



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”**



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

**SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
Beta Hemolítico Y *Escherichia coli* FRENTE AL EXTRACTO ETANÓLICO
DE HOJAS DE *Annona muricata* “GUANÁBANA”.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

Presentado por:

Bach. Cinthya Lizet Castro Hernández

Bach. José Gabriel Ayasta Senmache

LAMBAYEQUE – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
BETA HEMOLÍTICO Y *Escherichia coli* FRENTE AL EXTRACTO
ETANÓLICO DE HOJAS DE *Annona muricata* “GUANÁBANA”.

Bach. Cinthya Lizet Castro Hernández.

Bach. José Gabriel Ayasta Senmache

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

PRESIDENTE

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

SECRETARIA

Lic. Julio Cesar Silva Estela

VOCAL

Lic. Mario Cecilio Moreno Mantilla

PATROCINADOR

McS. Fransk Amarildo Carrasco Solano

Co - PATROCINADOR

Nuestra mayor gloria no está en no caer nunca, sino en levantarnos

Cada vez que caemos

Confucio

Dedicatoria

A Dios por permitirme vivir, por ser mi fortaleza y por sus dadas sin fin.

A mis padres Martha y José por sus consejos, su apoyo incondicional y ser mi fuente de inspiración para afrontar la vida.

A mis hermanos Karina y José por ser quienes hacen mis días llenos de dicha y felicidad.

Cinthya Castro.

A Dios por darme la libertad de vivir y la fortaleza en cada momento de mi vida.

A mis padres, Julio y Elva, que me dieron vida, educación, consejos y todo su apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A Esther, por ser la persona que siempre estuvo apoyándome y alentándome en la realización de esta tesis.

José Ayasta.

Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento al patrocinador, Lic. Mario Moreno Mantilla, por sus consejos, comprensión y por el apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

Al MSc. Fransk A. Carrasco Solano y al Lic. Jorge Fupuy por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

Al jurado por las exigencias requeridas en el presente trabajo de investigación.

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

Lic. Julio Cesar Silva Estela

A nuestras respectivas familias por su confianza, apoyo y ánimos lo cual hizo posible la realización de este trabajo de investigación.

A nuestra amiga Goretty Rivera J. por su apoyo en la presente tesis.

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana). La muestra estuvo representada por 135 unidades experimentales constituidas por 9 cepas bacterianas (3 cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* beta hemolítico) sometidas a 5 concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanabana” (125, 250, 500, 750, y 1000 mg/ml), sometida a 3 repeticiones; siguiendo el método modificado de difusión de Kirby Bauer. **RESULTADOS:** El crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* beta hemolítico fueron inhibidas por el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*; asimismo, además conforme se incrementaba la concentración del producto aumentaba la inhibición. Así mismo los promedios de halo de inhibición demuestran que *Streptococcus* beta hemolítico fue la especie más sensible ya que presenta halos de 14.6 mm a una concentración de 1000 mg/ml y 7.8 mm a una concentración de 125 mg/ml; Mientras que las cepas de *Escherichia coli* no presento halo de inhibición en ningunas de las concentraciones utilizadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) que presentó el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre las cepas 1,2 y 3 de *Staphylococcus aureus* fue 500 mg/ml. Mientras que las cepas 1,2 y 3 de *Streptococcus* beta hemolítico fue de 250mg/ml. En tanto para *Escherichia coli* no se realizó la concentración mínima inhibitoria (CMI) pues no existió inhibición en placa, en ninguna de las concentraciones del extracto. **CONCLUSIÓN:** *Streptococcus* beta hemolítico fue la especie con mayor susceptibilidad, presenta halos de inhibición de 14.6 mm a una concentración de 1000 mg/ml y 7.8 mm a una concentración de 125 mg/ml y la especie más resistente fue cepas de *Escherichia coli* no presento halo de inhibición en ningunas de las concentraciones utilizadas.

Palabras Clave: *Annona muricata*, susceptibilidad, extracto etanólico, cepas.

ABSTRAC

OBJECTIVE: To determine the susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus*, beta-hemolytic *Streptococcus* and *Escherichia coli* to the ethanolic extract of *Annona muricata* (Guanábana) leaves. The sample was represented by 135 experimental units constituted by 9 bacterial strains (3 strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and beta hemolytic *Streptococcus*) subjected to 5 concentrations of the ethanolic extract of leaves of *Annona muricata* "guanabana" (125, 250, 500, 750, and 1000 mg / ml), subjected to 3 repetitions; following the modified diffusion method of Kirby Bauer. **RESULTS:** The growth of strains of *Staphylococcus aureus* and beta-hemolytic *Streptococcus* were inhibited by the ethanolic extract of *Annona muricata* leaves; As well, as the concentration of the product increased, the inhibition increased. Likewise, the inhibition halo averages show that beta hemolytic *Streptococcus* was the most sensitive species since it presents halos of 14.6 mm at a concentration of 1000 mg / ml and 7.8 mm at a concentration of 125 mg / ml; While the strains of *Escherichia coli* did not present a halo of inhibition at any of the concentrations used. The minimum inhibitory concentration (MIC) presented by the ethanolic extract of *Annona muricata* leaves on strains 1, 2 and 3 of *Staphylococcus aureus* was 500 mg / ml. While strains 1, 2 and 3 of beta hemolytic *Streptococcus* was 250mg / ml. In the case of *Escherichia coli*, the minimum inhibitory concentration (MIC) was not carried out since there was no inhibition in plaque at any of the concentrations of the extract. **CONCLUSION:** Hemolytic beta-streptococcus was the species with the highest susceptibility, presented halos of inhibition of 14.6 mm at a concentration of 1000 mg / ml and 7.8 mm at a concentration of 125 mg / ml and the most resistant species was *Escherichia coli* strains. Halo inhibition in any of the concentrations used.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	vi
ABSTRAC.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Material.....	8
3.1.1. Material biológico.....	8
3.1.2. Población y muestra.....	9
3.2. Métodos.....	9
3.2.1 Variables de estudio.....	9
3.2.2 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas.....	9
3.2.3 Determinación de la susceptibilidad bacteriana al extracto etanólico de la hoja de <i>Annona muricata</i> (guanábana).....	11
Técnica para la obtención del extracto etanólico y preparación de las concentraciones y sus concentraciones.....	11
a) Obtención del extracto etanólico de la hoja de <i>Annona muricata</i> (guanábana).....	11
b) Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Annona muricata</i> (guanábana).....	13
Actividad antimicrobiana de la hoja de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.....	13
a) Preparación del inóculo bacteriano según el método descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú.....	13
b) Preparación de los discos de susceptibilidad.....	14

	c) Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer.....	14
	3.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del Instituto Nacional de Salud.....	15
	3.2.7 Análisis estadístico de datos.....	16
IV.	RESULTADOS.....	17
4.1	Susceptibilidad de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> beta hemolítico y <i>Escherichia coli</i> frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (Guanabana).....	17
4.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> beta hemolítico y <i>Escherichia coli</i>	20
4.3	Análisis de Varianza (ANAVA) de los promedios de halos de inhibición.....	22
4.4	La prueba de significancia de Tukey (0.05).....	23
V.	DISCUSIÓN.....	26
VI.	CONCLUSIONES.....	29
VII.	RECOMENDACIONES.....	30
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
IX.	ANEXOS.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Concentraciones del extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> (guanábana) obtenidas a partir de la solución madre.....	13
Tabla 2: Procedimiento del método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del Instituto Nacional de Salud.....	16
Tabla 3: Promedio del halo de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> beta hemolítico y <i>Escherichia coli</i> , enfrentadas al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.....	17
Tabla 4: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> beta hemolítico frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.	20
Tabla 5: Análisis de Varianza (ANOVA) de los Promedio del halo de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> beta hemolítico y <i>Escherichia coli</i> , enfrentadas al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.....	23
Tabla 6: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las tres cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.	23
Tabla 7: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las tres cepas de <i>Streptococcus</i> beta hemolíticos, frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.	24
Tabla 8: Halos de inhibición de las tres cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.	36
Tabla 9: Halos de inhibición de las tres cepas de <i>Streptococcus</i> beta hemolíticos, frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.	37

Tabla 10: Halos de inhibición de las tres cepas de *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.....	8
Figura 2: Cultivos puros de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus</i> beta hemolítico.....	8
Figura 3: Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> . a. <i>Staphylococcus aureus</i> en placa con agar sangre. b. Prueba de coagulasa.....	10
Figura 4: Identificación de <i>Escherichia coli</i> . a. <i>Escherichia coli</i> en placa de Agar Mac Conkey b. Pruebas bioquímicas.....	10
Figura 5: Identificación de <i>Streptococcus</i> beta hemolítico. a. <i>Streptococcus</i> producción de beta hemolisis. b. Prueba de catalasa.....	11
Figura 6: Selección de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana” en el Laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”.....	12
Figura 7: Hojas de <i>Annona muricata</i> “Guanábana” a. Maceración. b. Filtración con un papel filtro Whatman N° 1.	12
Figura 8: Promedio del halo de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> beta hemolítico y <i>Escherichia coli</i> , enfrentadas al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.....	18
Figura 9: Halos de inhibición (mm) de <i>Escherichia coli</i> , enfrentadas al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”. A concentraciones de 125, 250,500,750,1000mg/ml y control alcohol 40° (C).....	19
Figura 10: Halos de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> , enfrentadas al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”. A concentraciones de 125, 250,500,750,1000mg/ml y control alcohol 40° (C).....	19

Figura 11: Halos de inhibición (mm) de *Streptococcus* beta hemolítico enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”. A concentraciones de 125, 250,500,750,1000mg/ml y control alcohol 40° (C).....19

Figura 12: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Streptococcus* beta hemolítico frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”..... 21

Figura 13: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Staphylococcus aureus*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”. 21

Figura 14: Promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Staphylococcus aureus*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.....24

Figura 15: Promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”..... 25

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Clasificación taxonómica de <i>Annona muricata</i> “guanábana”.....	35
Anexo 2: Halos de inhibición de las cepas de <i>Streptococcus</i> beta hemolíticos, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> frente al extracto etanólico de hojas de <i>Annona muricata</i> “guanábana”	36
Anexo 3: Recolección de hojas de <i>Annona muricata</i> “Guanábana”, en el Caserio Callanca (Villa Saúl) Lambayeque.	38
Anexo 4: Obtención del extracto seco de las hojas de <i>Annona muricata</i>	38
Anexo 5: Prueba de susceptibilidad.....	39
Anexo 6 Constancia del herbario PRG.....	40

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico exacerbado por el uso indebido de los fármacos; el uso de un medicamento antimicrobiano contra la infección que sea, sin importar la dosis, por un período de tiempo obliga a los diversos microorganismos a adaptarse o morir, y los que se pueden adaptar transmiten los genes de resistencia contra los fármacos a generaciones futuras. La resistencia bacteriana a los antibióticos es cada vez más frecuente debido a que los microorganismos causantes de enfermedades desarrollan diferentes mecanismos que están codificados ya sea a nivel cromosómico o plasmídico, lo que conduce mayormente al fracaso de los tratamientos.

Asimismo una característica sobresaliente del genoma de *Staphylococcus aureus* es la presencia de un gran número de elementos móviles de ADN extracromosómicos (plásmidos, secuencias de inserción y transposones), que confieren al microorganismo factores de virulencia y resistencia a diversos antimicrobianos.

En la actualidad, el consumo desmesurado de antibióticos, especialmente beta lactámicos, cefalosporinas y fluoroquinolonas, ha favorecido el aumento de cepas de *Escherichia coli*, con patrón de multiresistencia, debido a la producción o hiperproducción de enzimas betalactamasas, ya sea de espectro reducido o amplio espectro.

Las infecciones faringo-amigdalinas son procesos patológicos muy frecuentes en el hombre; Se reconoce al *Streptococcus* beta hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*) como uno de los agentes infecciosos más comunes causante de esta enfermedad, además según estudios realizados presenta resistencia a los antibióticos como la eritromicina y clindamicina.

Datos epidemiológicos en el Perú revelaron que *Escherichia coli* aislada de muestras de orina de pacientes comunitarios, tiene una resistencia significativa a betalactámicos como ampicilina (72%), cefalotina (25%), amoxicilina/ácido

Clavulánico (35%) y también a las quinolonas como el ácido Nalidíxico y la Ciprofloxacina (30%). (INS, 2007).

En el Perú un estudio sobre resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en los servicios quirúrgicos, mostro una resistencia a meticilina de (52,2 %), eritromicina y azitromicina (92,3% respectivamente), ciprofloxacino (72%), gentamicina (28.2 %), amikacina (26 %). (Martínez,2017).

De muestras de exudados faríngeos se determinó que el *Streptococcus* beta hemolítico presentan una resistencia a eritromicina (70 %), a clindamicina (70 %) y un (81.25 %) resistentes a ambos antimicrobianos. (Olivera 2009)

Del total de microorganismos aislados en pacientes hospitalizados, en el Hospital Regional Docente las Mercedes de la provincia de Chiclayo en el año 2014, el 69% de aislamientos correspondieron a la especie *Escherichia coli* y el 4% fueron aislamientos de *Staphylococcus aureus*; en el caso del Hospital Regional Lambayeque también de la provincia de Chiclayo, en el año 2016 la incidencia es 56.4% para *Escherichia coli* y 0.3% para *Staphylococcus aureus*. En un estudio realizado por Olivera en el 2009 en la ciudad de Trujillo se determino una frecuencia de 0.71 % aislamientos de *Streptococcus* beta hemolítico.

La *Annona muricata* (Guanábana), ha sido referida como una planta medicinal la cual presenta en la corteza y frutos jóvenes taninos; que se usa para tratar diarreas y disenterías. También la corteza, raíz y hojas en infusión es utilizada contra la diabetes, puesto que disminuye el azúcar en sangre. También refiere que se utiliza como cicatrizante de úlceras o heridas en la piel para lo que se utiliza las hojas machacadas en forma de emplastos. El zumo de las hojas regulariza el tránsito gastrointestinal y elimina helmintos del intestino es antidiarreico y antiparasitario intestinal. (Rengifo 2007).

Frente a lo planteado se cuestionó ¿existe susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolíticos y *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanabana”? Considerando

que las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolíticos y *Escherichia coli* son susceptibles frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanabana” se ejecutó el presente trabajo de investigación con los objetivos:

- Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* (Guanábana).
- Determinar la CMI del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli*.

II. ANTECEDENTES

Lim T (2012) en estudios de la *Annona muricata*, han evidenciado muchos de sus usos tradicionales y han demostrado que diversas partes de la planta contienen acetogeninas, que son las responsables de los muchos beneficios terapéuticos. A la fecha aproximadamente 82 acetogeninas han sido cuantificadas de diez diferentes grupos de *A. muricata*. Las 3 acetogeninas de la Annonaceae son aparentemente una serie de policétidos derivados de ácidos grasos que poseen anillos tetrahidrofurano y metilado o lactona (algunas veces se reordena a una metil cetolactona) con varios grupos hidroxil, acetoxil y/o cetoxil a lo largo de la cadena de hidrocarbano. Las acetogeninas exhiben una amplia variedad de actividad biológica (citotóxica, antitumoral, antiviral, antimicrobiana, inmunosupresiva, utilizadas para el crecimiento de los animales y pesticida). Las hojas de *Annona muricata*, contienen alcaloides a los cuales se les atribuye propiedades antitumorales y antioxidantes.⁷

Las hojas de guanábana son utilizadas tradicionalmente en Brasil para problemas del hígado (Solís *et al.*, 2010), también son usadas como supurativo (contra mucosidades, secreciones o flujos) y antipirético (Badrie y Schauss, 2010) y contra la inflamación (Gomez *et al.*, 2009), por ejemplo, realizaron un análisis de la capacidad antiinflamatoria del extracto etanólico de las hojas de guanábana obteniendo la confirmación de su posible uso terapéutico, pero recomendando la realización de estudios sobre los efectos secundarios que se pueden presentar.

Takahashi *et al.*, (2006) realizaron un estudio para lo que utilizaron ocho plantas de la familia Annonaceae, las cuales fueron seleccionados por su actividad antibacteriana: *Xylopia frutescens*, *X. aromatica*, *X. amazonica*, *X. benthamii*, *Annona ambotay*, *A. crassiflora*, *A. muricata* y *A. cherimolia* contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Seis mostraron actividad antibacteriana

contra al menos uno de los organismos probados (extractos de hexano de frutos de *X. frutescens*, extractos etanólicos de frutos de *X. frutescens*, *X. amazonica*, extracto de cloroformo del tronco de *X. amazonica*, extracto de benceno de *A. ambotay* y hojas de *A. cherimolia*), a la concentración de 100 mg / ml, todos ellos activos contra *B. subtilis*. Tres extractos (extractos etanólicos de frutos de *X. frutescens*, extracto de benceno de *A. ambotay* y hojas de *A. cherimolia* también mostraron actividad contra *S. aureus*. Ninguno de los extractos o compuestos fueron activos contra *E. coli*, *M. luteus* y *P. aeruginosa*. El efecto más prometedor se obtuvo del extracto de etanol de hojas de *A. cherimolia*.

Pérez y et al., (2013) obtuvieron a partir de la cascara de “Lima”, *Citrus limetta* *Risso* flavonoides a los cuales se les atribuyen efectos benéficos sobre la salud tales como: anti diabética, antibacteriana, antiinflamatoria y antioxidante; esta actividad antioxidante es importante porque puede prevenir enfermedades como el cáncer y otras enfermedades degenerativas.

Abadie et al. (2014) En las pruebas in vitro de sensibilidad, realizados con 6 extractos vegetales (*Alchornea triplinervia*, *Annona muricata*, *Averrhoa carambola*, *Brunfelsia grandiflora*, *Caraipa grandifolia* y *Cedrela odorata*) Este estudio se realizó mediante la técnica de difusión en disco. Ninguno de los extractos tuvieron actividad frente a las cepas de *Escherichia. coli*; cuatro extractos tuvieron actividad frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, siendo los extractos de *Cedrela odorata* y *Alchornea triplinervia* los que tuvieron mayor actividad frente a esta bacteria, todos los extractos tuvieron actividad frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, siendo los extractos de *C. odorata*, *A. triplinervia* y *Caraipa grandiflora*, los de mayor actividad. Se obtuvieron prometedores resultados de actividad antibacteriana de los extractos en estudio frente a cepas intrahospitalarias, mayormente contra *Staphylococcus aureus*.

Solomon y Ugoh (2014) evaluaron las actividades antibacterianas y fitoquímicas del extracto foliar metanólico y acuoso de *Annona muricata*, frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumonia*. Las bacterias gram positivas inhibidas fueron *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, mientras que el gramnegativo más

inhibido fue *Escherichia coli*. Ambos extractos mostraron propiedades antibacterianas pero el extracto metanólico fue más eficaz, ya que inhibió una amplia gama de organismos a concentraciones variables.

García et al. (2016) utilizaron las hojas de *Amnona muricata* previamente seco y molido empleando etanol al 75 % como disolvente, una relación material vegetal-volumen de disolvente 1:20 por un tiempo de 1 h y a 50°C; se evaluó a dos concentraciones 500 y 250 mg/ml. Se empleó solución salina como control negativo y el combiótico Penicilina-Estreptomicina como control positivo. Se determinó que las cepas de *Erysipelothrix rhusiopathiae* es susceptible a la concentración del extracto etanólico de *Amnona muricata* de 500 mg/mL.

Tejerina (2001) Menciona que diversas extrategias se han surgido para tratar de minimizar esta amenaza y una de ella es la necesidad de hallar nuevos antibióticos, ya que, es alarmante la disminución del interés por parte de la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevas moléculas antibacterianas; al dia de hoy se considera que los mecanismos bacterianos de resistencia y su capacidad de diseminación son mucho más eficientes.

Amnona muricata, se trata de un pequeño árbol perenne, perteneciente a la familia de las Annonáceas, caracterizado por presentar una altura cercana a los 6-8 metros hasta 10. Su tronco es recto, de corteza lisa y color grisáceo, ramifica a baja altura siendo el ramaje intenso con ramas delgadas y grisáceas o pardeo grisácea. Su sistema radicular extensivo le permite soportar períodos relativamente largos de sequía, ya que explora y cubre una amplia franja de terreno. En suelos sin ningún obstáculo, las raíces llegan a penetran más de un metro de profundidad. (**Alonso 2004**).

Se ha identificado en extractos etanólicos de hojas de *A. muricata* la presencia de flavonoides, a los cuales se les atribuyen actividades farmacológicas tales como: anti diabética, antibacteriana, antiinflamatoria y antioxidante (**Pérez y et al., 2013; Gaitén y et al., 2012**) y en el año 2006 se realizó un estudio en el que se demostró el efecto antibacteriano de extractos de *A. muricata* sobre las bacterias *S.aureus* y *B. subtilis*

(**Takahashi y *et al.*, 2006**). Los flavonoides son moléculas polifenólicas que pueden ser vistos como dos anillos de benceno unidos por una pequeña cadena de tres carbonos. Uno de estos átomos de carbono está siempre conectado a uno de los anillos de benceno; ya sea directamente o por puente de hidrógeno, formando así un tercer anillo en el centro, el cual puede tener cinco o seis miembros. (**Escamilla *et al.* 2009**).

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora. Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticáncer, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. (**Paladino, S. 2009**) En los extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* se ha identificado la presencia de flavonoides a los cuales se les han atribuido propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antibacterianas. (**García *et al.* 2016**)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material biológico

Material botánico: Las hojas de *Annona muricata* “guanábana” fueron recolectadas en el Caserío Callanca – Distrito Monsefú - Provincia Chiclayo – Región Lambayeque. Su identificación fue corroborada en el herbario PRG como *Annona muricata*, siendo depositado y registrado con el N^o 17883. (Fig. 1).



Figura 1: Hojas de *Annona muricata* “guanábana”

Material biológico: Cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, proporcionados por el Hospital Regional Docente “Las Mercedes” – Chiclayo. Cultivos de *Streptococcus* beta hemolítico aislados e identificados en el laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Fig. 2).



Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Streptococcus beta hemolítico

Figura 2: Cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* beta hemolítico

3.1.2 Población y muestra

La población la conformaron todas las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* proporcionados por el Hospital Regional Docente “Las Mercedes” – Chiclayo; las cepas de *Streptococcus* beta hemolítico obtenidas a partir de secreciones faríngeas de alumnos de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

La muestra estuvo representada por 135 unidades experimentales constituidas por 9 cepas bacterianas (3 cepas de *Staphylococcus aureus*, 3 de cepas de *Escherichia coli* y 3 cepas de *Streptococcus* beta hemolítico) sometidas a 5 concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanabana” (125, 250, 500, 750, y 1000 mg/ml), sometida a 3 repeticiones.

El diseño de la investigación para el presente trabajo experimental corresponde al diseño de contrastación de hipótesis de estímulos crecientes (según Goode y Hatt, en Alvitres 2000).

3.2 Métodos

3.2.1 Variables de estudio

- **Independiente:** Extracto etanólico de la hoja de *Annona muricata*.
- **Dependiente:** Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* beta hemolítico.

3.2.2 Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas.

- Cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, proporcionados por el Hospital Regional Docente “Las Mercedes” – Chiclayo.
- Para identificar a *Staphylococcus aureus*, se sembraron en placas Petri estériles con Agar sangre con la finalidad de comprobar las características de producción de hemólisis, en la identificación se realizará la prueba de coagulasa. (Figura 3).

- Para identificar a *Escherichia coli*, se sembraron en placas Petri estériles con Agar Mac Conkey, en la identificación se realizará las pruebas bioquímicas TSI, LIA, INVIC. (Figura 4).
- En tanto los cultivos puros de *Streptococcus* beta hemolítico fueron obtenidas a partir de alumnos de biología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo con infecciones faríngeas, las muestras fueron sembradas en placas Petri estériles con Agar sangre para comprobar la producción de beta hemolisis, en la identificación se realizará la prueba de catalasa. (Figura 5)

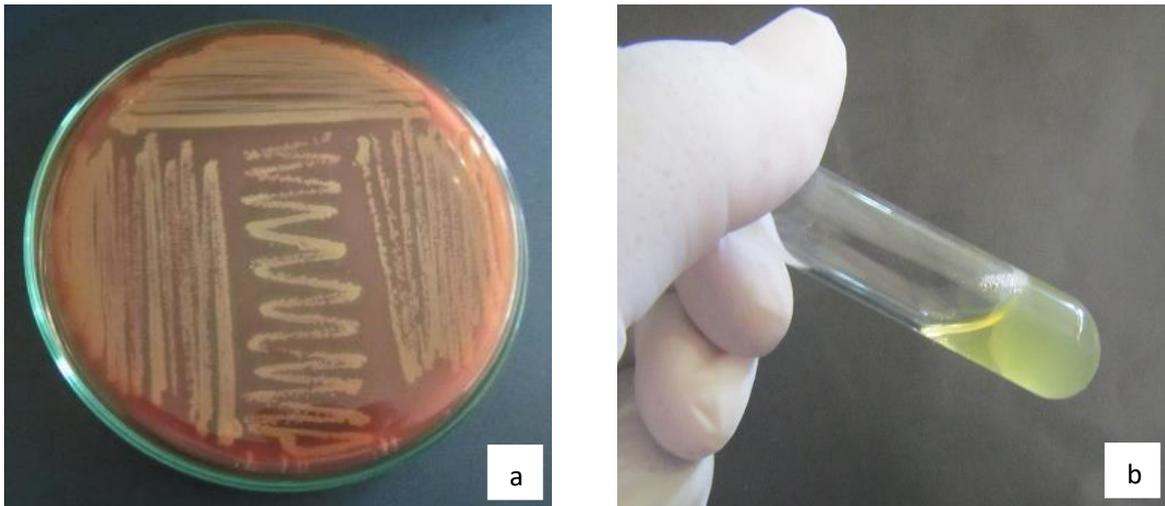


Figura 3: Identificación de *Staphylococcus aureus*. **a.** *Staphylococcus aureus* en placa con agar sangre. **b.** Prueba de coagulasa.

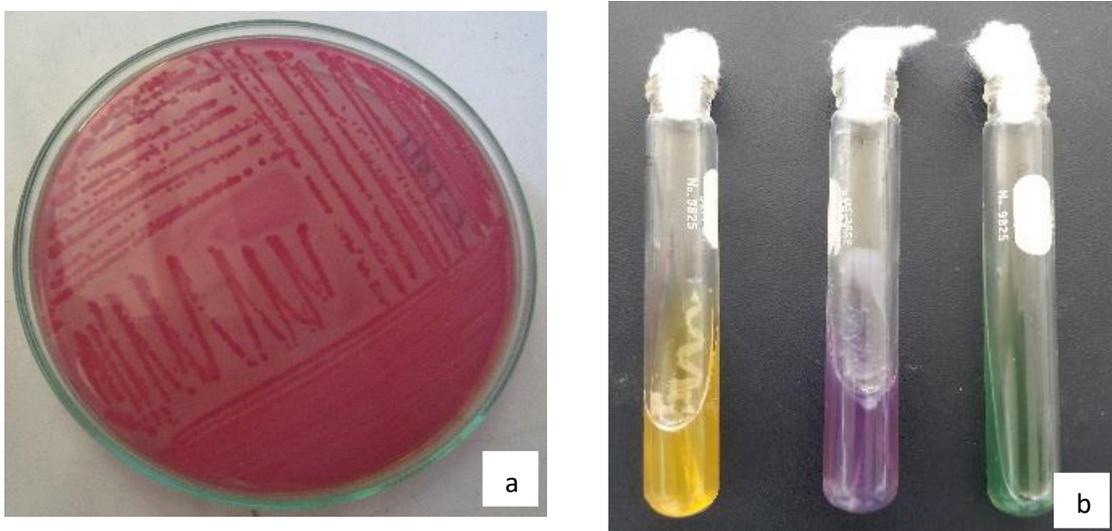


Figura 4: Identificación de *Escherichia coli*. **a.** *Escherichia coli* en placa de Agar Mac Conkey **b.** Pruebas bioquímicas.

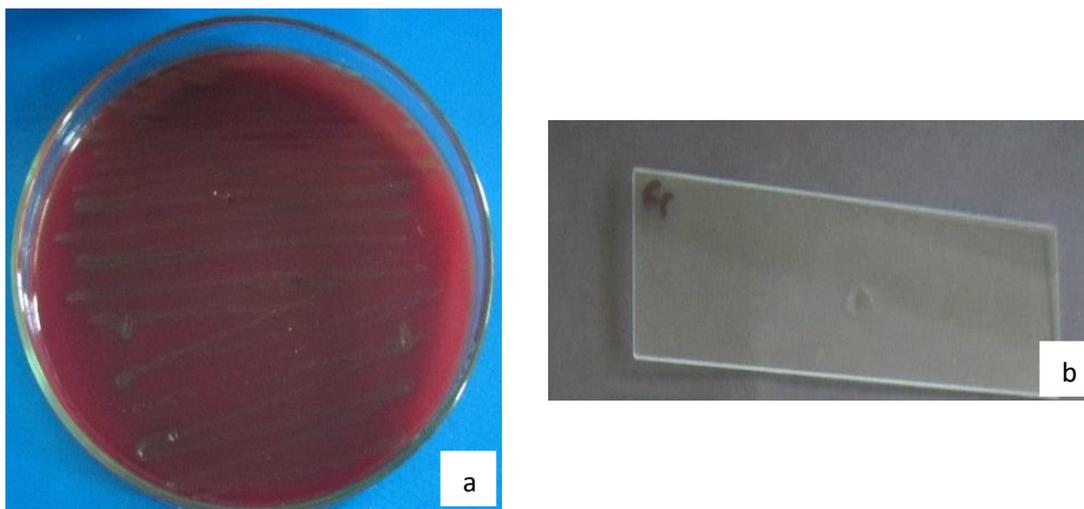


Figura 5: Identificación de *Streptococcus* beta hemolítico. **a.** *Streptococcus* producción de beta hemolisis. **b.** Prueba de catalasa.

3.2.3 Determinación de la susceptibilidad bacteriana al extracto etanólico de la hoja de *Annona muricata* (guanábana).

Técnica para la obtención del extracto etanólico y preparación de las concentraciones (Badrie N, y Schauss A. 2010)

a) Obtención del extracto etanólico de la hoja de *Annona muricata* (guanábana):

- La recolección de las hojas de *Annona muricata* “Guanábana” se realizó en el Caserío Callanca (Villa Saúl) Lambayeque.
- La muestra botánica se trasladó al Laboratorio de Botánica de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para su respectiva identificación.
- Las hojas de guanaba fueron llevadas al Laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”, en el laboratorio se procedió a seleccionar las hojas en buen estado. las cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2%, luego se enjuago tres veces con agua destilada estéril, para eliminar el cloro residual; fueron escurridos y secados con toallas absorbentes. (Figura 6)



Figura 6. Selección de hojas de *Annona muricata* “guanábana” en el Laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”.

- Las hojas de Guanábana se deshidrataron en horno a temperatura de 60°C, por 72 horas; una vez secas las hojas se procedió a triturar lo que se realizó manualmente.
- La muestra triturada se colocó en un recipiente grande de vidrio de aproximadamente 1000ml.
- Luego se le agregó el doble de etanol al 96°, es decir en proporción de 1:2 y se dejó macerar por 7 días con constantes movimientos rotacionales, se guardó en un lugar donde no tenga contacto con la luz solar.
- Luego de los 7 días de maceración se procedió a filtrar con un papel filtro Whatman N° 1 y se colocó el filtrado en capsula de porcelana la cual se llevó a estufa a 37°C para la evaporación del etanol, quedando así solo el extracto seco. (Figura 7).

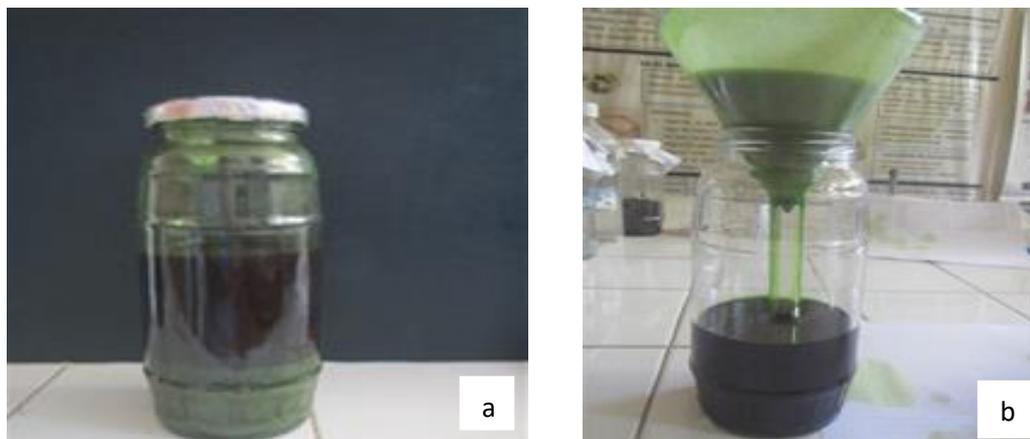


Figura 7: Hojas de *Annona muricata* “Guanábana” **a.** Maceración. **b.** Filtración con un papel filtro Whatman N° 1.

b) Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* (guanábana)

- El extracto seco se pesó y fue 5.83g. se le agregó un volumen de 5.83ml de alcohol al 40° en proporción de 1:1, así se obtuvo una solución madre con una concentración de 1000 mg/ml.
- A partir de la solución madre, se procedió a realizar las respectivas diluciones para obtener concentraciones de 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml. Tomando un volumen de la solución stock y completando con etanol de 40°.

Tabla N°1: concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* (guanábana) obtenidas a partir de la solución madre.

Extracto etanólico (ml)	Etanol al 40% (ml)	Concentraciones (mg/ml)
0.25	1.75	125
0.5	1.5	250
1	1	500
1.5	0.5	750
2	0	1000

Actividad antimicrobiana de la hoja de *Annona muricata* “guanábana”

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

- La preparación del inóculo bacteriano según el Manual de procedimientos para pruebas de susceptibilidad del INS, 2010 para lo cual se utilizó solución salina fisiológica esterilizada (NaCl 0,86 % p/v) como diluyente se coge 1 ó 2 colonias del cultivo bacteriano puro del que se hizo 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.

b) Preparación de los discos de susceptibilidad

- Para la preparación de los discos de susceptibilidad se utilizó papel de filtro Whatman N°1 del cual se obtuvieron discos de 5mm de diámetro con ayuda de un perforador. Estos discos se colocaron dentro de un frasco de vidrio el cual se llevó a esterilizar en autoclave (15 Lb. de presión a 121°C por 15 minutos), luego se dejó secar en horno a 80°C por 24 horas.
- Posteriormente en los discos se colocó 20µl de cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *Annona muricata* (guanábana) a 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml; se dejó reposar por 5 minutos para luego realizar la prueba de susceptibilidad. Se utilizó como control negativo discos embebidos en etanol al 40°.

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

- En placas Petri previamente esterilizadas se sirvió entre 10 ml a 15 ml por placa Agar Müller Hinton. Se dejó solidificar y se realizó el control de esterilización llevándolas a incubar a 37°C por 24 horas.
- Con un hisopo estéril se tomó el inóculo bacteriano estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo, luego se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar y se dejó secar durante 5 minutos.
- Se colocó los discos conteniendo 20µl del extracto etanólico de *Annona muricata* (guanábana) que contenían las diferentes concentraciones descritas anteriormente y en el centro de la placa se colocó el disco de control con 20 µl de etanol a 40°.

- Posteriormente 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 de cada una de las cepas.

3.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del Instituto Nacional de Salud.

- Para la obtención de la población bacteriana, las cepas se sembraron e incubaron en agar Müller Hinton por 24 horas a 37°C
- Con la ayuda de un ansa estéril se procedió a realizar la suspensión comparando con el tubo número 0.5 del nefelómetro de Mc Farland que indica una densidad poblacional de 1.5×10^8 UFC/ml.
- Se colocó 0.5 ml de Caldo Muller Hinton desde el tubo N°2 al N°12.
- Se colocó 0.5 ml de solución del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* con una concentración de (500mg/ml para las cepas de *Staphylococcus aureus*, y 250mg/ml para las cepas de *Streptococcus* beta hemolítico) a los tubos N°1 y N°2.
- Se mezcló el tubo N°2 y se transfirió 0.5 ml del tubo N°2 al tubo N°3.
- Se mesclo el tubo N°3 y se transfirió 0.5 ml de este tubo al tubo N°4. Se continuo con el mismo procedimiento hasta el tubo N°10
- Se descartó 0.5 ml de la dilución del tubo N°10.
- Se colocó 0.5 ml del inculo desde el tubo N°1 al tubo N°11.
- El tubo N° 11 fue el control del inculo y el tubo N°12 el control de esterilidad.
- Se incubo a 35°C, en un tiempo de 16-20 horas.
- El punto final se definió a simple vista, por falta de turbidez del caldo, para ello se comparó dado tubo con el tubo de control de crecimiento.

Tabla N°2: Procedimiento del método de macrodilución en tubo según Norma Técnica Peruana N° 30 del Instituto Nacional de Salud.

Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Caldo Müller Hinton (ml)	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Extracto etanólico de <i>Annona muricata</i> (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
Inoculo bacteriano (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Volumen final (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5

3.2.5 Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos correspondiente a la susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* (guanábana), se sometieron a un Análisis de Varianza (ANAVA), con arreglo factorial (5x3x3x3); donde cinco fueron las diferentes concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*, tres cepas fueron el número de cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, tres cepas de cultivos puros de *Streptococcus* beta hemolítico y tres cepas de cultivos puros de *Escherichia coli*. Y por último, tres es el número de repeticiones, para determinar la susceptibilidad de las bacterias empleadas es por la influencia del producto (extracto etanólico de *Annona muricata*) y sus concentraciones. Este análisis se complementó con la Prueba de Tukey (0.05) para el efecto inhibitorio del extracto etanólico, las concentraciones y cepas bacterianas probadas. Para todo ello se utilizó el software estadístico: Estadística versión 6.0 y Ms Excel 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* (Guanabana).

Los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de la presente investigación demostraron que el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* proporcionados por el Hospital Regional docente “Las Mercedes” y las cepas *Streptococcus* beta hemolítico aisladas en el laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo fueron inhibidas por el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*. Se observó que hubo mayor halo de inhibición del crecimiento conforme se incrementaba la concentración del producto.

Así mismo los promedios de halo de inhibición demuestran que *Streptococcus* beta hemolítico fue la especie más sensible ya que presenta halos de 14.6 mm a una concentración de 1000 mg/ml y 7.8 mm a una concentración de 125 mg/ml; en cambio la especie más resistente fue la *Staphylococcus aureus*, presentando halos de inhibición de 5 mm y 12.3 mm a las concentraciones de 125 y 1000 mg/ml. Mientras que las cepas de *Escherichia coli* no presento halo de inhibición en ningunas de las concentraciones utilizadas en la presente investigación. (Tabla N° 3 y Figura N° 8).

Tabla 3: Promedio del halo de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli*, enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

Concentración del extracto (mg/mL)	Halos de inhibición por especie (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	<i>Escherichia coli</i>
125	5.00	7.88	5.00
250	6.88	10.44	5.00
500	9.33	11.88	5.00
750	10.77	13.22	5.00
1000	12.33	14.66	5.00

El promedio de halo de inhibición 5mm corresponde al diámetro del disco.

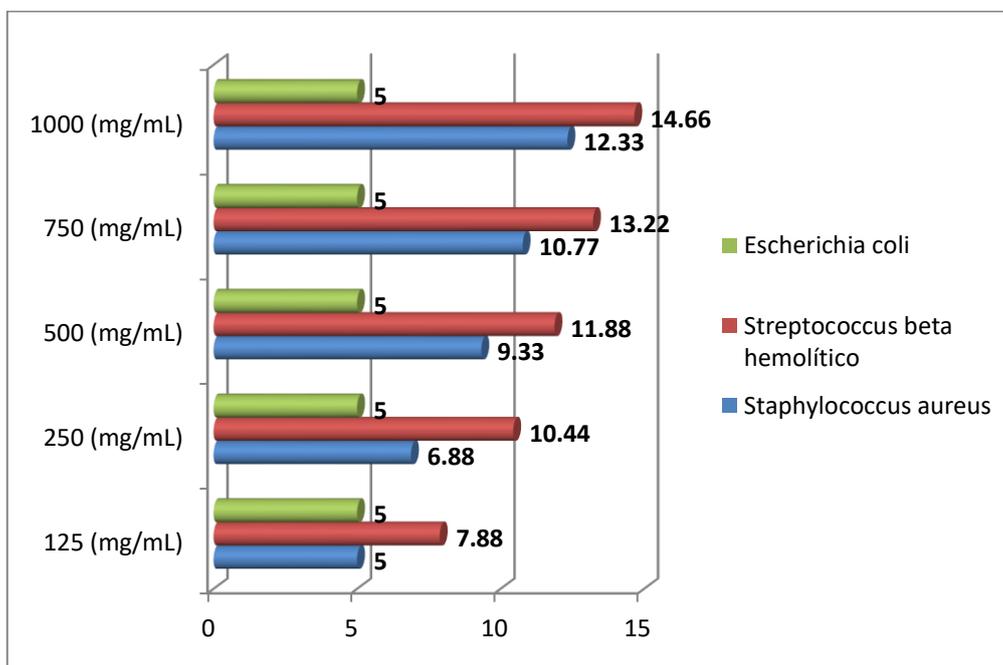


Figura 8: Promedio del halo de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli*, enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

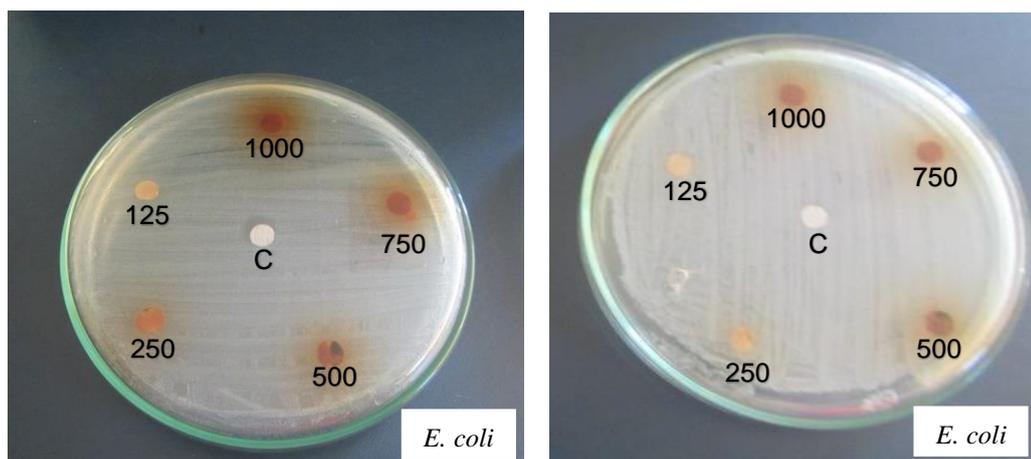


Figura 9: Halos de inhibición (mm) de *Escherichia coli*, enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* "guanábana". A concentraciones de 125, 250,500,750,1000mg/ml y control alcohol 40° (C).

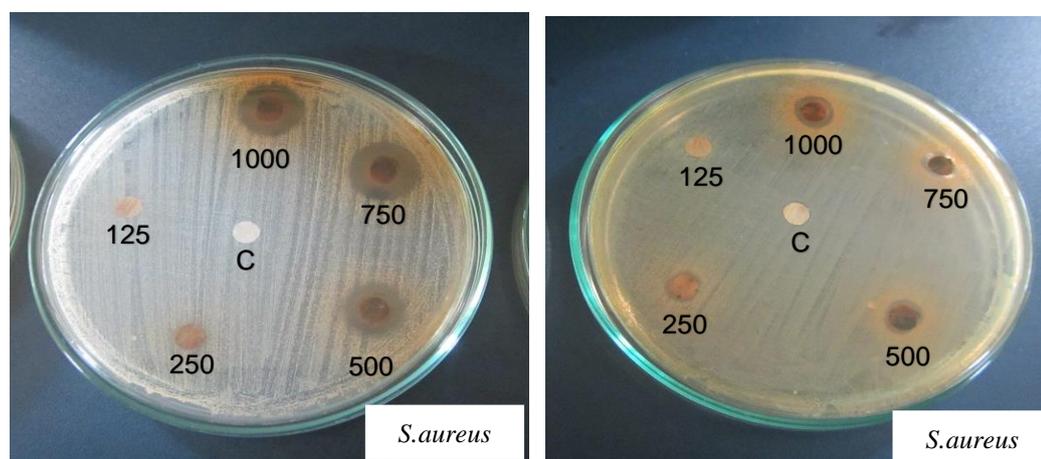


Figura 10: Halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* "guanábana". A concentraciones de 125, 250,500,750,1000mg/ml y control alcohol 40° (C).

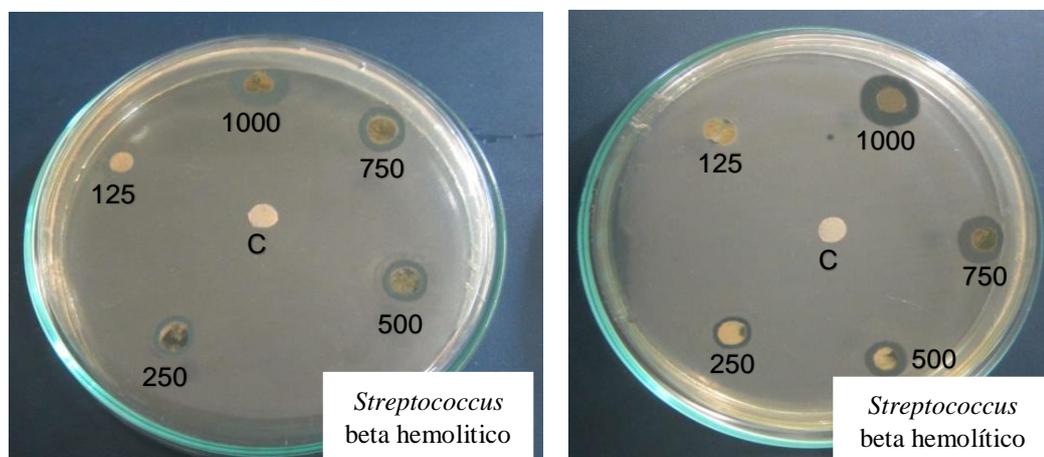


Figura 11: Halos de inhibición (mm) de *Streptococcus beta hemolítico* enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* "guanábana". A concentraciones de 125, 250,500,750,1000mg/ml y control alcohol 40° (C).

4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli*.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) que presentó el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre las cepas 1,2 y 3 de *Staphylococcus aureus* fue 500 mg/ml. En tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre las cepas 1,2 y 3 de *Streptococcus* beta hemolítico fue de 250mg/ml.

En tanto para *Escherichia coli* no se realizó la concentración mínima inhibitoria (CMI) pues no existió inhibición en placa, en ninguna de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana” (Tabla 4 y Figura 12).

Tabla 4: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Streptococcus</i> beta hemolítico		
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
CMI	500	500	500	250	250	250
	mg/ml.	mg/ml.	mg/ml.	mg/ml.	mg/ml.	mg/ml.
Tubos totales	12	12	12	12	12	12
Tubos sin crecimiento	1	1	1	1	1	1



Figura 12: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Streptococcus* beta hemolítico frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

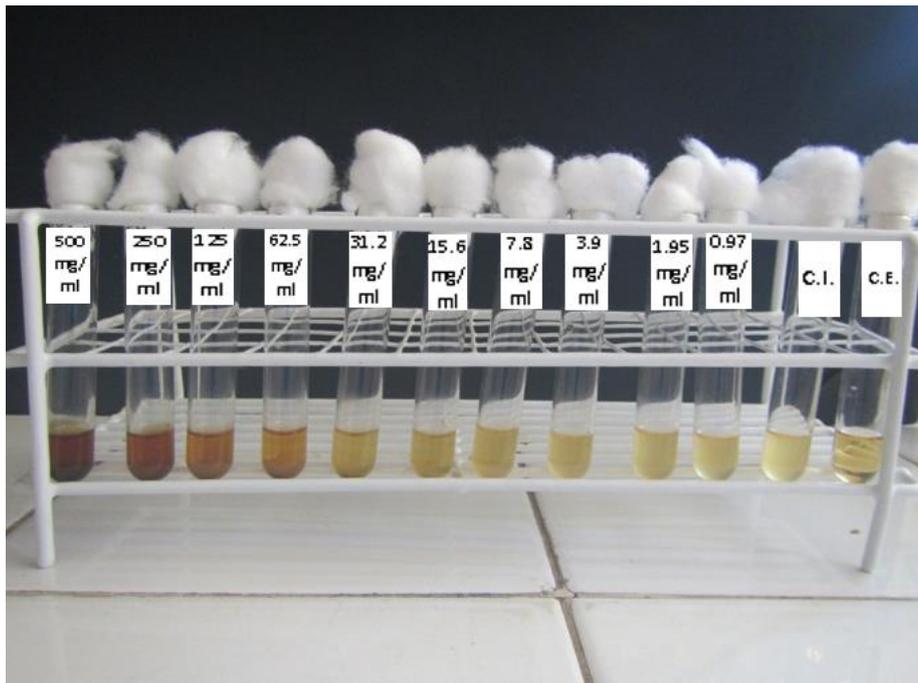


Figura 13 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Staphylococcus aureus*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

4.3 : Análisis de Varianza (ANAVA) de los promedios de halos de inhibición

Al realizar el Análisis de varianza reveló que el efecto inhibitorio del extracto etanólico del *Annona muricata* “guanábana”. Sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolítico* y *Escherichia coli*. es dependiente de las variables cepa y concentración del extracto.

Las variables cepa y concentración del extracto influyeron significativamente en el efecto del extracto etanólico del *Annona muricata* “guanábana”. Sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus beta hemolítico* donde se observa que en las cepas el efecto del extracto etanólico de Romero es diferente, así como con cada una de las concentraciones del extracto, del mismo modo ocurre con las interacciones de estas variables

HIPOTESIS:

- **CEPAS**

H₀: SA = SBH = EC

- **CONCENTRACIONES**

H₀: C125 = C250 = C500 = C750 = C1000

- **INTERACCIONES**

H₀: No hay efecto de las concentraciones del extracto etanólico de *Annona muricata* “guanábana” con las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolítico* y *Escherichia coli*,

Tabla 5: Análisis de Varianza (ANAVA) de los Promedio del halo de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli*, enfrentadas al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Desición
cepa	82,044	4	20,511	5,259	Rechaza H _{O1}
cc	1129,622	4	282,406	72,412	Rechaza H _{O2}
cepa * cc	35,289	16	2,206	,566	
Error	234,000	60	3,900		

4.4 La prueba de significancia de Tukey (0.05)

La Prueba de significancia de Tukey (0.05) para los promedios de halos de inhibición de las tres cepas de *Staphylococcus aureus*, proporcionados por el Hospital Regional Docente “Las Mercedes” – Chiclayo, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana” a concentraciones de 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml. Se observa que la Cepa S.a. 3 tuvo el promedio de halo de inhibición más bajo con un 6.533333 mm de diámetro, sin embargo no existen diferencias significativas entre las cepas, además a medida que aumenta la concentración también aumenta el diámetro del halo de inhibición.

Tabla 6: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Staphylococcus aureus* (Sa), frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

Cepas	Promedios de halos de inhibición (mm)	Significancia
S.a. 1	8	a
S.a. 2	8.333333	a
S.a. 3	6.533333	b

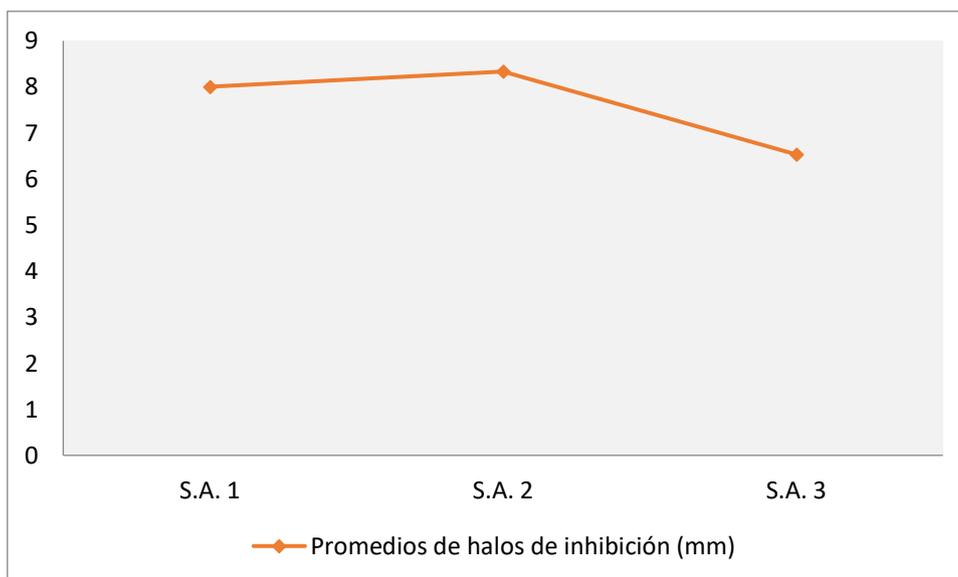


Figura 14: Promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Staphylococcus aureus*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

Como se observa la Prueba de significancia de Tukey (0.05) para los promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Streptococcus beta hemolíticos*, aislados e identificados en el laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana” a concentraciones de 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml, la Cepa S. B. H. 3 obtuvo el promedio de halo de inhibición más bajo con un 8.733333 mm de diámetro, sin embargo no existen diferencias significativas entre las cepas. Asimismo a medida que aumenta la concentración también aumenta el diámetro del halo de inhibición.

Tabla 7: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Streptococcus beta hemolíticos*, (SBH) frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

CEPAS	Promedios de halos de inhibición (mm)	Significancia
S. B. H. 1	10.66667	a
S. B. H. 2	10.73333	a
S. B. H. 3	8.733333	b

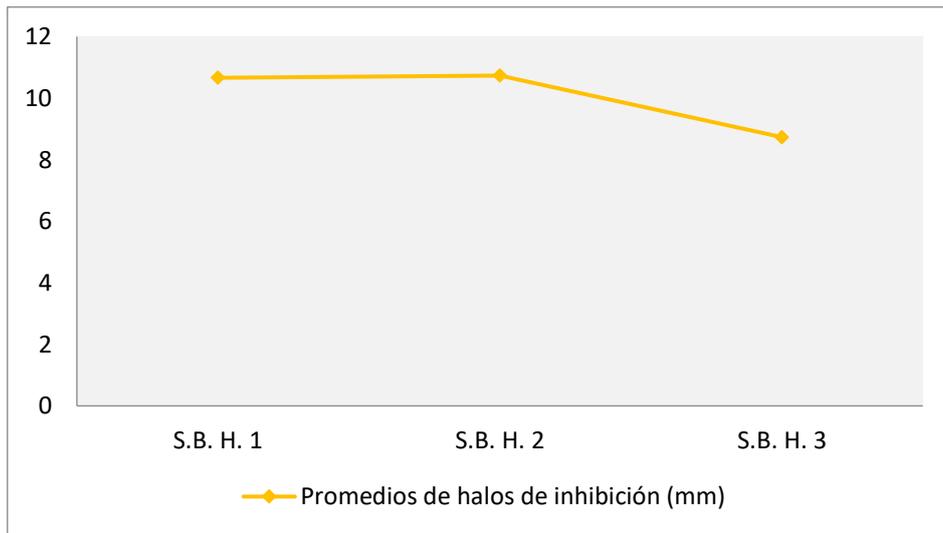


Figura 15: Promedio de halos de inhibición de las tres cepas de *Streptococcus beta hemolyticos*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se demostró que existe susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* beta hemolítico frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*, mientras que al enfrentar a *Escherichia coli* al extracto no presento inhibición.

La *Annona muricata* (Guanábana), ha sido referida como una planta medicinal la cual presenta en la corteza y frutos jóvenes taninos; que se usa para tratar diarreas y disenterías; también refiere que se utiliza como cicatrizante de úlceras o heridas en la piel y el zumo de las hojas regulariza el tránsito gastrointestinal y elimina helmintos del intestino, utilizada también como antidiarreico y antiparasitario intestinal. Esto debido a que se ha identificado que las hojas de *A. muricata* la presencia de flavonoides, a los cuales se les atribuyen actividades farmacológicas tales como: antidiabética, antibacteriana, antiinflamatoria y antioxidante. Los flavonoides son moléculas polifenólicas que pueden ser vistos como dos anillos de benceno unidos por una pequeña cadena de tres carbonos. Uno de estos átomos de carbono está siempre conectado a uno de los anillos de benceno; ya sea directamente o por puente de hidrógeno, formando así un tercer anillo en el centro, el cual puede tener cinco o seis miembros.

Por esta razón se cree que el efecto que existe de susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* beta hemolítico frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*, se deba a la acción de los flavonoides que se encuentra en sus hojas ya que posee la capacidad para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos, pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN y quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres lo que permitiría su acción antimicrobiana y antiinflamatoria; y además destacan desde el punto de vista farmacológico por su baja toxicidad. Por otro lado se puede decir que el grupo de

flavonoide como: Apigenina, kaenferol, morina, miricetina, naringenina, quercetina, quercitrina, serían los responsables del efecto antimicrobiano.

Estos resultados coinciden con los descritos por la investigación realizada por Abadie *et al.* (2014) y por Takahashi y col. (2006) quienes mencionan que no obtuvieron resultados del enfrentamiento del extracto etanólico de hoja de *Annona muricata* contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Esto se debería a que los compuestos que tiene acción antimicrobiana solo afectaría a las bacterias gram positivos (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus beta hemoliticos*) no a las bacterias gram negativos (*Escherichia coli*), uno de los motivos sería la presencia de la membrana externa en *Escherichia coli* que está formada por lipopolisacárido lo que no permitiría el paso de los metabolitos con acción antimicrobiana.

Por otro lado Solomon y Ugoh en el 2014 evaluaron las actividades antibacterianas y fitoquímicas del extracto foliar metanólico y acuoso de *Annona muricata* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumonia*. Donde tuvieron como resultados la inhibición de bacterias gram positivas como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* este resultado concuerda con lo realizado por la presente investigación pero no concuerda con los gramnegativo puesto que el más inhibido fue *Escherichia coli* que inhibió en casi todas las concentraciones del extracto metanólico. Este se debería al que presente trabajo de investigación se usó al etanol como disolvente para extraer los compuestos químicos de las hojas de la planta para su acción antibacteriana, mientras que Solomon y Ugoh usaron el metanol.

Asimismo, el presente trabajo de investigación concuerda por lo realizado por García *et al.* Realizado el año 2016 quienes utilizaron las hojas de *Annona muricata* previamente seco y molido empleando etanol al 75 % como disolvente y evaluó a dos concentraciones 500 y 250 mg/ml, sobre *Erysipelothrix rhusiopathiae* que es una bacteria gram positiva, determinando que es susceptible a la concentración del extracto de 500 mg/mL del extracto etanólico. esto comprobaría la susceptibilidad de las bacterias

gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus betas* y *Erysipelothrix rhusiopathiae*) sobre los compuestos fenólicos de las hojas de *Annona muricata* “guanabana”

Además de ello, se tiene conocimiento de la existencia de compuestos de comprobada actividad biológica en *Annona*, como las acetogeninas, las cuales son un grupo de sustancias conformadas por largas cadenas carbonadas C-32 o C-43 de ácidos grasos, que pueden estar combinados con una unidad 2-propanol en el C-2, y formar una lactona; las cuales presentan diferentes bioactividades, como antitumoral, inmunosupresiva, y antimicrobiana tal como lo menciona Kim GS, et. al. 1998, asimismo, Vander y Vlietinck demostró que fracción AM3-III inhibe selectivamente el crecimiento de algunos microorganismos Gram positivos tales como *Staphylococcus aureus*; sin embargo, no presenta el mismo efecto sobre bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*.

La acción no inhibitoria del extracto etanólico de *Annona muricata* “guanábana” frente a bacterias gram negativas se debería a que los flavonoides son absorbidos por las membranas celulares y protegen la acción de los radicales libres y tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles: es decir, se disuelven en lípidos o en agua. Por eso, en contraste con otros antioxidantes que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres. Por lo tanto, las bacterias gram negativas presentan en su estructura una membrana externa conformada por lipopolisacárido o de oligopolisacárido esto explicaría la no acción del extracto frente a este tipo de microorganismos

VI. CONCLUSIONES

- *Streptococcus* beta hemolítico fue la especie con mayor susceptibilidad, presenta halos de 14.6 mm a una concentración de 1000 mg/ml y 7.8 mm a una concentración de 125 mg/ml, *Staphylococcus aureus* presenta halos de inhibición de 5 mm y 12.3 mm a las concentraciones de 125 y 1000 mg/ml. y la especie más resistente fue cepas de *Escherichia coli* no presento halo de inhibición en ningunas de las concentraciones utilizadas en la presente investigación.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) que presentó el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* fue 500 mg/ml. En tanto para las cepas de *Streptococcus* beta hemolítico fue de 250mg/ml y para las cepas de *Escherichia coli* no se realizó la concentración mínima inhibitoria (CMI) pues no existió inhibición en placa, en ninguna de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* (guanábana).

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones del efecto inhibitorio del aceite esencial de *Annona muricata* (guanábana) sobre bacterias de importancia clínica.
- Determinar los principios activos de *Annona muricata* (guanábana) con actividad antibacteriana.
- Realizar investigaciones con las diferentes partes (raíz, flores, semillas, tallo) de *Annona muricata* frente a bacterias y parásitos de importancia clínica.
- Dar a conocer las propiedades medicinales de *Annona muricata* (guanábana) a la población para combatir diversas infecciones.
- Realizar investigaciones con otras plantas de interés medicinal con la finalidad de observar su efectividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Escherichia coli*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadie R, Medina O, Ruiz L, Alvaro T, Ayala O. 2014. “*Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias,*” Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (CIRNA-UNAP). Iquitos-Perú
- Alonso, J., 2004 “*Tratado de fitofármacos y nutracéuticos.*” Rosario - Argentina, Corpus, Pp. 641- 646, 927-930, 1037-1041.
- Avila, F., 2005 “Efecto del ácido giberelico y agua a 4° c en la germinación de las semillas de guanaba (*Annona muricata L.*)” Tesis para optar del título de ingeniero agrónomo. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
- Badrie N, y Schauss A. 2010. “*Soursop (Annona muricata L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology.*” En Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables. Watson RR, Preedy VR [Eds]. Elsevier Inc. Oxford, UK.
- Baraona, M., y otros., 1992 Guanábana Y Macadamia Fluricultura Especial., Fluricultura II., San José - Costa Rica., EUNED, Pp. 17-21
- Bello, J., 2005 “*Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos.*” Madrid- España., Ediciones Días de Santos., Pp. 304-308.
- Cervantes E, García R, Salazar P, 2014 “*Características generales de Sthaphylococcus aureus*” Rev Latinoam Patol Clin Med Lab

- Chicaiza, G., y otros., 2003 “Proyecto para la Producción y Exportación de la Guanábana en la Hacienda “María Dolores” del Cantón el Guabo. Provincia del Oro” Tesis para optar el título de Economista con Mención en Gestión Empresarial, especialización finanza. Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas (ICHE)., Guayaquil- Ecuador.
- Escamilla C., Cuevas E., Guevara J.2009. “*Flavonoides y sus acciones antioxidantes*”. Revista de la Facultad Medica. UNAM. México DF- México., Vol. 52. Pp 12-13.
- García Y, Manzur J, Mendoza J, Campos T, 2016. “*Efecto antibacteriano del extracto etanólico de hojas de annona muricata l. frente a erysipelothrix rhusiopathiae,*” Ciencia y Tecnol. Agrop. México Vol. 4 Núm. 1: 10-17.
- Gómez H, Germosen L, Nossin E. 2009. “Estudio etnofarmacológico de las plantas medicinales usadas en el Caribe colombiano. En Reyes G. Diálogo de saberes: plantas medicinales, salud y cosmovisiones.” Universidad Nacional de Colombia, Sede Amazonia. ARFO Editores e Impresos Ltda. Bogotá, Colombia
- Goode. & Hatt, 1976. Métodos de investigación social. México: Trillas.
- Hernández, 2011. “Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria”. Tesis para optar por Doctorado en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional San Antonio. Murcia, España
- Lim T (2012). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Springer
- Llatas S. 2000. “*Botánica fanerógamica.*” Lambayeque – Perú.

- Martinez A, Montes M, Alemañy J, Marrero Silva I, Reyna R, Cedeño R, 2017
 “Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima” Scielo Vol.15 N°2
- Olivera G. 2009 “Sensibilidad antimicrobiana in vitro del *Streptococcus pyogenes* a macrólidos y lincosaminas en muestras de secreción faríngea de pacientes con faringitis aguda, 2007-2008”. Tesis para optar el grado de bachiller en medicina, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.
- Pérez N; Cervantes L; Gutiérrez L; Del Toro S 2013. "Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta*Risso) y determinación de su actividad antioxidante”. Rev. Cub. Invest. Biomed. 3: 18-22.
- Rengifo E. 2007. “Experiencias en el manejo de plantas medicinales amazónicas”. Rev. Ramas floridas del bosque. 2(5):42-44
- Solomon G y Ugoh, S. 2014.*American Journal of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences* Vol. 2, No. 1, January
- Solís A, Amador C, Hernandez M, Duran C. 2010. “*Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de almendrade guanábana (Annona muricata, L)*”. Grasas y Aceites 61: 58 - 66.
- Paladino, S., Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (*Vitis vinifera* L.), Facultad de Ciencias Agrarias., Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis Sede Mendoza., MendozaArgentina., 2009., TESIS., Pp. 13- 17, 39-43
- Takahashi J; Pereira C; Pimenta L; Boaventura M; Silva G 2006. “*Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants.*” Nat Prod Res. Jan: 20(1):21-6.

Tejerina s. (2001) estudio de diferentes fracciones y extractos de *Allium sativum* sobre la reacción vascular, niveles de colesterol y cultivos celulares. Tesis doctoral, Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

ANEXOS

Anexo 1: Clasificación taxonómica de *Annona muricata* “guanábana”

Reino:	Vegetal
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Sub clase	Magnoliidae
Orden:	Magnoliales
Familia:	Annonaceae
Género:	Annona
Especie:	<i>A. muricata</i>



Fuente: Llatas S. 2000

Anexo 2: Halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus beta hemolíticos*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

Tabla 8: Halos de inhibición de las tres cepas de *Staphylococcus aureus*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

<i>Staphylococcus aureus</i>						
Cepas	Repeticiones	Concentraciones				
		1000	750	500	250	125
Cepa 1	R1	12	11	10	8	5
	R2	13	11	10	7	5
	R3	12	10	9	8	5
Cepa 2	R1	16	15	12	5	5
	R2	14	12	10	8	5
	R3	12	10	9	7	5
Cepa 3	R1	10	9	7	5	5
	R2	12	10	9	7	5
	R3	10	9	8	7	5
Promedios		12.33333	10.77778	9.333333	6.888889	5

El promedio de halo de inhibición 5mm corresponde al diámetro del disco.

Tabla 9: Halos de inhibición de las tres cepas de *Streptococcus* beta hemolíticos, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”.

<i>Streptococcus</i> beta hemolíticos						
Cepas	Repeticiones	Concentraciones				
		1000	750	500	250	125
Cepa 1	R1	15	13	12	11	8
	R2	16	15	14	12	10
	R3	16	14	12	10	7
Cepa 2	R1	16	15	14	12	10
	R2	16	14	12	11	9
	R3	15	14	12	10	5
Cepa 3	R1	13	12	11	10	9
	R2	12	11	10	9	8
	R3	13	11	10	9	5
Promedios		14.66667	13.22222	11.88889	10.44444	7.88889

El promedio de halo de inhibición 5mm corresponde al diámetro del disco.

Tabla 10: Halos de inhibición de las tres cepas de *Escherichia coli*, frente al extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* “guanábana”

<i>Escherichia coli</i>						
Cepas	Repeticiones	Concentraciones				
		1000	75	50	25	12.5
Cepa 1	R1	5	5	5	5	5
	R2	5	5	5	5	5
	R3	5	5	5	5	5
Cepa 2	R1	5	5	5	5	5
	R2	5	5	5	5	5
	R3	5	5	5	5	5
Cepa 3	R1	5	5	5	5	5
	R2	5	5	5	5	5
	R3	5	5	5	5	5
Promedios		5	5	5	5	5

El promedio de halo de inhibición 5mm corresponde al diámetro del disco.

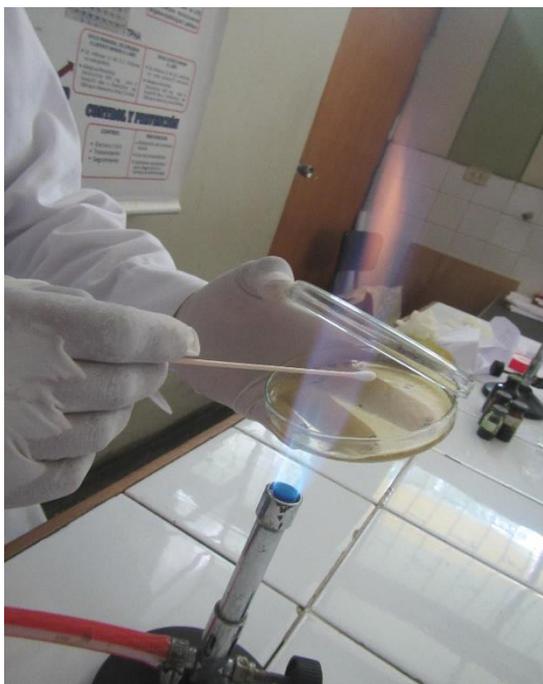
Anexo 3: Recoleccion de hojas de *Annona muricata* "Guanábana", en el Caserio Callanca (Villa Saúl) Lambayeque.



Anexo 4: Obtención del extracto seco de las hojas de *Annona muricata*.



Anexo 5: Prueba de susceptibilidad



Anexo 6: Constancia del herbario PRG.



**HERBARIO
PEDRO RUIZ GALLO
UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



CONSTANCIA

La que suscribe, hace constar que los ex alumnos **José Gabriel Ayasta Senmache y Cinthya Lizet Castro Hernández**, han hecho llegar al Herbario PRG, 01 ejemplar botánico, el que ha sido identificado como **Annona muricata** siendo depositado y registrado con el N° 17883.

Se expide la presente a solicitud de los interesados para los fines que crea conveniente.

Lambayeque, 19 de Abril del 2018


MSc. Josefa Escurra Puicón
Directora del Herbario PRG

