente.	4
Tabla N° 2: Extracción de solvente con rotavapor.	4
Tabla N 3: Protocolo para determinación acción antibacteriana de un extracto vegetal	5
Tabla N° 4: Resultados obtenidos en la determinación de la concentración mínima bactericida y acción antibacteriana de la cepa 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> .	7
Tabla N° 5: Resultados obtenidos en la determinación de la concentración mínima bactericida y acción antibacteriana de la cepa 25922 <i>Escherichia coli</i>	9

Índice de Gráficos

Grafico N° 1: Concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos verde y maduro ante las cepas de 25922 <i>Escherichia coli</i> y 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> .	6
Grafico N°2: Resultados obtenidos en el porcentaje de inhibición de ambos extractos ante la cepa 25922 <i>Escherichia coli</i> .	8
Grafico N° 3: Resultados obtenidos en el porcentaje de inhibición de ambos extractos ante la cepa 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> .	10

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Índice de Figuras	Pág.
Figura N° 1: Árbol de Nancite	11
Figura N° 2: fruto de nancite verde	11
Figura N° 3: Fruto de nancite maduro.	11
Figura N° 4: Recolección de frutos.	11
Figura N° 5: Lavado y preparación de muestras.	12
Figura N° 6: Homogenización de la muestra vegetal con el solvente.	13
Figura N° 7: Maceración de la muestra vegetal.	13
Figura N° 8: Extracción del solvente.	13
Figura N° 9: Preparación de medios de cultivo y activación de cepas.	14
Figura N° 10: Realización de macro dilución en caldo.	15
Figura N° 11: Lectura de resultado de la concentración mínima inhibitoria.	15
Figura N° 12: Resultado de antibiograma.	16
Figura N° 13: Antibiograma.	17

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Índice de Ilustraciones	Pág.
Ilustración N° 1: Procedimiento macrodilución en caldo.	1
Ilustración N° 2: Procedimiento antibiograma.	2

Índice de Formulas	
Formula N° 1: Cálculos para la determinación del solvente a utilizar.	3
Formula N° 2: Cálculos para el porcentaje de inhibición del extracto en mg/ mL	3
Formula N° 3: Determinación del porcentaje de inhibición.	5

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

1.1. Introducción

Las infecciones causadas por la contaminación de alimentos es un gran problema de salud pública en Nicaragua y afecta considerablemente a la población. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la *Escherichia coli* es uno de los patógenos principales que pueden encontrarse en los alimentos contaminados afirma (Gutiérrez, 2017), produciendo afecciones a diversos órganos y sistemas. El *Staphylococcus aureus* también es un agente contaminante en los alimentos pero además de ello pueden causar infecciones en la piel cuando se utilizan catéteres en los hospitales sin la asepsia necesaria o, cualquier herida que permita una entrada al agente para infectar.

Según (Shapiama, 2016) las plantas medicinales favorecen consolidar diversos programas de salud que optan por las terapias alternativas como la medicina natural. También para la economía de los países productores de medicina natural; puesto que para el año 2020 la población mundial, habrá alcanzado la cifra de 7,5 mil millones de habitantes, de los cuales el 75% vivirá en países en vía de desarrollo que hoy consumen menos de 15% del mercado farmacéutico, lo que indica que cada vez más población buscará el recurso de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de salud.

En Nicaragua el auge de la medicina natural ha sido considerable puesto que más número de personas optan por el consumo de esta alternativa de tratamiento y prevención de la salud. Con la incorporación de la Ley no. 774 "*Ley de medicina natural, terapias complementarias y productos naturales en Nicaragua*" Publicado en La Gaceta, Diario Oficial No. 10, arto N° 5, se ha logrado que en el sistema de salud se contemple aún más el uso de la medicina natural en los primeros niveles de atención a los pacientes y tome un lugar importante de elección

El Nancite (*Byrsonima Crassifolia*) es una planta que se utiliza empíricamente en varias comunidades del país para tratamientos de infecciones del tracto digestivo, así mismo, estudios realizados a nivel internacional han demostrado la presencia de taninos y flavonoides en la corteza de la planta atribuyéndole acciones como antipirético o

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

astringente (Fernandez, 2012). En Nicaragua no se han encontrado bases científicas a cerca de la actividad farmacológica que posee dicha planta, por esto es de gran importancia la búsqueda de una posible actividad antimicrobiana frente a microorganismo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de analizar la actividad antibacteriana del fruto y se utilizó el método de difusión en agar para identificar la concentración mínima inhibitoria y la macro dilución en caldo para la concentración mínima bactericida que posee el extracto etanólico ante las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que fueron escogidas para el estudio por ser las responsables de las infecciones más predominantes en el país, por lo tanto, se brindará bases concretas y científicas sobre ello y definir si tiene, o no actividad.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

1.2. Planteamiento del Problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que normalmente la farmacoresistencia mata alrededor de 700,000 pacientes al año, para el 2,050 probablemente va a matar a diez millones, porque no vamos a tener antibióticos ante los ataques de los microorganismos y normalmente un paciente iniciará a morir por una sepsis, una infección nosocomial a nivel hospitalario. (Arbizú, 2017) Puesto que ya los fármacos antibacterianos no ejercerán una adecuada inhibición del crecimiento o su eliminación total de los microorganismos, debido al uso irracional de los medicamentos es que los microorganismos desarrollan cierta resistencia.

La vigilancia a nivel internacional sobre la resistencia bacteriana que realiza la (OMS) indica datos alarmantes de algunas infecciones bacterianas graves y entre los patógenos más frecuentes que presentan resistencia están la *Echerichia coli* y el *Staphylococcus aureus* (Prensa, 2019) siendo resistentes al menos a uno de los antibióticos utilizados en sus tratamientos. En el caso de *Echerichia coli* presento entre un 8% y un 65% de sus muestras fueron resistentes a ciprofloxacina un antibiótico para tratar infecciones urinarias. Ante estas estadísticas es importante considerar o buscar alternativas que permitan contrarrestar la farmacoresistencia o la prevención de la misma.

Nicaragua es un país con una variable y rica flora con propiedades terapéuticas, sin embargo, son poco las investigaciones realizadas en el contexto de búsqueda de alternativas ante la farmacoresistencia, es por ello de gran relevancia facilitar el desarrollo de nuevas opciones de origen vegetal para el tratamiento de estos problemas a nivel de la salud. El nancite de la especie *Byrsonima crassifolia* es una planta que está presente en la vegetación de Nicaragua. Su uso cotidiano en el país es como fruta y para la elaboración de dulce, también de manera empírica en las comunidades rurales se utiliza contra la diarrea independientemente del tipo de patógeno.

A nivel internacional se le han atribuidos acciones farmacológicas como antifúngicos, antipiréticos y astringentes, existiendo diferentes preparados medicinales a partir de esta

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

planta. Sin embargo, no se han determinado una dosis adecuada para administrarse como una elección antibiótica natural evitando causar resistencia a un antibiótico convencional pero que brinde los beneficios deseados en un antibiótico ideal, es decir inocuo y que se administre a bajas concentraciones.

En Nicaragua aún no se ha desarrollado investigaciones que comprueben de manera científica la actividad antibacteriana del fruto y este sea administrado, para el tratamiento y prevención de las enfermedades de tipo microbiano. Es por ello que hacemos la pregunta ¿Poseen los extractos etanólico del fruto de nancite (*Byrsonima crassifolia*) actividades antibacterianas frente a microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

1.3. Justificación

Es inevitable la exposición de la población a diferentes microorganismos que están presentes en el entorno y que pueden causar infecciones bacterianas. Para el tratamiento de estas patologías existen antibióticos de diferentes generación de acuerdo al tipo de agente causante, estos pueden ser de origen sintético o producido por organismos vivos ya sea que inhiben el crecimiento o causan la muerte total de la bacteria En el país (Nicaragua) aún no se ha terminado la exploración de los beneficios medicinales de las especies vegetales en la región y que pueden ser utilizadas para afecciones microbianas.

En Nicaragua el nancite (*Byrsonima crassifolia*) es fruto tradicional en los periodo de cosecha entre agosto y octubre; este se encuentra disponible en diferentes zonas del país. Se selecciona, por la presencia de metabolitos secundarios de gran interés como antimicrobianos presentes en la planta tales como taninos, flavonoides y lactonas que poseen una acción antibacteriana por su capacidad atacar a los microorganismos evitando su crecimiento. (Fernandez, 2012)

Este estudio tiene como propósito realizar ensayos microbiológicos de sensibilidad antibacteriana para evaluar la actividad antibiótica de los extractos etanólicos del nancite verde y maduro frente a las cepas ya descritas con el fin de determinar a qué concentraciones inhibe dichas bacterias o puede eliminarlas, e indicar cuál de los extractos posee mejor actividad.

Examinar el potencial de los extractos de esta fruta es de importancia para controlar patógenos comunes como la *Echerichia. coli* y el *Staphylococcus. aureus* sentará las bases para futuros estudios e incluso formulaciones que contribuyan al control de estos microorganismos y su creciente resistencia, problemática que merma los recursos financieros destinados al sistema público de salud.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Analizar la acción antibacteriana del extracto etanólico fruto verde y maduro del nancite (*Byrsonima crassifolia*) en cepas de referencia ATCC 25922 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

1.4.2. Objetivos específicos

- Obtener extracciones etanólicas del fruto verde y del fruto maduro de nancite (*Byrsonima crassifolia*) por la técnica de rotavaporación.
- Definir la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida frente a las cepas de 25922 *Escherichia Coli* (ATCC) y 25923 *Staphylococcus aureus* (ATCC).
- Comparar la acción antibacteriana entre el extracto etanólico verde y el extracto etanólico maduro de nancite (*Byrsonima crassifolia*) frente a los microorganismos patógenos cepa de referencia *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

CAPÍTULO II: MARCO TEORICO.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

2.1. Antecedentes.

La mayoría de las enfermedades más comunes en la actualidad son las de origen infeccioso, estas afectan notablemente la salud pública en el país. Nicaragua posee una diversidad de plantas medicinales que son fuentes muy importantes para el tratamiento de diferentes patologías, pero aun no todos los recursos que se posee han sido explorado o investigados.

Quiñonez *et al* (2014) evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de cinco plantas nativas de uso popular en Guatemala, entre ellas la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance) frente a *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*, concluyendo que la concentración mínima inhibitoria de 0.0625 mg/mL y 0.0625 mg/mL frente a *Candida albicans* y *Trichophyton metagrophytes* respectivamente.

Rodríguez (2014) evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico fraccionado de la corteza de *Byrsonima crassifolia*, concluyendo que presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, la fracción “C” del extracto etanólico fraccionado (se dividió en el 3 partes el lote total de la muestra) de *Byrsonima crassifolia* presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* aunque el extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* no presento actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Escherichia Coli*.

Guerra *et al* (2013) determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* mediante el método de Difusión en Agar frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El screening fitoquímico evidenció la presencia de taninos, flavonoides, lactonas y azúcares reductores, el extracto etanólico evidenció poca actividad antibacteriana frente a las bacterias en estudio mientras que el extracto acuoso no presentó actividad frente a ambas bacterias.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Fernández M. (2012) realizó un estudio fitoquímico y farmacológico de la planta *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. determinó el contenido de polifenoles presentando un contenido de polifenoles totales de 0,8 mg (equivalentes de ácido gálico por gramo de planta fresca) y un contenido en flavonoides totales de 0,12 mg, plasmando lo metabolitos que pueda darle su acción antimicrobiana.

Rivero et al (2009) como parte de un proyecto dirigido hacia el descubrimiento de compuestos antimicrobianos orales a partir de plantas, aislaron ocho compuestos conocidos a partir de *Byrsonima crassifolia*, β – amirina (1) , la betulina (2) , el ácido betulínico (3), ácido oleanólico (4) , la quercetina (5), (-)-epicatequina (6), ácido gálico (7) y β -sitosterol (8) que fueron aisladas de una partición soluble en diclorometano de un extracto de metanol de *Byrsonima crassifolia*. Todos los compuestos aislados se evaluaron para su actividad antimicrobiana contra doce bacterias y *Candida albicans*. Los compuestos 1 y 4 -7 inhibieron el crecimiento de las bacterias con concentraciones que van desde 64 hasta 1.088 $\mu\text{g/mL}$.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

2.2. Marco teórico.

2.2.1. Especie vegetal: (*Byrsonima crassifolia*)

2.2.1.1. Descripción general

La *Byrsonima crassifolia*, es un árbol de aproximadamente 4 a 10 metros de altura de copa amplia e irregular. Posee un lento crecimiento, su fruto es característicamente oloroso, de jugosa pulpa y oleosa, que varía de un sabor insípido a dulce. Tiene un núcleo bastante grande y duro que posee una semilla de color oscuro. Suele crecer junto a otros árboles también llamados “chaparros”, como *Curatella americana* (Bernal,1998). ver ANEXO 6, Figura 1 y 2.-

2.2.1.2. Distribución geográfica

Este árbol es exuberante en la vida silvestre, en algunos casos esta en extensos rodales; nativo de bosques abiertos y sabanas de hierba que van desde el sur de México, Pacífico de Centroamérica y Zona Tropical de Sudamérica. Según Blanco (2008) los árboles de nancites requieren de suelos francos y profundos con una temperatura superior a los 21 grados celsius. Este de ser sembrado a una altura entre los 100 y los 800 metros sobre el nivel del mar con lluvias regulares. (Blanco, 2008)

El nancite puede ser sembrado en cualquier zona de Nicaragua pero se desarrolla de mejor manera en zonas secas del pacífico del país. Los principales departamentos que producen cosecha del fruto son Masaya, Carazo, Granada y Managua. De igual manera en las demás regiones del país son cosechados los árboles pero no con tanto auge para el comercio.

2.2.1.3. Descripción botánica

Esta especie, se puede presentar en árboles o arbustos de 4 a 10 metros de altura, con el tronco tortuoso, muy ramificado, con las ramas tocando el suelo o creciendo casi horizontalmente, corteza gruesa y superficie escamosa. Hojas opuestas, simples, coriáceas brillantes, peciolo corto, limbo elíptico, 7 a 15 cm de largo por 3 a 7 cm de ancho, ápice obtuso o agudo, haz liso pero, con tomento ferruginoso en el envés.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

El fruto del nancite (*Byrsonima crassifolia* (L) Kunth), muy conocido en países de la América tropical y subtropical como México, Centroamérica, Colombia, Venezuela y Brasil, es una pequeña drupaglobosa, variable en tamaño, muy olorosa (aroma a queso rancio), con sabor agradable y variado (insípido, dulce, ácido o astringente), que posee valor nutritivo y posibilidades de industrialización y comercialización (Fernandez, 2012). El mesocarpio que constituye hasta el 40% del fruto, es la parte comestible. (Rodríguez, 2014)

2.2.1.4. Taxonomía

La especie *Byrsonima crassifolia* posee la siguiente descripción taxonómica: (Humboldt, 1815-1825):

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta.</i>
Clase	<i>Equisetopsida</i>
Orden	<i>Malpighiales.</i>
Familia	<i>Malpighiaceae</i>
Género	<i>Byrsonima</i>
Especie	<i>Byrsonima crassifolia</i>
Nombre científico:	<i>Byrsonima crassifolia</i> L

2.2.1.5. Composición química del fruto

Se han descrito una variada serie de compuestos presentes en el fruto de la *Byrsonima Crasifolia* y en su mayoría son volátiles por lo que brindan un olor característico. Eso es el caso de etanol, hexanoato de etilo, ácido butanóico, ácido hexanóico y butirato de metilo. Con respecto a su composición química, el fruto es rico en azúcares, minerales, vitamina C, riboflavina, grasa, fibras y grandes cantidades de polifenoles. (Fernandez, 2012).

Se ha reportado que el fruto contiene un alto contenido en polifenoles totales de 0.8 mg (equivalentes de ácido gálico por gramo de planta fresca) y un contenido en flavonoides

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

totales de 0.12 mg (equivalentes de catequina por gramo de planta fresca). (Moreno G. , 2015)

Según (Víllachica, 1996) el valor nutricional de 100 g de pulpa comestible de nancite contiene:

Ácido Cítrico,	2,450 mg
Ácido Ascórbico	71 mg
Aminoácidos	25.86 mg
Azúcares Reductores	4,890 mg,
Calcio	29-80 mg
Extracto Etéreo	4,750 mg,
Fósforo	17-20 mg
Grasas Totales	1,300 mg
Hierro	1 mg,
Niacina	0.4 mg,
Pectina	20 mg
pH	2.8
Riboflavina	0.03 mg
Sólidos Soluble Totales	21,500 mg
Tiamina	0.03 mg
Vitamina C	7.27 mg

2.2.1.6. Usos medicinales

La *Byrsonima crassifolia* es una planta que se utilizada popularmente como antidiarreico, contra las inflamaciones de la vejiga, los ovarios y el dolor de estómago, así como también es utilizada para tratar afecciones de la piel tales como la sarna, el salpullido y ayuda a cicatrizar heridas. Se prepara una infusión con las hojas, la cual es administrada diariamente para aliviar la artritis, dolores de hueso, cansancio y anemia. (Fernández, 2009)

La utilización de la semilla y el fruto se consideran un antídoto eficaz contra envenenamiento por *Jatropha curcas* (dolores abdominales, diarrea, vómito, irritación de

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

garganta, gastroenteritis) y *Manihotes culenta* (manifestaciones disneicas y hasta la muerte del sujeto). Semilla (molida): sarampión, viruela, estomáquico, enfermedades del riñón, disentería y febrífugo, astringente y ligero purgante. El aceite de las semillas puede usarse con buen éxito contra la lepra. Los extractos en alcohol etílico de frutos han mostrado tener in vitro actividad en contra de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Por su parte (Bayuelo -Jiménez J.S., 2006) reportaron un contenido de proteína en el nanche (3.8%).

2.2.1.7. Farmacología

Según (Rodríguez, 2014) las propiedades nutraceuticas del nancite (en general de otras especies vegetales), se deben a los antioxidantes (catequinas) presentes en sus frutos, hojas y corteza. A la cual se le atribuyen actividades como la antimicrobiana, incluida la antidiarreica y para el tratamiento frente infecciones de la piel.

La catequina es un antioxidante que se caracterizan por interactuar con radicales libres ya que son capaces de formar compuestos que inhiben directamente los procesos de oxidación y en estos procesos se da la degeneración celular (Martínez, 1999). Al estudiar metabolitos procedente de plantas, es de vital importancia tener en cuenta que sus compuestos son sintetizados y metabolizados por el organismo humano, y también muchos de ellos son almacenados para combatir algunos microorganismos que atacan al sistema inmune. Estos son ingeridos en frutas y vegetales en la dieta alimenticia diaria.

Los principales metabolitos presentes en el nancite de interés farmacológico son los taninos pero según estudios de (Rodríguez, 2014), afirma que los responsables principales de la actividad farmacológica son los galatos de proantocianidinas J_{32} , que brindan el efecto de antifúngico, antiinflamatorio y nematicida.

Al conocer las diferentes propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de los extracto en estudio brinda que se pueda optimizar las dosis que pudieran sugerirse para que sea de satisfacción al momento de resolver problemas patológicos. de origen bacteriano.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

2.2.2. Extracto etanólico

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Esos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. (Gonzalez A., 2004)

2.2.3. Maceración

Es una técnica que consiste en mantener en contacto una sustancia machacada a la que queremos extraer un componente, con un volumen de disolvente prescrito a una temperatura ordinaria y durante un tiempo variable. El tiempo de maceración dependerá de la muestra en estudio y es recomendada para la extracción de principios activos con buena solubilidad o que sean termolábiles, esto también dependerá de las propiedades del solvente que se esté utilizando. Mediante el proceso de maceración se debe de acompañar de agitación de manera esporádica. (Jover, 2004)

2.2.4. Concepto de antimicrobiano:

Una sustancia natural o producto químico de síntesis capaz de detener la multiplicación de las bacterias o destruirlas por completo. Cualquier sustancia con suficiente actividad antibiótica que se pueda emplear para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Se consideran antibióticos los producidos por microorganismos vivos y los que se obtienen mediante síntesis química, son quimioterapéuticos. (Gamazo C., 2013)

2.2.5. Clasificación según su mecanismo de acción

Inhibidores de la formación de la pared bacteriana.

Inhibidores de la síntesis proteica

Inhibidores de la duplicación del ADN

Inhibidores de la membrana plasmática

Inhibidores de vías metabólicas

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

2.2.6. Métodos de resistencia

Las principales consecuencias del aumento del número de microorganismos resistentes son la mayor probabilidad de instauración de tratamientos empíricos inadecuados (tratamiento que se administra al paciente sin conocer el microorganismo causante de la infección y su patrón de sensibilidad a los antibióticos), el aumento del número de estancias hospitalarias, estancias hospitalarias más prolongadas, la pérdida de efectividad de los antibióticos actuales y la consecuente necesidad de desarrollo de nuevas moléculas capaces de vencer los mecanismos de resistencia desarrollados. (Gamazo C., 2013)

La resistencia de una bacteria hacia los antibióticos, se define como la incapacidad del antibiótico para curar una infección que haya sido causada por una determinada bacteria. Esta, se puede clasificar en intrínseca y adquirida.

- Resistencia intrínseca: El agente patógeno presenta resistencia a un antibiótico dado, ya sea por la carencia de la diana de acción del antimicrobiano, o bien porque la bacteria expresa siempre un mecanismo de resistencia que afecta a ese antimicrobiano.
- Resistencia adquirida: Al elaborar un antibiograma del microorganismo, este no concuerda con los descritos como fenotipos naturales, esto quiere decir que la bacteria que era sensible a un antimicrobiano, se convierte en resistente a él, esto puede deberse a la mutación de un gen bacteriano o a la adquisición de material genético que codifique dicho mecanismo de resistencia.

Los métodos de sensibilidad bacteriana utilizados son recomendados por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards), y está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales, y en un campo muy importante como es el estudio de nuevos antibióticos. (García, 2000)

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Los resultados de sensibilidad para los métodos de difusión en agar o método Kirby Bauer y método de dilución en caldo o Macro dilución serán interpretados de acuerdo a las tablas de la NCCLS ya estipuladas (Reller, 2011)

2.2.7. Método de Difusión En Agar o Método Kirby Bauer

El método radica en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton discos que contengan los agentes patógenos que estarán en investigación anticipadamente inoculados donde en la superficie contenga el agente antimicrobiano. Cuando los microorganismos entran en contacto con el antibiótico en la superficie húmeda del agar este absorbe agua y el agente lo va difundiendo radialmente por medio del disco, formándose un gradiente de concentración. . Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. (Reller, 2011)

Al haber ocurrido un tiempo determinado de la incubación del disco, los microorganismos se proliferan y es el momento para determinar la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano, el cual consta de medir el diámetro de la zona de inhibición alrededor del disco. Estos datos se reflejarán en milímetros y deben ser analizados como sensibles, intermedios o resistentes a las diferentes clasificaciones ya establecidas.

Este procedimiento también es conocido como antibiograma un trabajo fundamentado por la recopilación de Bauer, Kirby et al., que esta validado por la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) que permite determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. (Gamazo C., Sanchez S., Camacho A. I., 2013).

2.2.8. Método De Dilución en caldo o Macro dilución

El método de macro dilución en caldo fue estandarizado alrededor de los años 70 por la NCCLS y consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

para luego definir la CMI. De la misma forma es de mucha utilidad al realizar investigaciones de nuevos compuestos antimicrobianos.

La prueba de dilución en caldo consiste en exponer el microorganismos de interés a agentes antibacterianos en un medio líquido (caldo de cultivo). Cada agente antimicrobiano se prueba en un rango de concentraciones que suele expresarse en μg de fármaco activo/ mL de caldo (Forbes, 2009). Los rangos de concentración en este método de susceptibilidad típicamente son de 0.25, 0.5, 1, 2, 4,8 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pero estos pueden variar de acuerdo al tipo de droga que se utilice.

Para realizar este procedimiento es preciso que se brinden condiciones de acuerdo al microorganismo en estudio, casi siempre se necesita agar mueller hinton para preparar el caldo y en algunos tipos de bacteria agregar cloruro de sodio (NaCl), así también la cantidad de crecimiento bacteriano necesario es alrededor de 5×10^5 UFC/mL incubado a temperatura de 35°C entre 16 a 24 horas. Luego de esto se procede a la lectura; la menor concentración de antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento bacteriano observable y detectable visualmente se le conoce como la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Forbes, 2009).

Es un método en el cual se utiliza para estudio de drogas de origen vegetal en el cual un caldo es preparado y es mezclado con una cantidad de extracto de planta o compuesto activo para obtener una concentración final con el medio. Si no se conoce la concentración del extracto en estudio se puede agregar una alícuota en peso y se afora hasta un volumen final, obteniendo así una concentración peso/volumen. La interpretación de los resultados se realiza por turbidimetría aunque están en desventajas frente a compuestos no solubles que pudieran interferir con la lectura, por ello se debe de tener un control de crecimiento y a la vez un blanco que permita observar con mayor exactitud la turbidez de los tubos. (Rivas, 2016)

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Este método permite determinar también el efecto bacteriostático de la sustancia en estudio, se realiza por medio de diluciones seriadas. Por medio de este método se ha logrado determinar la CMI de una gran cantidad de compuestos, posee mayores ventajas frente a otros métodos debido a la sensibilidad y reproducibilidad. El medio que mayormente se recomienda para este método es el Mueller Hinton, aunque también podría utilizarse el tripticasa soya junto con el agar nutritivo, todo depende del inóculo a estudio. (Cos. P, 2006)

2.2.9. Turbidez

La determinación de la turbidez (turbidimetría) es un método práctico para controlar el crecimiento bacteriano. Cuando las bacterias se multiplican en un medio líquido este se toma turbio o nebuloso por las células. (Tortora & Funke, 2007)

Al utilizar métodos de sensibilidad en tubos, la turbidez es el parámetro principal, luego de la incubación, por medio del cual se determina el poder inhibitorio o bacteriostático de un antibiótico. La turbidez (densidad óptica) de una suspensión celular está correlacionada con su concentración celular. Puede determinarse directamente mediante un espectrofotómetro, o bien mediante comparación con la escala de McFarland. Esta última consiste en una serie de tubos con turbidez creciente según una escala de 0,5 a 10 (Gamazo C., 2013)

2.2.10. Microorganismos patógenos

Las bacterias que producen enfermedades son patógenas, y se conoce como patogenicidad la capacidad de una bacteria para causar enfermedad. Por otra parte se conoce como agente etiológico al organismo que causa la enfermedad. (Ingraham, 1997) Las bacterias causan enfermedades por 2 métodos; por la proliferación en el huésped o por la producción de toxinas en el organismo que dañan los tejidos del huésped.

La mayoría de enfermedades causadas por bacterias se le conoce como enfermedades infecciosas por su facilidad de contagio entre la población. Estas pueden ser transmitidas por

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

medio de alimentos y agua contaminados, también por aerosoles, contacto con personas o animales u objetos infestados.

Los seres humanos albergan un sin número de bacterias en el tracto gastrointestinal que son propias de la flora bacteria e inofensivas pero estas pueden causar infección de carácter etiológico si las bacterias son excretadas por las heces y el siguiente huésped las ingiere por la boca. Estas pueden ser ingeridas en alimentos contaminados o en moscas que frecuentemente se encuentran entre las heces.

Dichas bacterias patógenas pueden instalarse en vías respiratorias, vías uranias o la más común vía intestinal y causar enfermedades como la cólera, gastroenteritis, tuberculosis o neumonía. Pero la piel puede ser otra puerta de entrada para estos agentes infecciosos que dependen del contacto directo para infestar. Es por ello que las bacterias patógenas o etiológicas son fuente relevante del sin número de enfermedades que afecta la salud publica hoy en día.

2.2.10.1. *Escherichia coli*

Escherichia Coli (*E. Coli*) es una enterobacteria del grupo heterogéneo y de bacilos gram negativos. Las Enterobacteriaceae son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. (Jawetz, 2011)

En medios de cultivo la *E. coli* forma colonias circulares, convexas y lisa con bordes distintivos; en su aspecto bioquímico fermentan lactosa con facilidad y producción de indol. Aspectos muy relevantes para la identificación del microorganismo en pruebas de sangre en agar. La *E. coli* produce diferentes tipos de endotoxinas en las cuales están inmersas las citotoxinas, los inhibidores de síntesis de proteínas y las que alteras los mensajes de las células del huésped.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Una de las toxinas de la *E. coli* es la hemolisina α , esta es la responsable de formar poros en la membrana plasmática para romperla, ocasionar la salida del contenido citoplasmático y finalizar con la lisis celular. Este mecanismo es similar a la toxina α de los estafilococos por las alteraciones que produce a nivel epitelial. Las toxinas asimismo son producidas por la *E. coli* también reciben el nombre de toxinas A-B por la unión del complejo B ribosómico a la unidad A catalizando la ribolización de ADP en la membrana del epitelio intestinal, logrando una desactivación de proteínas G estimulando las células y como resultado de ello la alteración en la secreción de cloruro y el bloqueo de absorción de Cloruro de Sodio (NaCl) en el lumen intestinal.

Epidemiológicamente la *E. coli* es la responsable de un 90% de las infecciones de vías urinarias, esto es ocasionado por la presencia del microorganismo en la flora intestinal del paciente infectado, las cuales pueden transferirse y obstruir las vías urinarias con facilidad y dando ventajas a la proliferación de la *E. coli*. También una de las más causantes de las infecciones a nivel intestinal y de meningitis.

2.2.10.2. *Staphylococcus aureus*

Este tipo de microorganismo es el causante de la mayoría de las enfermedades de carácter cutáneo o purulento que producen pus o abscesos externos que afectan las cavidades del cuerpo. Las bacterias del genero estafilococos son cocos gram positivos que se presentan en forma de racimos de uvas (Gamazo C., 2013) aunque en algunos casos se pueden presentar de forma sola, pares o cadenas cortas.

Mayoritariamente son células gram positivas y de un tamaño regular y se unen entre sí a una gran presión. Cuando están en cultivos también posee características de lesiones frecuentes y alteran su tamaño con la presencia de algún antibiótico que disminuye su capacidad gram positiva. Cuando las células de *Staphylococcus aureus* son cultivado en presencia de sangre tienden a producir colonias blancas que luego se cambian a una apariencia crema-dorada y especialmente con un aro betahemolítico particularidad de los estafilococos. (Cervantes, 2014)

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) proporciona una gama de toxinas citolíticas responsables del incremento bacteriano de estos microorganismos que son identificadas con los símbolos α , β , δ , γ . La α es la de mayormente producida por todas las cepas de *S. aureus*, esta produce una lisis en la membrana citoplasmática del huésped para insertarse en los poros de la bicapa lipídica y producir necrosis celular para la rápida infección cutánea. (Databio, 2012)

También dichas cepas de estafilococos originan una exfoliatina que se encuentran en el estrato granuloso de la epidermis de niños menores y rara vez en adultos; esta unión a la epidermis causa una división celular del estrato espinoso y gránulos eliminando la capa protectora de la piel y dejando libre el paso del *S. aureus* para su proliferación.

Las toxinas súper antigénicas estafilocócicas son de igual importancia para el proceso patogénico de las enfermedades de este tipo de bacterias, son absorbidas en el tracto gastrointestinal donde se multiplican. Las enterotoxinas estafilocócicas producen síntomas a nivel gástricos, si ellas llegan a unirse su actividad llega a ser demasiado estable siendo difícil de eliminarse aun después de realizar lavados con agua hirviendo y al entrar en contacto con las enzimas gástricas.

Aproximadamente entre un 10% y 30% de los humanos poseen *S. aureus* en las fosas nasales anteriores (Gamazo C., 2013) en cualquier momento de su vida, como están en el sitio nasal son expulsadas al exterior y son fácil de adicionarse a la piel o la ropa de otro huésped, para una pronta propagación.

2.2.11. Cepas ATCC

Son una herramienta indispensable y eficaz para el control de calidad interno en tus cultivos de microbiología. Las cepas ATCC (American Type Culture Collection), son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental. Sus

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo y al tener esta documentación, el laboratorio evitará realizar pruebas adicionales para la identificación de las cepas, lo que se traduce en ahorro de tiempo y recursos. (Montoya, 2012)

2.2.11.1. Cepas de Referencia

Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes. (Montoya, 2012)

Las cepas son utilizadas al fin de demostrar la trazabilidad, las cepas de referencia deben obtenerse directamente de una colección con la reseña nacional o internacional de cultivo de referencia reconocido. "ISO: 2000" son microorganismos definidos, por lo menos a nivel de género y especie, catalogados, caracterizados y de origen conocido. Adquisición de las cepas de referencia debe ser de obtención directa a partir de una colección nacional e internacional reconocida como la ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, EU CCTM.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

2.2.12. Hipótesis

Los extractos etanólicos del fruto verde y maduro del nancite (*Byrsonima crassifolia*) poseen actividad antibacteriana frente a microorganismos de referencia ATCC 25922 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.1. Descripción del ámbito de estudio

La fase experimental para la obtención de la muestra del fruto del nancite (*B. crassifolia*) verde y maduro, se llevó a cabo en la finca La Conchita de la comunidad Presillitas del municipio de Muelle de los Bueyes que se encuentra ubicado a 35 km de ciudad Rama. El proceso de los extractos etanólicos de los frutos se realizaron en el laboratorio de Análisis Físico Químico de Alimentos (LAFQA) del Departamento de Química, ubicado en el pabellón 3 de UNAN-Managua y la realización del ensayo de determinación antibacteriana en los laboratorios del Instituto Politécnico de la Salud (POLISAL) ubicados contiguo en el pabellón 50 en la UNAN-Managua.

3.2. Tipo de Estudio

En esta investigación se empleó el diseño experimental, descriptivo y transversal

- **Experimental:** Tiene como propósito principal establecer relación causa-efecto utilizando la experimentación, se evalúa un fenómeno dado introduciendo elementos que modifican el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos. (Sampieri, 2010)
- **Prospectivo:** Porque en el registro de información se toma en cuenta los hechos a partir del inicio de la fecha de estudio. (Sampieri, 2010)
- **Descriptivo:** El estudio describe e interpreta en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación. Busca especificar propiedades y características importantes de cualquier fenómeno que se analice. (Sampieri, 2010).
- **Transversal:** Se recolectan datos en un solo momento, en un tiempo único. Su propósito es describir variables, y analizar su incidencia e interrelación en un momento dado. (Sampieri, 2010)

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3. Población y Muestra

3.3.1. Población Vegetal

Se considera como población los frutos de nancite (*Byrsonima crassifolia*) que se han recolectados por un muestreo aleatorio simple tantos frutos verdes como maduro en la finca La Conchita de la comunidad Presillitas del municipio de Muelle de los Bueyes que se encuentra ubicado a 35 km de ciudad Rama.

3.3.2. Muestra Vegetal

Se tomará como muestra los extractos etanólicos del fruto verde y maduro, extraídos en el laboratorio de Análisis Físico Químico de Alimentos (LAFQA) del Departamento de Química ubicado en el pabellón 3 de UNAN-Managua

3.3.2.1. Criterios de Inclusión

- Frutos de la especie *Byrsonima crassifolia*
- Frutos verdes cortados directamente del árbol.
- Frutos color amarillo, en etapa de madurez.
- Frutos enteros.

3.3.2.2. Criterios de Exclusión

- Frutos de la especie *Byrsonima Verbascifolia*
- Frutos dañados por plagas.

3.3.3. Variables y Operacionalización de las Variables

3.3.3.1. Variable Independiente

- Concentración del extracto etanólico.
- Concentración Mínima Inhibitoria.
- Concentración Mínima Bactericida.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.3.2. Variable Dependiente

- Acción Antibacteriana.
- Efectividad antibacteriana del extracto etanólico frente a cepas de referencia.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Operacionalización de las Variables

Variables	Definición	Indicadores	Escala	Tipo de variable
Independiente				
Concentración del extracto etanólico.	Es una sustancia que se obtiene por extracción del fruto del Nancite usando como solvente el etanol.	mg/mL	Nominal	Cuantitativa
Concentración Mínima Inhibitoria	La menor cantidad de concentración (mg/mL), la cual el microorganismo puede inhibir el crecimiento del microorganismo.	mg/mL	Nominal	Cuantitativa
Concentración Mínima Bactericida	Determina la concentración de antimicrobiano capaz de eliminar por completo un inóculo microbiano específico y erradicarlo definitivamente del huésped infestado.	mg/mL	Nominal	Cuantitativa
Dependiente				
Acción Antimicrobiana	Capacidad de inhibir microorganismos sensibles o causarles la muerte.	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivo <40% • Poco Activo 40% - 50% • Moderado activo 51-75% • Buena actividad >76% 	Nominal	Cuantitativa
Evaluar efectividad antimicrobiana del extracto etanólico frente a cepas de referencia.	Antibacteriano: sustancia que posee la capacidad de inhibir o eliminar el crecimiento de bacterias.	<ul style="list-style-type: none"> • Antibacteriano 	Nominal	Cuantitativa

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.4. Materiales y Métodos

3.3.4.1. Materiales

Materiales y cristalería utilizados:

- Matraz 10 mL
- Beaker 5, 10, 15, 20, 50 y 100 mL
- Erlenmeyer 250 y 500 mL
- Pipetas 1,5 y 10 mL
- Probetas 10, 100, 250 y 1000 mL
- Balones 250 y 500 mL
- Pipetas pasteur
- Tubos de bioquímica 10 mL
- Tubos de ensayos 50 mL
- Embudos
- Aza de siembra bacteriológica
- Platos Petri
- Espátulas
- Gradilla
- Pinzas estériles
- Regla
- Hisopos estériles
- Agitadores Magnéticos
- Pipetas Automáticas de 1-5 mL, 20-200 μ L, 100 μ L y 500 μ L
- Bolsas Ziploc plásticas

Reactivos

- Caldo Müller Hinton
- Agar Müller Hinton
- Agar Sangre
- Agua destilada

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

- Solución Salina
- Escala McFarland
- Agar Mckconkey
- Gentamicina de 80 mg / 2 mL
- Etanol al 99.99%

Equipos

- Autoclave (marca o capacidad)
- Balanza Analítica METTLER PJ400
- Baño maría
- Vortex
- Incubadora J.P. SELECTA 2002471 cap 720L
- Refrigerador
- Rotavapor Heidolph IDMI-027 Hei-VAP >285 °C(
- Mechero Bunsen
- Hot-Plate SP 131634Q Thermo Fisher Sci. Inc.

3.3.4.2. Materiales para la recolección de información

- Libreta de apuntes
- Tablas de recolección de datos

3.3.4.3. Materiales para procesar la información

- Microsoft Word 2013
- Microsoft Excel 2013
- Microsoft Power Point 2013

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.4.4. Métodos

3.3.4.4.1. Procedimiento de recolección y preparación de la muestra

Para iniciar la recolección de la muestra para los ensayos necesarios en esta investigación, se fue al lugar establecido para la obtener la muestra (Finca La Conchita). Para recolectar los nancites maduros y verdes de la especie *Byrsonima crassifolia* se tomaron en cuenta los criterios de inclusión establecidos. Cuando se finalizó la selección se almacenaron en bolsas ziploc plásticas con agua para mantener en buen estado los frutos hasta llegar al laboratorio LAFQA-UNAN, Managua.

Primero se limpiaron los frutos con suficiente agua destilada y luego se procedió a secar a en recipientes plásticos fuera de las instalaciones del laboratorio, ver (anexo6, fig. 4) a la temperatura que se encontraba el lugar (temperatura ambiente) entre un rango de 24 a 35 °C que oscila la temperatura en la ciudad de Managua. La etapa de secado duro 3 horas. Cuando los frutos estuvieron totalmente secos, se separó la cáscara de la semilla colocados en un beaker de 600 mL. Luego fueron pesados en una balanza analítica la cantidad de 600 g de cada muestra en análisis, ver (anexo 7, fig.5) Posteriormente se homogeneizó la muestra utilizando un equipo homogeneizador, hasta obtener los trozos más pequeños posibles. Ver (anexo 8, fig.7)

3.3.4.4.2. Obtención y preparación del extracto

Cuando se finalizó el pesaje de las muestras de nancite maduro y nancite verde, se procedió a la homogenización de las mismas con la ayuda del homogeneizador para obtener una muestra uniforme del macerado, ver (anexo 8, fig.8) Esta etapa de la preparación de la muestra, no fue sugerida por la investigación utilizada como base pero fue incluida en esta investigación para mejora de la muestra. Para la muestra de nancite verde se realizó en 3 etapas, es decir tomando 200 g del fruto homogenizado primeramente con 90 mL de etanol al 99.9 % luego 200g con 500 mL de solvente y los 200 g finales con 500 mL posterior se añadió al macerado el resto de solvente para completar los 1,500 mL de etanol; esto se realizó de esta manera probando primeramente con una cantidad reducida de nancite y de etanol. por lo que no se poseía un procedimiento descrito Para los 600 g de nancite maduro

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

se homogenizaron dos fracciones de 200 g en 250 mL y dos de 100 g en 250 mL de solvente, para completar los 1,500 mL de etanol y los 600 g de nancite. Para mejor visualización del procedimiento ver (anexo 8, fig. 7)

Lo siguiente fue trasladar a recipientes limpios, color ámbar para evitar cualquier degradación por la luz y su almacenamiento por 7 días, ver (anexo 8, fig. 8). Este fue el tiempo que se maceró la muestra en etanol. Las muestras de los dos tipos de cascara de nancite fueron dejadas en reposo por 7 días a 25° C con agitación cada 6 horas durante el lapso de tiempo en maceración-

3.3.4.4.3. Extracción del solvente por rotavapor

Transcurrido el tiempo de 7 días de maceración se procedió a la extracción del solvente (etanol 99.9 %) por el procedimiento de rotaevaporación. Este es un sistema al vacío que necesita una presión reducida, se utilizó un baño maría con una temperatura de 78 °C, la cuál es el punto de ebullición del etanol. Ver (anexo 9, fig. 9).

Como primer paso se filtró cada uno de los extractos en una gasa para evitar la presencia de grumos muy grandes y tener una solución bastante homogénea. Se necesitó hacer 2 repeticiones de extracción por la capacidad del equipo y en cada una se añadió 250 mL de la mezcla para un total de 500 mL para extracto verde y maduro de nancite respectivamente.

Se inició con la extracción del fruto verde, se alcanzó una temperatura de 78°C y 60 rpm. Transcurrido 1 hora y 50 minutos obtuvimos 60 mL de extracto verde concentrado. Se realizó el mismo procedimiento para la muestra de nancite maduro, alcanzando 78 °C de temperatura y 60 rpm transcurrió 1 hora y 40 minutos y se obtuvo 45 mL de extracto maduro. Ambos extractos fueron envasados en frascos color ámbar para su correcta conservación.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.4.4.4. Determinación de las Concentraciones Mínima Inhibitoria. (CMI)

3.3.4.4.4.1. Preparación de medios y suspensiones bacterianas:

Se pesó 1.89 g de caldo Mueller Hinton para 100 mL, se agito por 5 minutos para su disolución completa y obtener una capacidad de 72 tubos de los cuales 9 contenían 1.5 mL y el resto 1 mL. Posterior se ingresaron a la autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Del crecimiento de las bacterias ya previamente inoculadas se tomaron 3 colonias características y se realiza una suspensión bacteriana de cada una, en 50 mL de solución salina previamente esterilizadas en la autoclave, se llevó hasta 0.5 escala Mc Farland. Ver (anexo 8, fig. 9)

- **Soluciones Madres:**

Para las soluciones de extracto verde y maduro se preparó una solución de metanol/agua destilada (1:1), luego de esto se pesó 500 mg de cada uno de los extractos y se diluyó en 1 mL de la solución preparada con anterioridad, esto se realiza para obtener una concentración inicial de 500 mg/mL. Para el control positivo se tomó 1.64 mL de gentamicina en solución inyectable y se enraso a 5 mL de agua destilada.

- **Diluciones:**

Del tubo número uno que contenía 1.8 mL de caldo Mueller Hinton, se le añadió 0.2 mL de la solución madre del extracto para que al sacar 1 mL su volumen final sea de 1 mL. Los tubos restantes contenían 1 mL de caldo, al tubo número uno se sacó 1 mL y se le añadió al tubo número 2 y se prosiguió con la secuencia hasta llegar al tubo número 8. Del mL que se sacó del tubo número 8 fue desechado ya que es ahí donde termina la última dilución realizada y este mL no sería utilizado. Estas diluciones fueron preparadas por duplicados para cada extracto y un control positivo en cada extracto. Ver (anexo 10, fig. 11)

3.3.4.4.4.2. Lectura de Resultados:

Luego de incubar los tubos por 24 horas a 35 °C fueron sacados y expuestos a una luz blanca con fondo negro para una adecuada lectura. Ver (anexo 12)

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.4.4.5. Determinación de las Concentraciones Mínima Bactericida (CMB)

3.3.4.4.5.1. Preparación de Medios e Inoculación:

Se preparó agar Mueller Hinton con un peso de 38 g equivalentes para 400 mL equivalentes para 4 platos de medios; estos se vierten sobre las placas Petri y se dejan enfriar a 45 – 50 °C.

Posterior a esto se procede a la inoculación de las bacterias en los platos ya preparados, se utiliza un hisopo de algodón estéril, se sumerge en la suspensión bacteriana y se inocula pasando uniformemente en 3 direcciones por todo el plato. Se realizaron 6 pozos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pipeta pasteur esterilizada.

Los pozos se rotularon de la siguiente forma, según las concentraciones equivalentes:

Concentraciones (µL). Concentración equivalente del extracto (mg / mL)

Concentraciones (µL)	Concentración equivalente del extracto (mg / mL)
10	5
20	10
30	15
40	20
50	25
10	Disco de Gentamicina (Control Positivo)

Se incuban los platos a 35 °C por 24 horas

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

3.3.4.4.5.2. Lectura de Resultados

Luego de incubar los platos por 24 horas se procedió al secado y a exponer a una luz blanca con fondo negro para la lectura. Ver (anexo 11, fig. 13)

Para determinar actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición se tomó de referencia Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

4.1. Extractos de nancite verde y maduro.

Cuando se realizó la técnica de extracción por rotavaporación se utilizó el procedimiento realizado por el estudio de la “Actividad *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* “indano” mediante el método de difusión en agar”. (Guerra, 2013). En el cual se realiza el extracto por el método de maceración.

Guerra (2013) describe en su investigación el uso de 1000 g de muestra, macerados en 2500 mL de solvente. Utilizando esa relación se determinó que para 600 g de nancite eran necesario 1500 mL de solvente que en este caso se empleó etanol al 99.9 %. Posterior a esto se procedió a la realizar el extracto según la técnica ya descrita tomando la cascara del fruto de nancite para ser maceradas en alcohol por 7 días.

Cuando se iba a realizar la extracción del solvente se pudo apreciar que era demasiada cantidad de alcohol para la proporción de muestra del fruto. Con ello se puede afirmar que a menos cantidades de solvente se puede obtener más concentrado los extractos de nancite y se puede realizar la extracción del solvente en menor tiempo y con mejores resultados.

A su vez se aprecia que se obtiene más mL de extracto verde puesto que con 500 mL de muestra macerada se obtuvieron 60 mL de extracto y podría obtenerse aún más extracto si se reduce la cantidad de solvente en la maceración. Mientras que en el caso del extracto maduro con 500 mL de muestra macerada se obtuvieron 45 mL de extracto maduro es una diferencia de 15 mL que deja ver que se extrae con mayor cantidad el nancite verde en comparación al nancite maduro cuando ambos se extrajeron bajo las mismas condiciones de temperatura (78°C) y las mismas revoluciones del equipo (60rpm).

4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) en los extractos verde y maduro de nancite.

Se realizaron diluciones a partir de 25 mg/mL de cada extracto hasta llevarla a la dilución 1:16 que equivale a una concentración de 0.19 mg / mL.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Dilución	Concentración del extracto
Tubo n° 1	25 mg/mL
1:2	12.5 mg/mL
1:4	6.25 mg/mL
1:8	3.12 mg/mL
1:16	1.56 mg/mL
1:32	0.78 mg/mL
1:64	0.39 mg/mL
1:128	0.19 mg/mL

Para determinar la CMI se observó cada tubo y se eligió el de menor concentración que no presentara turbidez. El resultado para el extracto maduro ante la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, dio concentración mínima en la dilución correspondiente a 3.12 mg/mL de extracto. Para el caso del extracto verde frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, se encontró en la dilución correspondiente a 0.78 mg/mL de extracto.

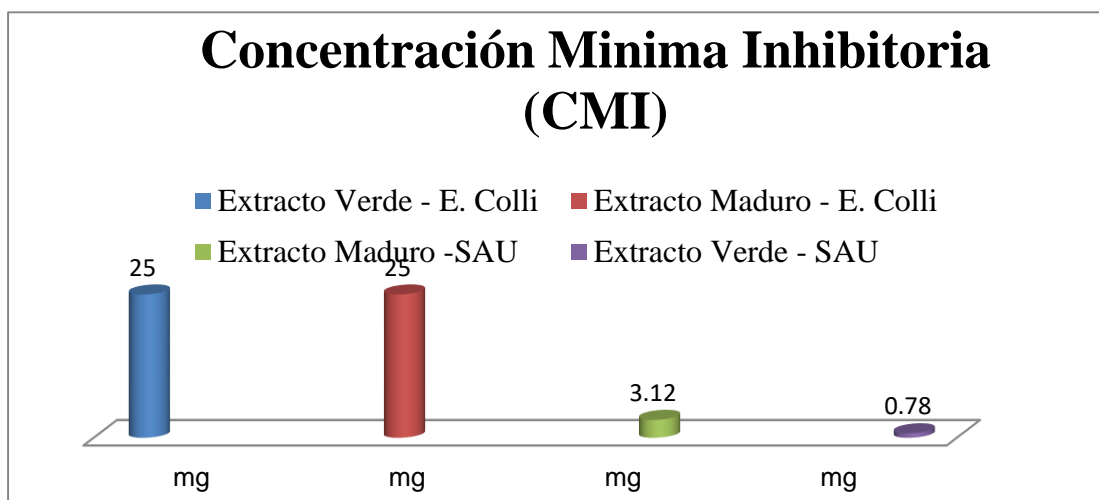


Grafico N° 1: Concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos verde y maduro ante ATCC 25922 *Escherichia coli* y ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Ante estos resultados, se identifica que la concentración inhibitoria mínima de los extractos tanto verde como maduro para la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 son las concentraciones descritas anteriormente. Ambos extractos inhiben el desarrollo visible de la cepa en estudio con eficacia pero con una diferencia de 2.34 mg entre cada extracto siendo así demostrado que el extracto verde brinda resultados inhibitorios en concentraciones reducidas.

Mientras tanto en el extracto maduro, es necesario dosis más grande de extracto para lograrlo. Es por ello que a la hora de elección de un extracto que pueda brindar los mejores resultados estaría el extracto verde ya que se lograría el mismo efecto con menores cantidades, reduciendo la cantidad de la muestra en estudio arrojando resultados esperados en las mismas condiciones pero con una concentración menor.

Es notorio que la concentración del extracto es proporcional a la inhibición puesto que entre más concentración de extracto puede inhibir aún más la cepa analizada. Desde el estudio farmacéutico es beneficioso contemplar que el extracto verde de nancite tenga el efecto inhibitorio en bajas concentraciones con la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923. Siendo esta una cualidad importante en el desarrollo clínico de cualquier fármaco antibacteriano ya que los parámetros de poseer actividad antimicrobiana, desarrollarlo a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped son analizados para cualquier antibiótico que este siendo propuesto e investigado. Y con las concentraciones identificadas de la CMI del extracto verde de nancite frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 se asevera que el extracto tiene un efecto a bajas concentraciones brindando resultados positivos como agente inhibitorio.

En los ensayos realizados para la cepa de *Escherichia coli* (ATCC) 25922 en ambos extractos verde y maduro la concentración mínima de inhibición fue en la dilución 1:2 equivalente a 25 mg/mL, por consiguiente, se necesitan concentraciones de 25 mg o más altas de extracto para poder tener un efecto inhibitorio contra la cepa.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Los extractos etanólicos de nancite tanto verde como maduro ante la cepa de *Escherichia coli* (ATCC) 25922 posee una inhibición pero no a las concentraciones reducidas como presento los mismos extractos frente a la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* considerando que los extractos en el proceso inhibitorio son más eficaz esta cepa. A la misma vez se observó que el rendimiento es aún mejor cuando es utilizado el extracto verde. Esto también fue descrito en el trabajo investigativo de (Rodríguez, 2014) describe que el extracto etanólico fraccionado que elaboro de la corteza de la planta de nancite (*Byrsonima crassifolia*), solamente fue efectivo frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Escherichia coli* no hubo ningún tipo de inhibición.

La eficacia del extracto verde al inhibir en menores cantidades está relacionada con que en los frutos verdes, en comparación con los frutos maduros, se encuentran mayormente concentrados algunos metabolitos secundarios, como por ejemplo, taninos y flavonoides a los cuales se le atribuyen varias propiedades entre ellas antioxidante y la de interés como antibacteriano. Ambos extractos son eficaces al poseer la actividad inhibitoria, sin embargo, el extracto verde es potente en términos terapéuticos como posible fármaco por su inhibición alta en bajas concentraciones en este estudio, demostrando ser un agente bacteriostático con actividad anti infecciosa.

4.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) en los extractos verde y maduro de nancite.

La CMB fue identificada por el método de difusión en agar o antibiograma. Este método permitió conocer a que concentración el extracto puede actuar como bactericida eliminando a las bacterias en estudio. Se llenó cada pozo con las concentraciones correspondiente del extracto entre 5 mg/mL a 20 mg/mL con un control positivo, con discos de Gentamicina de carga 10 µg/mL y definir su porcentaje de inhibición de acuerdo con el Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.

Con respecto al extracto verde frente a la cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922, en concentraciones de 5, 10 y 15 mg se obtuvieron porcentajes menores de 40 % por lo cual se

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

dice que se encuentra **Inactivo** a estas concentraciones, exceptuado el pozo que contenía una concentración de 20 mg presento un 42.30 %, el cual resulta como **Poco Activo**. Por ende, el extracto verde presenta actividad frente a la mencionada cepa, pero en la concentración más alta aplicada siendo esta la concentración mínima bactericida.

Con el extracto maduro, utilizando la misma cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922) el porcentaje de inhibición fue aún menor, reportando hasta 32.00% de inhibición arrojando una **Inactividad** del extracto, ya que sus resultados no se aproximan ni a un poco actividad a pesar de lograr halos inhibitorios. Reportando que no se puede considerar ninguna de sus concentraciones utilizadas en la difusión en agar en este procedimiento como bactericidas ante la cepa.

Extracto Verde - Cepa ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>			Extracto Maduro - Cepa ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>		
Concentración (mg / mL)	Halos de Inhibición (mm)	Porcentaje de Inhibición (%)	Concentración (mg / mL)	Halos de Inhibición (mm)	Porcentaje de Inhibición (%)
5	9	34.61	5	8	32.00
10	9	34.61	10	9	36.00
15	10	38.46	15	9	36.00
20	11	42.30	20	10	40.00
Control Positivo (10 µg)	26		Control Positivo (10 µg)	25	

Tabla N° 1 Resultados obtenidos en la determinación de la concentración mínima bactericida y acción antibacteriana y acción antibacteriana de la cepa *Escherichia coli* 25922 con ambos extractos.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Examinando los resultados es evidente ver que el extracto verde en concentraciones de 5 y 10 mg se obtiene el mismo halo de inhibición y porcentaje del mismo, pudiéndose afirmar que no hay diferencia si se aplican las 2 concentraciones pero esto cambia cuando se aplica 15 mg donde este genera un porcentaje de 38.46% con una diferencia de 3.84%. Y la diferencia entre 15 mg de extracto etanólico verde con 20 mg del mismo la diferencia es de 3.48% Observando estos resultados se afirma que el extracto etanólico verde posee un rendimiento en aumento de 3.84% por cada 5 mg con respecto a su acción inhibitoria frente a la cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922.

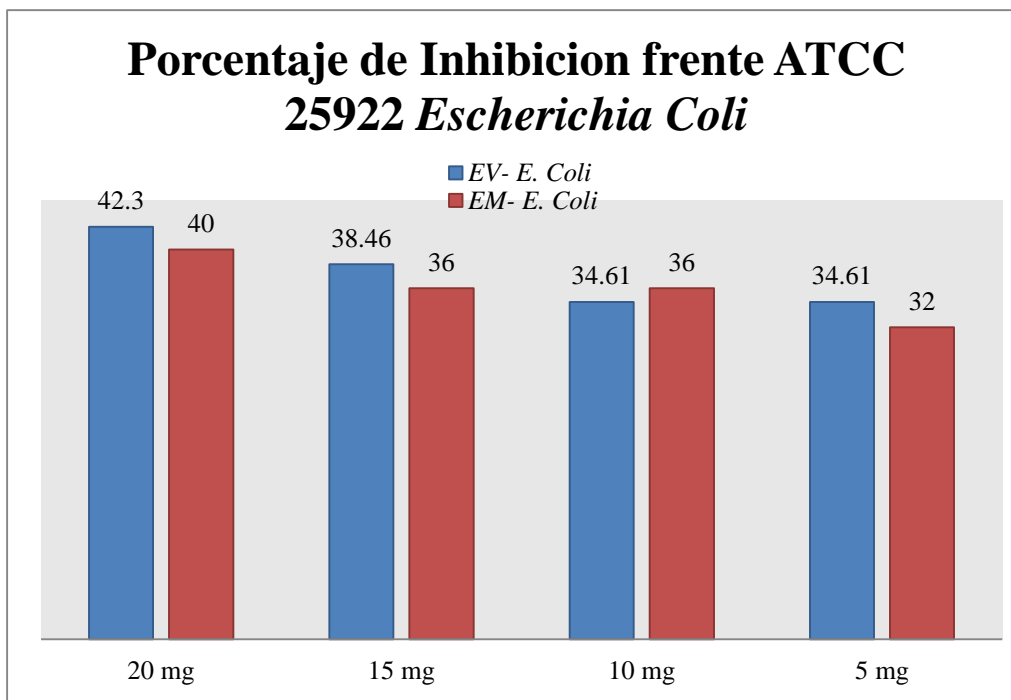


Grafico N°1: Resultados obtenidos en el porcentaje de inhibición de ambos extractos ante la cepa 25922 *Escherichia Coli* con ambos extractos.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

En el caso del extracto maduro con *Escherichia coli* (ATCC) 25922, sus porcentajes varían de 5 a 10 mg en un 2 % pero reporta que aplicando concentraciones de 10 y 15 mg refleja el mismo porcentaje de inhibición es decir que ambas concentraciones tienen el mismo efecto y una variación apenas de 2% entre 5 a 10 mg en su rendimiento. Para la concentración de 20 mg este efecto aumenta en un 4 % en la máxima concentración, siendo visible que la actividad inhibitoria mejora en 8 % desde la primera concentración pero aun así no es lo suficiente para poder lograr la capacidad bactericida del extracto necesario para poder decir que es activo como antimicrobiano para esta agente.

En ambos casos solo utilizamos como concentración máxima de 20 mg de extracto etanólico de nancite, se pudo visualizar que apenas con 25 mg en la macro dilución pudo inhibirse el crecimiento con mayor eficacia en el extracto verde en comparación con el extracto maduro, y para lograr una acción bactericida en el caso de la cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922 con extracto maduro sería necesario más de 25 mg; por ende con estas concentraciones no se pudo obtener una moderada o buena actividad del extracto.

Con respecto al extracto verde ante la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 en el antibiograma se obtuvieron porcentajes de inhibición en el rango de **Poco Activo**. El mayor fue de 50.0 % con una concentración de 20 mg de extracto y con la concentración mínima utilizada se obtuvo un 40.9 %. Lo que conlleva a señalar que el extracto verde posee propiedad bactericida en todas las concentraciones en estudio, frente a la cepa anteriormente mencionada.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Extracto Verde - Cepa ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i>			Extracto Maduro - Cepa ATCC 25923 <i>Staphylococcus Aureus</i>		
Concentración (mg / mL)	Halos de Inhibición (mm)	Porcentaje de Inhibición (%)	Concentración (mg / mL)	Halos de Inhibición (mm)	Porcentaje de Inhibición (%)
5	9	40.90	5	8	34.78
10	9	40.90	10	9	39.13
15	10	45.45	15	9	39.13
20	11	50.00	20	9	39.13
Control Positivo (10 µg)	22		Control Positivo (10 µg)	23	

Tabla N° 2: Resultados obtenidos en la determinación de la concentración mínima bactericida y acción antibacteriana y acción antibacteriana de la cepa 25922 *Escherichia coli* con ambos extractos.

También es necesario mencionar que los porcentajes del extracto etanólico verde en concentraciones de 5 y 10 mg da los mismos resultados de 40.9 % pero va en aumento de 4.55 % cuando se emplea 15 mg del extracto es decir que alcanza un mejor halo de inhibición a partir de dicha concentración y finalmente cuando se utiliza 20 mg el porcentaje también aumenta un 4.55 %; siendo así, este el rendimiento del extracto verde ante la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 por cada 5mg.

En el extracto maduro con la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 todos los porcentajes de inhibición fueron menor a 40 %, siendo el mayor el de la concentración de

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

20 mg con un 39.13 %, lo cual nos indica que se encuentra **Inactivo**, en consecuencia, este extracto no posee la cualidad de ser bactericida frente a este tipo de bacteria.

Analizando el rendimiento la única variación que hubo en las concentraciones fue entre la concentración de 5 mg con el resto de un 4.35 % puesto que las concentraciones de 10, 15, y 20 mg poseen el mismo porcentaje de inhibición, es decir, el extracto no varía en 15 mg empleados y no posee el efecto bactericida buscado en ninguna de sus concentraciones ante esta cepa de *Staphylococcus aureus*.

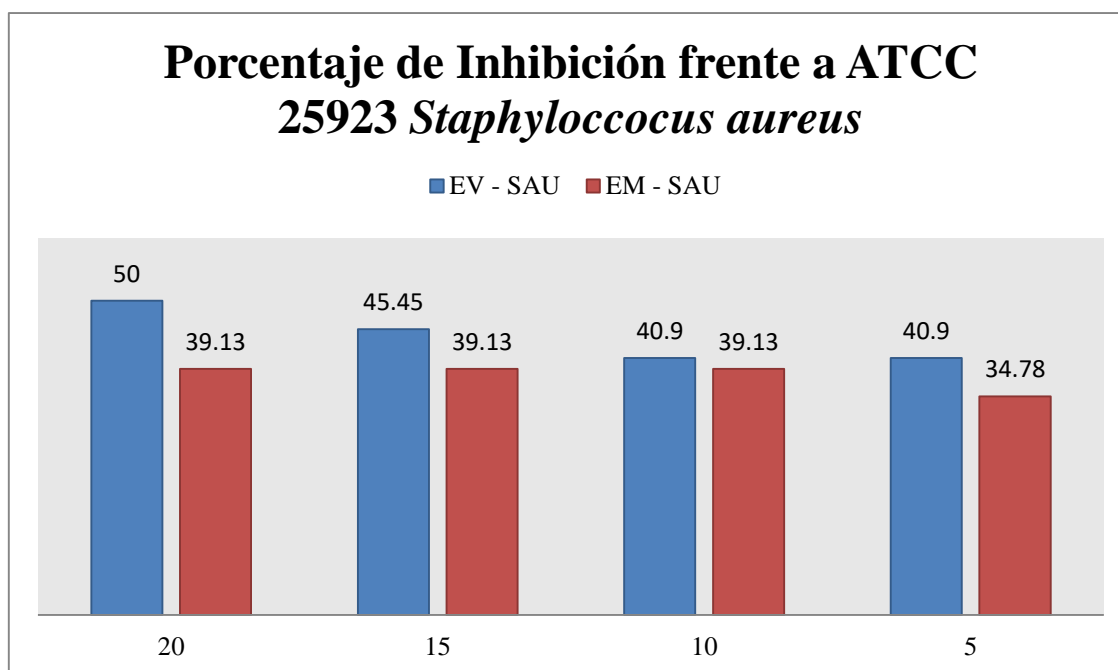


Gráfico N°3: Resultados obtenidos en el porcentaje de inhibición de ambos extractos ante la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus*

Ambos extractos ante la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 alcanzan halos de inhibición pero solo el extracto verde se considera como bactericida por la actividad reflejada en él un porcentaje de 50 % mientras que el extracto maduro se encuentra **Inactivo** y no ejerce la acción bactericida, al no estar en el rango de moderado o poco activo.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

La inactividad del extracto maduro ante ambas cepas tanto de *Escherichia coli* (ATCC) 25922 y *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 está ligada a que los frutos cuando inician su etapa de maduración van perdiendo sus propiedades, cambios de aroma, color y nutrientes y en nuestro caso de los metabolitos como compuestos fenólicos y flavonoides, taninos y otros responsables de la acción antibacteriana del fruto, mientras tanto en el fin de la etapa de crecimiento (fruto verde) se encuentran en mayor proporción.

Es por ello que el extracto verde genera mejores resultados como bactericida ante las cepas, pero con, mayor énfasis en la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 logrando hasta un 50 % de porcentaje de inhibición con 20 mg/ mL de extracto y de una concentración mínima de 0.78 mg/mL capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria. Para la cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922 presenta una inhibición mínima de 3.12 mg / mL de extracto, pero no fue capaz eliminar por completo la cepa con 20 mg.

Con el extracto maduro en ambas cepas estudiadas solo es capaz de inhibirlas con a una concentración de 25 mg siendo casi nula su actividad bactericida ante 20 mg. Concluyendo que la acción antibacteriana se encuentra en el extracto verde de nancite ante la cepa 25923 *Staphylococcus aureus* pues es aquí en donde se aprecia los resultados de bactericida en inhibitorio del extracto.

Es determinante notar con dichos resultados que los extractos etanólicos de nancite no es efectivo para *Escherichia Coli*, aún más el extracto maduro; en dicha bacteria gram negativa, es posible decir que no ataca bacterias de este tipo o estructura, probablemente por la estructura didérmica en la envoltura celular que presenta una doble membrana en el citoplasma siendo difícil ingresar o atacar la bacteria para su completa eliminación.

En el caso de la *Staphylococcus aureus* es significativo considerar el extracto etanólico como un agente antibacteriano ya que se ha presentado alarma de resistencia en el grupo de bacterias del tipo Cocos como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* y hacía, la vancomicina uno de los antibióticos más potentes (Cabrera, 2005) un fármaco de última

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

elección cuando la infección es resistente a la mayoría de los antibióticos, esto gracias al uso inadecuado de la población sobre los antibióticos generando la resistencia bacteriana con rapidez.

Por estas razones las alternativas de antibióticos de origen natural serían de gran ayuda en el tema de antibióticos y la ciencia farmacéutica puesto que generan grandes beneficios como la inocuidad, no generar resistencia a ellos por parte de las bacterias, favorecer el proceso de regeneración epitelial, el aumento de defensas en el organismo y estimular el funcionamiento de diversos órganos. (Cabrera, 2005)

El extracto etanólico de nancite aporta perspectivas positivas como posible antibiótico ante estos resultados la actividad presente como bactericida y antimicrobiano que puede ser potencia si es mejorado la dosis aplicada y la extracción del fruto. También agregando que logrando conocer la molécula y la cantidad de ella específicamente, la responsable de la acción antibacteriana se podría iniciar un estudio más exhaustivo del fruto como antibiótico. A pesar que el extracto del fruto no contiene la misma efectividad que tendría un extracto de la corteza en el estudio utilizado como antecedente para el procedimiento de las pruebas realizadas pero presenta la ventaja que genera más conservación ambiental y propiedades organolépticas asequible a un paciente a la hora de formular cualquier producto a base del fruto.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

5.1. Conclusiones

Se realizaron extractos etanólicos del fruto del nancite (*Byrsonima crassifolia*) verde y maduro, se observó que se pudo haber utilizado menos cantidad de solvente para obtener un extracto mayormente concentrado. Para ambas muestra se empleó la misma cantidad de soluto y solvente, pero se obtuvo mejor rendimiento en el extracto del fruto verde en comparación al extracto del fruto maduro con una diferencia de 15 mL entre ellos, notándose que el extracto verde produce mayor volumen, es decir un mayor rendimiento ya que para ambos se utilizó el mismo procedimiento y se trabajó bajo las mismas condiciones..

La concentración mínima inhibitoria fue determinada por el método de macrodilución en caldo, obteniendo que el extracto verde frente a la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 presentó la concentración mínima inhibitoria más baja, lo que significa que puede inhibir a concentraciones más pequeñas desde 0.78 mg/mL, siendo este el resultado más satisfactorio alcanzado durante el estudio.

Por el método de difusión en agar fue determinada la concentración mínima bactericida de ambos extractos. Teniendo como resultado para el extracto verde frente a la cepa *Escherichia coli* (ATCC) 25922 en las concentraciones de 5, 10 y 15 mg **Inactivo** y para 20 mg **poco activo**. En el caso del extracto maduro frente a la misma bacteria, todas las concentraciones dieron **Inactivo**. Para el extracto verde frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 todas las concentraciones originaron resultados de **poco activo**, para el extracto maduro contra este agente todas las concentraciones resultaron **Inactivo**.

El extracto etanólico del fruto verde presenta mayor actividad bactericida en comparación al extracto del fruto maduro y se pudo observar que actúa mucho mejor frente a la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923 inhibiéndola en todas las concentraciones en estudio, el extracto etanólico del fruto maduro se mostró totalmente inactivo frente a ambos agentes patógenos demostrando así que no es capaz de eliminar este tipo de bacterias.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

El extracto etanólico del fruto verde es el que posee actividad antibacteriana mayormente frente a la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC) 25923, sabiendo esto se puede concluir que si se continuara con los estudios para este extracto se podría conseguir el desarrollo de un nuevo fitofármaco que ayude a combatir este tipo de bacteria.

5.2. Recomendaciones

Habiendo obtenido los resultados antes presentados, se pueden hacer las siguientes recomendaciones para futuros estudios investigativos:

- Hacer un estudio fitoquímico del fruto para poder obtener una concentración exacta al instante de realizar los extractos.
- Realizar extractos de nancite en tiempos de maceración diferente, de 7 días ,15 días, 1 mes y 3 meses para comparar si el efecto del extracto varían en los diferentes tiempos d maceración .
- Estudiar los extractos etanólicos del fruto de nancite en el tipo de cepa de la especie *Candida Albicans* debido que empíricamente el fruto es utilizado contra infecciones de tipo vaginal que son causadas por levaduras para así, corroborar científicamente si contrarrestar estas afecciones.
- Emplear ensayos proximales para conocer residuos vegetales en el extracto, composición de proteínas y grasas contenidas en el, para conocer sus propiedades y realizar una formulación de acuerdo a ellas.
- Elaborar un suplemento alimenticio a base del fruto verde que ayude al alivio de infecciones gastrointestinales causados por *Staphylococcus aureus*. o *Escherichia coli*.
- Realizar investigaciones de la actividad antibacteriana de la hoja del árbol de nancite de la especie *Byrsonima crassifolia*.
- Utilizar fermentado de nancite (vino) para corroborar si este posee actividad antibacteriana ante microorganismos patógenos

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

Bibliografía

1. Arbizú, Ó. (12 de Septiembre de 2017). *El Nuevo Diario*. Obtenido de <http://www.elnuevodiario.com.ni/nacionales/439912-abuso-antibioticos-pone-riesgo-salud/>
2. Blanco., M. (19 de Agosto de 2008). *Las bondades del cultivo del nancite*. (L. Prensa, Entrevistador)
3. Cabello, R. R. (2007). *Bases de la etiología de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Panamá: Medica Panamericana.
4. Cabrera, Y. (2005). *SCIELO*. Obtenido de Revista Cubana de Medicina General: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252005000300025
5. Cervantes, E. (2014). *Características generales del Staphylococcus*. Revista Latinoamericana de patología clínica y de medicina de laboratorio.
6. Cos. P, V. A. (2006). *Potencial antiifecioso de los productos naturales como desarrollo de concepto invitro mas solida*. Epub 302.
7. Databio, I. N. (2012). *Ficha agente biologico. Staphylococcus Aureas*. Obtenido de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>
8. Fernández, C. C. (2009). *Plantas cosmestibles de Centroamérica* . Costa Rica : Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) .
9. Fernandez, M. (2012). *Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K.: Estudio fitoquímico y farmacológico*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
10. Forbes, B. (2009). *Diagnóstico microbiológico* (12 ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
11. Gamazo C. (2013). *Microbiología basada en la experimentación*. Barcelona España: GEA consultoria editorial, S.I.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

12. Gamazo C. (2013). *Microbiología Basada en la Experimentación*. Barcelona, España: Elsevier España, S.L.
13. García, J. C.-A. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Procedimientos en Microbiología Clínica. España: Editor Picazo J J. .
14. Guerra. (2013). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico y acuoso de Byrsonima Crassifolia "INDANO" mediante el método de difusión en agar*. Iquitos, Perú,: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
15. Gutiérrez, G. (15 de Septiembre de 2017). Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i0480s/i0480s06.pdf>
16. Humboldt, F. W. (1815-1825). *Nova Genera et Species Plantarum*. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/19500795>
17. Ingraham, J. (1997). *Introducción a la Microbiología*. Euned.
18. Jawetz. (2011). *Microbiología Medica*. México: Interamericana S. A.
19. Jover, G. y. (2004). *Manual del auxiliar de farmacia*. España: Editorial Mad, S.L.
20. Mijail Shapiama, A. B. (2016). *Actividad antifungica de fracciones del extracto etanolico de la corteza de Byrsonima crassifolia (Indano) frente a Candida Albicans y Trichophyton rubrum*. Iquitos, Peru: Universidad Nacional de la Amozonia Peruana.
21. Montoya, M. (2012). *Herramientas indispensables en el control de la calidad interno en Microbiología*. Obtenido de <https://docplayer.es/30245512-Maria-isabel-montoya-romero-especialista-en-microbiologia-clinica-directora-tecnica-coordinadora-de-calidad.html>
22. Moreno, G. (2015). *Evaluacion in vitro de la capacidad antioxidante del extracto del fruto del nanche (Byrsonima crassifolia)*. Veracruz: Universidad Veracruzana.

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

23. Moreno, M. (2006). *Caracterización morfológica de frutos y semillas de nanche (Byrsonima crassifolia (L) H.B.K.)*. Revista Chapingo, serie Horticultura, 17.
24. Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Panamá: Medica Panamericana 2da Edición.
25. Quiñonez, Y. (2014). *Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala.
26. Reller, L. W. (2011). *Performance Standards for Antimicrobial*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
27. Rivas, C. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. México: Omnia Publisher.
28. Rodríguez, S. (2014). *Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico fraccionado de Byrsonima crassifolia "indano" frente a Echerichia coli y Staphylococcus aureas por el método de difusión en agar*. Iquitos.
29. Sampieri. (2010). *Metodología de la Investigación*. Mexico: Interamericana editores S. A.

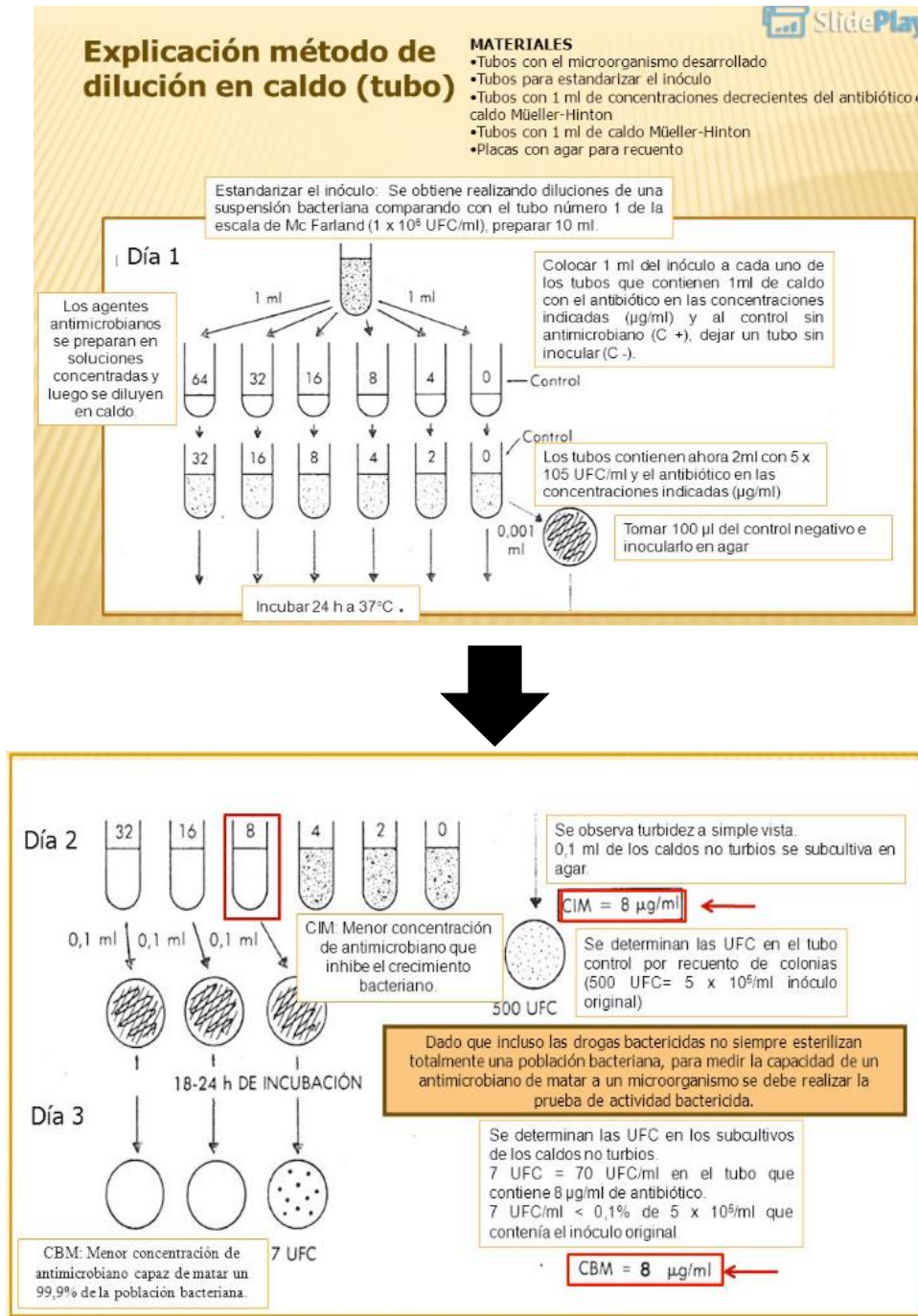
Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXOS

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 1

Ilustración N° 1: Procedimiento de Macro dilución en Caldo.



Fuente: *S*lideplayer.es

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

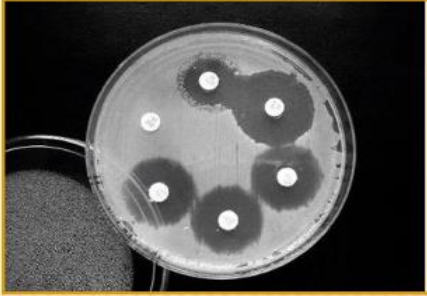
ANEXO 2

Ilustración N° 2: Procedimiento Antibiograma.

Resultados

Estándares de interpretación de zonas de diámetro.

Existen tablas específicas CLSI periódicamente publicadas que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente los niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos.



Categorías Interpretativas.



Sensible Una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.

Intermedio Implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y β -lactámicos en orina) o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej. β -lactámicos).

Resistente Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados.


↓

Siembra de las placas




Se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo, oprimiendo el algodón contra las paredes internas del tubo para descartar el exceso de líquido. Se aplica el hisopo sobre la superficie de las placas estriando uniformemente y rotando la placa cada 60°.

Colocación de los discos



Esperar entre 3 a 5 minutos y no más de 15 minutos antes de aplicar los discos, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. Colocar los discos con una pinza estéril cuidando que tengan un buen contacto con la superficie del agar haciendo una ligera presión. (22mm y 15 mm)

Incubación de las placas



Incubar las placas invertidas, en grupos no superiores a 5 placas, a 35°C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos durante 18 a 24 horas.

Fuente: *Slideplayer.es*

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 3

Formula N° 1: Cálculos para determinar el solvente a utilizar.

Según Guerra (2013), para la determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico acuoso de *Byrsonima crassifolia* "INDANO" mediante el método de difusión en agar se planteo lo siguiente.

- Muestra Vegetal de nancite: 1200 g
- Cantidad de solvente (etanol): 3,000 mL

Se obtiene la siguiente relación:

1200 g muestra vegetal	-----	3,000 mL solvente
600 g de muestra vegetal nancite		X

$$x = \frac{600 \text{ g} * 3,000 \text{ mL}}{1,200 \text{ g}} = 1,500 \text{ mL solvente}$$

Formula N° 2: Concentración porcentual del extracto en mg / mL.

Para realizar la maceración del extracto se necesitaron:

- Muestra Vegetal nancite: 600 g
- Cantidad de solvente (etanol 99.9%): 1,500 mL

$$x = \frac{600 \text{ g}}{1,500 \text{ mL}} * 100 = 40\%$$

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 4

Tabla N°1: Homogenización de las muestras con el solvente.

N° de muestras.	Cáscaras de Nancite Maduro.	Disolvente mL (Etanol 99.9%)	N° de muestras.	Cáscaras de Nancite Verde.	Disolvente mL (Etanol 99.9%)
1	200 g	90	1	100 g	250
2	200 g	500	2	200 g	250
3	200 g	500	3	200 g	250
Se completó con		410	4	100 g	250
			Se completó con		500
Muestra final a macerar		1,500	Muestra final a macerar		1,500

Tabla N° 2 Extracción de solvente con rotavapor.

Parámetros	Extracto Verde	Extracto Maduro
Cantidad de extracto filtrado	250 mL	250 mL
Temperatura	78.0 °C	78.5 °C
RPM	60	60
Tiempo	50 minutos	1 hora y 10 minutos
Recuperación	60 mL	50 mL

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 5

Tabla N° 3: Protocolo para determinar la actividad antibacteriana de un extracto.

Actividad Antimicrobiana	Porcentaje de Inhibición
Inactivo	< 40 %
Poco Activo	40 – 50 %
Moderado Activo	51 – 75 %
Buena Actividad	> 76 %

Fuente: *Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007*

Formula N°3: Determinación del porcentaje de Inhibición

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

Fuente: *Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007*

Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 6

Figura N° 1: Árbol de nancite.



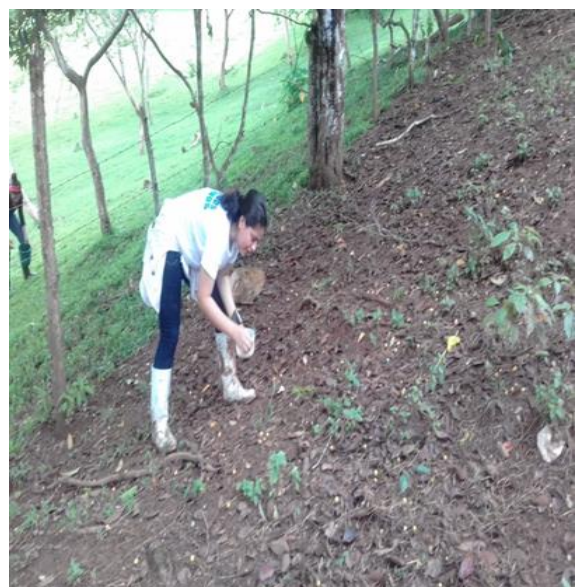
Figura N° 2: Fruto de nancite verde



Figura N° 3: Frutos de nancite maduro



Figura N° 4: Recolección de frutos



Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 7

Figura n° 5: Lavado y preparación de la muestra. Vegetal.

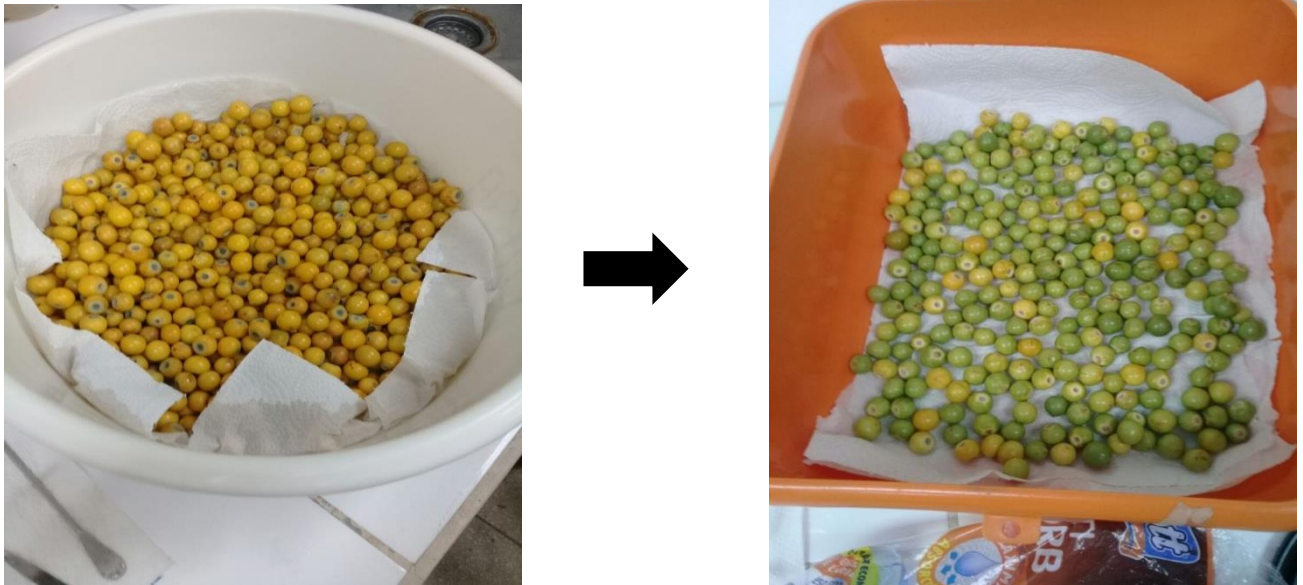
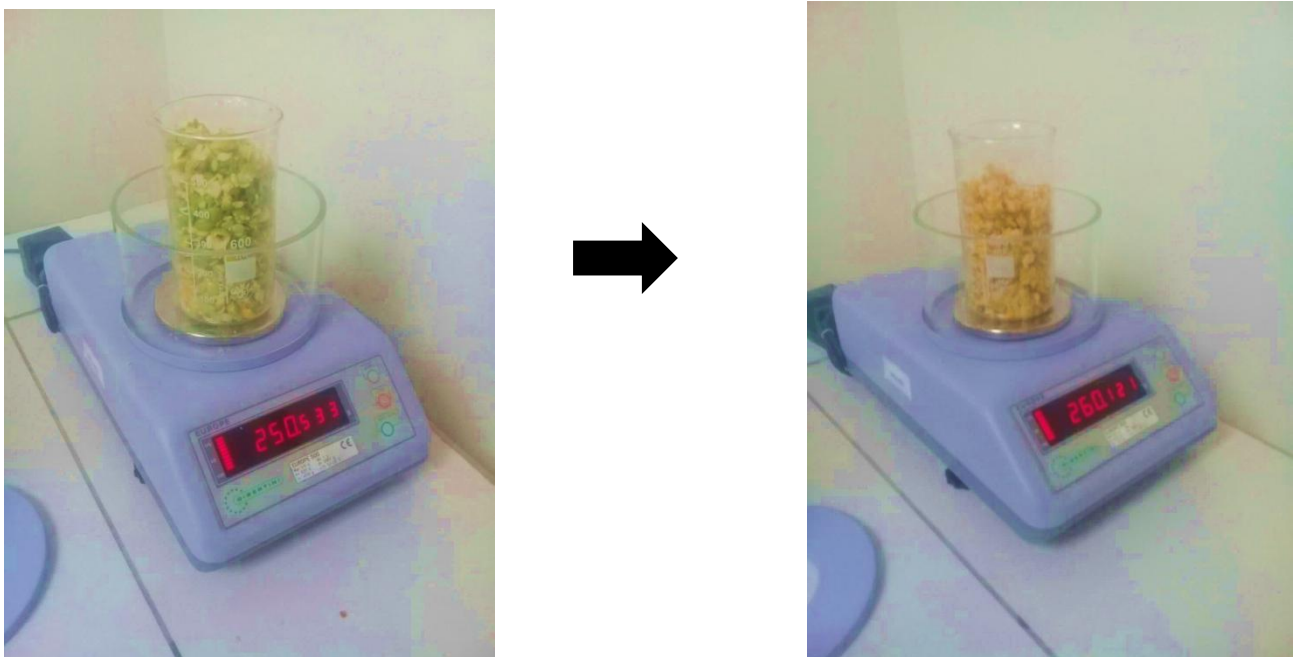


Figura n° 6: Pesada de la muestra vegetal.



Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 8

Figura N° 7: Homogenización de la muestra con el solvente (Etanol 99.9%)



Figura N°8: Macerados de la muestra vegetal almacenados por 7 días protegidos de la luz.

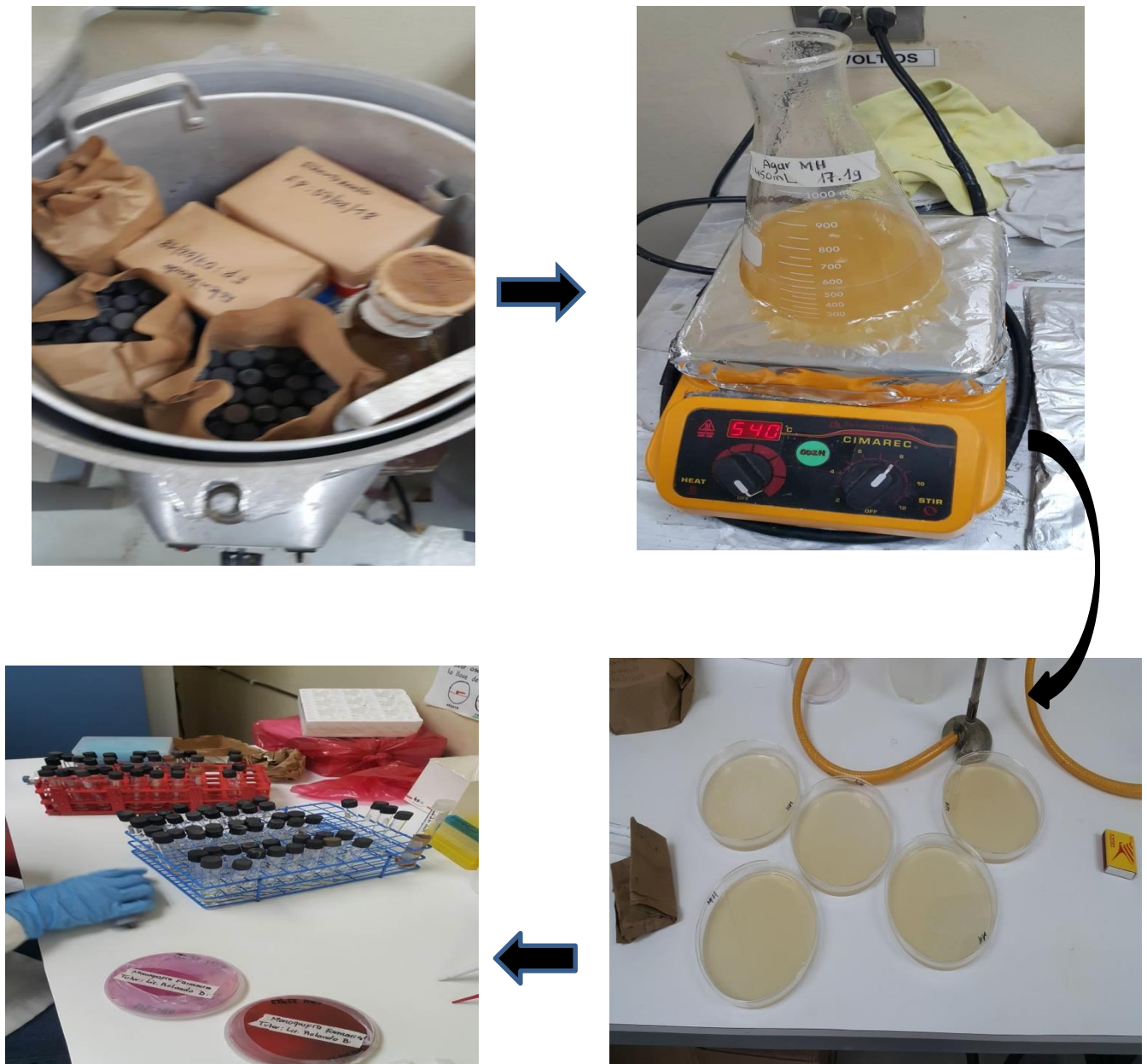
Figura N° 9: Extracción de solvente con rotavapor.



Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 9

Figura N° 10: Preparación de medios de cultivo y activación de cepas



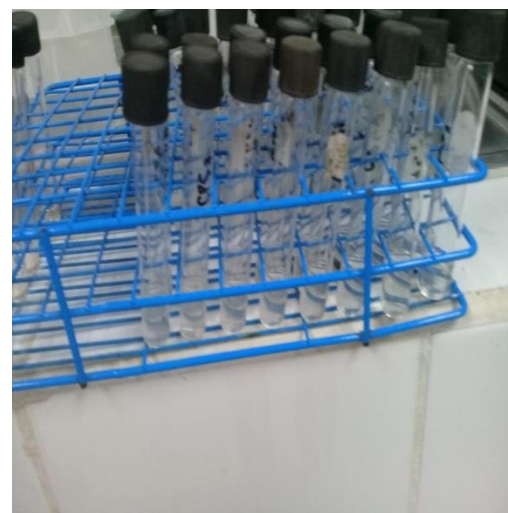
Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 10

Figura N° 11: Realización de macrodilución en caldo.



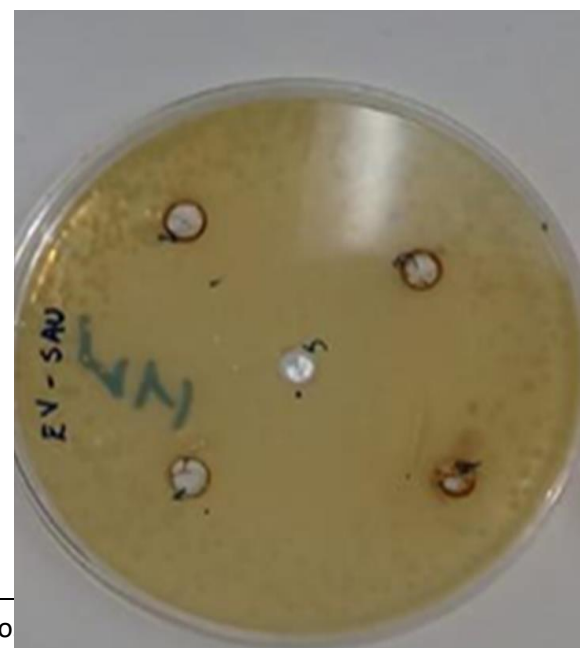
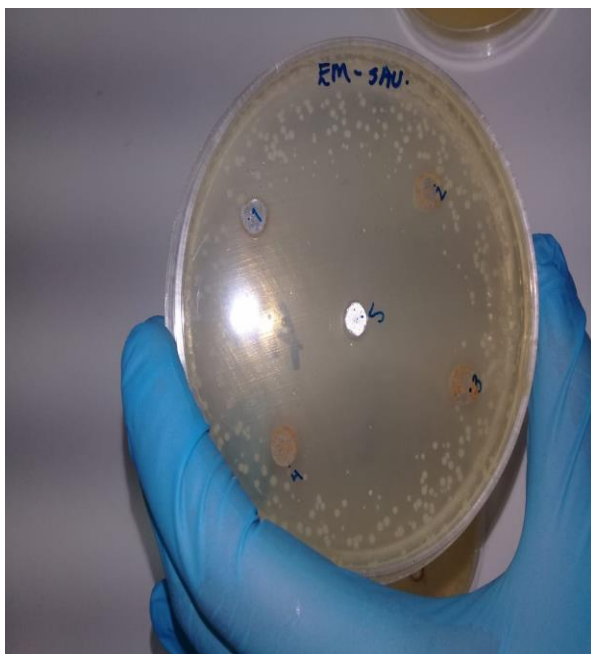
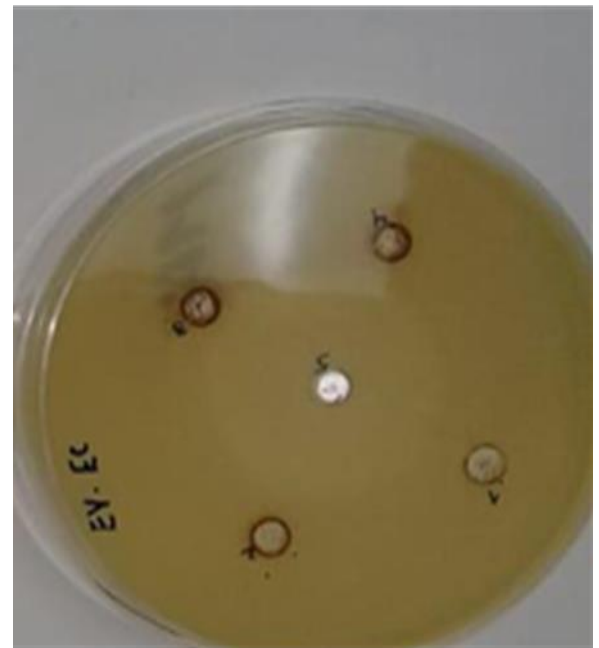
Figura N° 12: Lectura de Resultados de la concentración mínima inhibitoria.



Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 11

Figura N° 13: Lectura de Resultados Antibiograma.



Análisis de la acción antimicrobiana del extracto etanólico del fruto del nancite verde y maduro (*Byrsonima crassifolia*) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

ANEXO 12

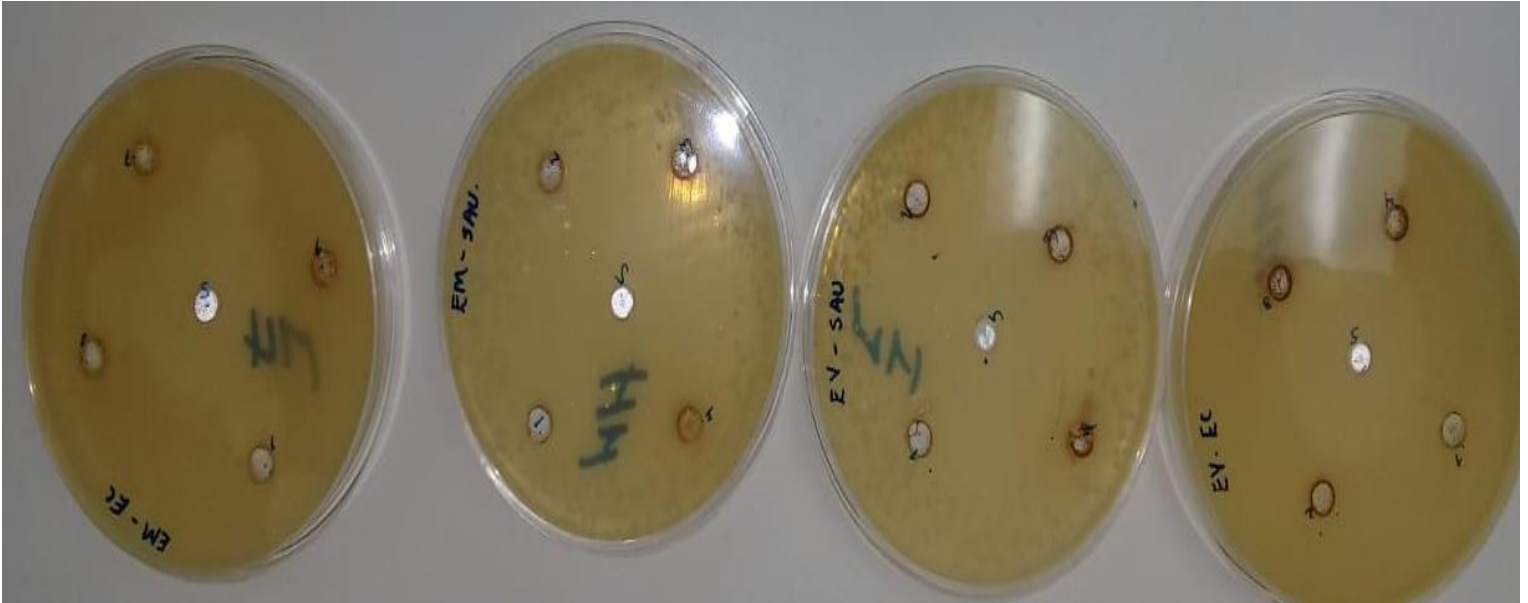


Figura N° 14: Antibiograma

Glosario

Afección: Enfermedad que se produce en una determinada parte del organismo.

Agar: Sustancia gelatinosa que se obtiene a partir de ciertas algas.

Anti fúngico: Que evita el desarrollo de hongos, los destruye o detiene su crecimiento.

Antiinflamatorio: Que combate la inflamación o sus síntomas.

Antipirético: Que reduce la fiebre.

Asepsia: Ausencia de gérmenes que puedan provocar una infección.

Astringente: Que produce desecación y contracción de los tejidos.

Bactericida: Este tipo de antibiótico que no sólo inhibe el crecimiento, sino que es letal para las bacterias. Ellos provocan la muerte del microorganismo de manera reversible ocasionando su muerte. (Gamazo C., 2013)

Bacteriostático: Producto que inhibe el crecimiento de los microorganismos dentro de un individuo. (Cabello, 2007) Estos bloquean la multiplicación de las bacterias, pero no las destruyen puesto que la multiplicación se reinicia luego de la eliminación del fármaco en el organismo.

***Byrsonima Crassifolia*:** Fruto pulposo de color amarillo en su maduración, con fuerte olor característico. Nombre común: Nancite o nanche.

Concentración mínima bactericida (CMB): Este es un concepto que determina la concentración de antibiótico capaz de eliminar por completo un inoculo microbiano específico (muerte celular) y erradicarlo definitivamente del huésped infestado.

Concentración mínima inhibitoria (CMI): Término utilizado en el laboratorio que permite definir la menor cantidad de concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la cual dichos antibiótico puede inhibir el crecimiento de microorganismos.

Dilución: Sustancia que resulta de diluir una cosa en un líquido.

Escala McFarland: Es un estándar de turbidez, el cual es de gran utilidad para tener una idea aproximada de la población bacteriana en una muestra. Preparación del estándar 0,5 de McFarland: añadir 0,05 mL de BaCl_2 0,048 M (1,75% [p/v] de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 9,95 mL de H_2SO_4 0,36 N (1% v/v).

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

Flavonoides: Término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de plantas.

Halo de Inhibición: Es el diámetro de la zona de inhibición que debe medirse alrededor del disco, que se utiliza para determinar la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición, expresada en milímetros, debe interpretarse como sensible, intermedia o resistente según las categorías establecidas por los organismos oficiales.

Hongos: Reino al que pertenecen los organismos sin clorofila, provistos de talo generalmente filamentosos y ramificados.

Incubar: Mantener a una temperatura de calor constante.

Inóculo: Término colectivo para referirse a los microorganismo o sus partes capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfiere a un huésped.

Lactonas: Es un compuesto orgánico del tipo éster etílico. Se forma como producto de la condensación de un grupo alcohol con un grupo carboxílico en una misma molécula.

Levaduras: Hongo unicelular que produce enzimas capaces de provocar la fermentación alcohólica de los hidratos de carbono.

Metabolitos: Sustancia que el cuerpo labora o usa cuando descompone los alimentos, los medicamentos o sustancias químicas; o su propio tejido.

Patogenicidad: Es la capacidad de un microbio para producir enfermedades en huéspedes susceptibles. Así mismo es un atributo de género y especie.

Polifenoles: Grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula.

Riboflavina: Es un nucleótido formado por la base nitrogenada flavina y por la pentosa ribitol que forma parte del complejo B.

Turbidimetria: Técnica analítica de medición que determina cuando se atenúa un haz de luz que se traslada a través de una suspensión.