UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGÍA

Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* "granada" y *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. José Ernesto Romero Flores

Br. Elizabeth Sarai Villegas Manay

Lambayeque – Perú
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGIA
Y PARASITOLOGÍA

Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* "granada" y *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. José Ernesto Romero Flores

Br. Elizabeth Sarai Villegas Manay,

Lambayeque – Perú
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGÍA

Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* "granada" y *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*

Aprobado por:

Mblga. Teresa Silva García _____
Presidente

Dra. Carmen Carreño Farfán _____
Secretario

Lic. Julio Silva Estela _____
Vocal

Lic. Mario Moreno Mantilla _____
PATROCINADOR

Lambayeque – Perú
2017

AGRADECIMIENTO

A DIOS,

Por demostrarnos su amor incomparable
y sus cuidados incondicionales.

Por la FAMILIA que fue apoyo.

Por Los asesores y docentes que nos encaminaron
en esta investigación.

"Y antes que clamen responderé yo;
mientras aún hablan yo habré oído".
Isaías 65:24

J. Ernesto Romero Flores
E. Sarai Villegas Manay

Índice

I. INTRODUCCIÓN……..... 1

II. MARCO TEÓRICO…….. 4

2.1. Antecedentes sobre la investigación realizada……... 4

2.2. Base Teórica……..... 8

2.2.1. Sustancias activas de las plantas empleadas……..... 9

2.2.2. Resistencia antimicrobiana …… 11

III. MATERIALES Y MÉTODOS……..... 13

3.1 Material……..……..... 13

3.1.1. Material biológico…….. 13

3.1.2. Población y muestra…..…… 13

3.2. Métodos……. 13

3.2.1. Variables de estudio……..... 13

3.2.2. Tipo de Estudio y diseño de contrastación…… 17

3.2.3. Aislamiento e identificación de las cepas Bacterianas…… 17

3.2.4. Técnica para la obtención del extracto etanólico y preparación de las concentraciones de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” y sus concentraciones.…….…… 21

3.2.5. Actividad antimicrobiana de la cáscara de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”…… 26

3.2.6. Pruebas de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida…… 30

3.2.7. Análisis Estadístico de Datos……..……..…… 33

IV. RESULTADOS……..……..……..……..…… 34

4.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida……..……..……..…… 38

4.2. Análisis estadísticos……..……..……..…. 44

V. DISCUSIÓN……..……..……..……..……..... 49

VI. CONCLUSIONES……..……..……..……..……. 52

VII. RECOMENDACIONES……..……..……..……..… 53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…..…….……..……..... 54
IX. REFERENCIAS LINKOGRÁFICAS……..……..……..... 59
X. ANEXOS…… ……..……..……..... 60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de los extractos etanólicos de flores secas de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor y de *Punica granatum* “granada”……..... 27

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de flores secas de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” y de *Punica granatum* “granada”……..... 32

Tabla 3. Promedios del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*, enfrentadas al extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”……..... 37

Tabla 4. Promedios del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*, enfrentadas al extracto etanólico de *Punica granatum* “granada”……. 37

Tabla 5. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*, frente a los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*……..... 45

Tabla 6. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de las cinco concentraciones de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*”…… 45

Tabla 7. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*…… 46

Tabla 8. Prueba de significancia de Tukey del promedio del halo de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum* frente a las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*…… 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 01 Fruto maduro de *Punica granatum* “granada” 14

Fig. 02 Flores secas de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” 14

Fig. 03 Cepas de *Staphylococcus aureus*..... 15

Fig. 04 Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*..... 15

Fig. 05 Cepas de *Vibrio cholera*..... 16

Fig. 06 Cultivo de *Staphylococcus aureus* en Agar Sangre……..... 18

Fig. 07 Cultivo de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado..... 18

Fig. 08 Prueba de Coagulasa para *Staphylococcus aureus*..... 19

Fig. 09 A. *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en Agar Cetrimide y en pruebas de identificación: B. Agar Tripticasa Soja, C. Agar Hierro Triple Azúcar y D. Agar Citrato de Simmons..... 19

Fig. 10 A. *Vibrio cholera* cultivado en Agar TCBS y en pruebas de identificación: B. Caldo peptonado (Prueba de Indól), C. Agar Hierro Triple Azúcar, D. Agar Citrato de Simmons y E. Agar Tripticasa Soja……. 20

Fig. 11 Pesado de la cáscara de *Punica granatum*……..... 22

Fig. 12 Pesado de flores secas de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor”…… 22

Fig. 13 Macerado de cáscaras de Punica granatum “granada” en alcohol..... 23

Fig. 14 Macerado de flores de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” en alcohol… 23

Fig. 15 Filtrado del macerado de *Punica granatum* ……..... 24

Fig. 16 Filtrado del macerado de las flores *Syzygium aromaticum* …….. 24

Fig. 17 **E**xtracto de *Punica granatum* en la estufa para la evaporación del alcohol……..... 25

Fig. 18 Extracto de *Syzygium aromaticum* en la estufa para la vaporación del alcohol…… 25

Fig. 19 Placas de Petri con Agar Muller Hinton para la prueba de Suceptibilidad bacteriana……..... 29

Fig. 20 Siembra en la superficie de la placa de Agar Muller Hinton con el inoculo de cada cepa incubado durante 24 horas 31

Fig. 21 Discos embebidos con los extractos, incluyendo el del control..... 31

Fig. 22 Resultados del enfrentamiento de las 3 cepas de *Staphylococcus aureus*; fila superior Extracto de Granada, fila inferior extracto de Clavo de Olor…….. 35

Fig. 23 Resultados del enfrentamiento de las 3 cepas de *Vibrio cholerae*; fila superior Extracto de Granada, fila inferior extracto de Clavo de Olor……. 35

Fig. 24 Resultados del enfrentamiento de las 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; fila superior Extracto de Granada, fila inferior extracto de clavo de olor…….. 36

Fig. 25 Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor frente a la especie *Staphylococcus aureus* Cepa 1……..…….. 39

Fig. 26 Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de granada frente a la especie *Staphylococcus aureus* Cepa 1…….. 39

Fig. 27 Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor frente a la especie *Vibrio cholerae* Cepa 2…… 40

Fig. 28 Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Granada frente a la especie *Vibrio cholerae* Cepa 3…… 40

Fig. 29 Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Clavo de Olor frente a la especie *Pseudomonas aeruginosa* Cepa 3..... 41

Fig. 30 Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Granada frente a la especie *Pseudomonas aeruginosa* Cepa 3…….……..... 41

Fig. 31 Placas de Petri cultivadas a partir de la prueba de CMI con el extracto de Clavo de Olor y de Granada frente a la Cepa 1 de la especie *Staphylococcus aureus*. Fila superior Extracto de Granada – Fila inferior Extracto de Clavo de Olor…… 42

Fig. 32 Placas de Petri cultivadas a partir de la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor y de granada frente a la Cepa 3 de la especie *Vibrio cholerae*. Fila superior Extracto de clavo de olor – Fila inferior Extracto de granada.. 42

Fig. 33 Resultados de la siembre a partir de la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor y de granada frente a la Cepa 3 de la especie *Pseudomonas aeruginosa.* Fila superior Extracto de clavo de olor – Fila inferior Extracto de granada ……..…….... 43

Fig. 34 Promedio del halo de inhibición (mm) con respecto a las cinco concentraciones utilizadas de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*……. 47

Fig. 35 Promedio de los halos de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*……. 47

Fig. 36 Promedio del halo de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera* frente a los extractos etanólicos de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”…… 48

Índice de anexos

Anexo 1. Clasificación Taxonómica de *Punica granatum* “granada”….. 60

Anexo 2. Clasificación Taxonómica de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”……. 61

Anexo 3. Clasificación química de los taninos…….. 62

Anexo 4. Clasificación química de los Eugenol…… 62

Anexo 5. Diagrama de obtención del extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* y *Punica granatum*…….. 63

RESUMEN:

El uso indiscriminado de la automedicación como práctica cotidiana de las persona a lo largo del tiempo han logrado que los principales microorganismos que provocan infecciones intrahospitalarias hayan desarrollado mediante cambios genéticos resistencia ante antibióticos de los cuales se esperaría normalmente que tengan sobre estos microorganismos efecto bactericida o inhibitorio por lo que la medicina a redireccionado el tratamiento de estos microorganismos hacia la medicina natural. Cubillo, (2007). Este proyecto de investigación analiza el efecto inhibitorio frente al crecimiento de tres principales patógenos sometiéndolos a la presencia de extractos etanólicos de especies vegetales de las que se tiene referencia pueden inhibir su crecimiento, durante el desarrollo del presente trabajo se midió que tanto efecto se evidenció del crecimiento o no normal de las bacterias en estudio. En la presente investigación se utilizaron cepas bacterianas obtenidas a partir de muestras clínicas las mismas que se identificaron y sometieron a los extractos antes mencionados; teniendo como resultado que las cepas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Vibrio cholerae,* fueron inhibidas por los extractos etanólicos de *Punica granatum* y de *Syzygium aromaticum* en las diferentes concentraciones utilizadas en el proceso experimental. Además, se observó que, a medida que las concentraciones de los extractos aumentaban, el efecto inhibitorio era mayor, siendo así que se observó que para la cepa de Staphylococcus aureus el efecto inhibitorio fue mucho mayor que en el caso de *Pseudomonas aeruginosa y Vibrio cholerae,* llegando a presentar un halo de inhibición que oscilan entre 13 a 20 mm.de diámetro frente a la presencia del extracto de *Syzygium* aromaticum mientras que para el extracto de *Punica granatum* presentó un halo que varió entre 12.44 mm y 20.55 mm de diámetro.

Palabras claves: *Efecto inhibitorio, Extracto etanólico, Staphylococcus aereus, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Punica granatum, Syzygium aromaticum, Resistencia antimicrobiana.*

ABSTRAC:

The indiscriminate use of self-medication as a daily practice of the person over time have made major microorganisms that cause hospital-acquired infections have developed through resistance genetic changes to antibiotics which are normally expected to have on these microorganisms bactericidal or inhibitory effect so medicine redirected treating these microorganisms to natural medicine. Cubillo, (2007). This research project analyzes the inhibitory effect against the growth of three main pathogens by subjecting them to the presence of ethanolic extracts of plant species of which reference can inhibit their growth, During the development of the present study it was measured that so much effect was evidenced of the growth or not normal of the bacteria in study. In the present investigation bacterial strains obtained from clinical samples were used which were identified and subjected to the abovementioned extracts; with the result that strains of *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae, w*ere inhibited by the ethanolic extracts of *Punica granatum* and *Syzygium aromaticum* in the different concentrations used in the experimental process. In addition, it was observed that, as the extracts concentrations increased, the inhibitory effect was greater, so it was observed that for the strain of *Staphylococcus aureus* the inhibitory effect was much greater than in the case of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* , reaching a halo of inhibition ranging from 13 to 20 mm in diameter against the presence of the extract of *Syzygium aromaticum* while for the extract of *Punica granatum* presented a halo that varied between 12.44 mm and 20.55 mm in diameter.

Keywords: Inhibitory effect, ethanolic extract, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae,* Punica granatu*m, Syzygium aromaticum*, Antimicrobial Resistance

I.INTRODUCCIÓN

La resistencia microbiana que en la actualidad enfrentan las ciencias médicas ha aumentado considerablemente y se ha convertido en un problema de carácter mundial, el uso irracional de antimicrobianos ha derivado en la dispersión de microorganismos que han adaptado sus defensas y desarrollado resistencia a drogas de primera línea, de bajos costos y de efectivo tratamiento (INS, 2007*).*

En las salas de cuidados intensivos de nuestro país se ha evidenciado que los microorganismos más importantes son bacterias como *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* (INS, 2007*)* y las cuales son causa de mortalidad en dichas salas (Mamani *et al*., 2006); en el caso de *Staphylococcus aureus* es un patógeno extremadamente versátil que depende de un conjunto de proteínas asociadas a la pared celular que le confieren patogenicidad estafilococcica multifactorial; en repetidos estudios sobre la inhibición de su crecimiento se obtuvieron resultados que muestran la inhibición de su crecimiento como en la producción de enzimas coagulasa, DNAsa, termonucleasa, y lipasa (Nuñez et al, 2007*).*

Por su parte *Pseudonomas aeruginosa* ha permanecido entre los primeros lugares como agente etiológico de múltiples infecciones intrahospitalarias y lidera los gérmenes multirresistentes, otros factores adicionales como los procedimientos invasivos, uso de ventilación mecánica, edad, diabetes y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se han descrito como factores de riesgo para infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente (MDR-PA) (Cuesta et al., 2012).

En el caso de *Vibrio cholerae* se sabe que desde el año 1997 el Instituto Nacional de Salud y la Organización Panamericana de la Salud inició el Sistema de Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos de microorganismos ligados a enfermedades diarreicas agudas y ha sido reconocida como un problema vinculado a la seguridad alimentaria debido a los brotes de cólera que se

presentaron a nivel mundial y de las cuales resultaron más de 120 000 muertes anuales, en su mayoría niños (Alarcón., 2002).

La resistencia adquirida de los microorganismos a sustancias antibiótica ha sido el motivo de inicio para la utilización de sustancias extraídas a partir de plantas consideradas medicinales debido a las referencias de costumbres tradicionales de diferentes partes del mundo (Cubillo, 2007*).* Entre estas plantas se destacan los extractos hechos a partir de *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" planta nativa de Indonesia perteneciente a la familia de las *Lythraceae* (Celis, 2010*),* de la cual se sabe que contiene una sustancia fenólica llamada Eugenol, el cual actúa nivel de la pared bacteriana aumentando la permeabilidad tanto en la pared como en la membrana bacteriana llevando al patógeno a su muerte. (Hall et al., 2002) esta planta ha sido probada en muchos trabajos de investigación y se ha comprobado su mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias Gram positivas en comparación con el crecimiento de Gram negativas (Herrera et al*.,* 2006).

Otra planta medicinal cuyo fruto posee propiedades terapéuticas es *Punica granatum* L*.,* En los últimos años, algunas investigaciones experimentales han sido dirigidas al estudio de las propiedades antigenotóxicas de este extracto como una valiosa propiedad adicional. Algunos fitocomponentes del fruto de la granada muestran una actividad antioxidante potente y existen resultados experimentales que demuestran su capacidad como agentes antimutagénicos naturales (Sánchez *et al.,* 2005*).*

La realización del presente trabajo de investigación se centró en la respuesta de la siguiente interrogante: ¿Tiene efecto inhibitorio in vitro el extracto etanólico de cáscara de *Punica granatum* y el extracto de *Syzygium aromaticum* sobre cepas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*?

El objetivo general de la investigación fue: Determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de cáscara de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae.*

Los objetivos específicos: Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de cáscara de *Punica granatum* “granada” y del extracto etanólico *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae. y* Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto etanólico de cáscara de *Punica granatum* “granada” y del extracto etanólico *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae.*La hipótesis planteada fue: El extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* y del extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y V*ibrio cholerae*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Estudió la enfermedad que causa *Vibrio cholerae* y las formas de controlarla con tratamientos de medicina natural alternativa que los gobiernos están incentivando en América Latina y recaba los datos de varias investigaciones hechas en Perú, Uruguay, México y otros países y sus fundamentos científicos; habla acerca de estos resultados y de la importancia que debe tomar el tratamiento alternativo natural con los extractos y aceites esenciales elaborados a partir de una variedad de entre catorce y veinticinco plantas distintas entre las que figura *Púnica granatum* y las recomienda como buenas alternativas del control en el avance del cólera , además no sólo resalta estudios hechos sólo en *Vibrio cholerae* sino también en bacterias patógenas como: *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus (*Alarcón, 2002*).*

El efecto inhibitorio de concentraciones de aceites esenciales de clavo de olor, canela, y tomillo frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus* y sus consecuencias en la producción de coagulasa, termonucleasa y enterotóxina. Con ese fin se agregaron diferentes concentraciones de los aceites esenciales a Caldo Cerebro Corazón. La producción de enterotóxina en presencia y en ausencia de los aceites esenciales se determinó por la técnica de enzimoinmunoensayo (ELISA). Los resultados obtenidos indicaron que bajas concentraciones no afectan el crecimiento, reducen la producción de las enzimas ensayadas y de enterotoxina lo que es importante cuando consideramos su potencial aplicación en alimentos para evitar contaminaciones bacterianas y en la industria farmacéutica para la aplicación a pacientes también infectados por esta bacteria (Núñez et al., 2007).

Las plantas medicinales como ajo, canela, cola de caballo, clavo de olor entre otros, en especial el aceite de clavo de olor es un antiséptico, antibacterial, fungicida, antiviral, espasmolítico y un anestésico local. El principal componente del aceite esencial de clavo de olor es el eugenol (4-alil-2-metoxifenol) encontrándose en un 70-90%, acetato de eugenol 17%, Beta-cariofileno y su oxido en un 5-12%. También se reportó que el aceite presenta una acción estimulante del apetito y la digestión. Puede administrase como polvo, triturado o la hierba entera para la obtención del aceite esencial y en otras preparaciones galénicas para uso tópico. Sugieren dosis diarias en soluciones acuosas correspondientes a un 1-5% del aceite esencial utilizándose de forma externa para realizar enjuagues bucales. El aceite esencial no diluido es empleado en odontología (Hall et al., 2002).

El potencial inhibitorio de especies naturales con propiedades antimicrobianas (canela, clavo de olor, orégano y pimienta) sobre *Escherichia coli* O157; H7, *Listeria monicytogenes*, *Salmonella sp*., *Penicilium sp.* y *Aspergillus sp*., por medio de técnica de difusión en agar. El efecto con respecto a especias que son secadas con óxido de etileno y al utilizar diluciones de las especias con respecto a la aplicación de la especia en peso seco. Tanto la canela como el clavo de olor y el orégano, mostraron cierto grado de inhibición sobre microorganismos estudiados; en cambio la pimienta no fue capaz de inhibir el crecimiento microbiano. Tampoco se obtuvo una gran diferencia al utilizar las especias en peso seco con respecto al uso de diluciones de estas (Cubillo, 2007).

El efecto del extracto acuoso de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” a concentraciones de 1% y 2%, disminuye el índice mitótico del ciclo celular en meristemos radiculares *de Allium cepa* “cebolla” var. Roja Arequipeña. Para ello, se indujo el crecimiento de raicillas, estableciéndose tres tratamientos (T1, T2 y T3): T1 (agua), T2 (extracto acuoso de clavo de olor al 1%), T3 (extracto acuoso de clavo de olor al 2%) durante 16 horas de exposición a cada uno de ellos. Después de la emergencia y exposición de las raicillas a los tratamientos, se

realizó el montaje, coloración y posterior lectura microscópica. Los resultados muestran una disminución del índice mitótico en T2 y T3, alcanzando su mínimo (11.07%) en T3. En cuanto al índice profásico se observó un incremento en los diferentes tratamientos con respecto a T1, llegando hasta 54,22% en T3. Estos resultados se explicarían debido a que probablemente se estaría afectando la normal actividad de las ciclinas mitóticas; debido a los compuestos con capacidad oxidante como taninos, ácidos, ésteres triterpénicos, alcaloides, heterósidos de sitosterol y estigmasterol, entre otros presentes en el extracto acuoso. Lo cual también explicaría la presencia de figuras mitóticas anormales como puentes anafásicos y células binucleadas presentes en T2 y T3. Por otro lado, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, lo cual fue confirmado mediante la prueba de comparación múltiple de promedios (Saldaña et al*.,* 2012).

Punica granatum L. es una planta medicinal cuyo fruto posee propiedades terapéuticas. En los últimos años, algunas investigaciones experimentales han sido dirigidas al estudio de las propiedades antigenotóxicas de este extracto como una valiosa propiedad adicional. Algunos fitocomponentes del fruto de la granada muestran una actividad antioxidante potente y existen resultados experimentales que demuestran su capacidad como agentes antimutagénicos naturales. El presente trabajo se expuso la capacidad que tiene el extracto de granada para disminuir el daño inducido por el peróxido de hidrógeno en células de ovario de Hamster chino cultivadas in vitro. Se realizaron experimentos de carácter citogenético como es el intercambio de cromátidas hermanas y citofluorimétrico. En las condiciones experimentales de esta investigación, el extracto de frutos enteros de granada fue capaz de secuestrar especies reactivas del oxígeno producidas por el peróxido de hidrógeno, mecanismo mediante el cual ejerce su acción protectora del ADN frente a las lesiones causadas por este agente (Sánchez et al*.,* 2005).

El trabajo tuvo por finalidad la elaboración de una jalea a base de granada a la que se le añadirá componentes antioxidantes que son parte de la cáscara de la granada para el control del nivel de glucosa en pacientes con diabetes mellitus, confirmar las concentraciones que tienen este efecto y las concentraciones dañinas para el organismo; sin embargo en la recopilación de los antecedentes bibliográfico encontramos datos en los que se informa sobre la actividad antibacteriana que posee la cáscara de este fruto. Así también el trabajo indica la composición de la cascara de granada y los enumera atribuyéndoles actividad microbiana. Se concluye con que ambas sustancias son diferentes en composición; al usar los extractos y jaleas se reduce el nivel de glucosa en sangre de un paciente diabético con una concentración de 25gm/kg por lo que atribuye un gran poder terapéutico a una de las partes del fruto de la granada (Ventura, 2012).

El efecto bactericida de los extractos acuosos de canela, clavo de olor, laurel y tomillo sobre cepas de importancias en la salud alimentaria y se midió que tanto es que logran inhibir el crecimiento el crecimiento de *Staphylococcus aureus, E. coli, Salmonella* spp. *,y Bacillus* spp.. Aplicando métodos ya estandarizados para calcular CMI y CMB en medio líquido y determinar el efecto antimicrobiano en placa, concluyendo que el extracto del clavo de olor muestra un gran efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias Gram positivas en el caso de este trabajo *Staphylococcus aureus* que al compararlo con el crecimiento de bacterias Gram negativas estas últimas no muestras ningún problema en crecer en presencia de este extracto (Herrera et al*.,* 2006).

El efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto de *Punica granatum* cultivada en Chao (La Libertad, Perú) sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa.* Se trabajó con cinco concentraciones del extracto (500; 250; 125; 62.5, y 31.25 mg/ mL) y Gentamicina como control positivo. El efecto se determinó siguiendo lo propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS); sembrando un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad 0,5 del

Nefelómetro de Mac Farland en placas con Agar Mueller Hinton por la técnica placa vertida y a su vez se realizó la Concentración Mínima Bactericida a partir de las concentraciones de: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 y 0.98 mg/mL, respectivamente, para *Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*. Se observó que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico aumenta porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana en el rango de 31,25 a 500 mg/mL. También se demostró que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Staphylococcus aureus y Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum* (Bernal et al*.,* 2014).

2.2. Base teórica

Punica granatum, es un arbusto o arbolillos con las ramas terminadas en espinas, perteneciente a la familia de las *Myrtaceae*; que puede crecer entre 2 a 5 metros de alto, habiendo variedades que solo crecen 40 cm. Es nativa de Irán donde se expandió por la región mediterránea y el sudeste de Asia (Anexo 1). Algunos trabajos de investigación recientes sugieren que el consumo de granadas podría tener efectos beneficiosos para la salud cardiovascular y la prevención de ciertos tipos de cáncer. En cuanto a medicina tradicional se emplea a *Punica granatum* en gargarismos, alivia la tos persistente, y es eficaz en caso de fiebre, de diarreas, de cólico y puede servir también de vermífugo. Tiene ligeras propiedades diuréticas y antihipertensivas (Llatas, 2008).

A *Syzygium aromaticum,* se le denomina comúnmente como clavo de olor o clavero es un árbol de la familia de las *Lythraceae* las que tardan unos 20 años en desarrollarse con una altura entre 12 y 15 metros (Anexo 2). Es una planta nativa de Indonesia y en la medicina tradicional es usada para combatir el mal aliento, para el malestar estomacal y como un expectorante. El aceite de clavo de olor se utiliza para la diarrea, las hernias, para los gases intestinales, las náuseas

y los vómitos; también se aplica directamente a las encías para el dolor de muelas, para controlar el dolor durante el procedimiento dental y para una complicación que puede ocurrir después de la extracción de un diente que se conoce como "alveolitos seca." Es aplicado a la piel como un contra irritante para el dolor y para la inflamación de la boca y la garganta (Celis, 2010).

Syzygium aromaticum “clavo de olor”, ha sido reconocido como analgésico, antiséptico, carminativo, antibacteriano y antifúngico. Este es un producto natural obtenido por destilación de tallos, flores y hojas trituradas de la planta del clavo, cuyo principal ingredientes es el eugenol (85 – 95 % del total/ 4-alil-2-vaselina); está compuesto además por acetileugeno, α y β cariofilenos y pequeñas cantidades de ésteres, cetonas y alcoholes. Como antiseptico, la acción de los aceites esenciales es similar a un efecto bacteriostático; sin embargo, algunos de sus componentes químicos parecen tener propiedades bactericidas (Gamboa y Vásquez, 2015).

2.2.1. Sustancias activas de las plantas empleadas

El Eugenol es un derivado fenólico (Anexo 4) conocido comúnmente como esencia de clavo, que también puede extraerse de pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites. El Eugenol es empleado en estomatología, a menudo mezclado con óxido de zinc, como material de obturación temporal, y es un componente de las preparaciones higiénicas orales. En ocasiones, es utilizado como saborizante. Igualmente ha sido utilizado como sedante pulpar, cementante provisional, apósito quirúrgico, obturador de conductos, anestésico tópico, protector dental, como desinfectante en la obturación de los conductos radiculares y en el revestimiento pulpar. El Eugenol es bactericida a relativamente altas concentraciones (10^{-2} a 10^{-3} mol/L). Una exposición breve a 10^{-2}mol/L de Eugenol mata las células de mamíferos, así como una exposición prolongada a 10^{-3} mol/L. Se han demostrado que concentraciones de Eugenol que difunden a través de la dentina son no citotóxicas, aunque bajas concentraciones también pueden inhibir la respiración y la división celular (González, 2002).

El Eugenol es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de “clavo” (flor seca que sirve de condimento de cocina y con forma de clavo), el extracto de ésta planta se ha industrializado teniendo varios usos comerciales, como: condimento que acompaña algunos alimentos, aromatizante de algunos perfumes y también forma parte de la fórmula de algunos insecticidas; la industria odontológica no ha escapado de su comercialización y la producción de éste componente se añade al Óxido de Zinc para que, al mezclarlos se forme un compuesto llamado Eugenolato de Zinc, cuyas características lo hacen utilizable con fines de restaurar temporalmente piezas dentales. Es un aceite líquido de color amarillo claro con un punto de ebullición de 24.7ºC. Posee un delicado olor a clavel de trébol y un sabor amargo. Su forma azeo-trópica se mezcla con Etilen glycol y ácido benzoico. Se obscurece y espesa al exponerlo al aire y rápidamente se evapora a temperatura ambiente. Es soluble en ether, etanol y cloroformo e insoluble en glycol y propilen glycol (Maldonado et al., (2008).

El término “tanino” se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados (Anexo3), en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Domingo y López Brea., 2003).

Punica granatum “granada”, es un arbusto de importancia económica y agrícola en las sociedades en que su cultivo es de mayor frecuencia como en las zonas de Asia, Europa y Centroamérica que por lo general presentan ambientes cálidos o secos; el cultivo de esta especie está muy ligada a su culturales de estas zonas ya que por sus compuestos bioactivos (taninos) resulta ser de beneficio para la salud humana. Los taninos son compuestos hidrolizables que se dividen en galotaninos y elagitaninos; estos últimos dan como producto a una molécula más

estable; El ácido elágico es un compuesto formado por cuatro grupos fenoles (cuatro anillos) y dos lactonas, lo que le confiere a esta sustancia algunas propiedades biológicas entre ellas están la función de ser un potente antiviral, antimicrobiano, antihumoral y antioxidante.

A demás, al examinar el fruto de la granada determinó que el 40% de su peso lo representa la cáscara la cual contiene en un gran porcentaje compuestos polifenólicos de los cuales contiene en su mayoría son taninos de tipo elagitaninos que le confieren a la planta resistencia ante el ataque de virus provocando la inactivación además de inhibir el crecimiento de una variedad amplia de microorganismos como bacterias y hongos (Aguilar et al., 2013).

2.2.2. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de carácter mundial según lo dice la INS debido al uso irracional de medicamentos de primera línea, de bajos costos y efectivos para tratar las infecciones que son causadas por los microorganismos que ahora son las principales causas de mortandad en centros médicos y en salas de urgencias para esto el INS y la OPS se unieron para vigilar la resistencia de las principales cepas bacterianas a nivel nacional en laboratorios registrados y centros de salud principal como lo son hospitales regionales, en todos reportaron como principales agentes infecciosos *Staphylococcus aureus, Staphylococcus* coagulasa negativo, *Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus, Enterobacter, Escherichia coli, Candida albicans, Klebsiella* sp*. Y otros (Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, Haemophylus influenzae)*.

En el desarrollo de dicho trabajo revisaron y reportaron tablas de control de resistencia a antimicrobianos en las que *Staphylococcus aureus* se sitúa entre el segundo y tercer lugar en cada tabla a nivel nacional, *Pseudomonas aeruginosa* se ubica en el quinto lugar y *Vibrio cholerae* es una de las bacterias ligadas a las enfermedades diarreicas agudas con mucha importancia de vigilancia en cuanto a la resistencia antimicrobiana que ha desarrollado desde las epidemias del cólera

presentadas en diferentes partes del mundo; estas tres bacterias son las principales causas de muertes en las salas de urgencias y en su gran mayoría niños (INS, *2007*).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material biológico

El material biológico, estuvo constituido por la Cáscara de *Punica granatum* "granada", recolectada en la sección de ventas de especias de las instalaciones del Mercado Modelo de Chiclayo departamento de Lambayeque; las flores secas de *Syzygium aromaticum* "clavo de olor", recolectadas en el mismo lugar (Figuras 1, 2) y cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae,* aislados e identificados en el Laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Figuras 3, 4, 5)

3.1.2. Población y muestra

La población la conformaron las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa,* obtenidas del Laboratorio de Microbiología humana de la Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. La muestra estuvo representada por tres cepas bacterianas por cada especie.

3.2. Métodos

3.2.1. Variables de estudio

Independiente: Extracto etanólico de cáscara de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*.

Dependiente: Crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae.*

Figura 1. Fruto maduro de *Punica granatum*.

Figura 2. Flores secas de *Syzygium aromaticum*.

Figura 3. Cepas de *Staphylococcus aureus.*

Figura 4. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa.*

Figura 5. Cepas de *Vibrio cholerae.*

3.2.2. Tipo de Estudio y diseño de contrastación

El trabajo de investigación se clasifica según al fin que persigue como una investigación Aplicada, según la técnica de contrastación como Experimental (Hernández, 2011).

En la contratación de hipótesis se consideró de estímulo creciente (Goode y Hatt, 1976)

3.2.3. Aislamiento e identificación de las cepas Bacterianas

Cultivos puros de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Vibrio cholera,* aislados e identificados en el Laboratorio de Microbiología Humana a partir de muestras clínicas. Para identificar *Staphylococcus aureus,* se sembraron en placas previamente estériles con Agar sangre en las que se comprobó las características culturales de las colonias rodeadas de hemolisis (Figura 6), y se realizó las pruebas de fermentación del manitol en aerobiosis y anaerobiosis (Figura 7) y la prueba de coagulasa (Figura 8). Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* se sembraron en una placa previamente estéril con Agar Cetrimide y se identificaron mediante las pruebas de Oxidasa, TSI, Citrato y producción de pigmento (Figura 9), y los cultivos de *Vibrio cholerae* fueron sembradas en una placa de Petri previamente estéril con Agar TCBS e identificadas mediante las pruebas de Oxidasa, TSI, Indól y String Test (Figura 10).

Figura 6. Cultivo de *Staphylococcus aureus* en Agar Sangre.

Figura 7. Cultivo de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado.

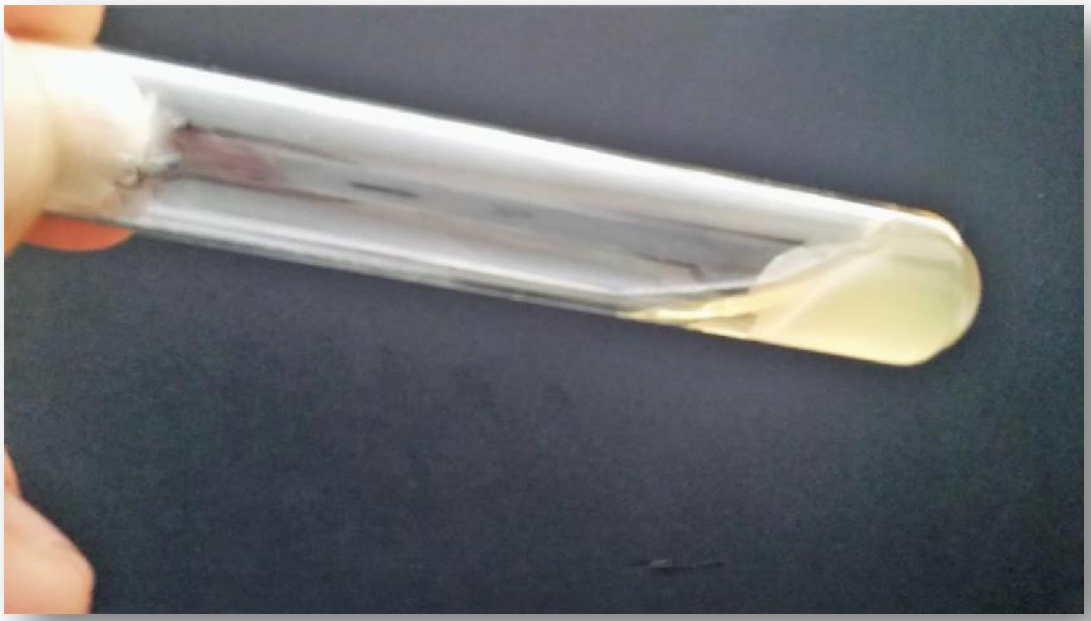


Figura 8. Prueba de Coagulasa para *Staphylococcus aureus*.

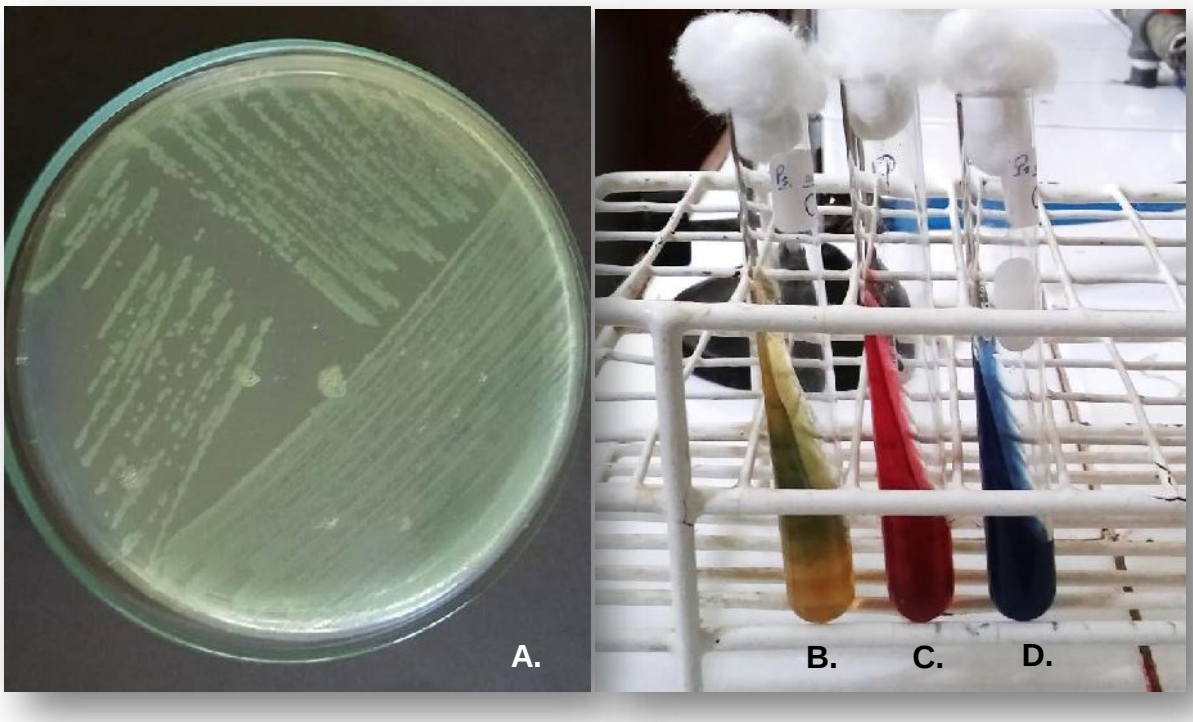


Figura 9. A. *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en Agar Cetrimide y en pruebas de identificación: B. Agar Tripticasa Soja, C. Agar Hierro Triple Azúcar y D. Agar Citrato de Simmons.

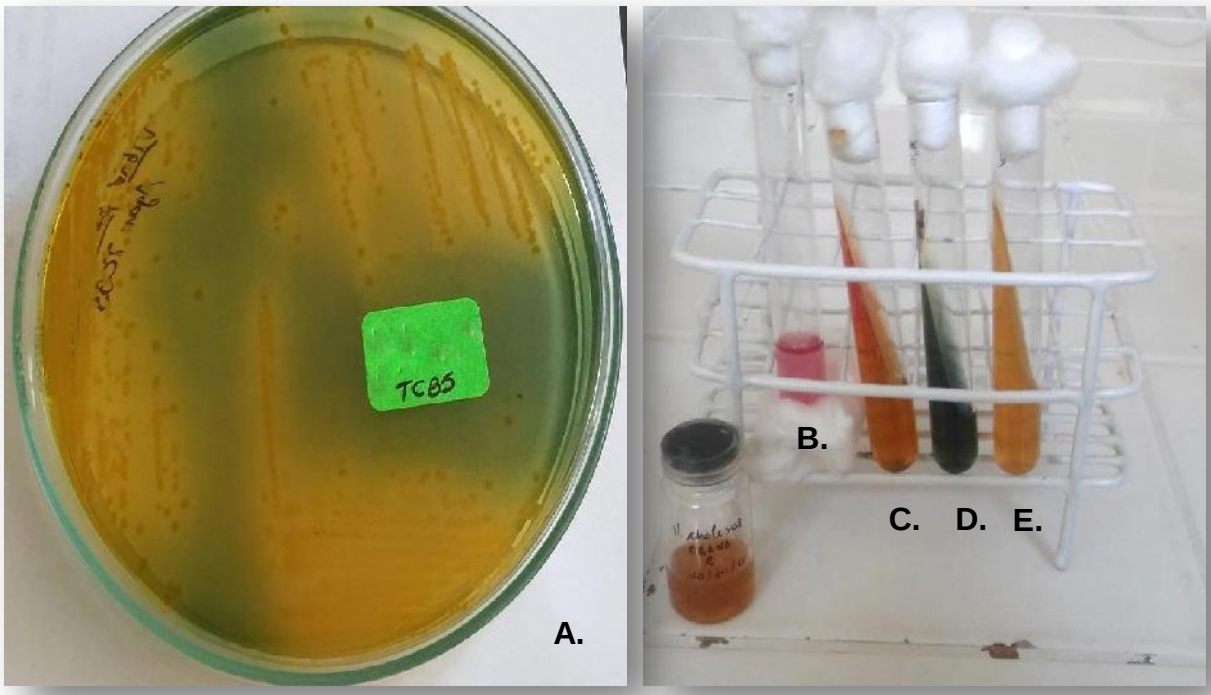


Figura 10. A. *Vibrio cholera* cultivado en Agar TCBS y en pruebas de identificación: B. Caldo peptonado (Prueba de Indól), C. Agar Hierro Triple Azúcar, D. Agar Citrato de Simmons y E. Agar Tripticasa Soja.

3.2.4. Técnica para la obtención del extracto etanólico y preparación de las concentraciones de *Punica granatum* **"granada" y** *Syzygium aromaticum* **"clavo de olor" y sus concentraciones.**

Las especies vegetales en estudio; granada y clavo de olor , se llevaron a secado y maceración para la obtención de los extractos finales con los que se trabajó siguiendo los pasos ya indicados en trabajos de investigación tomados como referencia (Anexo 5) (Gonzales, 2014). También se calculó y preparó cada concentración utilizada en la investigación.

a) **Obtención de los extractos etanólicos de la cáscara de** *Punica granatum* **"granada" y de las flores secas de** *Syzygium aromaticum* **"clavo de olor"**

Una vez recolectado el fruto de *Punica granatum* "granada" y las flores secas de *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" de las inmediaciones del Mercado Central de Chiclayo en el departamento de Lambayeque en horas de la mañana, se llevaron al Laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo", En el Laboratorio, se procedió a quitar la cáscara y separarla del fruto, se realizó el lavado de las cáscaras con abundante agua potable y luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2%, seguidamente se volvió a lavar con agua destilada estéril, para eliminar el cloro residual. Se procedió de la misma manera con las flores de *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" (Figuras 11, 12).

Las cáscaras ya cortadas y las flores se deshidrataron al horno a 60°C. Luego se trituraron las cáscaras y las flores de clavo de olor y se colocaron en un frasco grande de vidrio de aproximadamente 1000mL de capacidad (Figuras 13, 14). Se procedió luego agregar el doble de etanol al 96 %, es decir en proporción 1:2 para su posterior maceración por 7 días. En seguida guardaron los frascos en un ambiente oscuro. Pasado el tiempo de maceración, se llevó a cabo el filtrado (Figuras 15, 16), con papel filtro Whatman Nº 1 y luego se

colocó el macerado en crisoles para su evaporación, hasta obtener los extractos secos (Figuras 17,18).

Figura 11. Pesado de la cáscara de *Punica granatum.*

Figura 12. Pesado de flores secas de *Syzygium aromaticum*.

Figura 13. Macerado de cáscaras de *Punica granatum "granada"* en alcohol.

Figura 14. Macerado de flores de *Syzygium aromaticum* "clavo de olor" en alcohol.

Figura 15. Filtrado del macerado de cáscaras de *Punica granatum*.

Figura 16. Filtrado del macerado de flores de *Syzygium aromaticum*.

Figura 17. Extracto de *Punica granatum* en la estufa para la evaporación del alcohol.

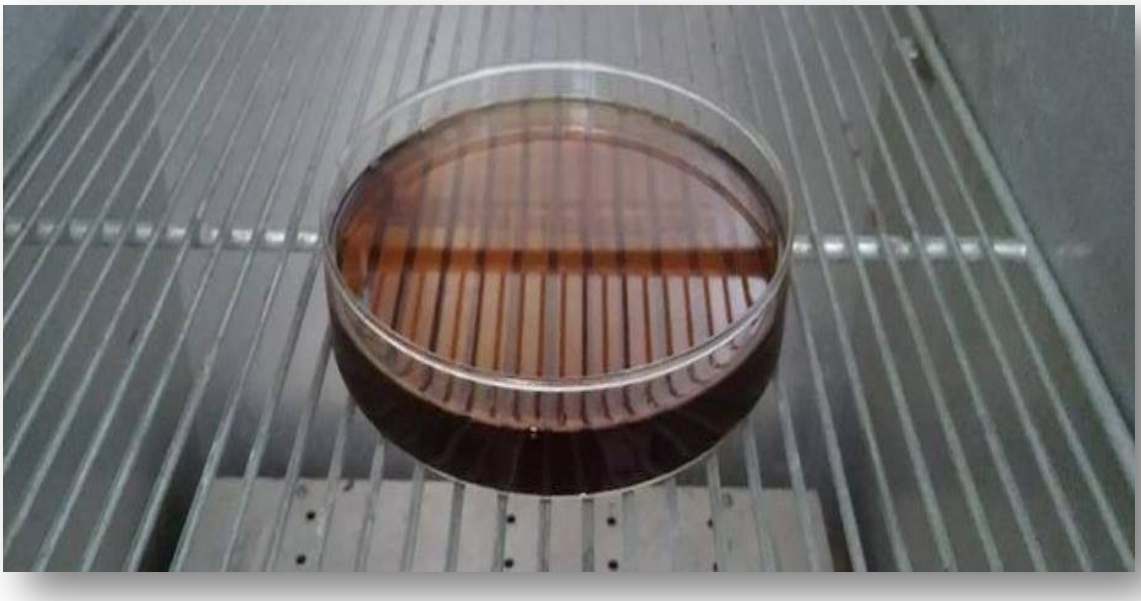


Figura 18. Extracto de *Syzygium aromaticum* en la estufa para la vaporación del alcohol.

b) **Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de flores secas de** *Syzygium aromaticum* **"clavo de olor" y cáscara de** *Punica granatum* **"granada"**

Los extractos se pesaron y se agregó el doble de alcohol al 40%, para obtener una concentración de 500 mg/ mL. A partir de esta solución madre se procedió a realizar las respectivas diluciones para obtener las concentraciones de 100mg/ml, 200mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL, 500 mg/mL, Tomando un volumen de la solución madre y completando con agua destilada estéril (Tabla 1).

3.2.5. Actividad antimicrobiana de la cáscara de *Punica granatum* "GRANADA" y *Syzygium aromaticum* "CLAVO DE OLOR"

Se procedió a enfrentar los extractos ya listos frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera* siguiendo una serie de pasos que se detallara a continuación.

a) **Preparación del inóculo bacteriano según método descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú**

Para la preparación del inóculo bacteriano según el Manual de procedimientos para pruebas de suceptibilidad del INS, 2010 donde se utilizó solución salina fisiológica esterilizada (NaCl 0,86 % p/v) como diluyente para 1 ó 2 colonias del cultivo bacteriano puro del que se hizo la estandarización hasta obtener una densidad poblacional semejante al tubo Nº 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland equivalente a 1.5×10^8 UFC/ mL

Tabla 1. Concentraciones de los extractos etanólicos de flores secas de *Syzygium aromaticum* y de *Punica granatum*

Solución madre (ml)	Agua destilada esterilizada (mL)	Concentración (mg/ml)
2	0	500 (+)
1	1.25	400
1	1.6	300
1	2.5	200
1	5	100

(+)Concentración de la solución madre

b) **Preparación de discos de susceptibilidad**

Se utilizó el papel Whatman Nº 01 con el cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador. Estos discos se colocaron dentro de tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave (15 Lb. de presión a 121 ºC por 15 minutos) para luego secarlos en horno a 80ºC por 24 horas.

Una vez esterilizados, los discos, se inocularon con 20ul de cada una de las concentraciones del extracto etanólico de cáscaras de *Punica granatum* y del extracto etanólico de flores de *Syzygium aromaticum* (100mg/ml, 200mg/mL, 300mg/mL, 400mg/mL, 500mg/mL), se dejaron reposar por 5 minutos para luego ser utilizados en la prueba de susceptibilidad. Se utilizó como control negativo discos embebidos en etanol al 40º.

c) **Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer**

Se prepararon placas de Petri, con Agar Muller Hinton (entre 10 mL a 15mL. por placa) para cada una de los microorganismos empleados en la investigación: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Después de haber pasado el control de esterilidad (Figura 19),

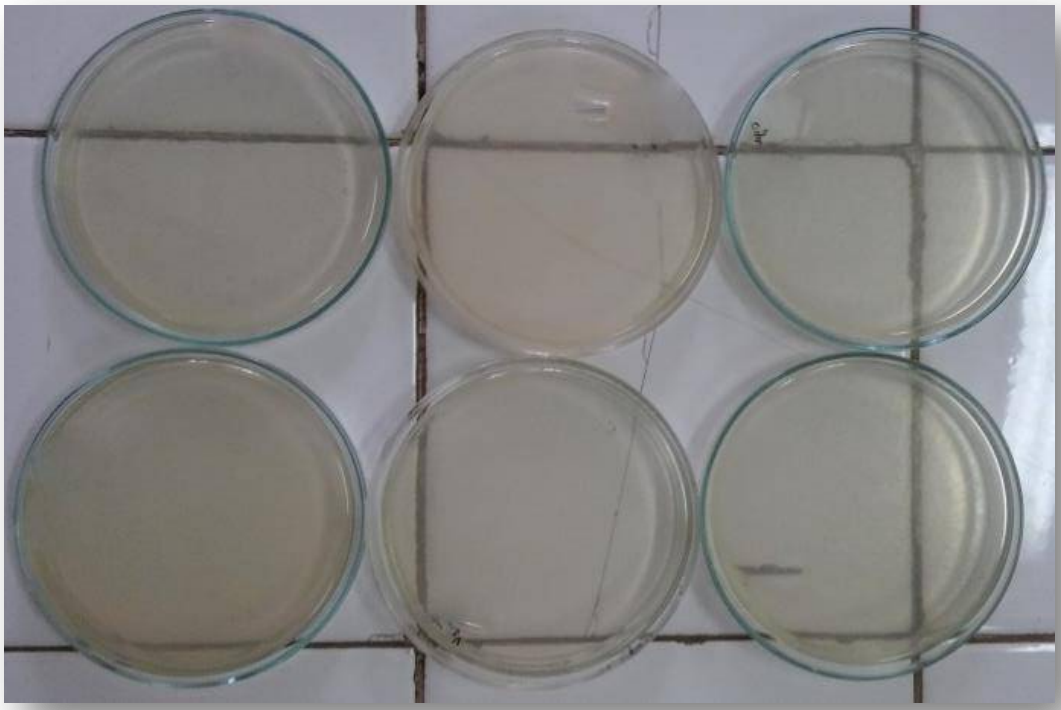


Figura 19. Placas de Petri con Agar Muller Hinton para la prueba de Suceptibilidad bacteriana.

se sembraron con un hisopo estéril por diseminación sobre la superficie del agar Muller Hinton de tal manera que el crecimiento bacteriano cubra la superficie del agar, se dejó secar durante cinco minutos y luego se colocaron los discos embebidos con cada una de las concentraciones de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y en otras placas los discos correspondientes al extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* y en el centro se colocó el disco de control con de etanol al 40% (Figuras 20, 21).

Luego se llevaron las placas a incubación a 37 ºC por 24 horas. Trascurrido el tiempo se midió los halos de inhibición (mm) y se registró la medida de cada una de las cepas, con estas medidas se obtuvo la medida promedio de los halos de inhibición que se observaron en el efecto de cada extracto y se utilizaron en el análisis estadístico de datos.

3.2.6. Pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Minina Bactericida (CMB)

Adecuamos la técnica según el Manual de procedimientos para pruebas de suceptibilidad del INS, 2010 donde se diluyó a partir de la concentración que tuvo menos efecto inhibitorio, así es como se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones decrecientes del extracto (Tablas 2), las cuales fueron 10mg/mL, 20 Mg/mL, 30mg/mL, 40mg/mL y 50 mg/ mL en tubos con un caldo nutritivo, a un tubo con caldo nutritivo no se le inoculó y lo tomamos como control negativo de crecimiento y otro sólo con el microorganismo sin añadirle el extracto etanólico como control positivo.

Después de un periodo de 18 a 24 horas de incubación a 37°C se observó si hubo crecimiento o no en base a la turbidez de los tubos lo que indica el desarrollo bacteriano.

Posteriormente de los tubos en que no se observó crecimiento bacteriano se sembraron en placas de Agar Tripticasa Soya previamente servidas y puestas a control de esterilidad, se usó para ello un asa bacteriológica calibrada; luego se las incubamos a 37°C por 24 horas y se procedió al recuento de colonias de cada placa.

Figura 20. Siembra en la superficie de la placa de Agar Muller Hinton con el inoculo de cada cepa incubado durante 24 horas.

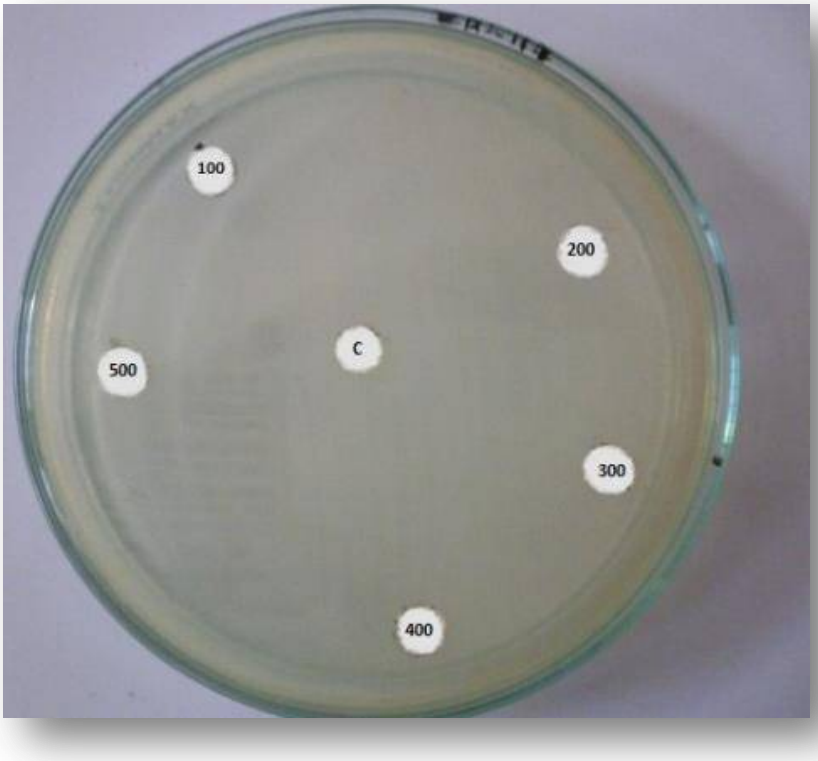


Figura 21. Discos embebidos con los extractos, incluyendo el del control.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de flores secas de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” y de *Punica granatum* “granada”

Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Solución madre: 1gr de extracto + 10 ml de Caldo Tripticasa Soja

Solución Madre (mL)	Caldo Tripticasa Soja (mL)	Concentración (mg/mL)
1	2	**50**
1	2.5	**40**
1	3.3	**30**
1	5	**20**
1	10	**10**

3.2.7. Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico los datos obtenidos, los resultados fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANAVA), con arreglo factorial 5 × 9 × 3 donde: cinco fueron las diferentes concentraciones de cada extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* y *Punica granatum*, tres cepas fueron el número de cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, tres cepas de cultivos puros de *Pseudomonas aeruginosa* y tres cepas de cultivos puros de *Vibrio cholerae*, en total hacen nueve el número de individuos. Y por último tres el número de repeticiones, para determinar si la inhibición de las bacterias empleadas es por la influencia del producto (extracto etanólico *Syzygium aromaticum* y *Punica granatum* y sus concentraciones. Este análisis se completó con la Prueba de Tukey (0.05) para el efecto inhibitorio del extracto etanólico, la concentración y cepas bacterianas probadas. Para todo ello se utilizó el software estadístico: Estadística versión 5 y Ms Excel 2010.

IV. RESULTADOS

Efecto inhibitorio del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* **"granada" y** *Syzygium aromaticum* **"clavo de olor" sobre el crecimiento de** *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*

Los resultados obtenidos de la presente investigación demuestran, que cepas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Vibrio cholerae,* fueron inhibidas por los extractos etanólicos de *Punica granatum* y de *Syzygium aromaticum* en las diferentes concentraciones utilizadas en el proceso experimental. Además, se observó que, a medida que las concentraciones de los extractos aumentaban, el efecto inhibitorio era mayor.

Se puedo observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Vibrio cholerae*, siendo la especie más sensible *S, aureus* con halos de inhibición que oscilan entre 13 a 20 mm, según la concentración del extracto que va desde 100mg/ml a 500mg/ml; le sigue *V. cholerae* con halos de 9 a 17.22 mm y finalmente *Pseudomonas aeruginosa* con halos de 7 a 14.66 mm (Tabla 3, Figuras 22, 23, 24).

Por lo tanto, se observa que la cepa de *Staphylococcus aureus* presenta mayor grado de inhibición frente a los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum* en comparación con las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (Tablas 3, 4). Se observan también que os promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Punica granatum* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, con un halo de sensibilidad entre 12.44 mm y 20.55 mm de diámetro, correspondiente a concentraciones de 100 mg/mL y 500 mg/mL respectivamente; en el caso de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, presenta halos de inhibición entre 9.44 mm y de 17 mm de diámetro, correspondiente a concentraciones de 100 mg/mL y 500 mg/mL respectivamente. Para el caso de las cepas de *Vibrio cholera,* presenta un halo de inhibición entre

8.66 mm y 16.33 mm de diámetro, correspondiente a concentraciones de 100 mg/mL y 500 mg/mL respectivamente.

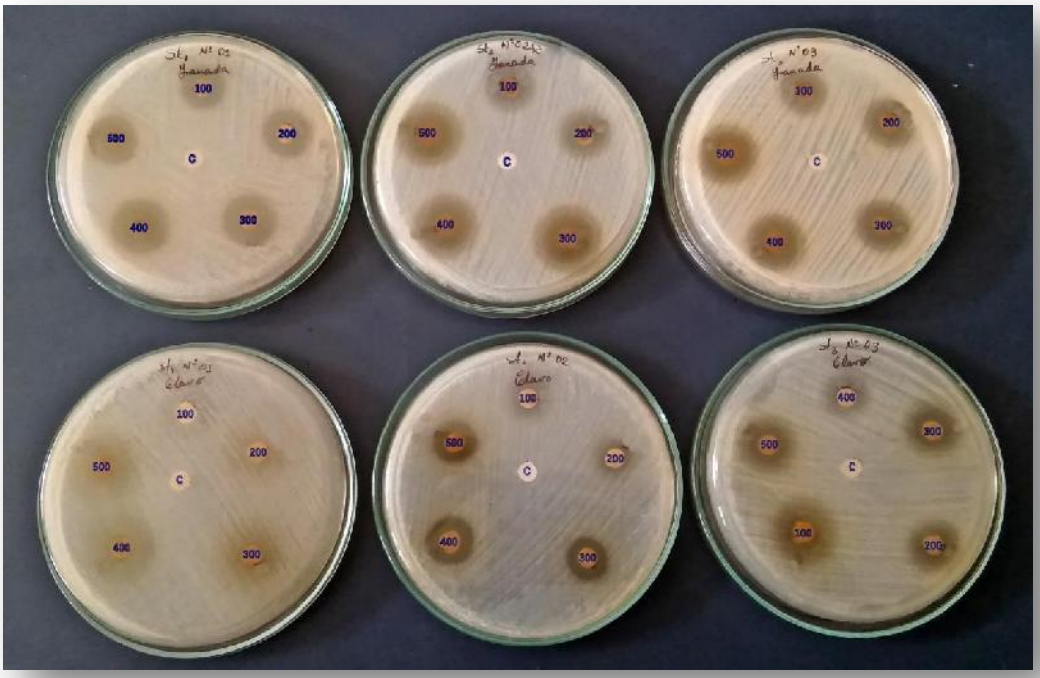


Figura 22. Resultados del enfrentamiento de las tres cepas de *Staphylococcus aureus*; fila superior Extracto de granada, fila inferior extracto de clavo de olor.

Figura 23. Resultados del enfrentamiento de las 3 cepas de *Vibrio cholerae*; fila superior Extracto de granada, fila inferior extracto de clavo de olor.

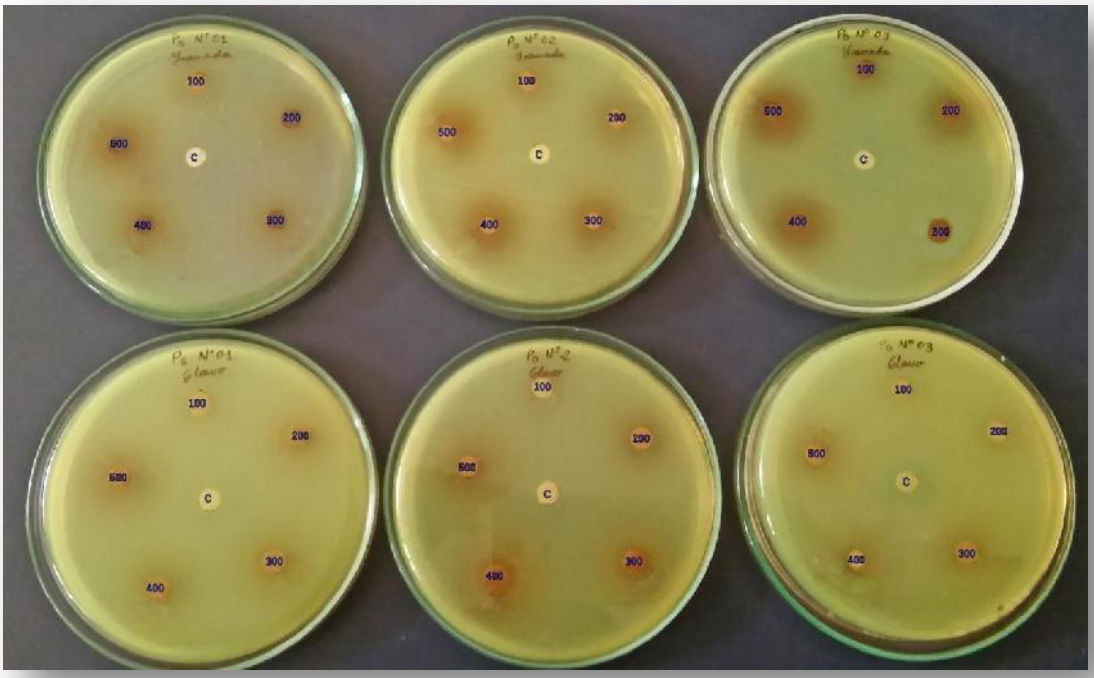


Figura 24. Resultados del enfrentamiento de las 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; fila superior Extracto de granada, fila inferior extracto de clavo de olor.

Tabla 3. Promedios del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, enfrentadas al extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”.

Concentración del extracto (mg/mL)	**Halos de inhibición por especie (mm)**		
	Staphylococcus aureus	*Pseudomonas aeruginosa*	*Vibrio cholerae*
100	13	7	9
200	15	9.11	11.33
300	15.22	9.77	13.55
400	17.88	12.22	15.11
500	20	14.66	17.22

Tabla 4. Promedios del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*, enfrentadas al extracto etanólico de *Punica granatum* “granada”.

Concentración del extracto (mg/mL)	**Halos de inhibición por especie (mm)**		
	Staphylococcus aureus	*Pseudomonas aeruginosa*	*Vibrio cholera*
100	12.44	9.44	8.66
200	14.88	9.88	10.44
300	16.33	12.55	13.22
400	18.55	15.22	14.44
500	20.55	17	16.33

4.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

a) Prueba de identificación de CMI y CMB según el método de dilución en Caldo.

La Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de Granada y Clavo de Olor fue de 100 mg/mL. para *Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa* mientras que para Staphylococcus *aureus* fue de 50 mg/mL (Figuras 25 a 30). También se observó que en ambos extractos no tienen efecto bactericida para las bacterias estudiadas**,** por lo que consideramos que no existe Concentración Mínima Bactericida (CMB) (Figuras 31, 32, 33).

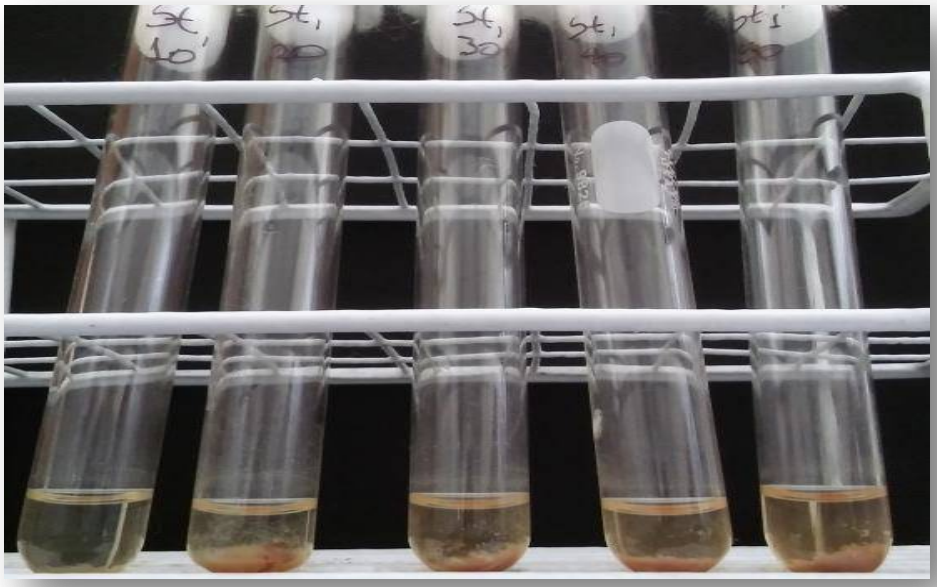


Figura 25. Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor frente a la especie *Staphylococcus aureus* Cepa 1.

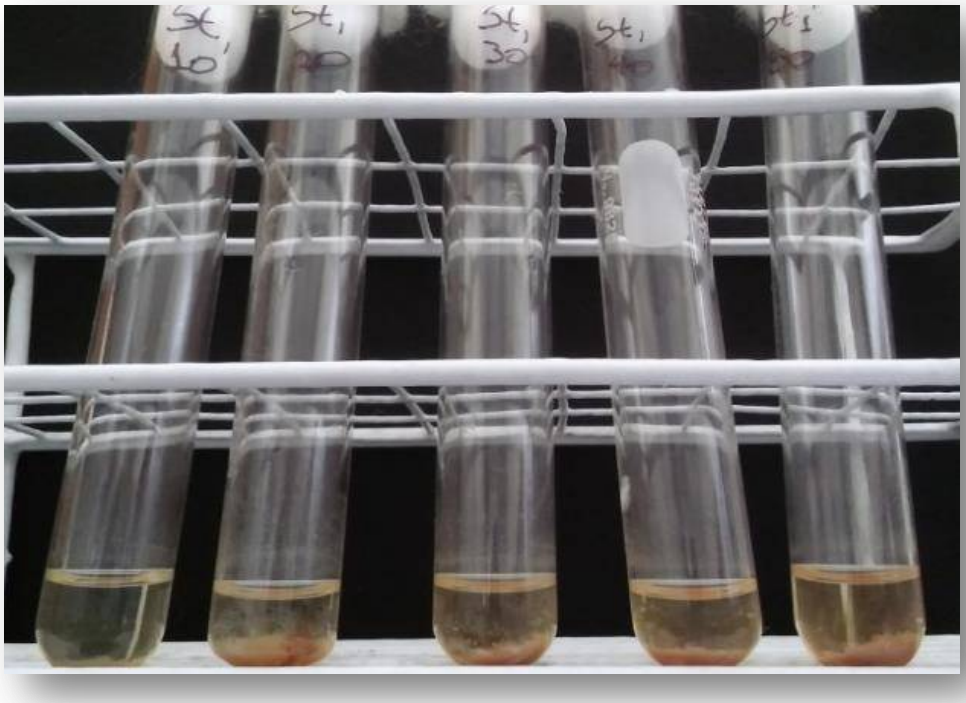


Figura 26. Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de granada frente a la especie *Staphylococcus aureus* Cepa 1.

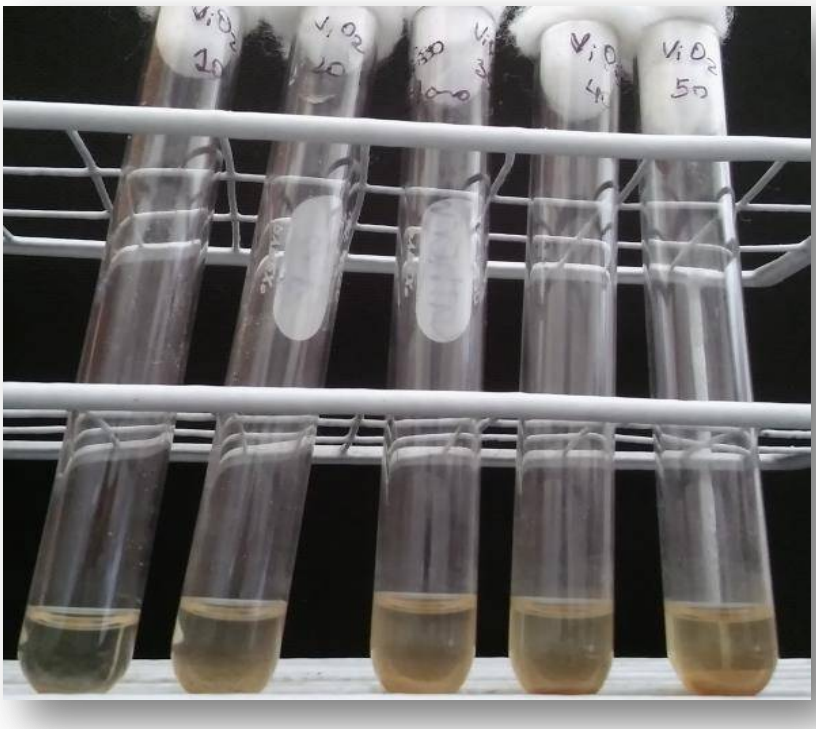


Figura 27. Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor frente a la especie *Vibrio cholerae* Cepa 2.

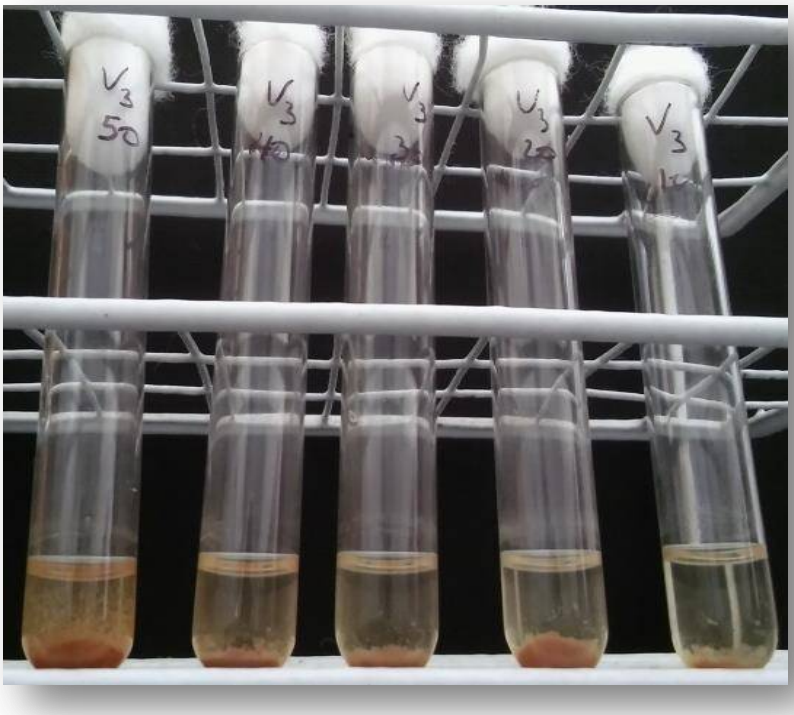


Figura 28. Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de granada frente a la especie *Vibrio cholerae* Cepa 3.

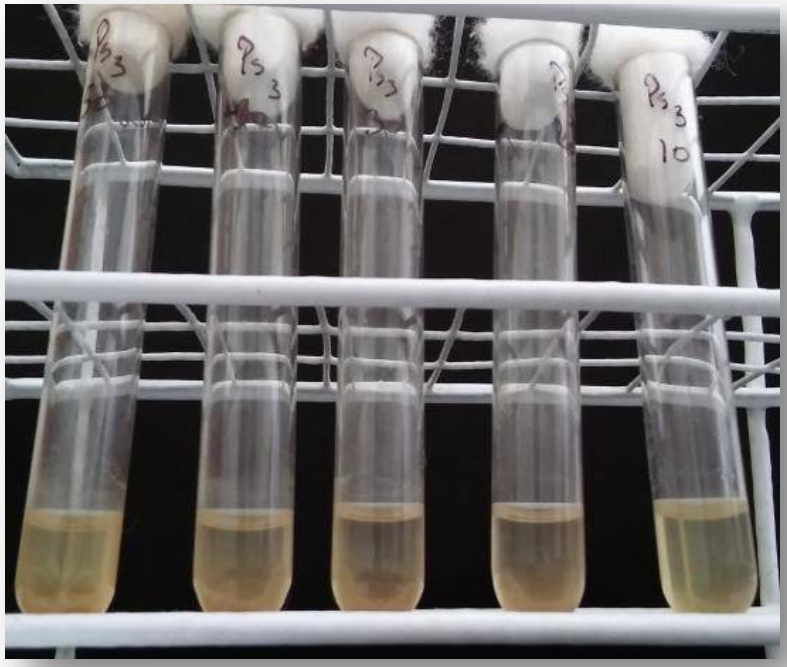


Figura 29. Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor frente a la especie *Pseudomonas aeruginosa* Cepa 3.

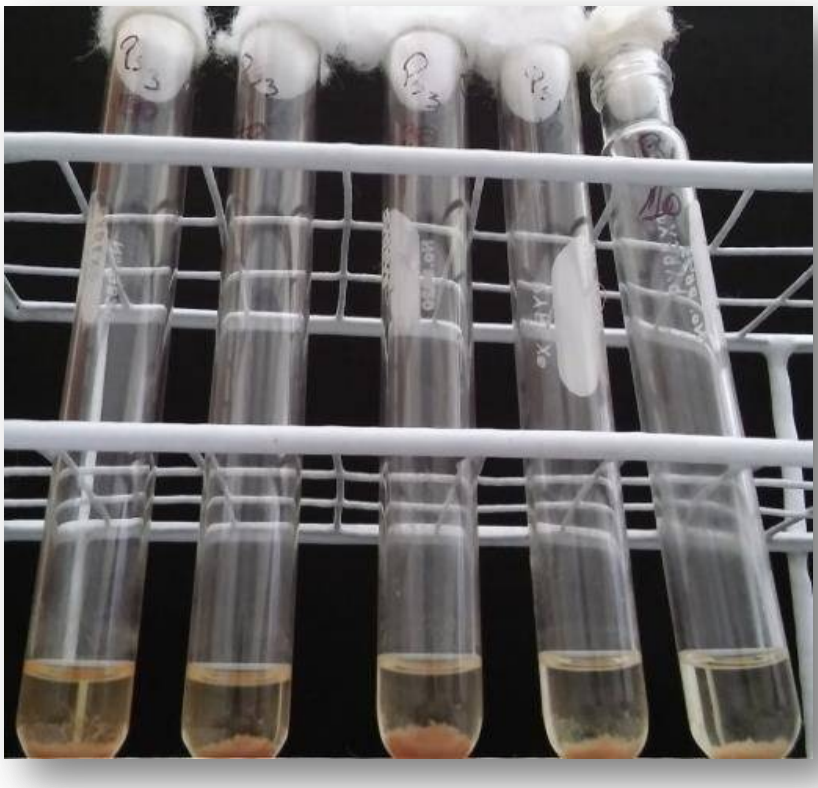


Figura 30. Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de granada frente a la especie *Pseudomonas aeruginosa* Cepa 3.

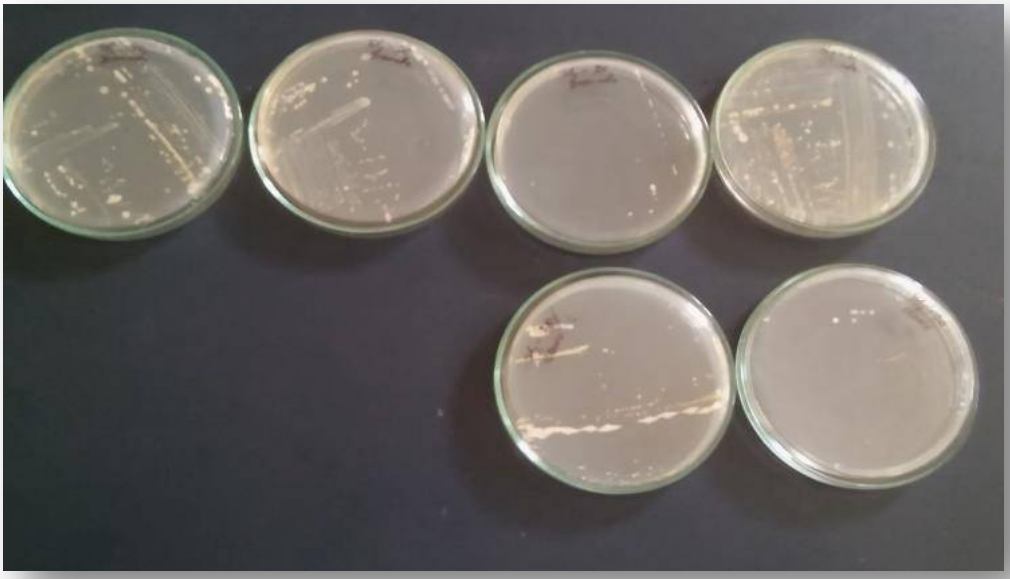


Figura 31. Placas de Petri cultivadas a partir de la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor y de granada frente a la Cepa 1 de la especie *Staphylococcus aureus*. Fila superior Extracto de granada – Fila inferior Extracto de clavo de olor.

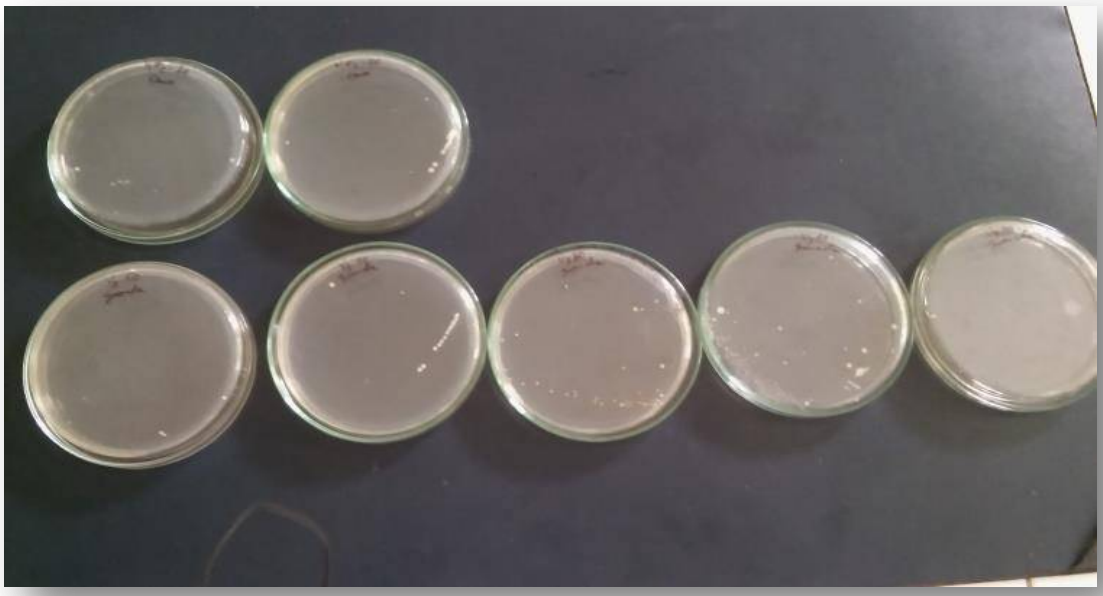


Figura 32. Placas de Petri cultivadas a partir de la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor y de granada frente a la Cepa 3 de la especie *Vibrio cholerae*. Fila superior Extracto de clavo de olor – Fila inferior Extracto de granada

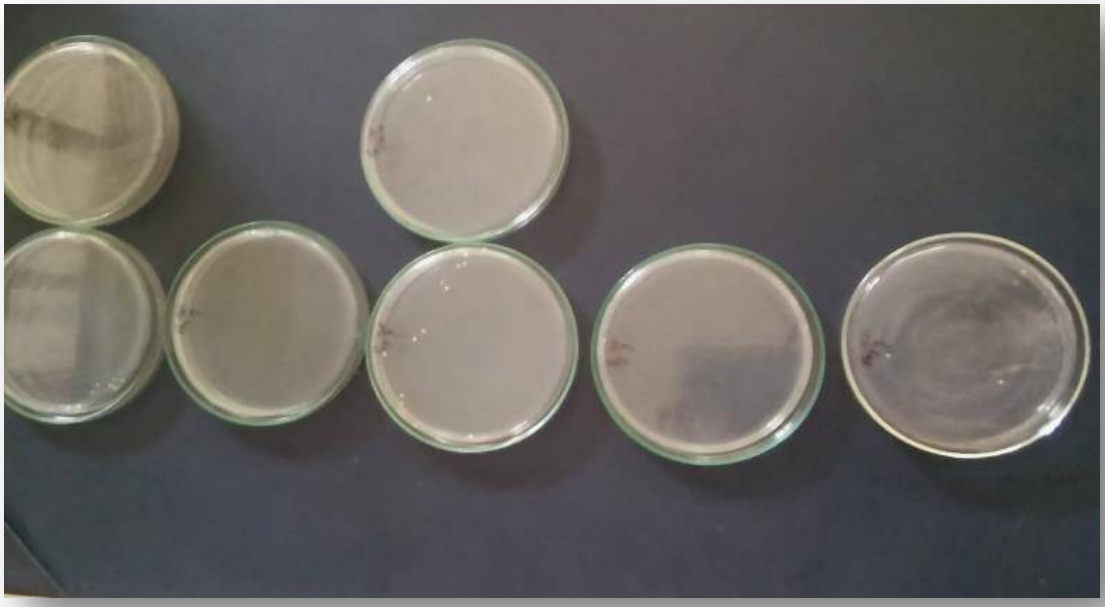


Figura 33. Resultados de la siembre a partir de la prueba de CMI con el extracto de clavo de olor y de granada frente a la Cepa 3 de la especie *Pseudomonas aeruginosa***.** Fila superior Extracto de clavo de olor – Fila inferior Extracto de granada

4.2. Análisis estadístico

Se describe el análisis de varianza (ANAVA) para cada uno de las variables estudiadas, observándose de que existen diferencias significativas entre las variables concentración, especie y en la interacción extracto especie. (Tabla 5)

Se puede apreciar el efecto que producen las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos empleados sobre las cepas de estudio evidenciando que existen diferencias entre las diferentes concentraciones, es decir de que a medida que las concentraciones de los extractos aumentan el efecto inhibitorio es mayor observándose en los diámetros de los halos de inhibición. (Tabla 6, Figura 34)

Se puede observar también que la prueba de significación de Tukey nos indica que el comportamiento de las cepas es significativamente diferentes, siendo *Pseudomonas aeruginosa* como la especie que presenta menores halos de inhibición en relación a *Vibrio cholerae y Staphylococcus aureus* (Tabla 7, Figura 35).

Además, la prueba de significación de Tukey nos demuestra que existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos empleados y las especies bacterianas. Así tenemos que el extracto de clavo de olor tiene menor efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que el extracto de granada y de clavo de olor, tienen un efecto similar sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa y Vibrio cholerae*, este mismo efecto ocurre con las cepas de *Staphylococcus aureus* (Tabla 8, Figura 36).

Tabla 5. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, frente a los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*

K: Extracto. E: Especie. CC: Concentración. SS: Suma de cuadrados. GL: Grados de Libertad. CM: Cuadrados Medios

Fuente de variación	**SS**	**GL**	**CM**	**F**	**p**
Extracto	28.03	1	28.03	3.759	0.053707
Concentración (Cc)	1994.65	4	498.66	66.860	0.000000[SS]
Especie	1059.49	2	529.74	71.027	0.000000[SS]
Extracto*cc	11.84	4	2.96	0.397	0.810869
Extracto*especie	94.29	2	47.14	6.321	0.002112[SS]
Cc*especie	22.33	8	2.79	0.374	0.933607
Extracto*cc*especie	10.34	8	1.29	0.173	0.994251
Error	1790.00	240	7.46		

[SS]: Sin significancia.

Tabla 6. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de las cinco concentraciones de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*

Concentración	**Promedio de halos de inhibición (mm)**	**Significancia (α=0.05)**				
100	9.92593	a				
200	11.77778		b			
300	13.48148			c		
400	15.57407				d	
500	17.62963					f

Tabla 7. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*.

Especies	Promedios de halos de inhibición (mm)	Significancia (α=0.05)		
Pseudomonas aeruginosa	11.71111	a’		
Vibrio cholerae	12.93333		b’	
Staphylococcus aureus	16.38889			c’

Tabla 8. Prueba de significancia de Tukey del promedio del halo de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum* frente a las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*.

Extracto	Especie	Halo	Significancia (α=0.05)		
Syzygium aromaticum	*Pseudomonas aeruginosa*	10.60000			A
Punica granatum	*Vibrio cholerae*	12.62222	B		
Punica granatum	*Pseudomonas aeruginosa*	12.82222	B		
Syzygium aromaticum	*Vibrio cholerae*	13.24444	B		
Syzygium aromaticum	*Staphylococcus aureus*	16.22222		C	
Punica granatum	*Staphylococcus aureus*	16.55556		C	

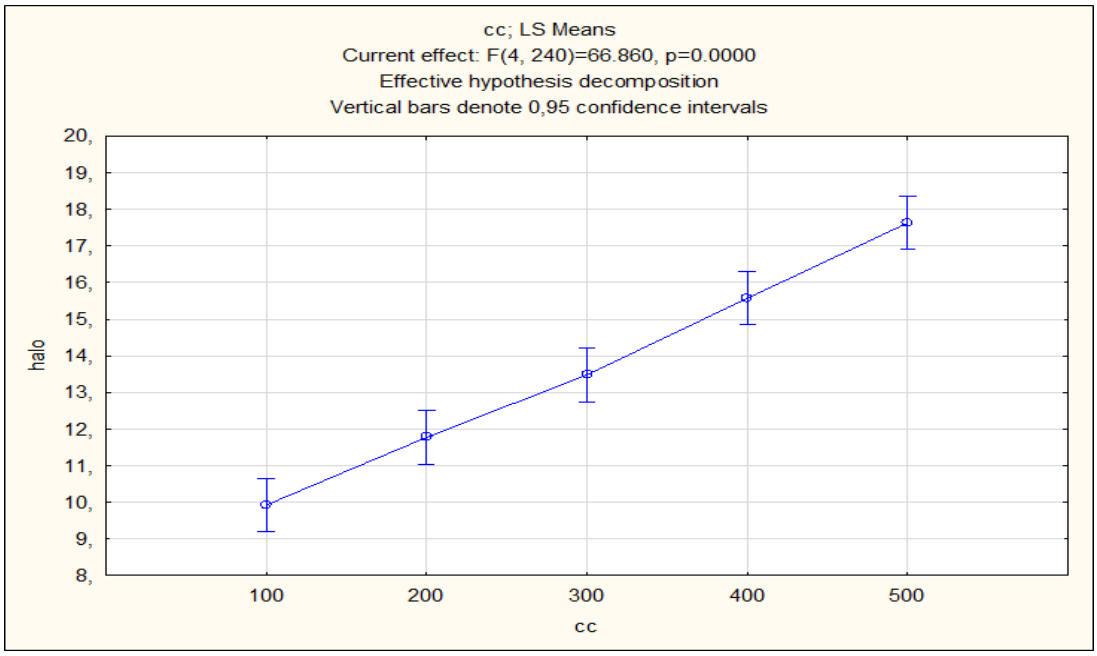


Figura 34. Promedio del halo de inhibición (mm) con respecto a las cinco concentraciones utilizadas de los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*

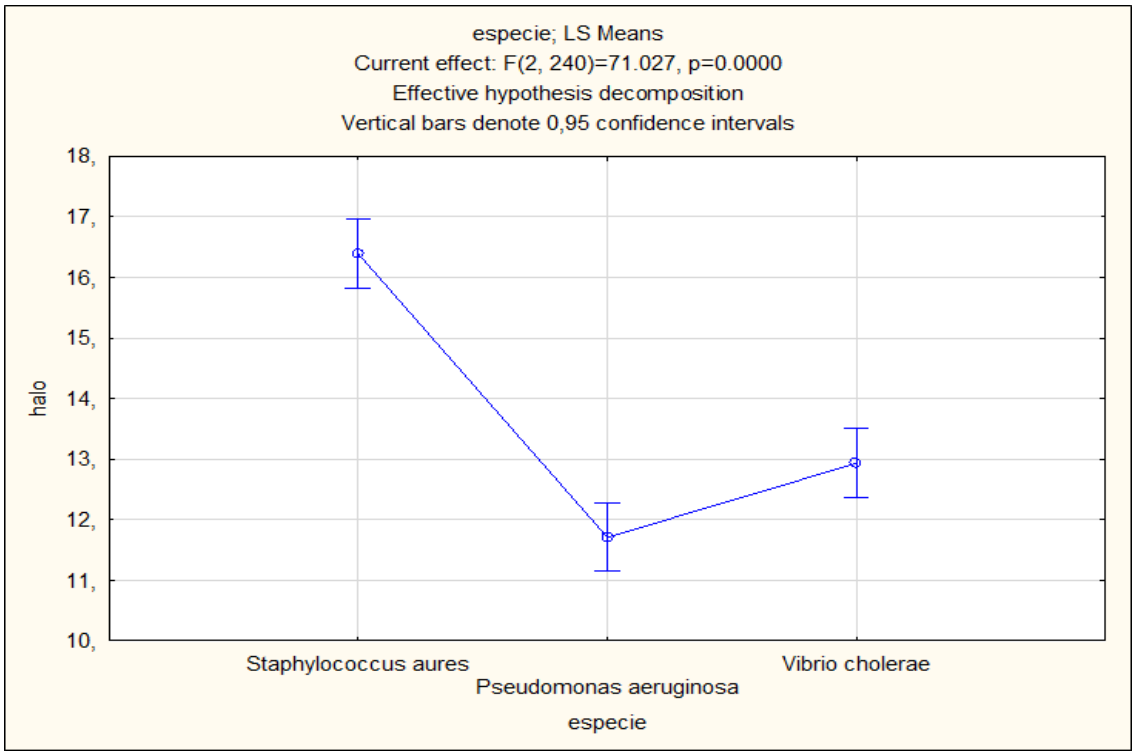


Figura 35. Promedio de los halos de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*.

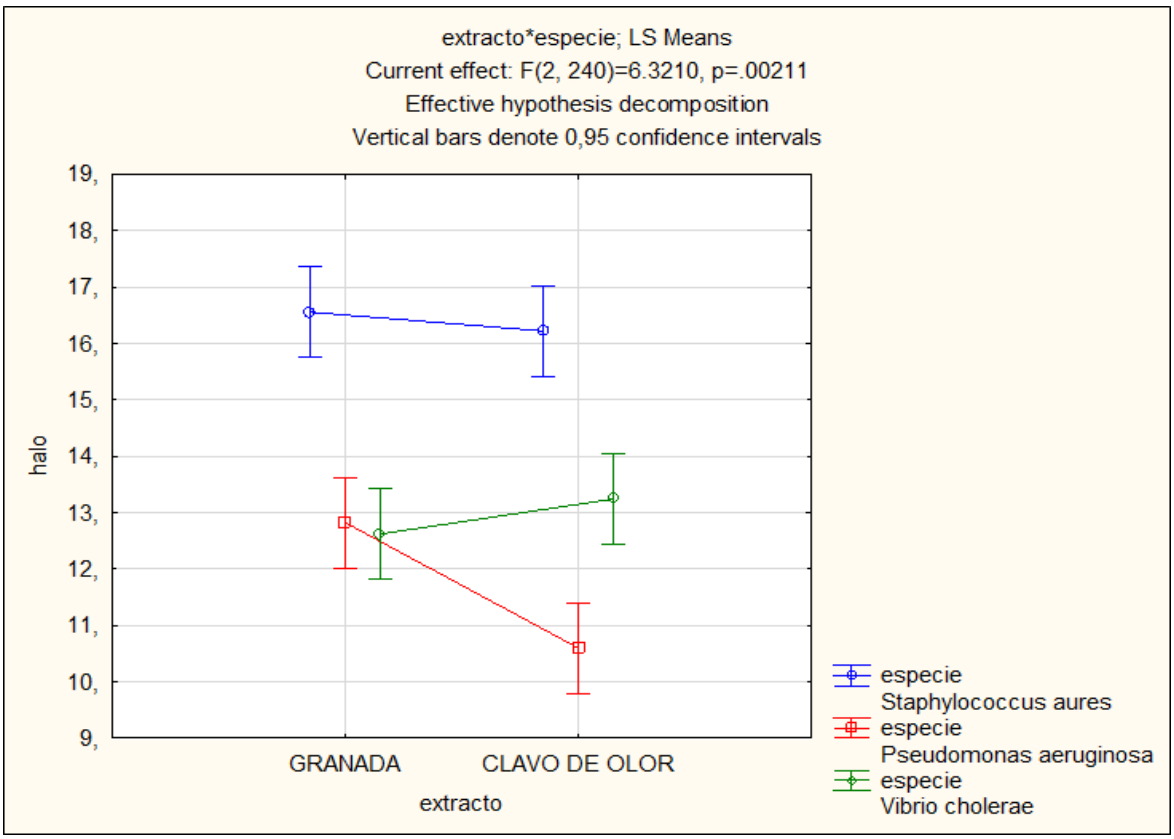


Figura 36. Promedio del halo de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera* frente a los extractos etanólicos de *Punica granatum* y *Syzygium aromaticum*.

IV. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados en el presente trabajo de investigación indican que los extractos etanólicos de *Syzygium aromaticum* “clavo de Olor” y de *Punica granatum “*Granada” tienen propiedades antibacterianas frente a *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae,* con los halos inhibición que oscilan entre 13.00 – 20.00 mm, 7 – 14.66 y 9.44 - 17.22 respectivamente para el extracto de *Syzygium aromaticum* “Clavo de Olor” y de 12.44 – 20.55, 9.44 – 17.50 y 8.66 – 16.33 respectivamente para el extracto de *Punica granatum* “Granada”. Nuestros resultados coinciden con (Núñez, 2007), (Hall *et al.,* 2002), (Cubillo, 2007) y (Herrera, 2006) quienes demostraron que el aceite esencial de clavo de olor y del extracto acuoso de Clavo de Olor tienen propiedades antibacterianas frente a bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*), así como de bacterias gram negativas (*E. coli* y *Salmonella sp.*).

Éstas propiedades del extracto etanólico de Clavo de olor reside en el Eugenol que es un derivado fenólico y actúa aumentando la permeabilidad de la pared y de la membrana citoplasmática causando la muerte del microorganismo, según (Hall *et a,* 2002).

Herrera menciona que el extracto acuoso de Clavo de Olor tiene efecto bactericida sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, pero no en *E. coli, Salmonella spp.* quienes crecen en presencia del extracto acuoso de Clavo de Olor.

Con respecto a la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Punica granatum* “Granada”, nuestros resultados coinciden con (Ventura, 2012) que demuestra que en la cáscara se encuentran los principios activos que tienen propiedades antioxidante, actividad antibacteriana y propiedades antimutagénicas (Sánchez, 2005); estas propiedades antibacterianas están relacionadas con sus principios activos que contienen, como son los flavonoles, elagitaninos, ácidos orgánicos alifáticos, flavomonas entre otros.

Realizado el ANAVA encontramos que no existen diferencias significativas entre los extractos de Clavo de Olor y de Granada, aun cuando son de familias diferentes y que presentan principios activos diferentes como lo menciona (Llatas, 2008), (Ventura, 2012), (Celis, 2010).

Por otro lado existen diferencias significativas entre las concentraciones empleadas, observándose que a medida que as concentraciones aumentan los diámetros de halo de inhibición se incrementan y esto se debe que a mayor concentración se encuentran en mayor porcentaje los principios activos.

Al evaluar las especies estudiadas observamos que existen diferencias significativas, así podemos observar que las cepas de *Staphylococcus aureus* son más sensibles con un halo de inhibición de 16.388 mm, le sigue *Vibrio cholerae* con 12.933 mm y por ultimo *Pseudomonas aeruginosa* como la especie que presenta menos halo de inhibición 11. 71 mm, esto se explica en la estructura de la pared celular de estas bacterias.

En *Staphylococcus aureus* su pared celular está formada principalmente por peptidoglicano y un menor proporción de proteínas, ac. Teicoicos y lipoteicoicos; así mismo su pared celular presentan poros que facilitan el ingreso de sustancias polares al interior de la célula en donde actúan los principios activos de los extractos; sin embargo, en las bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* su pared celular es más compleja debido a que además del peptidoglicano cuya capa es mínima (5.7 % del peso seco de la pared celular) y presentan una membrana externa constituida por una doble capa de fosfolípidos, en cuya capa superior se encuentra el lipopolisacárido, proteínas de membrana externa y las PORINAS, estas últimas favorecen el ingreso de muchas moléculas, antibióticos y moléculas polares que conforman.

Pseudomonas aeruginosa, aparece como la especie más resistente por presentar halos de inhibición menores a *Vibrio cholerae,* esto puede deberse a la capacidad de resistencia que presenta *Pseudomonas aeruginosa* como las

modificaciones conformacionales en la estructura de las porinas o por la actividad de sus bombas de expulsión que es una forma de sacar el extracto de su espacio periplásmico, capacidades que están ligadas a genes presenten en su genoma o en sus plásmidos (capacidades que están ligadas a modificaciones en su genoma o presentes en sus plásmidos)

Coincidentemente en el ANAVA se observa que existe diferencias significativas entre la interacción extracto y especie, sin embargo en la prueba de significación de Tukey observamos de que cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* presentan una respuesta inhibitoria similar con ambos extractos, lo mismo ocurre con las cepas de *Staphylococcus aureus* y estos se explica al mencionarlo anteriormente en la naturaleza de su estructura de su pared Celular (Sherris, 2011).

La CMI de los extractos de Granada y Clavo de Olor fue de 100 mg/mL. Para *Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa* mientras que para Staphylococcus *aureus* fue de 50 mg/ mL. También se observó que en ambos extractos no tienen efecto bactericida para las bacterias estudiadas, resultados que son corroborados por el trabajo de (Herrera, 2006) quien menciona que no tienen actividad bactericida en Gran negativa.

VI.- CONCLUSIONES

- Los extractos etanólicos de clavo de Olor y de Granada presentan actividad inhibitoria in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae y Pseudomonas aeruginosa*. La especie más susceptible a los extractos etanólicos de Clavo de Olor y Granada fue *Staphylococcus aureus* y la que presentó menos susceptibilidad fue *Pseudomonas aeruginosa*.

- La CMI para el extracto etanólico de Clavo de Olor y Granada, fue para *Staphyococcus aureus* 50mg/mL.; para *Vibrio cholerae y Pseudomonas aeruginosa* 100 mg/mL.

- En cuanto a la CMB de los extractos de Granada y Clavo de Olor se concluye que ninguna de las cepas utilizadas presentó efecto bactericida con las concentraciones empleadas.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con el trabajo de investigación, enfatizando en el estudio de los principios activos que poseen de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”, evaluando las diferentes propiedades y evaluando que tanto efecto inhibitorio tienen sobre otros microrganismos de importancia clínica.

- Probar con otro tipo de extracto a partir de las mismas especies vegetales con la finalidad de verificar si su efectividad es mayor o menos que os extractos etanólicos.

- Investigar la manera de cómo sería su utilización directa en pacientes con infecciones intrahospitalarias, examinando de esta manera si existe algún tipo de secuela negativa en el ser humano; de esta manera dilucidar el camino a la producción de medicamentos que puedan utilizarse como tratamientos factibles a su uso.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón, 2002. "*Actividad de extractos de plantas en el crecimiento, la producción de toxina y la unión de Vibrio cholerae a células*". Tesis de Maestría en Microbiología. Nuevo León, México

Aguilar, Sepúlveda, Ascacio, Buenrostro, De La Cruz, Rodrigues, Herrera, Contreras, Esquivel, Aguilera, 2012, "*Aspectos fundamentales delos elagitaninos de granada (Punica granatum L)".* Tesis para optar por título en Maestria, Universidad autónoma de Coahuila – México.

Álvarez, 2010. "*Efecto inhibitorio in vitro de Allium sativum L. "ajo" en solución hidroalcóholica sobre Staphylococcus aureus resistente a oxacilina y Escherichia coli y evaluación de su toxicidad sobre Artemia salina "camarón de salmuera*". Tesis de Licenciatura en Biología – Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú

Bernal, Rodríguez, Salazar, 2014. *"Efecto de extracto hidroalcoholico de Punica granatum en la viabilidad de Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa "in vitro*"", Revista Científica de Estudiantes Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

Castillo, 2012. ***"****Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de CLAVO (Syzygium aromaticum) Y CANELA (Cinnamomum verum), sobre la LEVADURA (Rhodotorula mucilaginosa) en leche chocolatada".* Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Medellín, Colombia

Celis, 2010. *"Usos medicinales del CLAVO DE OLOR (Syzygium aromaticum) Cuernavaca, Morelos*". Tesis de Diplomado de Medicina Tradicional de Cuernavaca. México.

Correa. & Bernal, 1990. "*Especies Vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello*". Talleres de Editora Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia. 569 p. Correa, J. & Bernal, H.

Cortez, 2005 *"Actividad Biológica de extractos de Plantas para el Tratamiento del Cáncer e Infecciones en Tepatepec"*. (Tesis de licenciado en Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo.

Cubillo, 2007. "*Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies naturales sobre microorganismos asociados a alimentos*". Tesis de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología. San José, Costa Rica.

Cuesta, Vallejo, Guerra, Cárdenas, Hoyos, Loaiza, Villegas, 2012. *"Infección intrahospitalaria por Pseudomonas aeruginosa multirresistente: estudio de casos y controles", Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal,* vol. 31, nº 2, p. 135-142

Domingo. Y López, 2003**.** Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española Quimioterapeutica, 16 (4):385 – 393

Flores, Pérez, Trelles, Málaga G, Loza, Tapia, 2010. *"Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un Hospital General".*

Gamboa. y Vásquez, 2015 *"Efecto del aceite esencial de Sizygium aromaticum sobre la supervivencia de Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A y Bacillus cereus"*. Tesis para optar por la Licenciatura en Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú

Gonzáles, 2002. *"Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso"*. Revista Cubana Estomatogial v.39 n.2.Ciudad de La Habana Mayo- Agosto".

Gonzales, 2004. "*Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*". Línea de Profundización: Tecnología en Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales departamento de Ingeniería Química.

Goode. & Hatt, 1976. *Métodos de investigación social*. México: Trillas.

Hall, Rocha, Rodríguez, 2002, Plantas Medicinales*, Centro de Información de Medicamentos*. vol II , p. 27 – 32.

Hernández, 2011. "*Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria*". Tesis para optar por Doctorado en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional San Antonio. Murcia, España

Herrer, García, 2006 "*Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos del laurel, clavo, canela y tomillo sobre 5 cepas bacterianas patógenas de origen alimentario"*. Pamplona- Colombia

INS, 2007 *Informe de Resistencia antimicrobiana en hospitales en Perú*

INS., 2010 *Manual de procedimientos para pruebas de suceptibilidad del INS*

Llatas, 2008. "*Botánica Fanerogámica*". Lambayeque – Perú,

Maldonado, Barrera, Guzmán, Pantoja**,** 2008. "Eugenol: Material de uso dental con riesgo de toxicidad local y sistémica" Revista de Ciencia Oral Año 9. Num. 28, Primavera. 446-449

Meillón, 2010. "*Evaluación de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de nuevas selecciones de flor de granada (Punica granatum L.) Cultivadas en el estado de Guanajuato - México*". Tesis para Maestría en Nutrición Humana. México

Ministerio de Salud, 2001. "*Estudio de etiología de la diarrea en las direcciones de salud Cajamarca, Lambayeque, Loreto y Lima este*". Noviembre Perú

Núñez, Moro, D'aquino , 2007. *"Enterotóxinas y enzimas estafilococcicas en presencia de aceites esenciales***".** Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Saldaña, Muro, Zavala, Zavaleta, Araujo, y Fajardo, 2012. *"Efecto del extracto acuoso de Syzygium aromaticum a diferentes concentraciones sobre el ciclo celular en meristemos radiculares de Allium cepa"*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo - Perú.

Sánchez*., Cozzi, Cundari, Fiore., Ricordy, Gensabella Degrassi,, De SalviaR.***,** 2005. "*Extracto de frutos enteros de Punica granatum L.*

como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno". Artículos Originales - REV CUBANA PLANT MED 2005; 10(2). La Habana – Cuba.

Sherris, 2011. *Microbiología Médica,* Revista Centífica Quinta edición, Mc Graw – Hill INTERAMERICANA EDITORES.S.A. México D. F.

Ventura, 2012. "*Elaboración de una jalea adicionada con fitoquímicos de cáscara de Punica granatum L. con posible utilidad para el control de la diabetes mellitus*". Tesis para Doctora en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapala, División De Ciencias Biológicas y de la Salud. México.

IX. REFERENCIAS LINKOGRÁFICAS

http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?DB=ubipub.fp3&lay=WebAll&Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=6627&-Find

http://redalyc.uaemex.mx/pdf/379/37961107.pdf

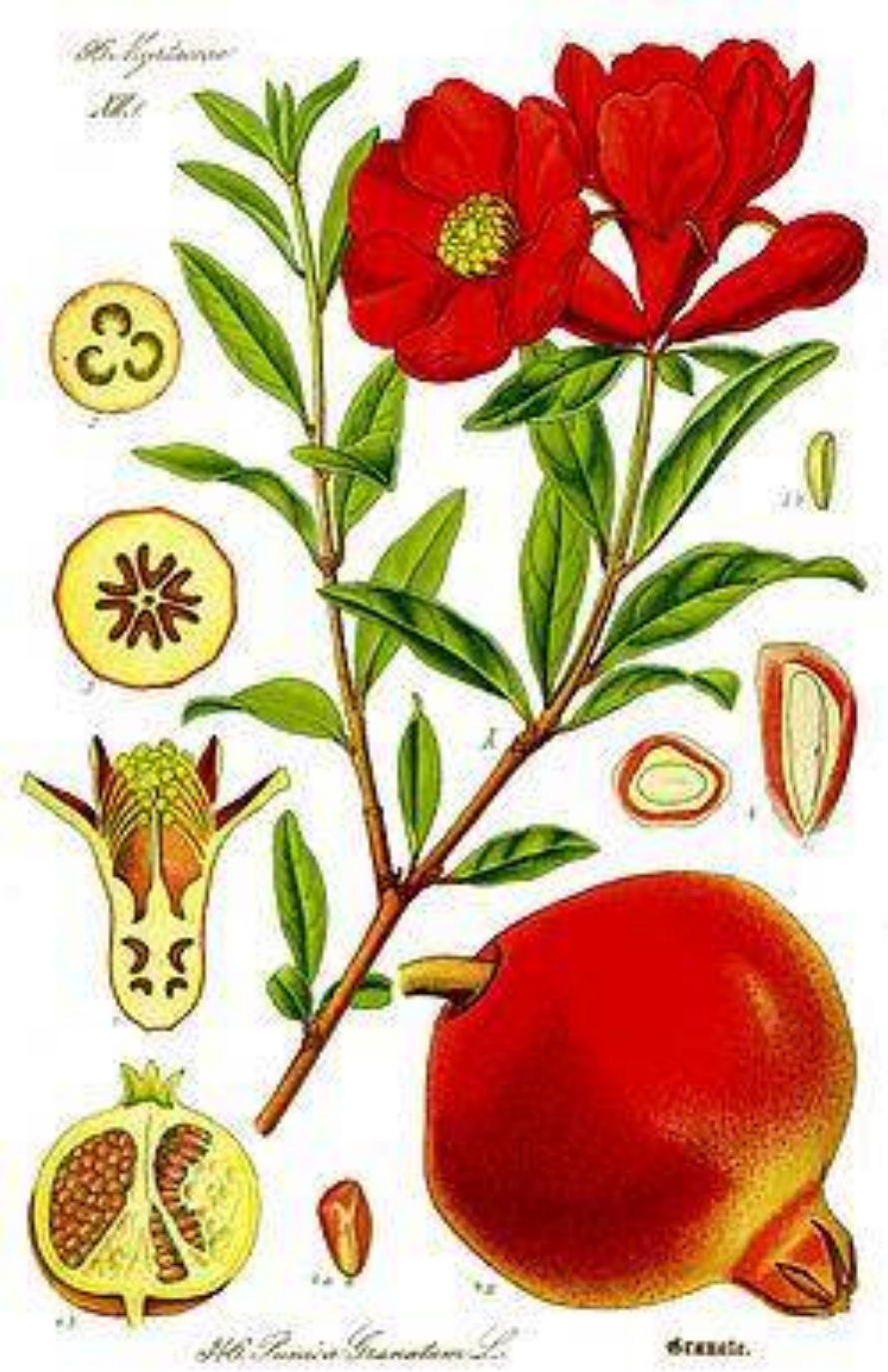
http://rev.med.panacea.unica.edu.pe/documentos/prevalencia-vaginitis vaginosis.pdf

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s102251292001000400006&script=sci_arttext

http://www.upch.edu.pe/famed/rmh/10-4/v10n4ao3.htm

X. ANEXOS

Anexo 1. Clasificación Taxonómica de *Punica granatum* "GRANADA"

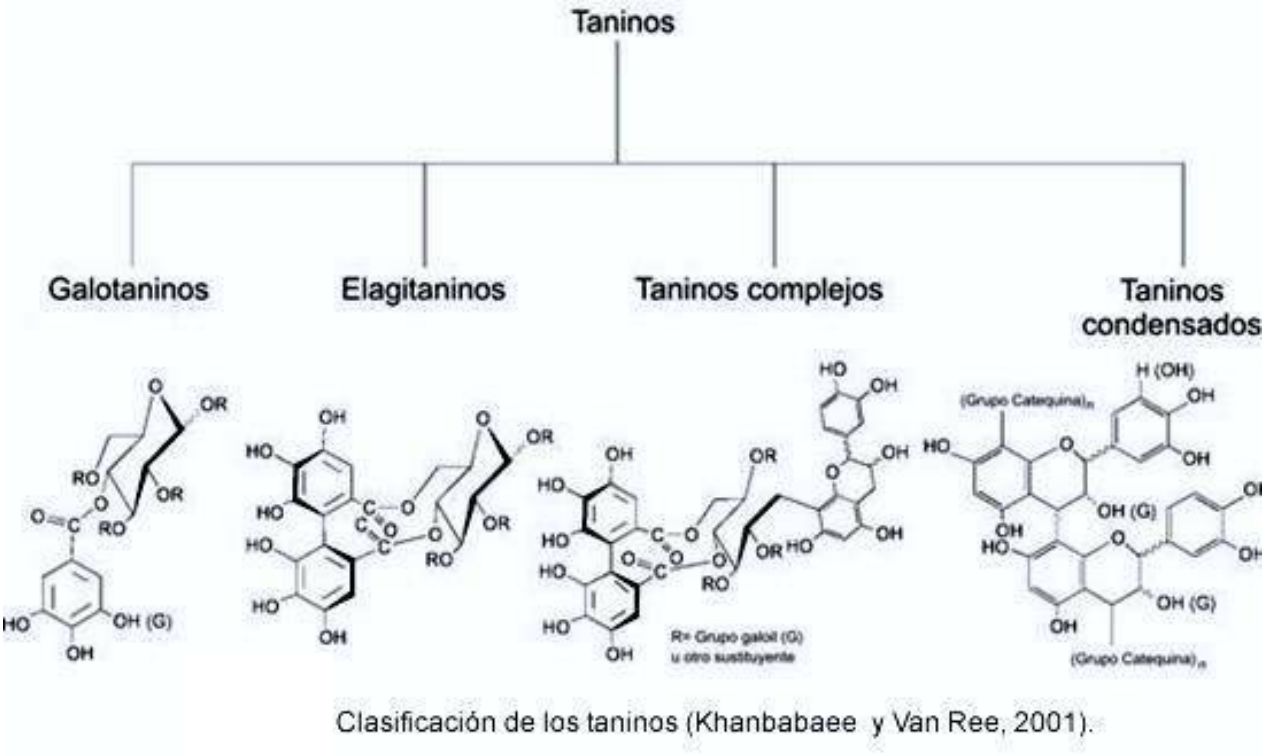


Clasificación Taxonómica		
Reino	:	*Plantae*
División	:	*Magnoliophyta*
Clase	:	*Magnoliopsida*
Orden	:	*Myrtales*
Familia	:	*Lythraceae*
Género	:	*Punica*
Especie	:	*Punica granatum*

Anexo 2. Clasificación Taxonómica de *Syzygium aromaticum* "CLAVO DE OLOR".

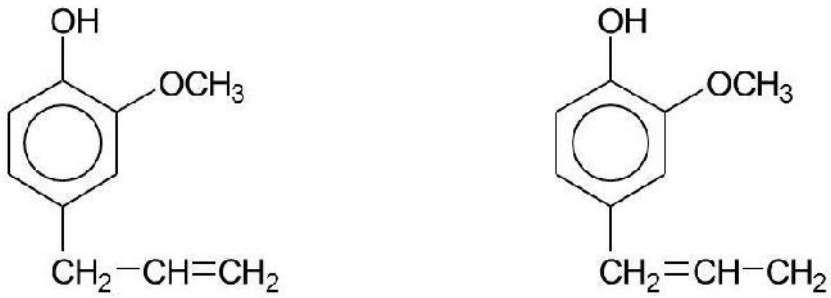
Clasificacion Taxonómica		
Reino	:	*Plantae*
División	:	*Magnoliophyta*
Clase	:	*Magnoliopsida*
Subclase	:	*Rosidae*
Orden	:	*Myrtales*
Familia	:	*Myrtaceae*
Subfamilia	:	*Myrtoideae*
Género	:	*Syzygium*
Especie	:	*Syzygium aromaticum*

Anexo 3. Clasificación química de los taninos

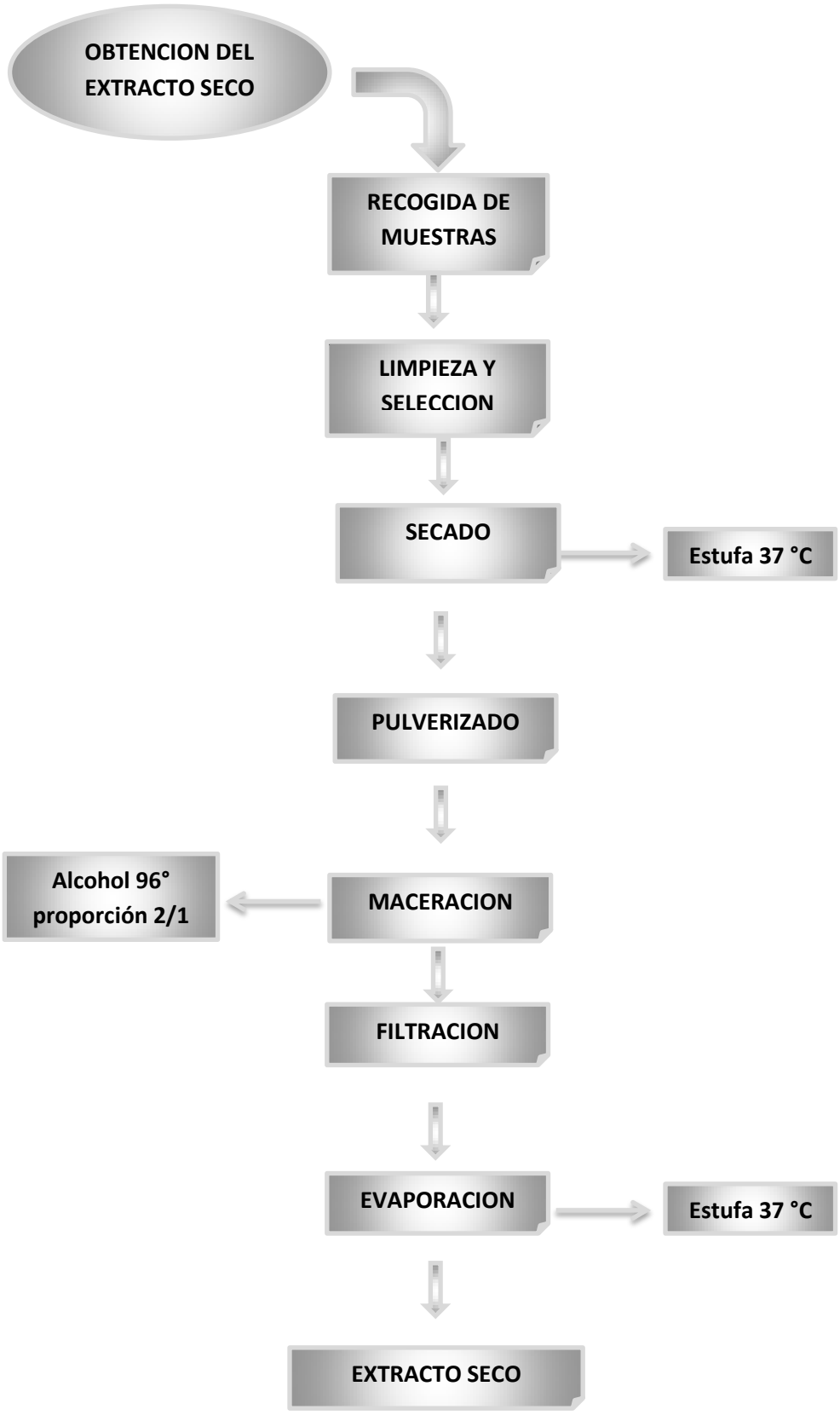


Clasificación de los taninos (Khanbabaee y Van Ree, 2001).

Anexo 4. Clasificación química de los Eugenol



EUGENOL ***ISOEUGENOL***

http://slideplayer.es/slide/4333359/

Anexo 5. DIAGRAMA DE OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Syzygium aromaticum* y *Punica granatum*.