



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA –
PARASITOLOGÍA**

TESIS

Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.

Para optar el Título Profesional de Licenciado en *Biología - Microbiología-Parasitología*

Autores:

Bach. Yesenia Paola Olivos Serrepe
Bach. Sergio Florentino Velásquez Torres

Asesor:

MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla

Lambayeque - Perú

2026



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA –
PARASITOLOGÍA**

TESIS

Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.

Bach. Olivos Serrepe Yesenia Paola

Bach. Sergio Florentino Velásquez Torres
AUTORES

Para optar el Título Profesional de Licenciado en *Biología - Microbiología-
Parasitología*

APROBADO POR:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo
PRESIDENTE

Dra. Gianina Llontop Barandiarán
SECRETARIO

Lic. Julio Silva Estela
VOCAL

MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla
ASESOR

Lambayeque, Perú - 2026

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 57-2026 / FCCBB-UI

Siendo las 09:00 horas del día 06 de octubre de 2026, en la Sala de Sesiones - Sustentaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas se reunieron los miembros del Jurado designado mediante **Resolución N° 430-2025-FCCBB/D de fecha 05 de setiembre de 2025 y aprobado mediante Resolución N° 610-2025-FCCBB/D de fecha 02 de diciembre de 2025**, conformado por:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo-Presidenta
Dra. Gianina Llontop Barandiarán- Secretaria
Lic. Julio César Silva Estela- Vocal
Mg. Mario Cecilio Moreno Mantilla- Asesor

con la finalidad de evaluar la sustentación de tesis titulada: **Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella sp.***, presentado por los Bachilleres YESENIA PAOLA OLIVOS SERREPE y SERGIO FLORENTINO VELÁSQUEZ TORRES.

Sustentación autorizada mediante **RESOLUCIÓN N°323-2026-FCCBB-D Lambayeque, 22 de setiembre de 2026** la misma que tuvo una duración de 30 minutos y luego de absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, obteniendo 19.00 puntos que equivale al calificativo de Muy Bueno.

Por lo que los sustentantes quedan **APTOS** para obtener el Título Profesional de **Licenciado (a) en Biología-Microbiología-Parasitología** de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 10:30 horas se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Dra. Consuelo Rojas Idrogo
Presidenta

Dra. Gianina Llontop Barandiarán
Secretaria

Lic. Julio César Silva Estela
Vocal

Mg. Mario Cecilio Moreno Mantilla
Asesor

CONSTANCIA DE VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, **MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla** con DNI: 16505740; usuario revisor del informe de tesis titulado: Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp, presentado por los **Bachilleres. Yesenia Paola Olivos Serrepe** con DNI: 76468828 y **Velásquez Torres Sergio Florentino** con DNI: 71707418; declaro que la evaluación realizada por el Programa Informático Turnitin, ha arrojado un porcentaje de similitud de 17 %, verificable en el Resumen de reporte automatizado de similitudes que se acompaña.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas dentro del porcentaje de similitud permitido no constituyen plagio y que el documento cumple con la integridad científica y con las normas para el uso de citas y referencias establecidas en los protocolos respectivos.

Se cumple con adjuntar el Recibo Digital a efectos de la trazabilidad respectiva del proceso.

Lambayeque, 28 de abril del 2026.



FIRMA

MSc. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA

DNI: 16505740

ASESOR

INFORME DE ORIGINALIDAD

Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa (Flor de Jamaica) frente a cepas de Escherichia coli productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y Shigella sp.

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%	14%	7%	7%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to MOODLE Trabajo del estudiante	1%
2	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
3	Submitted to Universidad Andina del Cusco Trabajo del estudiante	<1%
4	Villanueva Alvaro, Naysha Sharon. "Efecto antibacteriano In Vitro de enjuagues bucales sobre Actinomyces viscosus y Streptococcus mutans, Puno 2023", Universidad Nacional del Altiplano de Puno (Peru) Publicación	<1%
5	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru Trabajo del estudiante	<1%
7	Submitted to Universidad Tecnológica de los Andes Trabajo del estudiante	<1%



FIRMA
MSC. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA
DNI: 16505740
ASESOR

8	Submitted to Universidad de San Martin de Porres Trabajo del estudiante	<1 %
9	Submitted to Universidad Maria Auxiliadora SAC Trabajo del estudiante	<1 %
10	Submitted to Universidad Senor de Sipan Trabajo del estudiante	<1 %
11	Levi Jafet Bastida-Ramírez, Leticia Buendía-González, Euridice Ladisu Mejía-Argueta, Antonio Sandoval-Cabrera et al. "Lippia organoides and Thymus vulgaris Essential Oils Synergize with Ampicillin against Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli", Microorganisms, 2024 Publicación	<1 %
12	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
13	repositorio.unicesar.edu.co Fuente de Internet	<1 %
14	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	www.ins.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
16	ar.bookimed.com Fuente de Internet	<1 %
	es.scribd.com	



FIRMA
MSC. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA
DNI: 16505740
ASESOR

17	Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.usil.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
20	bolsa-trabajo.upads.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
21	dspace-api.istmas.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
22	publicaciones.usanpedro.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
23	repositorio.upn.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
24	dspace.espoch.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
25	Tatiana Camacho-Suntaxi, Santiago Sánchez-Loja. "Antibacterial activity of the Agaricus pampeanus (Agaricaceae) ethanol extract against Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa.", Actualidades Biológicas, 2020 Publicación	<1 %
26	acikerisim.pau.edu.tr:8080 Fuente de Internet	<1 %
27	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %



FIRMA
MSC. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA
DNI: 16505740
ASESOR

28	cia.uagraria.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
29	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
30	inba.info Fuente de Internet	<1 %
31	pdfs.semanticscholar.org Fuente de Internet	<1 %
32	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
33	Submitted to uncedu Trabajo del estudiante	<1 %
34	Submitted to Fundación Universitaria del Area Andina Trabajo del estudiante	<1 %
35	eur-lex.europa.eu Fuente de Internet	<1 %
36	www.cop.org.pe Fuente de Internet	<1 %
37	issuu.com Fuente de Internet	<1 %
38	repositorio.autonoma.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
39	repositorio.upsjb.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
40	G. Romero-Cullerés, I. Planells-Romeo, P. Martínez de Salazar-Muñoz, J. Conejero-	<1 %



FIRMA
MSC. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA
DNI: 16505740
ASESOR

RECIBO DIGITAL

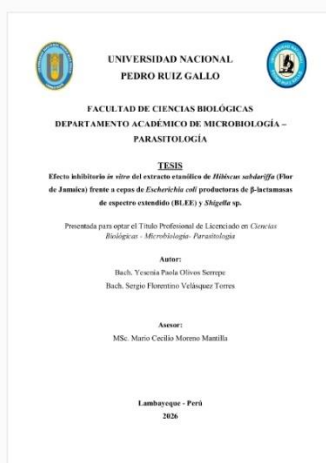


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Yesenia Paola Olivos Serrepe , Sergio Florentino Velásquez Tor...
Título del ejercicio: Quick Submit
Título de la entrega: Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de Hibiscus sa...
Nombre del archivo: INFORME_DE_TESIS_PAOLA_Y_SERGIO_-_CORREGIDO_09-02-20...
Tamaño del archivo: 4.41M
Total páginas: 72
Total de palabras: 14,265
Total de caracteres: 80,719
Fecha de entrega: 22-abr-2026 09:35p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2940968197



Derechos de autor 2026 Turnitin. Todos los derechos reservados.

FIRMA
MSC. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA
DNI: 16505740
ASESOR

DEDICATORIA

Dedicatoria Paola Olivos

A Dios, por sostenerme en cada etapa de mi vida, darme fuerzas en los momentos de cansancio y abrir las puertas que hicieron posible alcanzar esta meta.

A mi papá José, quien dio todo de sí para que sus hijos sean profesionales. Aunque hoy no estés, este logro es tuyo; siempre fuiste y serás mi mayor ejemplo.

A mi mamá Elsa, mi fuerza constante y mi mayor bendición. Gracias por celebrar cada paso conmigo y sostenerme incluso cuando yo dudé.

A quienes creyeron en mí en los momentos difíciles, gracias por impulsarme a seguir. Cada logro también les pertenece.

Dedicatoria Sergio Velásquez

A Dios, por iluminar mi camino, darme la vida y la fortaleza interior para mantenerme firme aún en medio de las dificultades.

A mis padres, Serapio y Donicia, y a mi hermana Ana, por su amor, sacrificio y apoyo incondicional. Este logro es también de ustedes.

A mis amigos Saúl y Sheila, por su amistad sincera, apoyo constante y ánimo en cada etapa de este proceso.

A todos quienes confiaron y apoyaron la realización de este trabajo, por su respaldo, orientación y estímulo a lo largo de su ejecución.

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento al MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla, asesor de esta tesis, por su acompañamiento permanente, sus observaciones oportunas y su compromiso académico, los cuales fueron fundamentales para el desarrollo riguroso y ordenado de la presente investigación, asimismo, agradecemos de manera especial su orientación metodológica clara y exigente, que contribuyó de forma decisiva a la adecuada estructuración de este trabajo.

Del mismo modo, manifestamos nuestro reconocimiento a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en particular a la carrera profesional de Ciencias Biológicas y a la especialidad de Microbiología, por la sólida formación científica brindada, de manera especial, al Laboratorio de Microbiología Humana y al personal del Servicio Técnico de la especialidad, por facilitar el acceso a los ambientes, materiales y apoyo técnico indispensables para el desarrollo experimental de este estudio.

ÍNDICE GENERAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
CONSTANCIA DE VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD.....	iv
DEDICATORIA	x
AGRADECIMIENTO	xi
ÍNDICE GENERAL	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRAC	xvii
INTRODUCCIÓN	18
CAPÍTULO I. DISEÑO TEÓRICO	20
1.1. Antecedentes	20
1.2. Bases teóricas	22
1.3. Bases conceptuales (Operacionalización o categorización de variables).....	25
CAPÍTULO II. DISEÑO METODOLÓGICO	27
2.1. Diseño de contrastación de hipótesis/procedimiento a seguir en la investigación	27
2.2. Población y muestra.....	27
2.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	31
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	33
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i>	29
Tabla 2 Diámetros promedio de los halos de inhibición (mm) producidos por el extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>E. coli</i> BLEE y <i>Shigella</i> sp. (200–1000 mg/mL). ..	35
Tabla 3 Comparación de los halos de inhibición del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>E. coli</i> BLEE y <i>Shigella</i> sp. (200–1000 mg/mL).	36
Tabla 4 Sensibilidad de cepas de <i>E. coli</i> BLEE y <i>Shigella</i> sp. al extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> : promedios de los halos de inhibición (mm) considerando todas las concentraciones.	37
Tabla 5 Análisis de varianza (ANOVA) del efecto del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> sobre los halos de inhibición frente a <i>E. coli</i> BLEE y <i>Shigella</i> sp., según concentración y cepa bacteriana.	40
Tabla 6 Comparación múltiple de Tukey de los diámetros promedio de los halos de inhibición del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>E. coli</i> BLEE, según concentración.	41
Tabla 7 Comparación múltiple de Tukey de los diámetros promedio de los halos de inhibición del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>Shigella</i> sp., según concentración. ..	43
Tabla 8 Comparación de la susceptibilidad de cepas de <i>E. coli</i> BLEE frente al extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i>	45
Tabla 9 Comparación de la susceptibilidad de cepas de <i>Shigella</i> sp. frente al extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> mediante la prueba de Tukey.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Comparación de los promedios de halos de inhibición entre las concentraciones del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>E. coli</i> BLEE.	42
Figura 2 Comparación de los promedios de halos de inhibición entre las concentraciones del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>Shigella</i> sp..	44
Figura 3 Comparación de la susceptibilidad de cepas de <i>E. coli</i> BLEE frente al extracto etanólico <i>H. sabdariffa</i>	46
Figura 4 Comparación de la susceptibilidad de cepas de <i>Shigella</i> sp. frente al extracto etanólico <i>H. sabdariffa</i>	48
Figura 5 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (flor de Jamaica).	61
Figura 6 Placas de agar McConkey con cultivos de tres cepas de <i>E. coli</i> BLEE.	64
Figura 7 Pruebas bioquímicas de TSI, Citrato, LIA y MIO para confirmación de cepas del género <i>E. coli</i>	64
Figura 8 Placas de agar Salmonella-Shigella con cultivos de cepas de <i>Shigella</i> sp.	65
Figura 9 Pruebas bioquímicas de TSI y LIA para confirmación de 3 cepas del género <i>Shigella</i> sp..	65
Figura 10 Flores secas de <i>H. sabdariffa</i>	66
Figura 11 Flores seleccionadas para el extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i>	66
Figura 12 Almacenamiento del macerado de las flores secas de <i>H. sabdariffa</i>	67
Figura 13 Pesado del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i>	67
Figura 14 Preparación de la solución madre y de las concentraciones del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i>	68
Figura 15 Concentraciones del extracto etanólico empleadas en el estudio.	69
Figura 16 Preparación de placas de Petri con agar Müller-Hinton.	70
Figura 17 Preparación del tubo patrón 0.5 de McFarland.	70
Figura 18 Siembra en agar Müller-Hinton con hisopo estéril impregnado con el inóculo bacteriano.	71

Figura 19 Colocación de discos impregnados con diferentes concentraciones del extracto etanólico y de un disco control con solución salina estéril en el centro de cada placa.	72
Figura 20 Ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer) mostrando la actividad inhibitoria del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>E. coli</i> BLEE.	73
Figura 21 Ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer) mostrando la actividad inhibitoria del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>Shigella</i> sp.	74

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto vegetal etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp. La investigación fue de tipo básica, de nivel explicativo y de diseño experimental. La muestra estuvo constituida por tres cepas de *E. coli* BLEE y *Shigella* sp. conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNPRG, seleccionadas mediante muestreo no probabilístico por criterio. El extracto etanólico de *H. sabdariffa* fue evaluado a concentraciones de 1000, 800, 600, 400 y 200 mg/mL, empleándose la técnica de difusión en agar; la técnica empleada fue la observación y el instrumento una ficha de recolección de datos. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* ejerció un efecto inhibitorio concentración-dependiente frente a ambas especies bacterianas, con incrementos de halos de inhibición de 6,33 a 12,22 mm en *E. coli* BLEE y de 10,67 a 19,11 mm en *Shigella* sp.. El análisis de varianza evidenció diferencias significativas entre concentraciones tanto para *E. coli* BLEE ($p < 0,001$) como para *Shigella* sp. ($p = 0,004$), a nivel de cepas, no se observaron diferencias en *E. coli* BLEE ($p = 0,092$), mientras que en *Shigella* sp. sí fueron significativas ($p < 0,001$), identificándose a las cepas 1 y 3 como las más susceptibles. Se concluye que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* presenta actividad inhibidora *in vitro* frente a *E. coli* BLEE y *Shigella* sp..

Palabras clave: *Hibiscus*; *Escherichia coli*; Beta-Lactamasas; *Shigella*; Extractos vegetales.

ABSTRAC

This research aimed to determine the in vitro inhibitory effect of the ethanolic plant extract of *Hibiscus sabdariffa* (Jamaica flower) against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains of *Escherichia coli* and *Shigella* sp. The research was basic, explanatory, and experimental in design. The sample consisted of three ESBL-producing *E. coli* and *Shigella* sp. strains maintained in the Microbiology and Parasitology Laboratory of UNPRG, selected using non-probability sampling. The ethanolic extract of *H. sabdariffa* was evaluated at concentrations of 1000, 800, 600, 400, and 200 mg/mL using the agar diffusion technique. Data was collected through observation using a data collection form. The results showed that the ethanolic extract of *H. sabdariffa* exerted a concentration-dependent inhibitory effect against both bacterial species, with increases in inhibition zones from 6.33 to 12.22 mm in ESBL-producing *E. coli* and from 10.67 to 19.11 mm in *Shigella* sp. Analysis of variance revealed significant differences between concentrations for both ESBL-producing *E. coli* ($p < 0.001$) and *Shigella* sp. ($p = 0.004$). At the strain level, no differences were observed in ESBL-producing *E. coli* ($p = 0.092$), while in *Shigella* sp., differences were significant ($p < 0.001$), with strains 1 and 3 identified as the most susceptible. It is concluded that the ethanolic extract of *H. sabdariffa* exhibits in vitro inhibitory activity against ESBL-producing *E. coli* and *Shigella* sp.

Keywords: *Hibiscus*; *Escherichia coli*; Beta-lactamases; *Shigella*; Plant extracts.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales constituye una práctica ancestral profundamente arraigada en Perú, un país reconocido por su mega diversidad y el vasto conocimiento tradicional de su flora. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80 % de la población mundial, y un porcentaje significativo en regiones como Latinoamérica, recurre a la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades primarias de salud. En este contexto, el *Hibiscus sabdariffa*, conocido comúnmente como flor de Jamaica, ha ganado popularidad en el Perú, no solo se consume ampliamente como una bebida refrescante y colorante natural, sino que diversas comunidades le atribuyen empíricamente propiedades medicinales. Si bien su cultivo no es masivo en todo el país, se adapta y se encuentra en varias regiones, facilitando su acceso y uso tradicional.

Tradicionalmente, a la flor de Jamaica se le han atribuido propiedades diuréticas, antioxidantes e incluso antisépticas, lo que sugiere un potencial en el manejo de diversas afecciones. Estudios recientes han evidenciado que los extractos de *Hibiscus sabdariffa* poseen actividades antimicrobianas significativas contra una variedad de patógenos, incluyendo bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y hongos como *Candida albicans*. Estos efectos se atribuyen principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas en la planta (Venkatesan et al., 2024).

Paralelamente, la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos representa una amenaza global para la salud pública, con un impacto particularmente severo en regiones como Latinoamérica. En Perú, se ha observado un incremento preocupante en la prevalencia de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), como *Escherichia coli*. Estas cepas son responsables de infecciones urinarias, intraabdominales y sepsis, complicando significativamente su manejo clínico. De igual manera, las infecciones por *Shigella* sp, una causa común de diarrea disenteriforme, presentan un desafío creciente debido a la emergencia de cepas multirresistentes. Esta situación limita drásticamente las opciones terapéuticas disponibles y contribuye a una mayor morbilidad y mortalidad, especialmente en poblaciones vulnerables como los niños. La problemática se agrava por la limitada disponibilidad de tratamientos efectivos, el aumento de los costos asociados a la atención médica y la escasez de nuevos antibióticos en el mercado.

A pesar del conocimiento empírico sobre las propiedades medicinales del *Hibiscus sabdariffa* y la relevancia de su uso tradicional en diversas comunidades peruanas, existe una marcada carencia de estudios científicos que validen rigurosamente su eficacia y seguridad

frente a patógenos resistentes específicamente relevantes en nuestro contexto, como las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y *Shigella* sp. Esta brecha en la investigación no solo impide su inclusión en protocolos terapéuticos estandarizados, sino que también limita el aprovechamiento de su potencial como una alternativa o coadyuvante viable y sostenible en la lucha contra la creciente resistencia antimicrobiana, esto subraya la urgencia y pertinencia de investigar su efecto inhibitorio *in vitro* como una contribución vital a la salud pública.

En el presente estudio se planteó como problema de investigación la siguiente interrogante: ¿Cuál es el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.? a partir de ello, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo: Existe un alto efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.

En coherencia con el problema e hipótesis planteados, el estudio tuvo como objetivo general: Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp., para alcanzar este propósito, se establecieron los siguientes objetivos específicos: Analizar comparativamente el efecto del extracto etanólico y sus distintas concentraciones sobre cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE y *Shigella* sp., y Determinar el grado de sensibilidad de dichas cepas frente a las diferentes concentraciones del extracto mediante ensayos microbiológicos *in vitro*.

CAPÍTULO I. DISEÑO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Padilla y Neyra (2022), en un estudio de tipo experimental con enfoque prospectivo, se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. frente a cepas de *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas de exposición. El diseño contempló el uso de 16 placas Petri, en las cuales se colocaron 7 discos de papel filtro N°4 por placa, sumando un total de 112 discos y pozos. La técnica utilizada fue la difusión en agar mediante el método de Kirby-Bauer adaptado con pozos. Las placas fueron distribuidas en cuatro grupos experimentales según la concentración del extracto (25%, 50%, 75% y 100%), obtenidas por dilución del extracto madre (preparado mediante maceración en etanol al 96%) con alcohol en distintas proporciones. Como controles se emplearon clorhexidina al 0.12% (positivo) y agua destilada (negativo). Los resultados evidenciaron un efecto inhibitorio del extracto de *H. sabdariffa* L. sobre *S. mutans*, siendo más pronunciado a las 48 horas y en la concentración al 100 %, donde se observó un halo de inhibición promedio de 14.23 mm, este hallazgo sugiere el potencial del extracto como agente antimicrobiano alternativo.

Juárez (2023), mediante un estudio con enfoque cuantitativo, de diseño experimental y corte transversal, evaluó el efecto antimicótico del extracto etanólico de flores secas de *H. sabdariffa* L. (flor de Jamaica) frente a la cepa *Candida albicans*. Para determinar la actividad antimicótica, se empleó la técnica de difusión en agar tipo Kirby-Bauer. Se establecieron cuatro grupos experimentales con concentraciones de extracto al 25%, 50%, 75% y 100%. Se utilizó el antifúngico Fluconazol (F) como control positivo. Los resultados demostraron actividad antimicótica significativa en las concentraciones del 75% y 100%. A una concentración del 75%, el extracto presentó un 21.91% de inhibición en comparación con el Fluconazol, considerado como referencia con un 100% de efectividad. A una concentración del 100%, el extracto alcanzó un efecto de inhibición del 47.96%, indicando una mayor eficacia a medida que se incrementa la concentración del extracto.

Del Rosario (2023), evaluó con un estudio experimental el efecto antimicrobiano del extracto metanólico y el aceite esencial de *H. sabdariffa* L. frente a *Escherichia coli*, con el objetivo de proponer su uso como aditivos naturales en la industria agroalimentaria. Se identificaron compuestos bioactivos mediante análisis fitoquímico: el extracto presentó flavonoides, saponinas y taninos, mientras que el aceite esencial mostró alcaloides, saponinas y taninos. Se aplicaron tratamientos con concentraciones del 20%, 30% y 40%. Los tratamientos más eficaces fueron el T3 (extracto metanólico al 40%) con un 31.67% de

inhibición, y el T8 (aceite esencial al 40%), ambos derivados demostraron actividad antimicrobiana significativa frente a *E. coli*.

Encarnación y Esquivel (2018), realizaron un estudio experimental *in vitro* de tipo cuantitativo y cohorte longitudinal que comparó el efecto antibacteriano del extracto de *H. sabdariffa* (70%) frente a la clorhexidina al 0.12% sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Se evaluaron los halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas en medio de cultivo Müller-Hinton, utilizando un diseño con dos grupos experimentales y un grupo control. A las 72 horas, el extracto de *H. sabdariffa* mostró un halo de inhibición promedio de 23 mm en el 8.9 % de las muestras, mientras que la clorhexidina generó halos de 24 mm en el 11.1%. El grupo control no presentó inhibición. Se concluyó que *H. sabdariffa* posee efecto antibacteriano comparable al de la clorhexidina 0.12%.

Velázquez y Silva (2024), en su estudio reciente emplearon una metodología de síntesis verde para obtener nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando extractos de hojas y tallos de *H. sabdariffa* var. Colima, con el fin de generar un agente antimicrobiano ecológico. Las AgNPs demostraron una alta capacidad antioxidante con valores de reducción cercanos al 90% en las pruebas DPPH, ABTS y FRAP. Asimismo, mostraron una inhibición superior al 90% frente a *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*, así como del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. El bioensayo con *Artemia salina* confirmó la ausencia de toxicidad. Estos resultados respaldan el uso de *H. sabdariffa* como agente reductor en la síntesis de nanopartículas antimicrobianas seguras y sostenibles para aplicaciones en la industria alimentaria.

Portillo et al. (2022), evaluaron el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cálices de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium multirresistentes en ratones CD⁻¹ (n=6 por grupo, 9 grupos totales). La concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del extracto fueron 20 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente; para el cloranfenicol, entre 17.5 y 82 µg/mL. Tras la inoculación con 1×10^4 UFC de cada patógeno, se administraron tratamientos orales de extracto (50 mg/mL), cloranfenicol (82 µg/mL) o solución salina. En los grupos tratados con extracto acuoso no se detectaron bacterias en heces a partir del segundo día y los animales se recuperaron. En contraste, en los grupos con cloranfenicol o sin tratamiento, las bacterias persistieron y se registró mortalidad. Esto indica que el extracto de *H. sabdariffa* tiene mayor eficacia antimicrobiana contra estas bacterias multirresistentes en este modelo.

Rangel et al. (2018), evaluaron el comportamiento de bacterias transmitidas por alimentos en mangos enteros y cortados (variedades Ataulfo y Kent), así como el efecto

antibacteriano de extractos de cáliz de *H. sabdariffa* y sanitizantes químicos. Las bacterias evaluadas incluyeron *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp. y diversas cepas de *Escherichia coli*. Los mangos enteros contaminados sumergidos por 5 minutos en extractos acuosos, etanólicos, metanólicos, acetónicos y acetato de etilo, así como en hipoclorito de sodio, plata coloidal y ácido acético, mostraron una reducción bacteriana significativa. Después de 20 días a 25 ± 2 °C, la carga bacteriana disminuyó en aproximadamente 2.5 log UFC/g en mangos Ataulfo y 2 log UFC/g en mangos Kent; a 3 ± 2 °C, las reducciones fueron de 1.9 y 1.5 log UFC/g respectivamente. En mangos cortados, las bacterias crecieron a 25 ± 2 °C, pero su crecimiento se inhibió a 3 ± 2 °C. No se detectaron residuos de solventes en los extractos secos. Los extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos del cáliz de jamaica lograron una reducción mayor (entre 2 y 2.6 log UFC/g) de bacterias que el hipoclorito de sodio, plata coloidal y ácido acético.

1.2. Bases teóricas

Hibiscus sabdariffa

Hibiscus sabdariffa L. es un arbusto que pertenece a la subfamilia Malvoidea, familia Malvaceae y orden Malvales dentro del clado Rosidae, Superosidae que corresponde a las Pentapétalas y Dicotiledoneas nucleares (APC V, 2026). Este arbusto generalmente crece dos metros, pero pueden llegar hasta tres dependiendo de las condiciones edafoclimáticas, presenta cinco pétalos y un cáliz carnoso succulento, el mismo que de manera industrial es deshidratado y en esa forma llega a los centros de expendio. Es una planta herbácea anual originaria de África tropical, especialmente de regiones como Egipto y Sudán. Actualmente, su cultivo se ha extendido a diversas regiones del mundo, incluyendo América Latina y el sudeste asiático, debido a sus múltiples aplicaciones en la alimentación y la medicina tradicional (Fosado et al., 2022).

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* son una fuente rica en compuestos bioactivos que le otorgan múltiples propiedades terapéuticas y funcionales. Entre los más destacados se encuentran las antocianinas, pigmentos que confieren el característico color rojo intenso a la flor. Las principales antocianinas reportadas son la delfinidina-3-sambubiósido y la cianidina-3-sambubiósido, las cuales poseen actividad antioxidante significativa (Cid-Ortega y Guerrero-Beltrán, 2020).

Diversos estudios han demostrado que *Hibiscus sabdariffa* posee una notable riqueza fitoquímica, con compuestos que le otorgan propiedades terapéuticas relevantes. Los análisis realizados en sus cálices secos revelan la presencia significativa de flavonoides (20.08%), taninos (17.0%), alcaloides (2.14%), fenoles (1.1%), saponinas (0.96%) y glucósidos (0.13%).

Estos metabolitos secundarios contribuyen a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, diuréticos y cardioprotectores. Además, la planta es fuente de minerales esenciales como hierro, cobre, calcio, magnesio y manganeso, lo que complementa sus beneficios en la salud humana (Okereke et al., 2015);); así mismo, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC/MS) se han podido identificar entre los constituyentes químicos ácido de hibisco, ácido 3-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 5-feruloilquínico, cianidina-3-O-glucósido, entre los flavonoides a miricetina, quercetina-7-O-rutinósido, quercetina-3-O-glucósido, delfinidina-3-O-sambubiósido y kaempferol-3-O-p-cumaroil-glucósido, además de ser un potente antioxidante llegando a capturar el 86 % del radical DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo), un radical sintético utilizado en laboratorio para pruebas antioxidantes de productos naturales (Harmita, et al., 2022)

H. sabdariffa ha sido ampliamente estudiada por sus múltiples beneficios para la salud humana. Entre sus propiedades terapéuticas destacan su notable actividad antioxidante, atribuida a la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas, que le confieren la capacidad de neutralizar radicales libres y prevenir el daño oxidativo celular. Además, diversos estudios han evidenciado su efecto antihipertensivo, ya que el consumo regular de infusiones de esta planta puede contribuir a la reducción de la presión arterial en individuos con hipertensión leve a moderada. En cuanto a sus propiedades hipolipemiantes, se ha observado que los extractos de *H. sabdariffa* pueden disminuir los niveles de colesterol LDL y triglicéridos, favoreciendo así el control del perfil lipídico. Asimismo, se le atribuyen efectos diuréticos y hepatoprotectores, lo que respalda su uso tradicional en la promoción de la diuresis y la protección hepática frente a agentes tóxicos (Shaban et al., 2022). Además, estudios fitoquímicos han identificado la presencia de triterpenos, esteroides, taninos, saponinas, alcaloides y quinonas, compuestos con distintas acciones biológicas, incluyendo efectos antimicrobianos, hepatoprotectores y antiinflamatorios (Fosado et al., 2022).

Enterobacterias

Los miembros de esta familia presentan como características microbiológicas: tamaño intermedio (de 0.3 a 1.0 por 1.0 a 6 μm), comparten una estructura antigénica conocida como antígeno común enterobacteriano; algunas especies pueden desplazarse mediante flagelos peritricos, mientras que otras carecen de movilidad, no forman esporas y son capaces de desarrollarse rápidamente en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, ya que son anaerobios facultativos, además, pueden crecer en medios de cultivo selectivo y no selectivo. Por otro lado, cuentan con un metabolismo que, fermenta la glucosa, reduce nitratos, son positivas a la prueba de catalasa y negativas a la oxidasa (Pérez et al., 2014).

Las enterobacterias son responsables de una amplia gama de patologías en los seres humanos, incluyendo aproximadamente un tercio de los casos de bacteriemia, más del 70 % de las infecciones del tracto urinario (ITU), así como numerosas infecciones gastrointestinales, algunas especies, como *Salmonella* serotipo *typhi*, *Shigella* spp. y *Yersinia pestis*, están estrechamente relacionadas con enfermedades humanas específicas (Murray et al., 2021).

Escherichia coli (*E. coli*) forma parte del grupo de las enterobacterias y se distingue por su adaptabilidad, su frecuente presencia en diversos entornos y su tendencia a experimentar modificaciones genéticas de forma espontánea. Se han identificado numerosos genomas secuenciados de *E. coli*, lo que evidencia una notable variabilidad genética entre cepas comensales y patógenas, demostrando la diversidad existente dentro de esta misma especie. Algunas cepas son inofensivas y habitan normalmente el intestino de humanos y animales, desempeñando un rol como parte de la flora intestinal. No obstante, otras cepas han desarrollado características patogénicas, clasificándose en dos grandes grupos: las que causan infecciones intestinales (como la diarrea) y las que provocan infecciones en otros sitios del cuerpo. Además, se han identificado cepas híbridas que combinan rasgos de distintos patotipos. Las variantes facultativas pueden vivir normalmente en el intestino sin causar daño, pero en determinadas condiciones pueden comportarse como patógenos oportunistas al diseminarse a otros tejidos. Por otro lado, las cepas intestinales obligadas son capaces de originar enfermedades digestivas de distinta gravedad, desde infecciones leves hasta trastornos serios que ponen en riesgo la vida del paciente (Braz et al., 2020).

Shigella sp es una bacteria Gram-negativa que representa la principal causa de la shigelosis en diversas regiones, incluyendo Perú y otros países de Latinoamérica, cuya presencia siempre indica una infección activa. Su transmisión se da predominantemente por la vía fecal-oral, requiriendo una dosis infecciosa mínima para provocar la enfermedad, la cual se manifiesta con diarrea acuosa que puede progresar a disentería (sangre y moco en heces), fiebre y cólicos abdominales. Esta infección es particularmente grave en niños menores de cinco años en comunidades con saneamiento deficiente, donde contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad infantil. El manejo de la shigelosis se ha tornado crecientemente complejo debido a la emergencia y propagación de cepas multirresistentes a antibióticos de uso común, como las fluoroquinolonas y el trimetoprim-sulfametoxazol, lo que limita drásticamente las opciones terapéuticas, prolonga la enfermedad, incrementa el riesgo de complicaciones y eleva los costos de atención médica. Esta compleja situación epidemiológica de *Shigella* sp en Perú subraya la urgente necesidad de explorar alternativas terapéuticas innovadoras. (Toro y Correa, 2010).

La resistencia bacteriana de estas dos especies constituye una problemática persistente y de gran relevancia para la salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha identificado como una de sus principales preocupaciones debido a las graves consecuencias que acarrea, tanto a nivel sanitario como económico. De hecho, proyecciones recientes advierten que, para el año 2050, las muertes atribuibles a infecciones resistentes podrían superar a las causadas por el cáncer en la actualidad. Desde el punto de vista económico, estudios realizados en el Reino Unido estiman que el impacto financiero global de esta crisis podría alcanzar los 100 billones de dólares. La rápida proliferación de cepas bacterianas multirresistentes y panresistentes ha puesto en duda la efectividad de muchos antibióticos disponibles, generando un desafío de escala mundial (Camacho, 2023).

Los antibióticos betalactámicos constituyen una amplia clase de agentes antimicrobianos que incluye a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y los inhibidores de penicilinasas, todos ellos caracterizados por la presencia de un anillo betalactámico en su estructura. Su acción terapéutica se basa en interferir con la síntesis de la pared celular bacteriana, al unirse a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Sin embargo, muchas bacterias, especialmente las gramnegativas, han desarrollado mecanismos de defensa mediante la producción de enzimas denominadas betalactamasas, que degradan el anillo betalactámico y neutralizan el efecto del antibiótico (Astocondor, 2018). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), también conocidas como de espectro ampliado, son enzimas producidas principalmente por bacterias gramnegativas como *Escherichia coli* y *Shigella* sp. Estas enzimas confieren resistencia no solo a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, sino también a oximino-cefalosporinas y al aztreonam (Miranda, 2013). Los genes responsables de la producción de BLEE se localizan en elementos genéticos móviles, lo que favorece su propagación entre bacterias. Además, estas enzimas suelen estar asociadas a resistencia simultánea a otros antimicrobianos, como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Las familias más comunes de BLEE incluyen TEM, SHV y CTX-M (Pérez et al., 2014).

1.3. Bases conceptuales (Operacionalización o categorización de variables)

Operacionalización de variables

Variable independiente: Extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa*

Variable dependiente: Susceptibilidad de las cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.

Cuadro de operacionalización de variables

Variables	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Tipo de variable	Escala de medición
Variable independiente: Extracto etanólico de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Sustancia obtenida a partir de <i>H. sabdariffa</i> mediante extracción etanólica, utilizada para impregnar discos en distintas concentraciones, con el fin de evaluar su efecto inhibitorio sobre cepas de estudio, mediante el método de Kirby-Bauer.	Concentración del extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i>	Concentraciones de 1000 mg/mL a 200 mg/mL ensayadas en placa	Numérica	De Razón
Variable dependiente: Susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y <i>Shigella</i> sp.	Es la capacidad de inhibición o eliminación observada en cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE y <i>Shigella</i> sp. tras la exposición al extracto etanólico de <i>H. sabdariffa</i> , evaluada a través del diámetro del halo de inhibición alrededor de los discos impregnados.	Inhibición del crecimiento bacteriano	Diámetro del halo de inhibición (mm)	Numérica	De Razón

CAPÍTULO II. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1. Diseño de contrastación de hipótesis/procedimiento a seguir en la investigación

Diseño de investigación:

La investigación fue de tipo básica y de nivel explicativo, ya que permitió demostrar la existencia de una relación de causa y efecto a partir de la comparación de los resultados obtenidos bajo condiciones experimentales controladas, presentó un diseño experimental, debido a que se manipuló intencionalmente la variable independiente (extracto etanólico de *H. sabdariffa*) para observar su efecto causal sobre la variable dependiente, definida como la susceptibilidad de cepas bacterianas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.

La hipótesis se contrastó mediante un diseño factorial completamente al azar ($2 \times 3 \times 1 \times 5 \times 3$), considerando como factores: la especie bacteriana (2 niveles: *E. coli* BLEE y *Shigella* sp.), el número de cepas por especie (3 niveles), el tipo de extracto vegetal (1 nivel: extracto etanólico de *H. sabdariffa*), las concentraciones del extracto (5 niveles) y el número de repeticiones por tratamiento (3 niveles).

2.2. Población y muestra

La población de este estudio estuvo constituida por todas las cepas viables de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp. conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, provenientes de aislamientos clínicos realizados previamente. En cuanto al material botánico, se utilizaron los pétalos de *H. sabdariffa* (Flor de Jamaica) como fuente para la obtención del extracto etanólico empleado en los ensayos *in vitro*, para lo cual se dispuso de 500 g de pétalos secos adquiridas en el centro de abastos de la ciudad de Chiclayo; estas se consideraron como material biológico y no como unidad de análisis.

Para la muestra, se emplearon tres cepas por cada especie bacteriana (*E. coli* BLEE y *Shigella* sp.), el diseño experimental consideró cinco concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* (1000, 800, 600, 400 y 200 mg/mL), por ende, el diseño factorial se estructuró como $2 \times 3 \times 1 \times 5 \times 3$, correspondiente a dos especies bacterianas, tres cepas por especie, un tipo de extracto vegetal, cinco concentraciones y tres repeticiones por tratamiento, lo que dio un total de 90 unidades experimentales, con las cuales se evaluó *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto.

Procedimiento a seguir en la investigación

a) Obtención de *Hibiscus sabdariffa*

La flor de Jamaica se obtuvo en el centro de abastos de la ciudad de Chiclayo, lugar donde son expendidos de forma disecadas y empaquetadas.

b) Preparación del extracto etanólico de *H. sabdariffa*

Para el inicio de la extracción se tuvo en cuenta todas las condiciones de asepsia que se deben reunir para llevar a cabo la extracción de manera estéril, trabajando con las medidas de bioseguridad requeridas. El material de laboratorio a utilizar se esterilizó, de la misma manera se desinfectó la mesa de trabajo con alcohol etílico de 96° antes de iniciar el proceso. El procedimiento fue de la siguiente manera:

- Se seleccionaron los pétalos secos más conservados, descartando las impurezas y los pétalos dañados.
- En un frasco ámbar se depositará 500 gr de pétalos triturados y luego se agregaron 1000 ml de alcohol etanólico al 96 %, se tapó el envase de forma hermética, se envolvió con papel aluminio y se dejó reposar en lugar oscuro.
- Para obtener una mejor disolución, el frasco ámbar que contendrá el producto de maceración se mantuvo en oscuridad agitándose por 5 min todos los días durante 7 días.
- Una vez transcurridos los 7 días, la fase líquida se filtró y se depositó en recipientes para posterior llevar a incubar hasta lograr la evaporación final de la solución de alcohol.
- Posterior a la evaporación de la solución de alcohol, la fase sólida restante fue almacenada en frascos color ámbar con ayuda de espátula estéril.
- Se procedió a pesar el frasco para determinar la masa del extracto, para su posterior uso en la fase experimental.

c) Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa*

Del total de extracto seco obtenido de *H. sabdariffa*, se utilizaron 10 g para la preparación de la solución madre, esta cantidad de extracto etanólico seco se disolvió en alcohol etílico al 40 % dentro de un frasco ámbar de 10 mL de capacidad, completando dicho volumen y obteniéndose así una concentración final de 1000 mg/mL. A partir de esta solución madre, se prepararon diluciones seriadas utilizando alcohol etílico al 40 % como diluyente, hasta obtener las siguientes concentraciones: 800 mg/mL, 600 mg/mL, 400 mg/mL y 200 mg/mL, siguiendo el procedimiento descrito por Moreno (2020) y las recomendaciones del estándar CLSI M07-A9 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) (ver Tabla 1).

Tabla 1

Concentraciones del extracto etanólico de H. sabdariffa.

Solución madre	Alcohol al 40 %	Volumen final	Concentración final
(mL)	(mL)	(mL)	(mg/mL)
10,0	0,0	1,0	1000 (+)
0,8	0,2	1,0	800
0,6	0,4	1,0	600
0,4	0,6	1,0	400
0,2	0,8	1,0	200

Nota. +: Concentración de la solución madre.

d) Obtención de las cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas (BLEE) y *Shigella* sp. fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”.

e) Verificación de las cepas bacterianas (Moreno y Villegas, 2018)

Para la identificación de enterobacterias, las cepas fueron sembradas en agar McConkey y agar SS, para luego realizar pruebas bioquímicas como: TSI, citrato, LIA, MIO; de esta manera quedaron identificadas en género y especie para su posterior utilización en la investigación.

f) Determinación de fenotipo BLEE (Lezameta et-al., 2010).

- La determinación de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas (BLEE) se realizó mediante el método de Jarlier (método de sinergia del doble disco).
- Se utilizó una placa de agar Mueller Hinton (MH) y se inoculó con una suspensión bacteriana de 0,5 McFarland, sobre ella se colocaron discos de susceptibilidad antimicrobiana: ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g) y cefepime (30 μ g) a 20 mm de centro a centro de un disco central de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g), esta placa se incubará a 35 °C por 18 – 24 h; posteriormente, se realizó la lectura.
- La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico entre el inhibidor y los discos de antimicrobianos).

g) Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica)

Estandarización del Inóculo bacteriano (INS, 2010):

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar. El inóculo se obtuvo mediante el método descrito por el Instituto Nacional de Salud, según el cual se utiliza solución salina fisiológica esterilizada como diluyente para la estandarización hasta obtener una densidad poblacional semejante al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL.

Preparación de los discos de susceptibilidad (Romero y Villegas, 2017).

- Para la preparación de los discos sensibilidad se utilizó papel de filtro Whatman N° 01 del cual se obtuvo discos de 6 mm de diámetro con la ayuda de un perforador.
- Los discos se colocaron dentro de un frasco de vidrio el cual se esterilizó en autoclave (15 lb. de presión a 121° C por 15 minutos).
- Se dejó secar en horno a 80° durante 24 horas.
- Posteriormente, con la ayuda de una pinza estéril, los discos se colocaron en placas Petri esterilizadas y se impregnaron con 10 µl de cada una de las concentraciones del extracto natural de *H. sabdariffa*, se dejaron secar por 10 minutos para luego realizar la prueba de susceptibilidad.

Prueba de susceptibilidad bacteriana según el Método de Difusión de Kirby Bauer (Romero y Villegas, 2017)

- En placas Petri previamente esterilizadas se sirvieron 20 mL de Agar Müller Hinton, se dejaron solidificar y se realizó control de esterilización llevándolas a incubación a 37° por 24 horas.
- Con el hisopo esterilizado se tomó el inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo, luego se sembró superficialmente por estrías en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar y se dejó secar durante cinco minutos.
- Se colocaron los discos impregnados con el extracto natural a diferentes concentraciones y además el disco de control con 10 µl. de solución salina fisiológica estéril, a una distancia aproximada de 20 a 25 mm presionándolos suavemente con una pinza esterilizada.
- Luego de 15 minutos se llevaron las placas a incubación a 37 °C por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm) y se registró la medida los halos de cada una de las cepas.

- Se consideró además un control microbiológico del extracto para lo cual se sembró por separado en una placa con Agar Müller Hinton una muestra del extracto de *H. sabdariffa* (Flor de Jamaica).

h) Análisis estadístico de datos

Una vez obtenidas las mediciones de los halos de inhibición, se elaboró una base de datos en el programa Microsoft Excel, donde la información recolectada fue organizada y codificada de manera sistemática. Posteriormente, el análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics, aplicando estadística descriptiva e inferencial bajo un diseño factorial $2 \times 3 \times 1 \times 5 \times 3$, que consideró dos especies bacterianas, tres cepas por especie, un tipo de extracto vegetal, cinco concentraciones y tres repeticiones por tratamiento. Este diseño dio lugar a 30 combinaciones de tratamiento ($2 \times 3 \times 1 \times 5$) y a un total de 90 unidades experimentales (30 tratamientos $\times$ 3 repeticiones), con las cuales se evaluó *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto etanólico, para todas las pruebas estadísticas se estableció un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La comparación de las medias de los halos de inhibición entre los grupos experimentales se realizó mediante la prueba de Análisis de la Varianza (ANOVA), en aquellas comparaciones donde se identificaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey como análisis post hoc, con el fin de determinar entre qué grupos específicos existían dichas diferencias. Los resultados obtenidos fueron presentados en tablas y gráficos estadísticos, lo que permitió una interpretación clara y comparativa del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *H. sabdariffa*, en función de sus diferentes concentraciones y condiciones experimentales.

2.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnicas

La técnica empleada fue la observación, debido a que el procedimiento experimental se basó en la evaluación directa de los halos de inhibición formados alrededor de los discos impregnados con el extracto etanólico de *H. sabdariffa*, se registró de forma objetiva el efecto inhibitorio del extracto sobre las cepas bacterianas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp., considerando el diámetro de los halos de inhibición, medidos en milímetros, o su ausencia. Esta observación se realizó de manera sistemática y estructurada, en condiciones controladas de laboratorio, acorde con el diseño experimental planteado.

Instrumento de recolección de datos

El instrumento que se empleó fue una ficha de recolección de datos, diseñada para el registro sistemático de las medidas de los halos de inhibición obtenidos durante el experimento. Esta ficha contempló campos para la especie bacteriana (*E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.), el código de la cepa, la concentración del extracto etanólico de *H. sabdariffa*, el número de repetición y el diámetro del halo de inhibición medido en milímetros.

Los datos registrados en la ficha fueron ingresados en una base de datos en Excel, lo que permitió organizar y depurar la información de manera eficiente, posteriormente, la base fue exportada al software estadístico IBM SPSS Statistics versión 27 para el procesamiento y análisis de los datos obtenidos, garantizando un manejo sistemático, ordenado y preciso de la información recolectada (ver Anexo 01).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

El presente capítulo expone los resultados obtenidos del estudio *in vitro* del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas clínicas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp. Los ensayos de susceptibilidad bacteriana se realizaron mediante el método de difusión en agar, evaluando concentraciones crecientes del extracto entre 200 y 1000 mg/mL, a partir de estos ensayos se determinaron los diámetros de los halos de inhibición como medida de la actividad antibacteriana, organizando los datos en tablas y gráficos que permiten visualizar el comportamiento del extracto según la especie bacteriana, la concentración aplicada y la cepa evaluada.

Los resultados se presentan de acuerdo con los objetivos específicos del estudio: en primer lugar, se describe el efecto inhibitorio del extracto de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE y *Shigella* sp. a diferentes concentraciones; en segundo lugar, se analiza comparativamente la magnitud de los halos de inhibición entre ambas especies y entre sus respectivas cepas, con el fin de determinar el grado de sensibilidad bacteriana; y, finalmente, se realiza un análisis estadístico inferencial mediante pruebas ANOVA y comparaciones post hoc de Tukey para contrastar las hipótesis planteadas y establecer si las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Estos análisis permiten sustentar, con evidencia estadística, la relación entre la concentración del extracto y su eficacia antimicrobiana, así como la variabilidad en la respuesta entre las cepas estudiadas.

Determinación del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *H. sabdariffa* (Flor de Jamaica) frente a cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Shigella* sp.

El comportamiento antibacteriano del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a las cepas clínicas evaluadas mostró variaciones tanto según la especie bacteriana como de acuerdo con la concentración probada. Los diámetros promedio de los halos de inhibición generados *in vitro* se determinaron frente a cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (*E. coli* BLEE) y *Shigella* sp., utilizando concentraciones crecientes del extracto entre 200 y 1000 mg/mL.

En el caso de *E. coli* productora de BLEE, se observó un aumento progresivo del halo de inhibición conforme se incrementó la concentración del extracto, a 200 mg/mL, el diámetro promedio fue de 6,33 mm, elevándose a 7,67 mm a 400 mg/mL y alcanzando 12,22 mm a 1000 mg/mL, estos resultados indican un efecto inhibitorio concentración-dependiente de intensidad moderada frente a *E. coli* BLEE. En cambio, frente a *Shigella* sp. el extracto de *H. sabdariffa* mostró una actividad inhibidora más marcada, el halo promedio se incrementó de 10,67 mm a 200 mg/mL hasta 19,11 mm a 1000 mg/mL. Los resultados sugieren que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* ejerce un efecto inhibitorio *in vitro* dependiente de la concentración en ambas especies, siendo más evidente y de mayor magnitud frente a cepas de *Shigella* sp. que frente a cepas de *E. coli* productoras de BLEE (ver Tabla 2).

Tabla 2

Diámetros promedio de los halos de inhibición (mm) producidos por el extracto etanólico de H. sabdariffa frente a E. coli BLEE y Shigella sp. (200–1000 mg/mL).

Extracto etanólico	Especie	Cepa	Concentraciones (mg/mL)				
			200	400	600	800	1000
<i>H. sabdariffa</i>	<i>E. coli</i> BLEE	Cepa 1	6,00	8,00	9,33	9,67	11,00
		Cepa 2	6,00	6,67	8,67	9,33	11,67
		Cepa 3	7,00	8,33	9,67	12,00	14,00
		Media	6,33	7,67	9,22	10,33	12,22
	<i>Shigella</i> sp.	Cepa 1	13,33	16,33	19,00	21,67	23,00
		Cepa 2	6,33	8,67	10,67	11,67	14,33
		Cepa 3	12,33	14,00	15,00	16,00	20,00
		Media	10,67	13,00	14,89	16,44	19,11

Análisis comparativo del efecto del extracto etanólico de *H. sabdariffa* y sus distintas concentraciones sobre cepas de *E. coli* productoras de BLEE y *Shigella* sp.

El análisis comparativo del efecto del extracto etanólico de *H. sabdariffa* sobre *E. coli* productora de BLEE y *Shigella* sp. evidenció un patrón claramente concentración-dependiente en ambas especies, con incrementos progresivos en los diámetros promedio de los halos de inhibición a medida que se aumentó la concentración del extracto de 200 a 1000 mg/mL. Sin embargo, la magnitud de la respuesta antibacteriana fue consistentemente mayor en *Shigella* sp. que en *E. coli* BLEE a todas las concentraciones evaluadas.

A 200 mg/mL, el halo promedio frente a *E. coli* BLEE fue de 6,33 mm, mientras que para *Shigella* sp. alcanzó 10,67 mm, mostrando una diferencia inicial de aproximadamente 4,34 mm a favor de *Shigella* sp. Esta brecha se mantuvo e incluso tendió a incrementarse conforme aumentó la concentración: a 400 y 600 mg/mL, los halos promedio frente a *E. coli* BLEE fueron de 7,67 mm y 9,22 mm, respectivamente, frente a 13,00 mm y 14,89 mm en *Shigella* sp.

En las concentraciones más altas (800 y 1000 mg/mL), el extracto mantuvo este patrón diferencial, *E. coli* BLEE presentó diámetros promedio de 10,33 mm y 12,22 mm, mientras que *Shigella* sp. alcanzó 16,44 mm y 19,11 mm, respectivamente, de esta manera, aunque en ambas especies se observa un incremento sostenido del efecto inhibitorio con el aumento de la concentración, *Shigella* sp. muestra una mayor sensibilidad global al extracto de *H. sabdariffa*, reflejada en halos de inhibición de mayor tamaño en todo el rango de concentraciones evaluado (ver Tabla 3).

Tabla 3

Comparación de los halos de inhibición del extracto etanólico de H. sabdariffa frente a E. coli BLEE y Shigella sp. (200–1000 mg/mL).

Concentración (mg/mL)	$\bar{X}$ halo <i>E. coli</i> BLEE (mm)	$\bar{X}$ halo <i>Shigella</i> sp. (mm)
200	6,33	10,67
400	7,67	13,00
600	9,22	14,89
800	10,33	16,44
1000	12,22	19,11

Nota. $\bar{X}$: valor promedio (media aritmética) del diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros (mm).

Determinación del grado de sensibilidad de dichas cepas frente a las diferentes concentraciones del extracto mediante ensayos microbiológicos *in vitro*

Con el fin de determinar el grado de sensibilidad de las cepas evaluadas frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*, se calcularon los diámetros promedio de los halos de inhibición integrando todas las concentraciones ensayadas. En *E. coli* productora de BLEE, los valores promedio oscilaron entre 8,47 mm (Cepa 2) y 10,20 mm (Cepa 3), con un promedio global de 9,16 mm, lo que refleja una sensibilidad moderada y relativamente homogénea entre cepas.

En *Shigella* sp., los diámetros promedio fueron notablemente mayores: 10,33 mm (Cepa 2), 15,47 mm (Cepa 3) y 18,67 mm (Cepa 1), alcanzando un promedio global de 14,82 mm, estos resultados evidencian una mayor susceptibilidad de *Shigella* sp. al extracto en comparación con *E. coli* BLEE, así como una variabilidad más marcada entre sus cepas, lo que confirma un efecto inhibitorio más intenso sobre esta especie bajo las condiciones *in vitro* evaluadas (ver Tabla 4).

Tabla 4

Sensibilidad de cepas de E. coli BLEE y Shigella sp. al extracto etanólico de H. sabdariffa: promedios de los halos de inhibición (mm) considerando todas las concentraciones.

Especie	Cepa	$\bar{X}$ halo (mm)	$\bar{X}$ global por especie (mm)
<i>E. coli</i> BLEE	Cepa 1	8,80	9,16
	Cepa 2	8,47	
	Cepa 3	10,20	
<i>Shigella</i> sp.	Cepa 1	18,67	14,82
	Cepa 2	10,33	
	Cepa 3	15,47	

Nota. $\bar{X}$: valor promedio (media aritmética) del diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros (mm).

Análisis estadístico complementario

Para contrastar de manera inferencial las hipótesis planteadas sobre la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de *H. sabdariffa* y la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y *Shigella* sp., se realizó un análisis estadístico complementario basado en pruebas de ANOVA y comparaciones post hoc de Tukey. Este análisis tuvo como finalidad respaldar con evidencia estadística las diferencias observadas previamente a nivel descriptivo, tanto entre las distintas concentraciones del extracto como entre las cepas bacterianas evaluadas.

Se formularon cuatro hipótesis: dos orientadas a determinar si la eficacia del extracto varía significativamente según la concentración frente a cada especie bacteriana, y dos dirigidas a identificar posibles diferencias en la susceptibilidad entre cepas de *E. coli* BLEE y de *Shigella* sp. frente al extracto. El ANOVA permitió establecer la presencia o ausencia de diferencias globales entre grupos, y en aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey para precisar entre qué concentraciones o cepas se encontraban dichas discrepancias. Finalmente, con el objetivo de complementar y visualizar de forma más clara estos resultados inferenciales, se incorporaron gráficos que muestran la variación de los promedios de los halos de inhibición según concentración y cepa bacteriana.

Planteamiento de las hipótesis

Primera hipótesis:

H₀: No existen diferencias significativas entre la eficacia de las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE.

H₁: Sí existen diferencias significativas entre la eficacia de las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE.

Segunda hipótesis:

H₀: No existen diferencias significativas entre la eficacia de las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *Shigella* sp.

H₁: Sí existen diferencias significativas entre la eficacia de las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *Shigella* sp.

Tercera hipótesis:

H₀: No existen diferencias significativas entre la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* BLEE frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*.

H₁: Sí existen diferencias significativas entre la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* BLEE frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*.

Cuarta hipótesis:

H₀: No existen diferencias significativas entre la susceptibilidad de las cepas de *Shigella* sp. frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*.

H₁: Sí existen diferencias significativas entre la susceptibilidad de las cepas de *Shigella* sp. frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para contrastar las cuatro hipótesis planteadas respecto a la eficacia del extracto etanólico de *H. sabdariffa* y la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* BLEE y *Shigella* sp., las decisiones estadísticas se tomaron con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la eficacia del extracto según la concentración, tanto frente a *E. coli* productora de BLEE ($F = 40,075$; $p < 0,001$) como frente a *Shigella* sp. ($F = 4,613$; $p = 0,004$), lo que llevó al rechazo de las hipótesis nulas de la primera y segunda hipótesis. Esto indica que el tamaño de los halos de inhibición varía de manera significativa al modificar la concentración del extracto, evidenciando un efecto concentración–dependiente sobre ambas especies bacterianas.

En relación con la susceptibilidad entre cepas, no se observaron diferencias significativas entre las cepas de *E. coli* BLEE ($F = 2,531$; $p = 0,092$), por lo que no se rechazó la hipótesis nula de la tercera hipótesis. Este resultado sugiere que las cepas evaluadas de *E. coli* BLEE presentan un comportamiento relativamente homogéneo frente al extracto de *H. sabdariffa*. A diferencia de las cepas de *Shigella* sp., las cuales sí mostraron diferencias significativas en su respuesta ($F = 16,962$; $p < 0,001$), lo que condujo al rechazo de la hipótesis nula de la cuarta hipótesis y evidencia una variabilidad marcada en la susceptibilidad entre cepas de *Shigella* sp. tratadas con el extracto (ver Tabla 5).

Tabla 5

Análisis de varianza (ANOVA) del efecto del extracto etanólico de H. sabdariffa sobre los halos de inhibición frente a E. coli BLEE y Shigella sp., según concentración y cepa bacteriana.

Fuente de variación	Análisis de varianza			F	Sig.	Decisión
	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios			
Concentraciones de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>E. coli</i> BLEE	188,800	4	47,075	40,075	0,001	Rechazar H_0
Concentraciones de <i>H. sabdariffa</i> frente a <i>Shigella</i> sp.	374,578	4	93,644	4,613	0,004	Rechazar H_0
Cepas de <i>E. coli</i> BLEE frente a <i>H. sabdariffa</i>	25,378	2	12,689	2,531	0,092	Aceptar H_0
Cepas de <i>Shigella</i> sp. frente a <i>H. sabdariffa</i>	530,178	2	265,089	16,962	0,001	Rechazar H_0

Nota. gl: grados de libertad; F: estadístico F de Fisher. Sig.: valor de significancia: $\alpha = 0,05$. Se rechaza (no se acepta) H_0 cuando $p < 0,05$.

Prueba de Tukey (post hoc)

Tras evidenciar diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA para las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE, se aplicó la prueba post hoc de Tukey con el fin de identificar entre qué concentraciones se presentan dichas diferencias, esta prueba permitió comparar todos los pares de promedios de halos de inhibición controlando el error tipo I ($\alpha = 0,05$).

Los resultados muestran que las concentraciones de 200 mg/mL ($6,33 \pm 0,50$ mm) y 400 mg/mL ($7,67 \pm 0,87$ mm) pertenecen al mismo subconjunto estadístico (letra “a”), lo que indica que no difieren significativamente entre sí en términos de efecto inhibitorio. De forma similar, las concentraciones de 600 mg/mL ($9,22 \pm 0,67$ mm) y 800 mg/mL ($10,33 \pm 1,50$ mm) se agrupan en un segundo subconjunto (letra “b”), sin diferencias significativas entre ellas, pero sí con respecto a las concentraciones más bajas, finalmente, la concentración de 1000 mg/mL ($12,22 \pm 1,48$ mm) forma un subconjunto independiente (letra “c”), siendo significativamente superior a todas las demás concentraciones evaluadas.

Estos resultados confirman un patrón de incremento escalonado del efecto antibacteriano frente a *E. coli* BLEE, donde las concentraciones bajas (200–400 mg/mL), medias (600–800 mg/mL) y alta (1000 mg/mL) constituyen grupos estadísticamente distintos en cuanto al tamaño de los halos de inhibición (ver Tabla 6).

Tabla 6

Comparación múltiple de Tukey de los diámetros promedio de los halos de inhibición del extracto etanólico de H. sabdariffa frente a E. coli BLEE, según concentración.

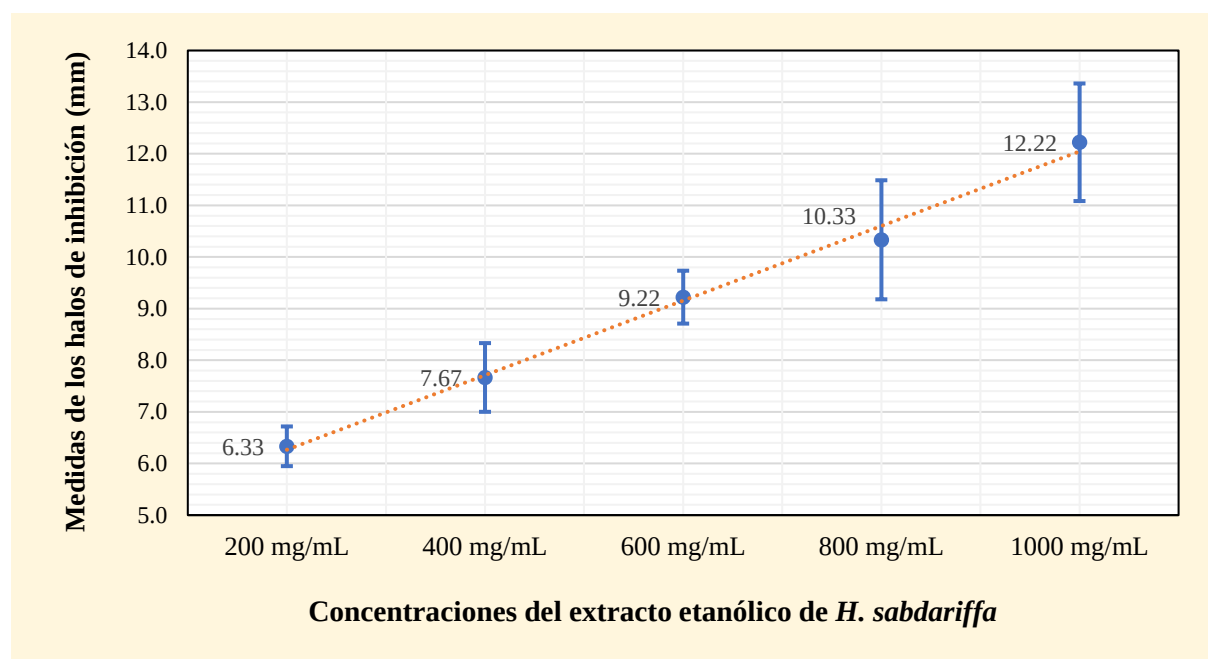
Concentración (mg/mL)	Promedio de los halos de inhibición (mm)	Subconjuntos		
		1	2	3
200	$6,33 \pm 0,50$	a		
400	$7,67 \pm 0,87$	a		
600	$9,22 \pm 0,67$		b	
800	$10,33 \pm 1,50$		b	
1000	$12,22 \pm 1,48$			c

Nota. Letras diferentes = Diferencia significativa; Letras iguales = No existe diferencia significativa.

La comparación de los promedios de los halos de inhibición generados por las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE muestra una tendencia ascendente conforme aumenta la concentración, en el rango de 200 a 1000 mg/mL. Los valores promedio se incrementan de 6,33 mm a 200 mg/mL hasta 12,22 mm a 1000 mg/mL, lo que evidencia una relación directa entre la dosis del extracto y su efecto inhibitorio. La línea de tendencia ilustra este patrón de aumento progresivo, mientras que las barras de error representan la desviación estándar, reflejando una variabilidad moderada en cada grupo de concentración. En concordancia con los resultados del ANOVA y de la prueba post hoc de Tukey, estos resultados confirman que la actividad antibacteriana de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE es dependiente de la concentración, con un incremento gradual en la eficacia antimicrobiana a medida que se eleva la concentración del extracto (ver Figura 1).

Figura 1

Comparación de los promedios de halos de inhibición entre las concentraciones del extracto etanólico de H. sabdariffa frente a E. coli BLEE.



Tras encontrar diferencias significativas en el ANOVA para las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *Shigella* sp., se aplicó la prueba post hoc de Tukey con el propósito de identificar entre qué concentraciones se presentan dichas diferencias en los halos de inhibición.

Los promedios muestran una tendencia general de aumento del halo de inhibición a medida que se incrementa la concentración del extracto, pasando de $10,67 \pm 3,87$ mm a 200 mg/mL hasta $19,11 \pm 4,54$ mm a 1000 mg/mL, sin embargo, el patrón de subconjuntos estadísticos revela que no todas las concentraciones difieren significativamente entre sí.

La concentración de 200 mg/mL se ubica únicamente en el subconjunto “a”, mientras que la concentración de 1000 mg/mL se ubica solo en el subconjunto “b”, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre la dosis más baja y la más alta, en cambio, las concentraciones intermedias de 400, 600 y 800 mg/mL aparecen en ambos subconjuntos (“a” y “b”), lo que sugiere un comportamiento transicional: no presentan diferencias significativas ni con la concentración mínima ni con la máxima.

Esto indica que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* muestra una actividad inhibidora globalmente dependiente de la concentración frente a *Shigella* sp., con un incremento progresivo del halo, pero con diferencias estadísticamente claras solo entre los extremos del rango evaluado (200 vs. 1000 mg/mL) (ver Tabla 7).

Tabla 7

Comparación múltiple de Tukey de los diámetros promedio de los halos de inhibición del extracto etanólico de H. sabdariffa frente a Shigella sp., según concentración.

Concentración (mg/mL)	Promedio de los halos de inhibición (mm)	Subconjuntos	
		1	2
200	$10,67 \pm 3,87$	a	
400	$13,00 \pm 4,53$	a	b
600	$14,89 \pm 4,51$	a	b
800	$16,44 \pm 5,00$	a	b
1000	$19,11 \pm 4,54$		b

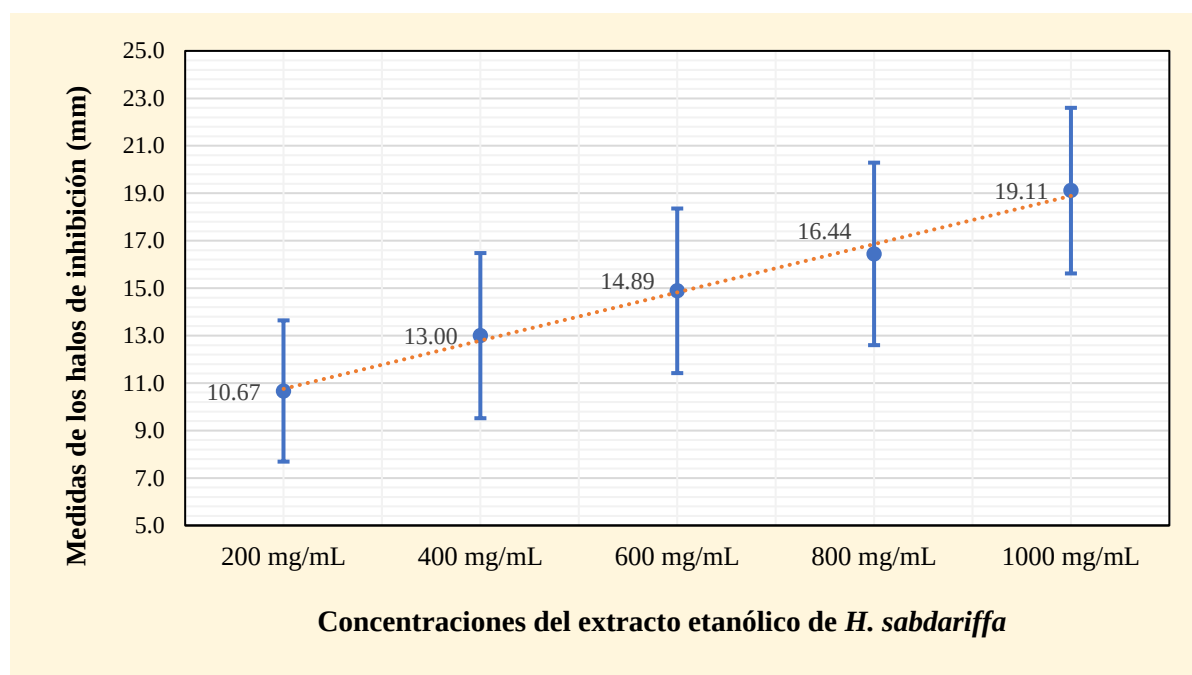
Nota. Letras diferentes = Diferencia significativa; Letras iguales = No existe diferencia significativa.

La comparación de los promedios de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *Shigella* sp. muestra una clara tendencia ascendente conforme aumenta la concentración del extracto, en el rango de 200 a 1000 mg/mL. Los halos promedio se incrementan desde 10,67 mm a 200 mg/mL hasta 19,11 mm a 1000 mg/mL, lo que evidencia una relación directa entre la dosis y el efecto inhibitorio.

Las barras de error representan la desviación estándar, indicando una variabilidad moderada en la respuesta bacteriana para cada concentración, junto con los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey, estos datos respaldan que la actividad antibacteriana de *H. sabdariffa* frente a *Shigella* sp. es globalmente dependiente de la concentración, con un aumento progresivo del halo de inhibición a medida que se eleva la dosis del extracto (ver Figura 2).

Figura 2

Comparación de los promedios de halos de inhibición entre las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *Shigella* sp..



Para comparar la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*, se aplicó la prueba post hoc de Tukey a los promedios de los halos de inhibición. Los valores obtenidos muestran halos promedio de $8,47 \pm 2,17$ mm para la cepa 2, $8,80 \pm 1,78$ mm para la cepa 1 y $10,20 \pm 2,68$ mm para la cepa 3.

A pesar de estas diferencias numéricas, las tres cepas se agrupan en un mismo subconjunto estadístico (letra “a”), lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en la susceptibilidad frente al extracto ($p > 0,05$), es decir, las cepas de *E. coli* BLEE evaluadas responden de manera similar al tratamiento con *H. sabdariffa*, y la variación observada en los halos de inhibición puede atribuirse a fluctuaciones biológicas no significativas más que a un verdadero cambio en la sensibilidad bacteriana (ver Tabla 8).

Tabla 8

Comparación de la susceptibilidad de cepas de E. coli BLEE frente al extracto etanólico de H. sabdariffa.

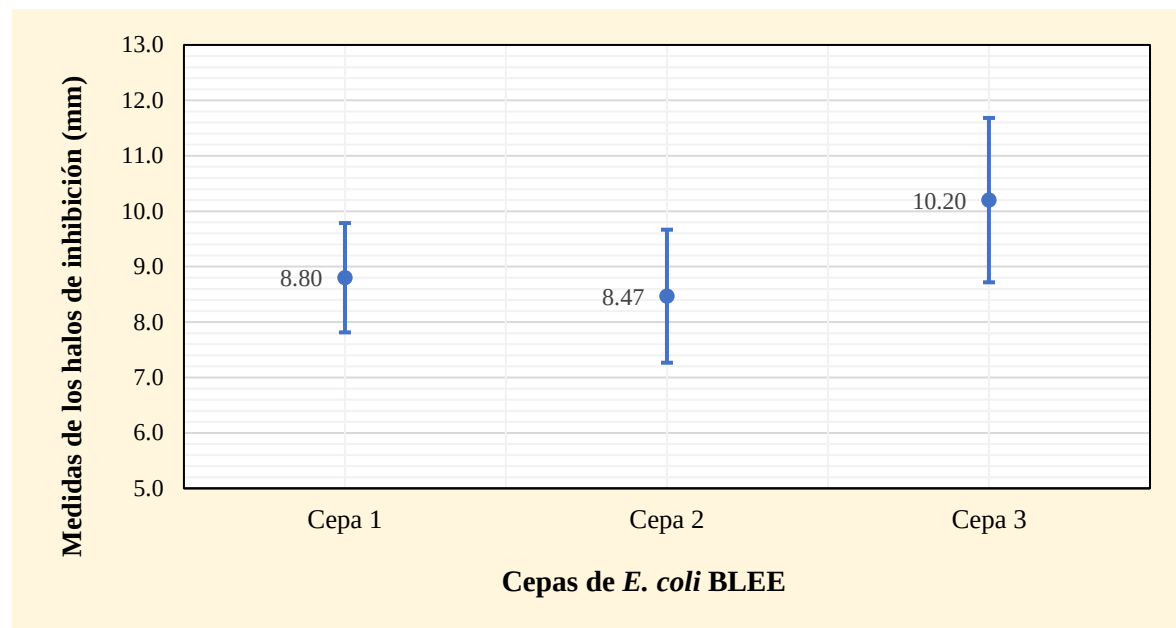
Cepas de <i>E. coli</i> BLEE	Promedio de los halos de inhibición (mm)	Subconjuntos
		1
Cepa 2	$8,47 \pm 2,17$	a
Cepa 1	$8,80 \pm 1,78$	a
Cepa 3	$10,20 \pm 2,68$	a

Nota. Letras iguales = No existe diferencia significativa.

La comparación de los promedios de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a tres cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE evidencia diferencias numéricas pequeñas en la susceptibilidad bacteriana. La cepa 3 presentó el mayor halo de inhibición (10,20 mm), seguida de la cepa 1 (8,80 mm) y la cepa 2 (8,47 mm). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio, mostrando una variabilidad moderada entre las repeticiones, sin embargo, de acuerdo con los resultados del ANOVA, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística ($p > 0,05$), por lo que las tres cepas pueden considerarse con una respuesta similar frente al extracto de *H. sabdariffa*, sin evidenciarse variaciones relevantes en su grado de susceptibilidad (ver Figura 3).

Figura 3

Comparación de la susceptibilidad de cepas de *E. coli* BLEE frente al extracto etanólico *H. sabdariffa*.



Con el objetivo de comparar la susceptibilidad de tres cepas de *Shigella* sp. frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*, se aplicó la prueba post hoc de Tukey a los promedios de los halos de inhibición, los resultados muestran halos promedio de $10,33 \pm 2,94$ mm para la cepa 2, $15,47 \pm 2,90$ mm para la cepa 3 y $18,67 \pm 5,46$ mm para la cepa 1.

Las letras asignadas a los subconjuntos estadísticos indican que la cepa 2 se ubica únicamente en el subconjunto “a”, mientras que las cepas 1 y 3 se agrupan en el subconjunto “b”, esto evidencia que la cepa 2 presenta una susceptibilidad significativamente menor frente al extracto en comparación con las cepas 1 y 3 ($p < 0,05$), al compartir la misma letra, las cepas 1 y 3 no difieren significativamente entre sí, a pesar de que la cepa 1 muestra un halo promedio ligeramente mayor.

Los resultados indican una variabilidad marcada en la respuesta de *Shigella* sp. al extracto de *H. sabdariffa*, con cepas de alta susceptibilidad (cepas 1 y 3) y una cepa menos sensible (cepa 2), lo que confirma diferencias significativas en la magnitud del efecto inhibitorio entre las cepas evaluadas (ver Tabla 9).

Tabla 9

Comparación de la susceptibilidad de cepas de Shigella sp. frente al extracto etanólico de H. sabdariffa mediante la prueba de Tukey.

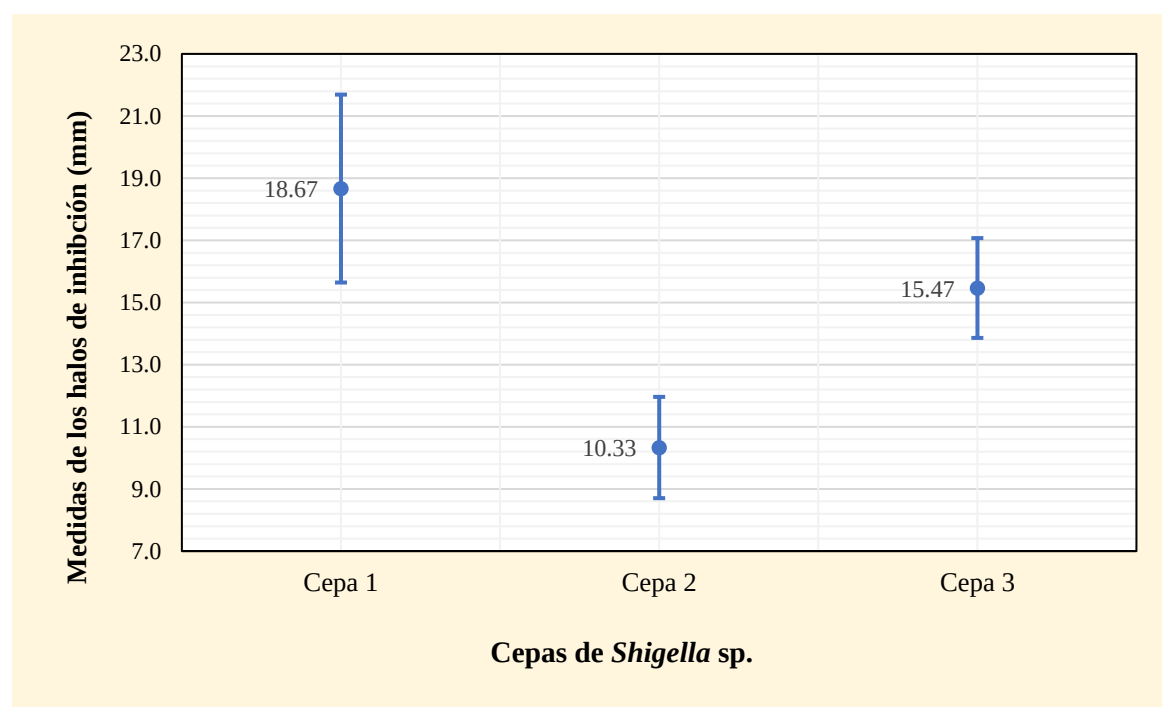
Cepas de <i>Shigella</i> sp.	Promedio de los halos de inhibición (mm)	Subconjuntos	
		1	2
Cepa 2	$10,33 \pm 2,94$	a	
Cepa 3	$15,47 \pm 2,90$		b
Cepa 1	$18,67 \pm 5,46$		b

Nota. Letras diferentes = Diferencia significativa; Letras iguales = No existe diferencia significativa.

La comparación de los promedios de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a tres cepas clínicas de *Shigella* sp. evidencia diferencias marcadas en la susceptibilidad bacteriana. La cepa 1 mostró el mayor halo de inhibición (18,67 mm), seguida de la cepa 3 (15,47 mm), mientras que la cepa 2 presentó el valor más bajo (10,33 mm). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio, reflejando la variabilidad experimental en cada cepa. De acuerdo con el ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, la cepa 2 difiere significativamente de las cepas 1 y 3 ($p < 0,05$), que comparten un comportamiento similar entre sí. Estos resultados indican que existe una variabilidad importante en la respuesta de *Shigella* sp. al extracto de *H. sabdariffa*, con cepas claramente más susceptibles (cepas 1 y 3) y una cepa menos sensible (cepa 2) al efecto inhibitorio del extracto (ver Figura 4).

Figura 4

Comparación de la susceptibilidad de cepas de *Shigella* sp. frente al extracto etanólico *H. sabdariffa*.



CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que el extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* ejerce un efecto inhibitorio *in vitro* frente a cepas clínicas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y frente a *Shigella* sp., no obstante, la magnitud de dicha inhibición difiere de manera notable entre ambas especies, lo que permite establecer comparaciones relevantes con los antecedentes y profundizar en las razones microbiológicas que explican estas diferencias.

En el caso de *E. coli* BLEE, los halos de inhibición observados en la presente investigación alcanzaron valores promedio cercanos a 12 mm en la mayor concentración evaluada, este efecto, aunque evidente, puede considerarse moderado si se compara con estudios previos realizados con otras bacterias o con cepas no multirresistentes, por ejemplo, Padilla y Neyra (2022) reportaron halos promedio de 14,23 mm utilizando extracto etanólico de *H. sabdariffa* al 100 % frente a *Streptococcus mutans*, una bacteria Gram positiva. La diferencia entre ambos resultados puede explicarse, en primer lugar, por la naturaleza de las cepas evaluadas, mientras *S. mutans* carece de mecanismos avanzados de resistencia antimicrobiana, *E. coli* BLEE presenta sistemas enzimáticos capaces de neutralizar una amplia variedad de agentes antibacterianos, lo que limita la acción del extracto y reduce el tamaño de los halos observados.

Una situación concordante se observa al contrastar los resultados del presente estudio con los reportados por Portillo et al. (2022), quienes demostraron una marcada actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *H. sabdariffa* frente a cepas multirresistentes de *E. coli* enterohemorrágica y *Salmonella enterica*, evidenciando incluso mayor eficacia que el cloranfenicol en un modelo *in vivo*, aunque dicho estudio empleó un extracto acuoso y un diseño experimental distinto, los resultados respaldan el potencial antibacteriano de *H. sabdariffa* frente a enterobacterias con perfiles de resistencia complejos, ante esta situación, la menor magnitud de los halos de inhibición observados en *E. coli* BLEE en el presente trabajo no debe interpretarse como ausencia de actividad del extracto etanólico, sino como una respuesta condicionada por los mecanismos de resistencia propios de estas cepas clínicas.

A diferencia, los resultados frente a *Shigella* sp. muestran una inhibición considerablemente mayor, con halos promedio que superan los 19 mm en la concentración más alta, estos valores se aproximan a los reportados en antecedentes donde *H. sabdariffa* demostró una elevada eficacia antibacteriana, Rangel et al. (2018), aunque utilizaron como indicador la reducción logarítmica de UFC y no halos de inhibición, evidenciaron una disminución significativa de *Shigella flexneri* al emplear extractos etanólicos y metanólicos de jamaica, lo

que coincide con la alta sensibilidad observada en el presente estudio, la concordancia entre ambos trabajos sugiere que *Shigella* presenta una susceptibilidad intrínseca mayor a los compuestos bioactivos del cáliz de *H. sabdariffa*.

La diferencia en la respuesta entre *Shigella* sp. y *E. coli* BLEE puede atribuirse a varios factores, aunque ambas pertenecen al grupo de las bacterias Gram negativas, *Shigella* no presenta de forma generalizada mecanismos de resistencia tan sofisticados como las β -lactamasas de espectro extendido, lo que facilita la acción de flavonoides, taninos y otros metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico. Esta mayor susceptibilidad se refleja claramente en los halos obtenidos, los cuales superan incluso a los observados en *E. coli* BLEE a concentraciones equivalentes, reforzando la consistencia biológica de los resultados.

Al comparar estos resultados con el estudio de Del Rosario (2023), quien reportó porcentajes de inhibición frente a *E. coli* utilizando extracto metanólico y aceite esencial de *H. sabdariffa*, se observa que, aunque las metodologías difieren, ambos estudios coinciden en que el efecto antibacteriano aumenta conforme se incrementa la concentración del extracto, la discrepancia en la forma de expresión de los resultados no impide reconocer un patrón común, la actividad antimicrobiana de *H. sabdariffa* es real, pero su magnitud depende tanto del tipo de extracto como del perfil de resistencia de la bacteria evaluada.

La discusión de estos resultados permite afirmar que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* presenta un efecto inhibitorio *in vitro* dependiente de la concentración frente a *E. coli* BLEE y *Shigella* sp., con una eficacia claramente mayor frente a esta última, la menor inhibición observada en *E. coli* BLEE concuerda con lo reportado en la literatura cuando se evalúan bacterias multirresistentes, mientras que los valores elevados de halo frente a *Shigella* sp. coinciden con antecedentes que destacan la sensibilidad de este patógeno a los extractos de la flor de Jamaica.

Con respecto al primer objetivo específico, el análisis comparativo del efecto del extracto etanólico de *H. sabdariffa* sobre *E. coli* productora de BLEE y *Shigella* sp. pone en evidencia una respuesta antibacteriana diferenciada entre ambas especies, aun cuando en los dos casos se mantiene un patrón dependiente de la concentración, este comportamiento sugiere que, si bien el extracto actúa de manera progresiva conforme aumenta la dosis, la sensibilidad bacteriana no es uniforme y está condicionada por características propias de cada microorganismo.

La mayor inhibición observada de forma consistente en *Shigella* sp. concuerda con lo reportado por Rangel et al. (2018), quienes evidenciaron una elevada susceptibilidad de *S. flexneri* frente a extractos de *H. sabdariffa*, esta coincidencia respalda la idea de que *Shigella*

presenta una menor capacidad de tolerancia frente a los compuestos bioactivos de la planta, lo que se traduce en halos de inhibición más amplios en comparación con *E. coli*, en contraste, la respuesta más limitada de *E. coli* BLEE resulta coherente con su perfil de multirresistencia, el cual puede atenuar la acción de agentes antimicrobianos, incluso de origen vegetal.

Al comparar estos resultados con estudios que evaluaron *H. sabdariffa* frente a bacterias no productoras de BLEE, como los reportados por Del Rosario (2023), se observa que los niveles de inhibición suelen ser mayores en cepas sin mecanismos de resistencia específicos, esta diferencia refuerza la interpretación de que la menor sensibilidad de *E. coli* BLEE no implica ausencia de efecto del extracto, sino una respuesta modulada por la presencia de β -lactamasas de espectro extendido.

La diferencia entre ambas especies confirma que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* ejerce un efecto antibacteriano *in vitro* dependiente de la concentración, pero con una eficacia claramente superior frente a *Shigella* sp., esta diferencia resulta consistente con los antecedentes revisados y subraya la importancia de considerar el perfil de resistencia bacteriana al evaluar el potencial antimicrobiano de extractos vegetales.

Y con respecto al segundo objetivo específico, en el cual se determinó el grado de sensibilidad de las cepas frente al extracto etanólico de *H. sabdariffa*, se encontraron diferencias claras tanto entre especies como entre cepas de una misma especie, lo que permite interpretar la acción antibacteriana del extracto desde una perspectiva más fina que la simple comparación de concentraciones. En *E. coli* productora de BLEE, los valores promedio de los halos reflejan una sensibilidad moderada y relativamente homogénea, lo cual resulta coherente con la presencia de mecanismos de resistencia que tienden a limitar, pero no a anular, la acción de agentes antimicrobianos de origen vegetal.

Este comportamiento concuerda con lo observado por Del Rosario (2023), quien reportó una inhibición moderada de *E. coli* al emplear extractos de *H. sabdariffa*, incluso a concentraciones elevadas, la coincidencia sugiere que, independientemente del tipo de solvente utilizado, *E. coli* presenta una respuesta restringida frente a los metabolitos bioactivos de la planta, probablemente asociada a su capacidad de adaptación y defensa celular, la baja variabilidad entre cepas BLEE observada en el presente estudio refuerza la idea de un perfil de sensibilidad relativamente uniforme dentro de este grupo bacteriano.

En contraste, *Shigella* sp. mostró una sensibilidad claramente superior, con valores promedio más elevados y una mayor variabilidad entre cepas, este patrón coincide con lo descrito por Rangel et al. (2018), quienes evidenciaron una marcada susceptibilidad de *S. flexneri* frente a extractos de *H. sabdariffa*, la mayor dispersión de los valores entre cepas de

Shigella sugiere que, si bien la especie es globalmente más sensible, existen diferencias intraespecíficas que podrían estar relacionadas con variaciones en la estructura de la membrana bacteriana externa o en la expresión de mecanismos defensivos.

Estos resultados confirman que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* induce un mayor grado de sensibilidad en *Shigella* sp. que en *E. coli* BLEE, lo que concuerda con los antecedentes revisados y puede explicarse por la menor complejidad de los mecanismos de resistencia presentes en *Shigella*.

El análisis inferencial confirmó que las diferencias observadas en el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* productora de BLEE y *Shigella* sp. son estadísticamente significativas, lo que indica que la variación en los halos de inhibición responde a factores biológicos reales y no al azar, en particular, el análisis de varianza evidenció que la concentración del extracto influye de manera significativa en la magnitud del efecto antibacteriano en ambas especies.

La significancia asociada al incremento del efecto inhibitorio con el aumento de la concentración respalda el comportamiento dosis–respuesta descrito previamente en estudios sobre *H. sabdariffa*, como los de Padilla y Neyra (2022) y Del Rosario (2023), aunque dichos trabajos no aplicaron análisis estadísticos comparativos, los resultados del presente estudio confirman estadísticamente que este patrón es consistente y reproducible, mientras que el análisis post hoc de Tukey permitió establecer diferencias significativas entre *E. coli* BLEE y *Shigella* sp., corroborando que esta última presenta una mayor sensibilidad global al extracto etanólico, este resultado concuerda con lo reportado por Rangel et al. (2018), quienes señalaron una elevada susceptibilidad de *Shigella* frente a extractos de *H. sabdariffa*, la significancia estadística obtenida en el presente estudio refuerza que esta diferencia entre especies es estructural y no circunstancial.

En el caso de *E. coli* BLEE, la menor variabilidad intercepa observada se tradujo en diferencias estadísticas menos pronunciadas, lo que puede atribuirse a la homogeneidad del mecanismo de resistencia BLEE, este resultado es coherente con lo descrito en la literatura para bacterias multirresistentes y confirma que, aun bajo este perfil, el extracto ejerce un efecto inhibitorio significativo, aunque de menor magnitud. El análisis inferencial valida estadísticamente el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *H. sabdariffa*, demostrando que dicho efecto es dependiente de la concentración y diferencial entre especies, con mayor impacto frente a *Shigella* sp. que frente a *E. coli* BLEE.

CONCLUSIONES

Se determinó que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* presenta efecto inhibitorio *in vitro* frente a cepas de *E. coli* productoras de BLEE y *Shigella* sp..

Se analizó que el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *H. sabdariffa* fue mayor frente a *Shigella* sp. que frente a *E. coli* BLEE.

Se determinó que las cepas de *E. coli* BLEE mostraron una sensibilidad moderada y homogénea al extracto, mientras que las cepas de *Shigella* sp. presentaron mayor sensibilidad y variabilidad en su respuesta.

RECOMENDACIONES

Se recomienda a investigadores en microbiología realizar nuevos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el extracto etanólico de *H. sabdariffa*, ampliando el número de cepas y especies bacterianas evaluadas, para confirmar y profundizar su potencial como alternativa o coadyuvante en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

A laboratorios de microbiología clínica y de investigación, se recomienda emplear extractos liofilizados de *H. sabdariffa* en estudios posteriores, a fin de mejorar la estabilidad, estandarización y reproducibilidad de los ensayos *in vitro*, facilitando su comparación y posible aplicación en investigaciones preclínicas o en el desarrollo de fitofármacos.

A autoridades sanitarias y equipos de salud pública, se recomienda promover y apoyar líneas de investigación sobre productos naturales con actividad frente bacterias multirresistentes, como *E. coli* BLEE y *Shigella* sp., para disponer a mediano y largo plazo de alternativas terapéuticas complementarias ante el incremento de la resistencia a los antibióticos convencionales.

REFERENCIAS

- Aliaga, F., Andrade, C., y Escalante, E. (2015). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 32(1), 26–32. doi:10.17843/RPMESP.2015.321.1571
- Astocóndor-Salazar, L. (2018). Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación en Salud*, 2(2), 42–49. <https://doi.org/10.35839/repis.2.2.224>
- Braz, V., Melchior, K., y Moreira, C. (2020). *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, Artículo 548492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>
- Byng, M., Chase, M.W., Christenhusz, M.J., Fay, M.F., Li, D.Z., Ma, H., Mabberley, D.J., Soltis, D.E., De-Zhu Li, Soltis, P.S., Stevens, P., Baker, W.J., Dodsworth, S., Forest, F., Maurin, O., Pokorny, L., Smith, S. & Zuntuni, A.R. (2026) Large-scale nuclear and plastid phylogenomic analyses inform an updated Angiosperm Phylogeny Group classification: APG V. *Journal of Systematics and Evolution* Vol. 64 (5): 845 - 874.
- Camacho, L. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual [Bacterial resistance, a current crisis]. *Revista Española de Salud Pública*, 97, Artículo e202301004.
- Cid-Ortega, S., y Guerrero-Beltrán, J. (2020). *Propiedades funcionales de la jamaica (Hibiscus sabdariffa L.)*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/343825241_Propiedades_funcionales_de_la_jamaica_Hibiscus_sabdariffa_L
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition* (CLSI documento M07-A9). CLSI. <https://clsi.org/shop/standards/m07/>
- Coelho, C. A., & Amorim, B. S. (2019). Expandindo a distribuição geográfica de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): uma espécie naturalizada e negligenciada para a flora brasileira. *Hoehnea*, 46(1). <https://doi.org/10.1590/2236-8906-101/2018>
- Del Rosario Camposano, J. F. (2023). *Evaluación del extracto y aceite esencial de la flor de Jamaica para evidenciar actividad antimicrobiana en Escherichia coli* [Trabajo de titulación de grado, Universidad Agraria del Ecuador]. Repositorio Institucional UAGRARIA. <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/DEL%20ROSARIO%20CAMPOZANO%20JENNIFER%20FIORELLA.pdf>

- Encarnación, M., y Esquivel, K. (2017). *Comparación del efecto antibacteriano entre soluciones de Hibiscus sabdariffa y clorhexidina 0.12 % sobre el Agregatibacter actinomycetemcomitans (estudio in vitro) Huánuco 2017* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Hermilio Valdizán]. Repositorio Institucional UNHEVAL. <https://repositorio.unheval.edu.pe/item/17033e40-af1d-4eea-86e9-3f0976beff67>
- Fosado, R., Castro, J., y Gómez, C. (2022). Producción, composición y usos de la Jamaica. *Revista Universitarios Potosinos*, (263), 6. <https://leka.uaslp.mx/index.php/universitarios-potosinos/article/view/153>
- Harmita,B., Emira, N., Papetti, A., Badraoui, R.,Bousslam, L., Ben Tekfa,M.I.,Hamdi, A. Patel, M.,Elasbali, AM., Adnan,M., Ashraf,A.S. & Snoussi, M. (2022) Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Swarming Properties of *Hibiscus sabdariffa* L. Calyx Extracts: *In Vitro* and *In Silico* Modelling Approaches. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 1252672, 14 pages.
- Hernández-Sampieri, R., y Mendoza, C. (2018). *Metodología de la investigación: Las rutas quantitative, cualitativa y mixta*. McGraw-Hill. <https://www.goinvestiga.com/hernandez-sampieri-r-mendoza-c-2018-metodologia-de-la-investigacion-las-rutas-cuantitativa-cualitativa-y-mixta/>
- Instituto Nacional de Salud. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Ministerio de Salud del Perú. https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/30.pdf
- Instituto Nacional de Salud. (2010). *Manual de procedimientos para pruebas de susceptibilidad del INS*. Ministerio de Salud del Perú.
- Juárez Allca, M. P. (2023). *Efecto antimicótico del extracto etanólico de la flor de Hibiscus sabdariffa L. (Flor de Jamaica) frente a la cepa de Candida albicans* [Tesis de licenciatura, Universidad Inca Garcilaso de la Vega]. ALICIA: Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UIGV_bed5ff92d05e90f723c13f12b7b6f23d
- Lezameta, L., Gonzales-Escalante, E., y Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(3), 345–351. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342010000300006>

- Miranda García, M. C. (2013). *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69(4), 244–248. <https://doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003>
- Moreno, M. (2020). *Efecto antibacteriano in vitro de extractos etanólicos de orégano, tomillo y salvia sobre cepas de Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa con resistencia múltiple* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio UNPRG. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8421>
- Moreno, M., y Villegas, E. (2018). *Guía de prácticas de microbiología humana*. Departamento Académico de Microbiología y Parasitología.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). *Microbiología médica* (9.^a ed.). Elsevier.
- Okereke, C. N., Iroka, F. C., y Chukwuma, M. O. (2015). Phytochemical analysis and medicinal uses of *Hibiscus sabdariffa*. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(6), 16–19. https://www.researchgate.net/publication/304157698_Phytochemical_analysis_and_medicinal_uses_of_Hibiscus_sabdariffa
- Padilla, L., Neyra, K., Huacasi, V., y Macedo, S. (2022). *Efecto antibacterial in vitro del extracto etanolico de Hibiscus sabdariffa L. sobre cepas de Streptococcus mutans*. Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú. <https://doi.org/10.35622/inudi.b.012>
- Pérez, P., Galán, F., Gutiérrez, D., y Guerrero, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicina*, 11(55), 3276–3282. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304541214707681>
- Portillo-Torres, L., Bernardino-Nicanor, A., Mercado-Monroy, J., Gómez-Aldapa, C., González-Cruz, L., Rangel-Vargas, E., y Castro-Rosas, J. (2022). Antimicrobial effects of aqueous extract from calyces of *Hibiscus sabdariffa* in CD-1 mice infected with multidrug-resistant enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Medicinal Food*, 25(9), 902–909. <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0216>
- Rangel-Vargas, E., Luna-Rojo, A. M., Cadena-Ramírez, A., Torres-Vitela, R., Gómez-Aldapa, C. A., Villarruel-López, A., Téllez-Jurado, A., Villagómez-Ibarra, J. R., Reynoso-Camacho, R., y Castro-Rosas, J. (2018). Behavior of 11 foodborne bacteria on whole and cut mangoes var. Ataulfo and Kent and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chemical sanitizers directly onto mangoes contaminated with

- foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 81(5), 743–753.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-258>
- Romero, J. y Villegas, E. (2017) 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 de licenciatura, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio UNPRG.
- Shaban, W., Mohamed, E., y Ahmed, N. (2022). Efficacy of *Hibiscus sabdariffa* on reducing blood pressure in patients with mild-to-moderate hypertension: A systematic review and meta-analysis of published randomized controlled trials. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 79(1), 70–78. DOI: [10.1097/FJC.0000000000001161](https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000001161)
- Toro, L., y Correa, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *IATREIA*, 23(3), 240–249.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000300006
- Velázquez, C., y Silva, J. (2024). Síntesis y evaluación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata obtenidas con extractos de *Hibiscus sabdariffa* var. Colima. *INGENIERÍA: Ciencia, Tecnología e Innovación*, 11(2), 1–12.
<https://doi.org/10.26495/17jkc212>
- Venkatesan, K., Venkatesan, S., y N, M. (2024). Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* (Rosella) using methanolic extract. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 16(4), 110–115. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_527_23

ANEXOS

Anexo 1

Instrumentos de recolección de datos.

Ficha de recolección de datos para las medidas de los halos de inhibición (mm) por el método modificado de difusión de Kirby Bauer

Extracto etanólico de la planta	Especie	Cepa	Concentración (mg/mL)	Medida de los halos inhibición (mm)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> (Flor de Jamaica)	<i>Escherichia coli</i> productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	Cepa 1	200 mg/mL	
			400 mg/mL	
			600 mg/mL	
			800 mg/mL	
			1000 mg/mL	
		Cepa 2	200 mg/mL	
			400 mg/mL	
			600 mg/mL	
			800 mg/mL	
			1000 mg/mL	
		Cepa 3	200 mg/mL	
			400 mg/mL	
			600 mg/mL	
			800 mg/mL	
			1000 mg/mL	
	<i>Shigella</i> sp.	Cepa 1	200 mg/mL	
			400 mg/mL	
			600 mg/mL	
			800 mg/mL	
			1000 mg/mL	
		Cepa 2	200 mg/mL	
			400 mg/mL	
			600 mg/mL	
			800 mg/mL	
			1000 mg/mL	
		Cepa 3	200 mg/mL	
			400 mg/mL	
			600 mg/mL	
			800 mg/mL	
			1000 mg/mL	

Anexo 2

Clasificación taxonómica de H. sabdariffa.

Clasificación taxonómica de *H. sabdariffa* (Flor de Jamaica) (APG V, 2026)

- ❖ **Clado:** Angiospermas
- ❖ **Clado:** Eudicotiledóneas
- ❖ **Clado:** Eudicotiledóneas nucleares
- ❖ **Clado:** Superrósidas
- ❖ **Clado:** Rósidas
- ❖ **Clado:** Málvidas (Eurrósidas II)
- ❖ **Orden:** Malvales Juss
- ❖ **Familia:** Malvaceae Juss
- ❖ **Subfamilia:** Malvoideae Burnett
- ❖ **Tribu:** Hibisceae Rchb
- ❖ **Género:** *Hibiscus*
- ❖ **Especie:** *H. sabdariffa* L.

Figura 5

Hibiscus sabdariffa L. (flor de Jamaica).



Fuente: Tomado de *Expandindo a distribuição geográfica de Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): uma espécie naturalizada e negligenciada para a flora brasileira, por C. A. Coelho y B. S. Amorim, 2019, *Hoehnea*, 46(1), e1012018.

Anexo 3

Anexo metodológico complementario.

Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de *H. sabdariffa*

Las concentraciones utilizadas en los ensayos antibacterianos se obtuvieron a partir del extracto etanólico seco de *H. sabdariffa*. Del total de extracto seco obtenido, se emplearon 10 g para la preparación de la solución madre, esta cantidad de extracto etanólico seco fue pesada en balanza analítica y posteriormente disuelta en alcohol etílico al 40 %, completando un volumen final de 10 mL en un frasco ámbar, con el fin de proteger el extracto de la luz y preservar su estabilidad, de esta manera, se obtuvo una solución madre con una concentración de 1000 mg/mL.

La concentración de la solución madre se determinó aplicando la fórmula general de concentración:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{masa del soluto (mg)}}{\text{volumen total de la disolución (mL)}}$$

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$\text{Concentración} = \frac{10\,000 \text{ (mg)}}{10 \text{ (mL)}} = 1000 \text{ mg/mL}$$

A partir de esta solución madre, se prepararon diluciones seriadas utilizando alcohol etílico al 40 % como diluyente, con el objetivo de obtener las concentraciones de 800 mg/mL, 600 mg/mL, 400 mg/mL y 200 mg/mL, de acuerdo con el procedimiento descrito por Moreno (2020) y siguiendo las recomendaciones del estándar CLSI M07-A9 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Para la preparación de cada dilución, se estableció un volumen final constante de 1,0 mL. El volumen de solución madre necesario para cada concentración se calculó empleando la fórmula de dilución:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

- C_1 : corresponde a la concentración de la solución madre (1000 mg/mL),
- V_1 : es el volumen de solución madre requerido,
- C_2 : representa la concentración deseada, y
- V_2 : es el volumen final de la dilución (1,0 mL).

Por ejemplo, para obtener una concentración final de 800 mg/mL, se utilizó 0,8 mL de la solución madre y se completó el volumen con 0,2 mL de alcohol etílico al 40 %. Este mismo procedimiento se aplicó de manera análoga para la obtención de las concentraciones de 600, 400 y 200 mg/mL, garantizando la precisión, homogeneidad y reproducibilidad de todas las diluciones preparadas. La concentración original de 1000 mg/mL, correspondiente a la solución madre, se indica en la tabla con el símbolo (+) (ver Tabla 1).

Tabla 1

Concentraciones del extracto etanólico de H. sabdariffa.

Solución madre (mL)	Alcohol al 40 % (mL)	Volumen final (ml)	Concentración final (mg/mL)
10,0	0,0	1,0	1000 (+)
0,8	0,2	1,0	800
0,6	0,4	1,0	600
0,4	0,6	1,0	400
0,2	0,8	1,0	200

Nota. +: Concentración de la solución madre.

Anexo 4

Registro fotográfico del proceso experimental de la investigación.

a) Reactivación de cepas

Figura 6

Placas de agar McConkey con cultivos de tres cepas de E. coli BLEE.

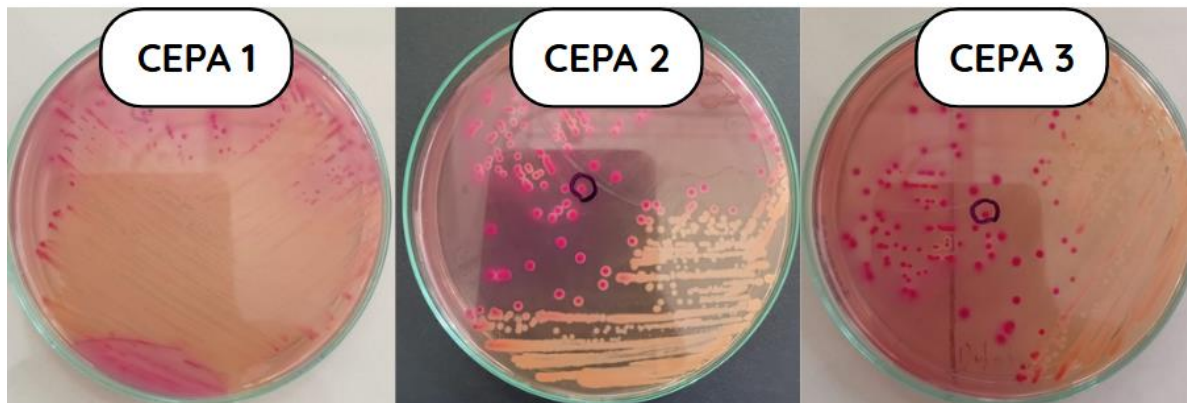


Figura 7

Pruebas bioquímicas de TSI, Citrato, LIA y MIO para confirmación de cepas del género E. coli.



Figura 8

Placas de agar Salmonella-Shigella con cultivos de cepas de Shigella sp..

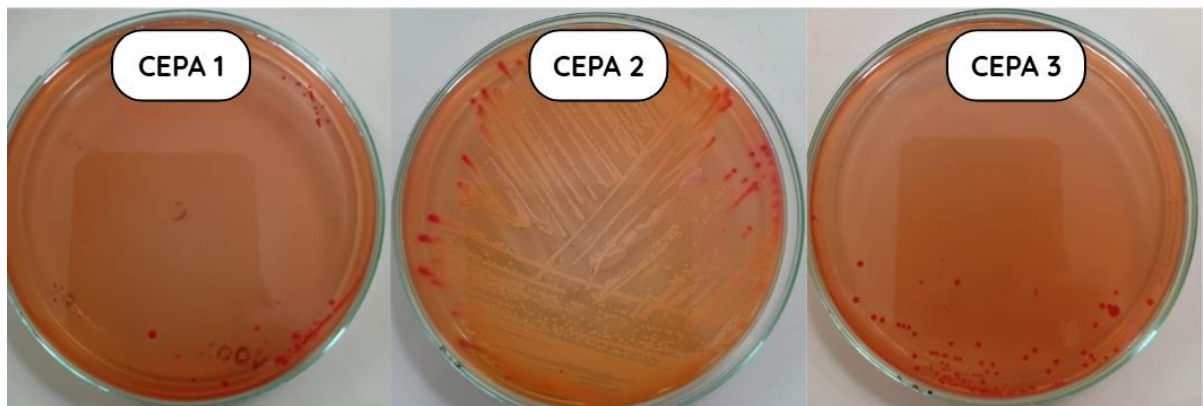
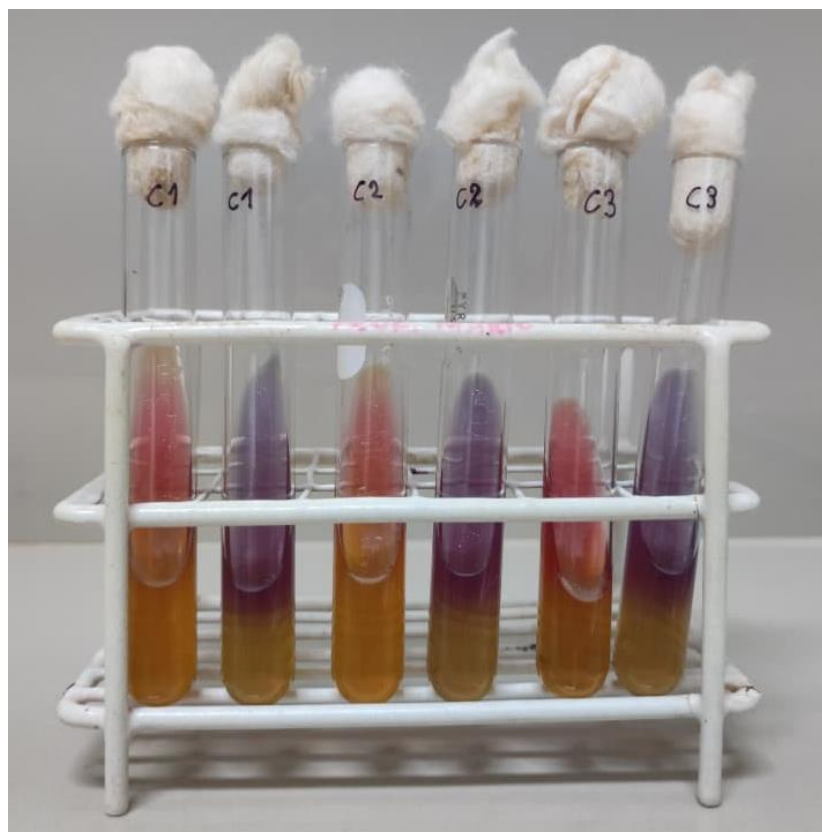


Figura 9

Pruebas bioquímicas de TSI y LIA para confirmación de 3 cepas del género Shigella sp..



b) Obtención del extracto etanólico

Figura 10

Flores secas de H. sabdariffa.



Figura 11

Flores seleccionadas para el extracto etanólico de H. sabdariffa.



Figura 12

Almacenamiento del macerado de las flores secas de H. sabdariffa.



Figura 13

Pesado del extracto etanólico de H. sabdariffa.



Figura 14

Preparación de la solución madre y de las concentraciones del extracto etanólico de H. sabdariffa.



Figura 15

Concentraciones del extracto etanólico empleadas en el estudio.



Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby-Bauer

Figura 16

Preparación de placas de Petri con agar Müller-Hinton.

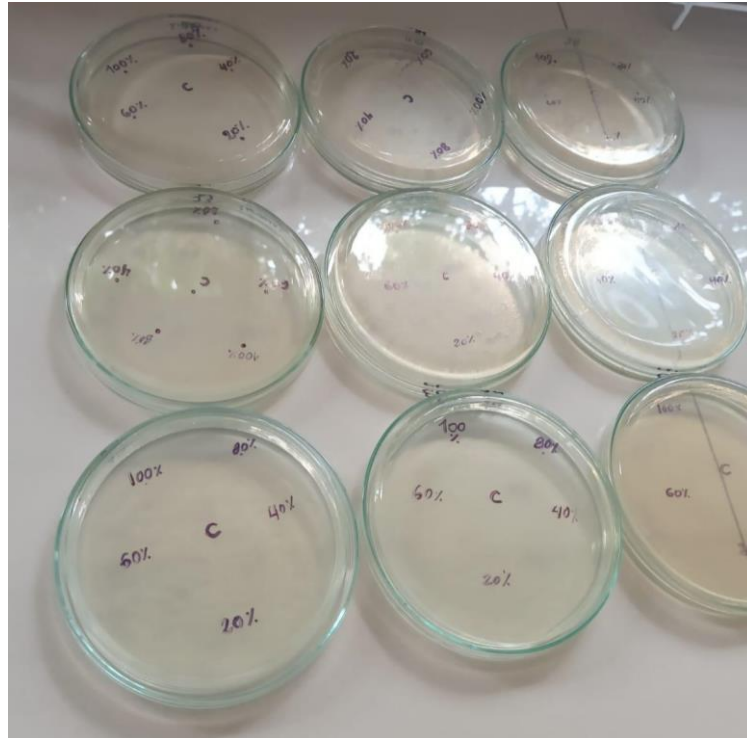


Figura 17

Preparación del tubo patrón 0.5 de McFarland.



Figura 18

Siembra en agar Müller-Hinton con hisopo estéril impregnado con el inóculo bacteriano.



Figura 19

Colocación de discos impregnados con diferentes concentraciones del extracto etanólico y de un disco control con solución salina estéril en el centro de cada placa.

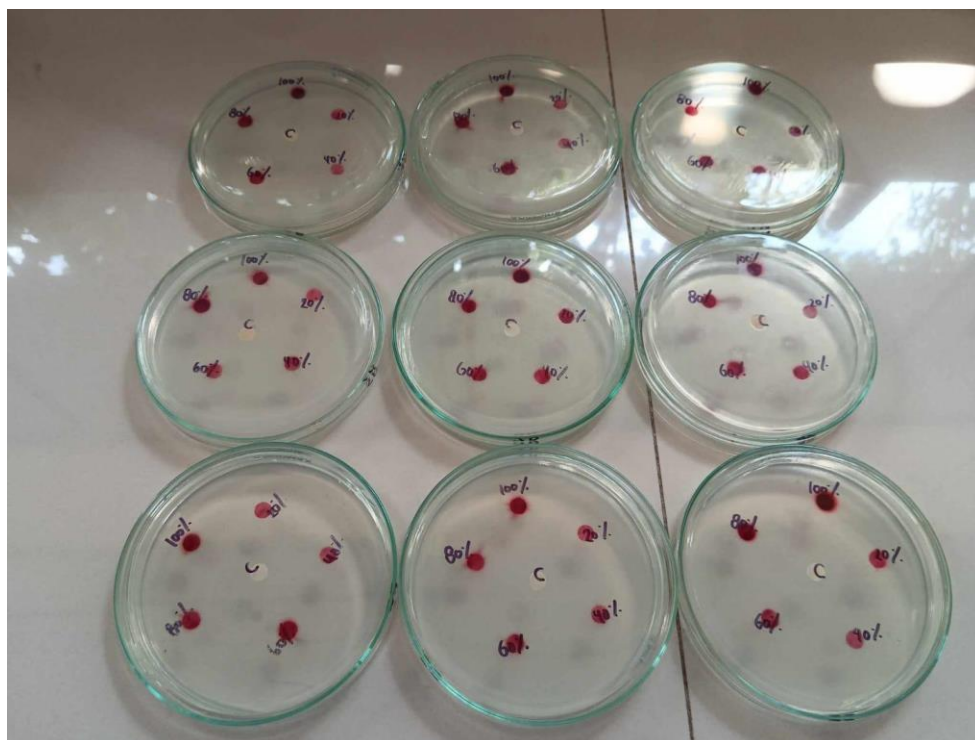
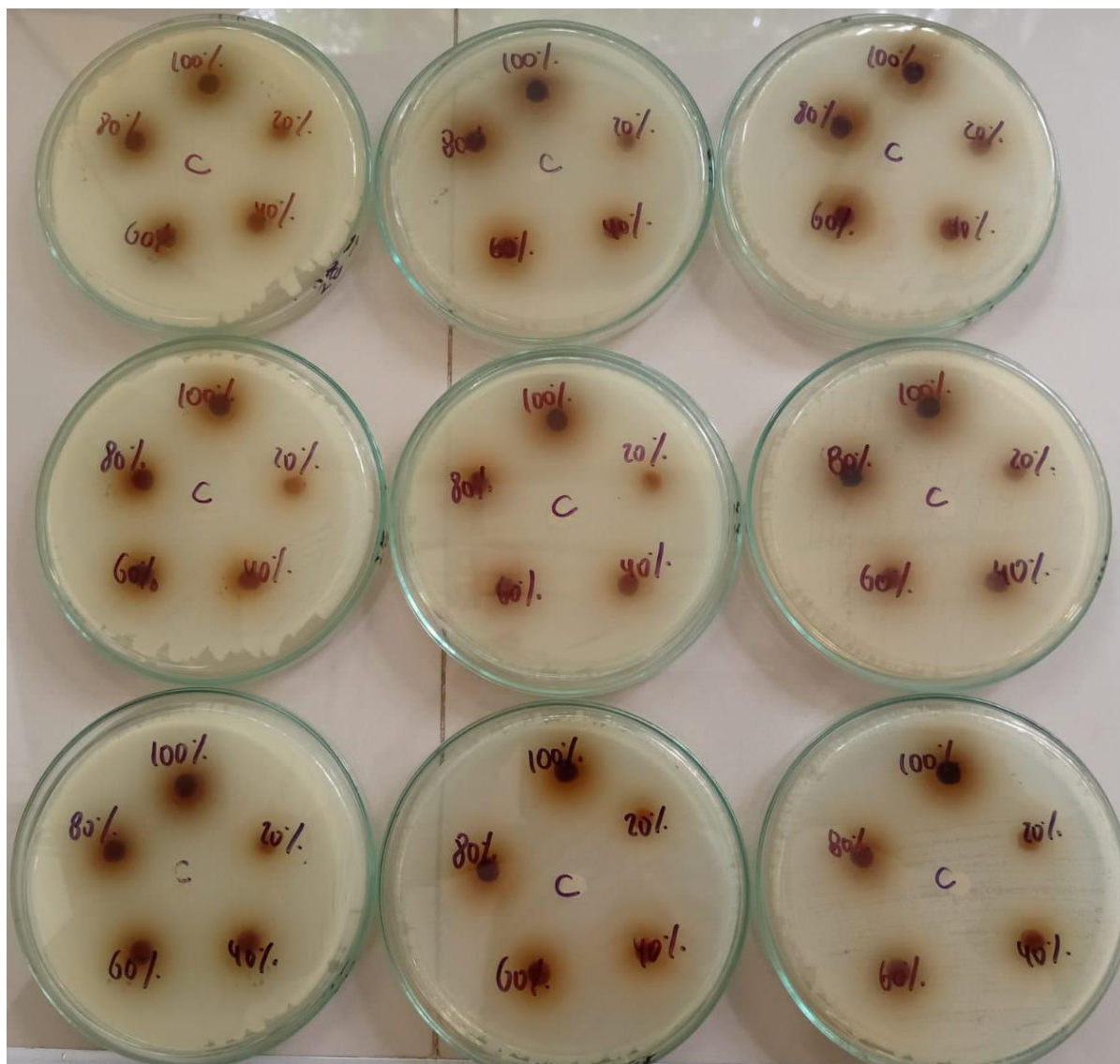


Figura 20

Ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer) mostrando la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *H. sabdariffa* frente a *E. coli* BLEE.



Ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer) mostrando la actividad inhibitoria del extracto etanólico de H. sabdariffa frente a Shigella sp.

