



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: AGROINDUSTRIAS

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

**MODALIDAD:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:
EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE
HOJAS DE ICACO EN BACTERIAS MESÓFILAS (*Salmonella*
spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).**

**AUTORA:
LIDIA MARÍA SABANDO LOOR**

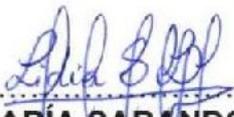
**TUTOR:
BLGO, JHONNY NAVARRETE ÁLAVA, MPA.**

CALCETA, JULIO 2020

DERECHOS DE AUTORÍA

LIDIA MARÍA SABANDO LOOR, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.


.....
LIDIA MARÍA SABANDO LOOR

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Jhonny Navarrete Álava certifica haber titulado el trabajo de titulación **EFFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ICACO EN BACTERIAS MESÓFILAS (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*)**, que ha sido desarrollada por Lidia María Sabando Loor, previa la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al Reglamento para la elaboración del trabajo de titulación de Grado de tercer nivel de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



.....
BLGO, JHONNY NAVARRETE ÁLAVA, MPA.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** el trabajo de titulación **EFFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ICACO EN BACTERIAS MESÓFILAS (*Salmonella spp, Escherichia coli, Staphylococcus aureus*)**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Lidia María Sabando Loor, previa la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López



ING. PABLO GAVILANES LÓPEZ, Mg.

MIEMBRO



ING. FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS, Mg.

MIEMBRO



ING. LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, Mg.

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ellos por ser los pilares en mi formación personal y profesional.

A mi abuelita y a mis hermanas y hermano que de una u otra manera me han apoyado, estando siempre presentes, acompañándome y brindándome todo su apoyo en esta etapa de mi vida.

A mi pareja sentimental, por haberme apoyado en cada momento durante el desarrollo de esta investigación.

A mi querido tutor el Blgo, Jhonny Navarrete Álava, por haberme impartido sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación, a mi querida Madrina Cruz Alexandra Pinargote Zambrano por su apoyo incondicional, así como también a todos los docentes y técnicos de los laboratorios del área de Agroindustria, Medicina Veterinaria y, todas las personas que me han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito, en especial aquellos que abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos.

LIDIA M. SABANDO LOOR

DEDICATORIA

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A Dios, a mis padres, a mí querida abuelita, a mis hermanas y hermano quienes son el pilar fundamental en mi vida, que con su motivación he podido cumplir mi meta.

A todos los docentes que han sido una guía en mi formación profesional porque gracias a ellos he enriquecido mis conocimientos.

LIDIA M. SABANDO LOOR

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO GENERAL.....	vii
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS	ix
RESUMEN	x
PALABRAS CLAVE.....	x
ABSTRACT.....	xi
KEYWORDS.....	xi
Icaco plum, extract, total phenols, antimicrobial	xi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. ETA	5
2.2. BACTERIAS PATÓGENAS	5
2.1.1. <i>Salmonella spp.</i>	6
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	6
2.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2. CONSERVANTES NATURALES.....	7
2.3. EXTRACTO.....	8
2.3.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	9
2.3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	9
2.3.3. FENOLES TOTALES.	10
2.4. TÉCNICA DE ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	10
2.4.1. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO (<i>KIRBY-BAUER</i>).....	10
2.5. ICACO	12

2.5.1.	DISTRIBUCIÓN	12
2.5.2.	HÁBITATS	12
2.5.3.	DESCRIPCIÓN	12
2.5.4.	COMPOSICIÓN QUÍMICA	13
2.5.5.	PROPIEDADES Y USOS MEDICINALES	13
2.5.6.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	13
2.6.	HOJAS DE ICACO	14
2.6.1.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	14
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO		16
3.1.	UBICACIÓN	16
3.2.	DURACIÓN	16
3.3.1.	MÉTODOS	16
3.3.2.	TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	17
3.3.3.	TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	17
3.3.4.	TÉCNICAS PARA LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	17
3.4.	FACTORES EN ESTUDIO	18
3.4.1.	TRATAMIENTOS	18
3.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	19
3.6.	UNIDAD EXPERIMENTAL	19
3.7.	VARIABLES A MEDIR	19
3.8.	MANEJO DEL EXPERIMENTO	20
3.8.1.	DIAGRAMA DE PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE C. ICACO 20	
3.8.2.	RENDIMIENTO DEL PRODUCTO	23
3.8.3.	PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO	24
3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		26
4.1.	FENOLES TOTALES	26
4.2.	RENDIMIENTO	26
4.3.	EVALUACIÓN DEL EXTRACTO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO	27
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		29
5.1.	CONCLUSIONES	29
5.2.	RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA		30

ANEXOS.....	34
-------------	----

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 3.1. FACTOR EN ESTUDIO	18
CUADRO 3.2 TRATAMIENTOS EN ESTUDIO	18
CUADRO 3.3. ESQUEMA DEL ADEVA	19
CUADRO 4.1. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	26
CUADRO 4.2. RESULTADO DE LOS HALOS FORMADOS POR LAS MUESTRAS DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE ICACO	27
CUADRO 4.3. ANÁLISIS DE VARIANZA (SUMA DE CUADRADOS TIPO III)	28
CUADRO 4.4. TEST DE TUKEY ALFA =0,05.....	28
FIGURA 3.1. DIAGRAMA DE PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE C. ICACO	20

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto de hojas de icaco frente a tres bacterias patógenas mesófilas (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). El extracto fue obtenido de las hojas de icaco mediante el método Soxhlet con el uso de etanol al 95-99%, posteriormente se cuantificó el contenido de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu. El rendimiento del extracto etanólico obtenido fue de 16,7%. El ensayo antimicrobiano se realizó mediante el método de difusión en discos de papel según Kirby-Bauer, teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo del extracto. La prueba de difusión en disco de papel mostró la sensibilidad frente a todas las bacterias evaluadas, presentando para *Escherichia coli* un halo mínimo de 10,67mm a 0,1µg/mL y un diámetro máximo de 20,67mm a 10µg/mL, mientras que para *Salmonella* se obtuvo un valor mínimo de 8,67mm a 0,1µg/mL y un máximo de 23,33mm a 10 µg/mL, por otro lado para *Staphylococcus aureus* se obtuvo como valor mínimo 8,67mm a 0,1µg/mL y un valor máximo 26,67mm a 10µg/mL de dilución. El extracto de hojas de icaco con una concentración de 10µg/mL presentó mejores propiedades antimicrobianas para bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Salmonella* y Gram positivas *Staphylococcus aureus*.

PALABRAS CLAVE

Icaco, extracto, fenoles totales, antimicrobiano.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the antimicrobial effect *in vitro* of icaco plum's leaf extract against three mesophilic pathogenic bacteria (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). The extract was obtained from the icaco plum's leaves using the Soxhlet method with the use of ethanol at 95-99%, subsequently the total of phenols content was quantified using the Folin-Ciocalteu method. The yield of the ethanolic extract obtained was 16.7%. The antimicrobial test was performed using the method of diffusion on paper discs according to Kirby-Bauer, taking as reference the measurement of the diameter of the inhibition zone of positive control and the measurement of the halo of the extract. The paper disc diffusion test showed sensitivity to all the bacteria evaluated, presenting for *Escherichia coli* a minimum halo of 10,67mm at 0,1µg/mL and a maximum diameter of 20,67mm at 10µg/mL, while for *Salmonella* a minimum value of 8,67mm at 0,1µg/mL and a maximum of 23,33mm at 10µg/mL, on the other hand for *Staphylococcus aureus* was obtained at least 8, 67mm at 0.1µg/mL and a maximum value of 26,67 mm at 10µg/mL of dilution. The icaco plum's leaves extract with a concentration of 10µg/mL had better antimicrobial properties for bacteria Gram-negative *Escherichia coli*, *Salmonella* and Gram-positive *Staphylococcus aureus*.

KEYWORDS

Icaco plum, extract, total phenols, antimicrobial.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad existe un gran potencial de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), las cuales son una preocupación global porque acarrear diversos problemas en la salud humana que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados. Algunos ejemplos de alimentos insalubres son los alimentos de origen animal no cocinado, las frutas y hortalizas contaminadas con heces (OMS, 2017).

El control de estos patógenos es importante para los organismos reguladores y la industria alimentaria (AMYS, 2017). Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas casi 1 de cada 10 habitantes por ingerir alimentos contaminados y que 420000 mueren por esta misma causa. La *Salmonella* y *Escherichia coli* figuran entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes que afectan a millones de personas, a veces con consecuencias graves o mortales (OMS, 2017). El *Staphylococcus aureus*, se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones ocasionadas por alimentos (Zendejas *et al.*, 2014).

En Ecuador, un estudio de la Secretaría de Salud reveló que el 47% de 4000 muestras de alimentos analizadas tenían algún grado de contaminación y no cumplía la norma de calidad de alimentos. Esta Secretaría es la encargada de controlar los riesgos de enfermedades transmitidas por comida preparada (Jácome, 2017).

Con respecto a diversos análisis realizados en muestras colectadas del río Portoviejo perteneciente a la provincia de Manabí, cuyos resultados presentan altos contenidos de coliformes fecales en la mayoría de los puntos, el agua en siete de los diez sitios de muestreo considerados tiene contenidos de coliformes fecales por encima de los 600 Números Más Probables/ 100mL (NMP/100mL),

siendo este el límite máximo permisible para coliformes fecales en aguas de consumo humano y uso doméstico (Vargas, 2014).

Así mismo Hidalgo (2018), en una investigación desarrollada en noviembre del 2017 en la ciudad de Manta, destacó 5 zonas como los más críticas de descargas de aguas servidas e industriales, las cuales terminan en la playa, análisis que arroja resultados preocupantes de contaminación que sobrepasan los parámetros permitidos, especialmente por la alta presencia de bacterias coliformes porque al “Río Muerto” también se descargan aguas sanitarias provenientes de las viviendas asentadas a lo largo del recorrido de la quebrada, a lo que se suman los volúmenes de aguas industriales.

Se reporta que existe poca investigación científica sobre las hojas de esta planta y debido a la ausencia de información en nuestro país y viendo el interés que tiene su uso en otros países, surge la intención de realizar una investigación para compilar información detallada sobre el efecto que causa el extracto de las hojas de *C. icaco* sobre la inhibición de los microorganismos en cualquier producto de consumo:

¿El extracto de la hoja de icaco (*Chrysobalanus icaco*) tendrá efecto antimicrobiano sobre cepas de *Salmonella spp*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Con esta investigación se pretende demostrar que el extracto de las hojas de *C. icaco* tiene un efecto antimicrobiano del crecimiento de microorganismos patógenos, para de esta manera proponer la introducción del extracto en el tratamiento de estas bacterias en futuros usos agroindustriales y así evitar las ETA que estos provocan en el ser humano, ya que los extractos vegetales gozan de una serie de propiedades que pueden ser aprovechadas.

Debido a la incidencia de estos patógenos, la conciencia de los consumidores como las normas de los mercados han abierto un espacio progresivo para la aplicación del conocimiento científico con el fin de solucionar problemas

limitantes para la humanidad. Satisfacer todas las necesidades involucra un gran reto en el desarrollo de productos naturales con alta eficacia y sin efectos nocivos para el medio ambiente y el ser humano.

Castilho y Kaplan (2011), citado por Villagra (2018), indican que fue evaluada la actividad antibacteriana en las hojas de *C. icaco*, presentando actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Cabe señalar que mediante otro análisis evaluado por el método de difusión en pozo y dilución en caldo, mostraron actividad contra cepas Gram positiva y Gram negativa, todas las cepas fueron sensibles a todas las muestras de icaco. La mayor sensibilidad se presentó frente a *Staphylococcus* spp, seguido de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp.

Tomando en cuenta que el Ecuador presenta una rica biodiversidad de especies vegetales, se da la necesidad de poner en claro alternativas de control y uso. Puesto que existe una gran variedad de plantas, de las cuales no han sido estudiadas y se desconoce sus propiedades, uso medicinal y composición química, así como su actividad microbiológica, situación por la cual es necesario realizar este tipo de investigaciones que aporten con conocimientos científicos, así como demostrar lo importante que es conocer cada una de estas y la relevancia que tienen en el cuidado de la salud.

En cuanto a un estudio sobre la caracterización de los metabolitos presentes en los extractos de las hojas de *C. icaco* y considerando la diversidad estructural de los productos naturales bioactivos de la familia *Chrysobalanaceae*, se ha podido identificar mediante la prueba de tamizaje fitoquímico compuestos como flavonoides, glucósidos cardiotónicos, triterpenos y esteroides. La infusión de icaco preparada con las hojas secas puede ser aprovechada por su contenido de polifenoles, sensibilidad bacteriana y por su particular características organolépticas; por lo que se motiva la propagación de esta planta (Villagra, 2018).

Por otra parte, las plantas tienen una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos le sirven como mecanismos de

defensa contra microorganismos. Atendiendo a ello el hombre, ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre (Castillo *et al.*, 2014).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto de hojas de icaco en bacterias mesófilas *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los compuestos fenólicos del extracto de hojas de icaco para la aplicación de las dosis *in vitro*.
- Establecer el rendimiento del extracto de hojas de icaco mediante el método de Soxhlet.
- Diseñar el experimento *in vitro* que permita la evaluación del extracto de hojas de icaco como un agente antimicrobiano.

1.4. HIPÓTESIS

Al menos uno de los porcentajes de extractos de las hojas de *C. icaco* tiene mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas de *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. ETA

Actualmente existen aproximadamente alrededor de 250 Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA), conocidas también como, infecciones transmitidas por los alimentos y las intoxicaciones alimentarias, son muy comunes, pero prevenibles, generalmente se caracterizan por ser de carácter infeccioso o tóxico, pueden variar desde leves hasta graves problemas y riesgos de salud (Reyes, 2017). Las ETA constituyen uno de los principales y más importantes problemas de salud pública a nivel mundial, ya que ocasionan alta morbilidad y mortalidad. Afectan principalmente a la población pobre, niños, mujeres embarazadas y ancianos, generando pérdidas económicas y grandes costos a los servicios de salud, ocasionando cerca del 70% de las diarreas (Forero *et al.*, 2017).

Según la Organización Mundial de la salud (OMS) estas son causadas principalmente por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados. Estos patógenos pueden ocasionar diarrea grave o infecciones debilitantes, como la meningitis. Los alimentos insalubres son comúnmente los de origen animal no cocinados, las frutas y hortalizas contaminadas con heces y los mariscos crudos que contienen biotoxinas marinas (OMS, 2017).

2.2. BACTERIAS PATÓGENAS

Según la Organización Panorámica de la Salud (OPS) las bacterias, generalmente, son las causantes de ETA. La multiplicación bacteriana es llamada crecimiento bacteriano, y potencialmente causa problemas de especial interés, en la inocuidad de los productos alimenticios (OPS, 2015). Por otro lado, la Administración de Alimentos y Medicamentos por sus siglas en inglés (FDA) establece que los patógenos transmitidos por los alimentos pueden afectar seriamente a cualquier persona, dentro de los principales se encuentran la *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (FDA, 2018).

2.1.1. *Salmonella spp*

Según el Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCH), el género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias Gram negativas no esporuladas, anaerobias facultativas, mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 35 - 37°C y un rango de 5 - 46°C. Desde el punto de vista epidemiológico se encuentran las que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales (ISPCH, 2016).

A este grupo pertenecen la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis. Las serovariedades zoonóticas se describen como *Salmonella no Typhi*, las que están ampliamente distribuidas en el reino animal, siendo las aves y sus derivados las fuentes más comunes de infección, generalmente se presenta como brotes de ETA (ISPCH, 2016).

El género *Salmonella* tiene gran impacto en salud pública; datos epidemiológicos indican que la gastroenteritis y la fiebre tifoidea son de distribución mundial, y ocurren en países desarrollados y subdesarrollados. Los alimentos en los que se ha detectado principalmente este patógeno son la carne de pollo, carne de cerdo, carne de pavo, productos con carne cruda, huevos y jamón de cerdo (Soto *et al.*, 2016).

2.1.2. *Escherichia coli*

La *E. coli* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por flagelos peritricos, cuyo hábitat es el intestino de animales de sangre caliente. Esta bacteria es utilizada como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales Soto *et al.* (2016). De acuerdo a Lucas *et al.* (2016) algunas cepas de *E. coli* han adquirido factores de virulencia que las hacen patógenas, denominándose cepas diarrogénicas o patogénicas.

2.1.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertenece a la familia *Staphylococcaceae*. Es una bacteria anaerobia facultativa, no esporuladas, Gram positivo, aunque las cepas viejas o los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativo. Tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección Silvia (2012), citado por Vera (2018).

La transmisión de esta bacteria o sus toxinas se produce principalmente por la ingesta de alimentos contaminados. En el ámbito laboral, la transmisión se produce por contacto con personas, animales (zoonosis) o elementos contaminados, ocurriendo principalmente por la contaminación de heridas y mucosas, por la inoculación accidental a través de pinchazos o cortes con objetos contaminados y por mordeduras de animales. Esta bacteria es responsable de muchos casos de enfermedad nosocomial (INSHT, 2012).

2.2. CONSERVANTES NATURALES

El reemplazo de los conservantes tradicionales de naturaleza química, por conservantes naturales se da en respuesta a la demanda por parte del consumidor que busca productos con compuestos menos tóxicos para el ser humano y etiquetas limpias, es decir, productos con el menor número de aditivos e ingredientes. Las estadísticas reportan un 73% de crecimiento del consumo de productos que declaran en su etiqueta 100% natural (Anzueto, 2015).

De acuerdo con Morales (2015), se han utilizado diferentes métodos para evitar la proliferación de microorganismos, evitando de esta manera el crecimiento de agentes patógenos, con el fin de proveer inocuidad a los alimentos. Dentro de los métodos de control más utilizados se encuentra la tendencia que, aunque no es nueva es de gran aceptación actual hacia el uso de conservantes naturales. Las sustancias de esencias naturales, se han utilizado desde épocas antiguas, como sustancias aromáticas y como conservantes. Las plantas tienen la

capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxigenados.

Por acción de estos agentes conservantes puede ocurrir que los microorganismos se dañen de manera reversible, lo que da lugar al llamado efecto bacteriostático, en el que los microorganismos quedan con vida y no pueden volver a reproducirse, a no ser que vuelvan a tener un nuevo ambiente idóneo para tal fin. También puede ocurrir que sean dañados de forma irreversible. Es el denominado efecto bactericida; en este caso sí que se produce la destrucción definitiva de estos microorganismos. Estas acciones dependerán de la naturaleza química y de la dosis empleada (Lemmel, 2008).

Se estima que del 1 al 10% de las cerca de 500000 especie de plantas que existen en el mundo, tienen uso como alimento o medicinal. Existen diversos productos de origen botánico que poseen una actividad antimicrobiana como el ajo, orégano, mostaza, canela, albahaca, tomillo, pimienta, mejorana, chile, achiote, cebolla, cilantro, té, limón y naranja (Anzueto, 2015). Por otra parte, Arellano & Montesdeoca (2016), indican que entre los conservantes naturales más comunes y empleados en casi todas las formulaciones se encuentran la sal y el vinagre (ácido acético), aceites esenciales, ácidos como el jugo de limón y antioxidantes naturales como la vitamina C y el tocoferol.

2.3. EXTRACTO

La RAE (2018) define al extracto como un producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales, estos pueden ser acuoso, alcohólico o etéreo. Por otra parte, Ortuño (2006) citado por Vélez *et al.* (2018) define al extracto como una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos y/o químicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología; en general, los extractos son soluciones diluidas de metabolitos secundarios.

2.3.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

La técnica de extracción es una de las más usadas para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo desde sus fuentes naturales. Se define también como la separación de las porciones activas a partir de los tejidos de las plantas, de los componentes inertes de los mismos, de una mezcla en medio de un disolvente, mediante el uso de solventes selectivos denominados “menstruos” (Villagra, 2018).

2.3.1.1. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

Esta técnica se basa en la separación de los principios activos del material vegetal al estar en contacto con un solvente o la mezcla de ellos, el cual es capaz de solubilizar dichos principios Pérez (2009), citado por Amaguachi & Churuchumbi (2018).

Las técnicas extracción pueden ser mediante 2 tipos:

- Extracción líquido-líquido.
- Extracción sólido-líquido.

2.3.1.2. EXTRACCIÓN CONTINUA O PROGRESIVA

En este tipo de extracción, el solvente se va renovando o recirculando y actúa sobre el material vegetal en una sola dirección. El Soxhlet es una de las técnicas que corresponde a este grupo, la cual se detalla a continuación:

- a) Soxhlet: Esta técnica consiste en la extracción sólido-líquido mediante un equipo que tiene como función recircular los vapores condensados arrastrando consigo los principios activos de la materia prima Caldas (2012), citado por Amaguachi & Churuchumbi (2018).

2.3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Con respecto a los compuestos fenólicos Parveen *et al.* (2013), citado por Montesdeoca *et al.* (2017) indican que estos tienen una amplia distribución en el reino vegetal y pueden encontrarse en cualquier parte de las plantas (hojas, flores, tallos, raíces). Además, estos constituyen una de las principales clases de

metabolitos secundarios de los vegetales, los cuales efectúan diversas funciones fisiológicas. Son compuestos que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta (García *et al.*, 2015)

A estos compuestos pueden otorgarle la actividad antibacteriana, debido a que, los flavonoides por tener en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos (Soto *et al.*, 2015).

2.3.3. FENOLES TOTALES.

La expresión Polifenoles totales se refiere a la cuantificación analítica del contenido de todos los compuestos Poli-fenólicos presentes en una muestra. Los principales grupos son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. La determinación del contenido de fenoles totales es muy importante debido a que ayuda a estimar la actividad antioxidante en función de los compuestos polifenólicos en productos naturales, para lo cual se usa el reactivo Folin-Ciocalteu. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm (nanómetro) y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método simple, preciso y sensible pero que sufre de numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de la muestra, concentraciones de reactivos, tiempos y temperaturas de incubación (Aillón, 2014).

2.4. TÉCNICA DE ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

2.4.1. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)

Esta prueba permite cuantificar el grado de inhibición para el crecimiento de los microorganismos y posiblemente cambios en su morfología de una manera

simple. En cajas de Petri se inocula la especie a evaluar; existen dos métodos posibles para la incorporación del Aceite Esencial (AE) que son: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio del agar. Se preparan en cajas de Petri, soluciones del AE en diferentes concentraciones y los discos de papel son sometidos a inmersión. La eficacia del AE se demuestra por el tamaño de la zona de inhibición alrededor del disco y se expresa como el diámetro de esta zona en milímetros o centímetros (Morales, 2015).

La prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer), se basa en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene el antimicrobiano se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco de inhibición del crecimiento (Morales, 2015).

De acuerdo a Malbrán (2012), existen varias categorías para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, la misma que es basada en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un antibiótico.

- 1) Categoría de interpretación SENSIBLE: Implica que una infección dada por la cepa en estudio se puede tratar apropiadamente con la dosis del antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiese contraindicaciones. El punto de corte de sensibilidad es $\leq 4\mu\text{g/mL}$ y $\geq 20\text{mm}$ de diámetro de los halos de inhibición.
- 2) Categoría de interpretación INTERMEDIO: Incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibióticos más elevadas, siempre que se pueda aumentar la dosis o que la droga concentre fisiológicamente en el tejido infectado. El punto de corte intermedio es de $8\text{-}16\mu\text{g/mL}$ y de $15\text{-}19\text{mm}$ de diámetro de los halos de inhibición.
- 3) Categoría de interpretación RESISTENTE: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana y la eficacia clínica no ha sido

comprobada. El punto de corte de resistencia es $\geq 32\mu\text{g/mL}$ y $\leq 14\text{mm}$ de diámetro de los halos de inhibición (Malbrán, 2012).

2.5. ICACO

El arbusto de icaco cuyo nombre científico es (*Chrysobalanus icaco L.*), pertenece a la familia de *Chrysobalanaceae* (Martínez *et al.*, 2016). En las costas del sureste mexicano se lo conoce comúnmente con los nombres de hicaco o caco, ciruela de paloma y pepe. En otras regiones del mundo se le ha denominado zicaque, icacillo, caramio, y en idiomas como el inglés es reconocido como coco-plum y en francés como prunier de icaco (Jiménez *et al.*, 2011).

2.5.1. DISTRIBUCIÓN

Es oriundo de América y África tropicales, actualmente está naturalizado en regiones similares de todo el mundo. Crece en forma espontánea desde el sur de los Estados Unidos hasta Brasil, Ecuador, y Venezuela, incluyendo las Antillas (Martínez *et al.* (2016). Esta planta es cultivada principalmente con fines de ornato, al que se le suman sus propiedades medicinales astringentes y como inhibidor del virus de HIV-1 (Jiménez *et al.*, 2011).

2.5.2. HÁBITATS

Esta especie se encuentra comúnmente en zonas pantanosas costeras y humedales. Además, suele ser abundante en suelos rocosos y/o secos donde generalmente otro tipo de plantas están sujetas a estrés hídrico, se desarrolla bien en suelos arenosos y salinos, pero usualmente el subsuelo donde llega a desarrollarse es de drenaje pobre (Villagra, 2018).

2.5.3. DESCRIPCIÓN

El arbusto mide 1 a 6m de altura y suele alcanzar hasta los 10m. Posee hojas verdes ovaladas, casi redondas, de textura un poco de cuero (de 3 a 10cm de largo y de 2,5 a 7cm de ancho). Las hojas varían en color de verde a rojo suave. La corteza es grisácea o marrón rojizo, con pintas blancas. Las flores son

pequeñas, blancas, en racimos, aparecen a finales de la primavera. Fruto en racimos, tipo drupa, redondo y de color amarillo pálido con rubor rosado o púrpura oscuro. Su sabor es muy suave, por lo que se acostumbra usarlo para almíbar (Patiño, 2017).

2.5.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las variaciones en la coloración de la cáscara del fruto de icaco han sido estudiadas, para determinar una posible relación con los compuestos presentes en ella. De los primeros estudios llevados a cabo sobre las hojas de este árbol se aislaron flavonoides, como la miricetina; otros estudios arrojaron la presencia de diterpenos y triterpenos (Patiño, 2017).

2.5.5. PROPIEDADES Y USOS MEDICINALES

Según Patiño (2017), el icaco tiene dos usos principales, el primero es tratar la disentería y prevenir la diarrea; y el segundo, para controlar la glicemia en personas diabéticas. De igual manera, Villagra (2018) indica que en El Salvador, Trinidad y Brasil la infusión y decocción de frutos, hojas, raíz de *C. icaco*, es usado para tratar hemorragias, y leucorrea. Las raíces, cáscaras, hojas y flores son astringente, probablemente debido a la presencia de taninos, siendo utilizada popularmente contra dolencias infecciosas. Además, las hojas son indicadas en la medicina popular como anestésica, antiinflamatoria e hipoglucemiante.

2.5.6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Villagra (2018) clasifica taxonómicamente al icaco (*Chrysobalanus icaco* L.) de la siguiente manera:

División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Chrysobalanaceae</i>
Género	<i>Chrysobalanus</i>

Especie **Chrysobalanus icaco L.**

2.6. HOJAS DE ICACO

De acuerdo con Santizo (2013) se caracterizan por ser simples, redondeadas, coriáceas de 3 - 10cm de largo, enteras, de color verde fuerte. Villagra (2018) indican que son coriáceas con pecíolos muy cortos, elípticas y de 3 a 8cm de largo, el ápice redondeado a obtuso, anchamente cuneado en la base, de color verde oscuro lustroso en el haz y opaco en el envés, el cual es glabro o casi glabro. Por otro lado; Galán (2018) indica que, estas son simples y alternas, de tonalidad verdes de oscuras a verdes amarillentas; el haz es liso y brillante y el envés opaco. La nerviación es reticulada, adicional a ello las hojas poseen puntos de color negro y tienden a ser quebradizas.

2.6.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Respecto a resultados obtenidos en una investigación realizada por Villagra (2018) se demuestra que las hojas de *C. icaco*, presentan actividad antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Todas las cepas bacterianas evaluadas, fueron sensibles a todas las muestras de icaco. La mayor sensibilidad se presentó frente a *Staphylococcus spp*, seguido de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp*.

Cabe destacar que en dicha investigación la infusión de las hojas secas presentó mayor actividad contra *Staphylococcus spp* a concentraciones de 160mg/mL, al bajar la concentración de la muestra de icaco, la actividad disminuyó contra esta cepa. De igual manera los halos de inhibición disminuyeron frente a cepas Gram negativa al disminuir la concentración. Considerando los halos de inhibición posterior al diámetro del pozo, se puede decir que las muestras de icaco presentan un amplio espectro de actividad antibacteriana (Villagra, 2018).

Según Villagra (2018) indica que se conoce que muchos flavonoides son sintetizados por las plantas en respuesta al ataque microbiano, por lo tanto, se han reportado que los extractos de diferentes especies de plantas ricas en flavonoides poseen actividad antibacteriana *in vitro*. Además, se recalca que la

actividad se debe posiblemente a que en la muestra se reporta compuestos polifenólicos, entre ellos los flavonoides como la Miricetina, la Quercetina conocidos como poseedores de propiedades antibacteriana. Además, se ha reportado que el 7- O- metilkaempferol, un flavonol que fue aislado de las hojas de icaco, presenta actividad antibacteriana *in vitro* contra cepas de *S. aureus* y *S. pyogenes* a concentración de 60µg/ml.

El extracto acuoso preparado a partir de hojas de *C. icaco* muestra acción antioxidante. A su vez, un derivado de flavonoides aislado de las hojas demostró actividad antibacteriana *in vitro*. Los primeros resultados obtenidos de la realización de las pruebas de identificación química, a través del uso de reacciones con cambios de color, precipitados o formación de espuma (Tamizaje fitoquímico) muestran diferencias significativas en la química de las diferentes partes de la planta analizadas, siendo las hojas del Icaco una de las más enriquecidas (CIPNABIOT, 2017).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La investigación se desarrolló en la ciudad de Calceta, en el laboratorio de Bromatología de la carrera de Agroindustrias y en el de Microbiología de la carrera de Medicina Veterinaria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, situada en el sitio el Limón, cantón Bolívar, provincia de Manabí, en las siguientes coordenadas: 0°50'S 80°10'O, se encuentra a 22 m. s. n. m. (Google Earth, 2019).

3.2. DURACIÓN

El desarrollo de la presente investigación tuvo una duración de 9 meses, considerando los plazos en los cuales se realizaron las actividades.

3.3. MÉTODOS, TÉCNICAS

3.3.1. MÉTODOS

MÉTODO EXPERIMENTAL. Integrado por un conjunto de actividades metódicas que se realizan para recabar la información y datos necesarios sobre el tema a investigar y el problema a resolver. Consiste en la manipulación de las variables no comprobadas (Marcano, 2018).

MÉTODO ANALÍTICO. A partir del conocimiento general de una realidad realiza la distinción, conocimiento y clasificación de los distintos elementos esenciales que forman parte de ella y de las interrelaciones que sostienen entre sí. Se fundamenta en la premisa de que a partir del todo absoluto se puede conocer y explicar las características de cada una de sus partes y de las relaciones entre ellas (Abreu, 2014). Este método se aplicó a partir de los resultados de análisis microbiológicos.

MÉTODO DESCRIPTIVO. En este método se realiza una exposición narrativa, numérica y/o gráfica, bien detallada y exhaustiva de la realidad que se estudia. Además, busca un conocimiento inicial de la realidad que se produce de la observación directa del investigador y del conocimiento que se obtiene mediante

la lectura o estudio de las informaciones aportadas por otros autores (Abreu, 2014).

3.3.2. TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

El presente estudio se centró en la extracción sólido-líquido (hojas-solvente) mediante el uso del equipo Soxhlet. Este tipo de extracción es conocida como continua o progresiva, debido a que el solvente (etanol) se va renovando o recirculando y actúa sobre la planta en una sola dirección.

3.3.3. TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos totales en el extracto de hojas secas de icaco se determinaron de acuerdo al método Folin-Ciocalteu propuesto por Mahmood *et al.* (2011), el cual se basa en la reacción de los compuestos fenólicos del extracto vegetal con el reactivo Folin-Ciocalteu, mediante un mecanismo redox; que oxida los polifenoles a fenolatos presentes en la muestra con la aparición de una coloración azulada. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Jenway 6320D (Germany) a una longitud de onda de 760nm, empleando una curva de calibración utilizando ácido gálico (2g de Ac. Gálico/100mL H₂O d.), como solución estándar. El análisis se realizó por triplicado y se midió la absorbancia de la muestra y los resultados se expresaron en mg de GAE (equivalente de ácido gálico), por 100g de la muestra (Anexo 3-A).

3.3.4. TÉCNICAS PARA LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

3.3.4.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)

Se realizó la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares Mueller Hinton para las bacterias: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, cada una de ellas por separado; cepas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL. Se impregnaron 0,2mL de las diferentes concentraciones de los extractos, en cada uno de los discos de

papel filtro por triplicado y se colocan sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Estas se incubaron invertidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 8 h, posteriormente se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos; esto se lo efectuó basándose en el estudio de Sánchez *et al.* (2016), con diversas modificaciones.

3.4. FACTORES EN ESTUDIO

Cuadro 3.1. Factores en estudio.

FACTORES	NIVELES
A. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE ICACO	Ex1= Agar Mueller Hinton con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de <i>C. icaco</i> .
	Ex2= Agar Mueller Hinton con 1 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de <i>C. icaco</i> .
	Ex3= Agar Mueller Hinton con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de <i>C. icaco</i> .
B. BACTERIAS	S1= <i>Salmonella spp.</i>
	E2= <i>Escherichia coli</i> .
	St3= <i>Staphylococcus aureus</i> .

3.4.1. TRATAMIENTOS.

Cuadro 3.2. Tratamientos en estudio

Tratamientos	Códigos	Descripción	
		Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Bacterias
T ₁	Ex ₁ S ₁	10	<i>Salmonella spp</i>
T ₂	Ex ₂ S ₁	1	<i>Salmonella spp</i>
T ₃	Ex ₃ S ₁	0,1	<i>Salmonella spp</i>
T ₄	Ex ₁ E ₂	10	<i>Escherichia coli</i>
T ₅	Ex ₂ E ₂	1	<i>Escherichia coli</i>
T ₆	Ex ₃ E ₂	0,1	<i>Escherichia coli</i>
T ₇	Ex ₁ St ₃	10	<i>Staphylococcus aureus</i>
T ₈	Ex ₂ St ₃	1	<i>Staphylococcus aureus</i>
T ₉	Ex ₃ St ₃	0,1	<i>Staphylococcus aureus</i>

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se desarrolló mediante un diseño completamente Aleatorizado (DCA), con tres réplicas por cada tratamiento. Con arreglo factorial A x B, el cual se ajustó al siguiente modelo matemático, detallado en la fórmula 3.1. Para el procesamiento de los resultados se empleó el paquete estadístico InfoStat/L Versión 2019.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + u_{ijk} \quad [3.1]$$

Donde:

μ = parámetro de escala común a todos los tratamientos

α_i = es un parámetro que mide el efecto del tratamiento i

β_j = es un parámetro que mide el efecto del tratamiento j

$\alpha\beta_{ij}$ = Interacción de los niveles ij.

u_{ijk} = Componente aleatorio.

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental la constituyó la caja Petri con 15mL del medio Agar Mueller Hinton y las cepas correspondientes de acuerdo al tratamiento.

Cuadro 3.3. Esquema del ADEVA

ADEVA	
FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Total	26
Factor A	2
Facto B	2
A*B	4
Error	18

3.7. VARIABLES A MEDIR

Halo de inhibición microbiana (mm) del extracto de hojas de icaco.

3.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para el cumplimiento de los objetivos de esta investigación se desarrollaron los siguientes procedimientos:

3.8.1. DIAGRAMA DE PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *C. ICACO*

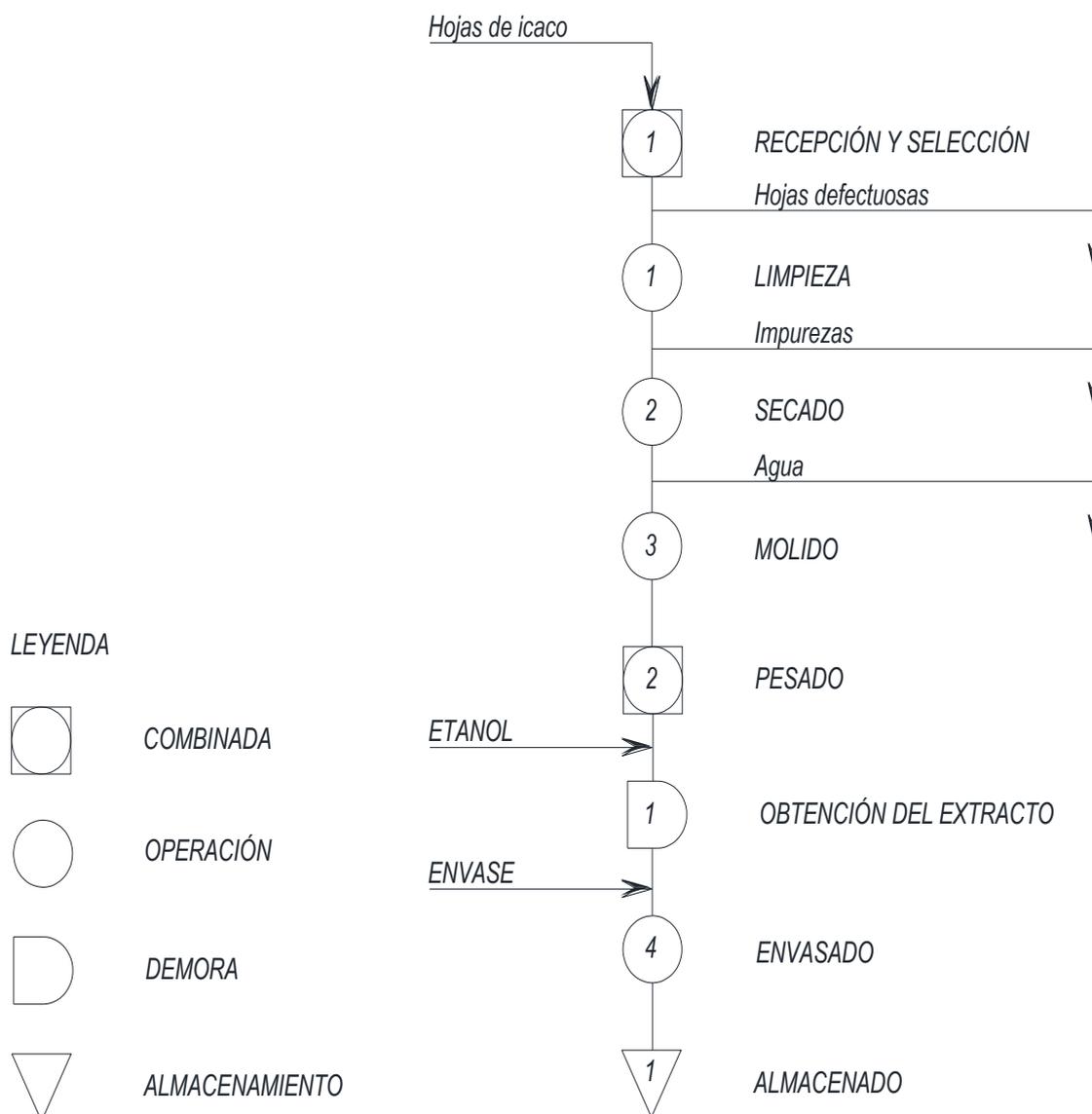


Figura 3.1. Diagrama de proceso para la obtención del extracto de hojas de *C. icaco*.

3.8.1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE C. ICACO

Recolección de materia prima: Para la realización de este trabajo se realizó la recolección de las hojas de icaco en el mes de abril de 2019, que sirvieron de materia prima para la extracción Soxhlet, para esto se cosecharon las hojas directamente del árbol, que se encuentra ubicado en el Barrio “Miraflores” de la ciudad de Calceta del cantón Bolívar perteneciente a la provincia de Manabí, cuya ubicación geográfica se encuentra en:

Altura: 24m

Latitud: -0. 853836m.

Selección: Una vez realizada la recolección de la materia prima se debe tomar en cuenta que estas se encuentren en un estado idóneo, es decir que no presenten daños por plagas y posean un color verde oscuro brillante, caso contrario estas deberán ser desechadas (Anexo 1-A).

Limpieza: Las hojas de icaco recolectadas se limpiaron y lavaron con agua destilada, eliminando cualquier material extraño que estas contengan, es decir que estén libre de impurezas.

Secado: Las hojas de icaco recolectadas se colocaron en forma ordenada sobre una superficie firme y recubierta de papel absorbente para de esta manera eliminar el agua que contienen las hojas. La materia prima se colocó en un lugar seco, libre de humedad y sin exposición directa a los rayos solares. Posteriormente se lo llevó a la estufa marca MEMMERT UNB-400 a una temperatura de 75°C durante 7 horas (Anexo 1-B).

Molido: Se disminuyó el tamaño de partícula de la muestra hasta obtener un polvo fino, para lo cual se utilizó un molino manual cuerpo de hierro fundido marca CORONA, teniendo en cuenta la ley de Fick que dice que mientras mayor es el grado de división de la muestra, mayor será la superficie entre las fases de extracción y por tanto mayor será la difusión a través de la membrana porosa; es decir para que durante la destilación el vapor entre en íntimo contacto con el

tejido de la planta, para ello en primer lugar se eliminó las nervaduras de las hojas secas.

Pesado: Una vez pulverizadas las hojas se pesaron aproximadamente 130g en una balanza analítica marca Sartorius modelo CP2245 de los cuales se tomaron 20g y se colocaron en un cartucho de celulosa el cual se selló con grapas (Anexo 1-C).

Obtención del extracto: Para obtener los extractos se empleó el equipo Soxhlet marca GERMANY, el cual consta de una plancha de calentamiento marca CORNING PC-620 D, matraz redondo ILBAMOR TGI de 250mL de fondo aplanado con cuerpos de ebullición, un refrigerante, un cuerpo extractor, mangueras y un cartucho poroso de celulosa que permite al solvente entrar y salir reteniendo el material vegetal.

Previo a la instalación el equipo se lavó con abundante agua y detergente marca DEJA para eliminar posibles contaminantes, después de haber dejado escurrir cada parte del equipo se procedió a armarlo, para lo cual primero se colocó el cartucho de celulosa con los 20g de muestra en el cuerpo extractor, se adosó el matraz a dicho recipiente donde se agregó 150mL del solvente etanol al 95-99%, luego se procedió a colocar las mangueras (una para la entrada del agua y la otra para su evacuación) en el refrigerante y este se colocó encima del cuerpo extractor, el cual se sujetó con la ayuda de unas pinzas a un soporte universal.

Una vez que se instaló el equipo, se encendió la plancha de calentamiento a una temperatura de 150°C y se abrió la llave para dar paso al agua. Cuando el solvente empieza a calentarse, los vapores ascienden y se condensan en el refrigerante, que luego caen en el cuerpo extractor impregnando al material vegetal que se encuentra en el cartucho, arrastrando consigo los principios activos. El cuerpo extractor se va llenando lentamente de líquido hasta que llega al tope del sifón y se descarga dentro del matraz a lo que se conoce como sifonada, este procedimiento se repite automáticamente hasta que la extracción se complete (Anexo 1-D).

Finalmente se apagó la plancha de calentamiento, se esperó a que el equipo enfríe, se desarmó y con la ayuda de una pinza se sacó el cartucho del cuerpo extractor; luego se procede armar nuevamente el equipo a la misma temperatura para evaporar el solvente, obteniendo así el extracto deseado.

Envasado: Una vez obtenido el extracto, se procedió a realizar el envasado en un tubo de ensayo recubierto con papel aluminio para que la luz no afecte a las características del extracto.

Almacenamiento: El extracto etanólico obtenido se almacenó y se refrigeró a 4°C en una refrigeradora marca KELVINATOR hasta su posterior evaluación.

3.8.2. RENDIMIENTO DEL PRODUCTO

El rendimiento del producto se determinó utilizando el método gravimétrico-volumétrico; mediante la fórmula 3.2 Castro (2008), citado por Rivera (2016).

$$\%RE = \frac{P.E (g)}{Pm (g)} \times 100 \text{ [3.2]}$$

En donde:

RE = Rendimiento del producto (%)

P.E = Peso del extracto obtenido (g)

Pm = Peso de la muestra a extraer (g)

Para realizar este cálculo se consideró que a partir de 20g de muestra vegetal seca y pulverizada, 150mL del solvente etanol al 95-99%, se obtuvieron aproximadamente 3,34g de extracto, con estos datos tenemos que el rendimiento en la extracción es:

$$\%Rendimiento = \frac{\textit{peso del extracto obtenido}}{\textit{peso de la muestra a extraer}} \times 100$$

$$\%Rendimiento = \frac{3.34g}{20g} \times 100 = 16,7\%$$

3.8.3. PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO

Los ensayos se realizaron utilizando las bacterias Gram negativas: *Salmonella spp* y *Escherichia coli* y la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* cepas tomadas del laboratorio de Microbiología del área Agropecuaria de la Universidad ESPAM MFL de la ciudad de Calceta. Para la determinación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en discos (KIRBY-BAUER), los cuales fueron realizados con papel filtro de 5mm de diámetro, para la preparación de los discos se ubicaron aproximadamente 50 discos por caja Petri para cada concentración, en la cual se realizaron diluciones del extracto (10^2 , 10^3 y 10^4), equivalentes a (10, 1 y 0,1) $\mu\text{g/mL}$ (Anexo 2-A), posteriormente con ayuda de una micropipeta cuyo rango volumétrico es de 0,1 μL a 1mL, se impregnó 0,2mL para cada disco con las concentraciones respectivas de extractos de hojas de icaco, las cajas fueron selladas hasta que los discos secan completamente por un tiempo aproximado de 24 horas (Anexo 2-C).

Posteriormente se realizó la preparación del inóculo la cual se inició con tomar cada una de las bacterias con un asa bacteriológica y se colocó en un tubo de ensayo con suero estéril para realizar la suspensión, enseguida se verificó de manera visual que tenga una igual turbidez. Cada caja fue rotulada con sus respectivas concentraciones para posteriormente colocar los discos. La suspensión posteriormente fue sembrada en cajas con 15mL de Agar Mueller Hinton preparadas previamente totalmente solidificadas (Anexo 2-B); con ayuda de un hisopo estéril para llegar a los espacios vacíos, se realizó la siembra por inundación en cada caja, en las cuales con ayuda de una pinza estéril se colocaron 3 discos haciendo una ligera presión sobre la superficie del agar, distribuidos de forma que no se produjo superposición de los halos de inhibición, obteniendo un total de 9 cajas por cada concentración y un total de 3 repeticiones. Una vez que los tres discos se encuentren en todas las cajas se las tapó y dejó reposar, finalmente se sellaron las cajas con papel film y se incubaron a $37\pm 2^\circ\text{C}$ durante 8 h (Anexo 2-D). Transcurrido el tiempo necesario, se pudo observar en una forma positiva que el extracto de hojas de icaco formó halos de

inhibición en la siembra de las tres bacterias en estudio, la actividad antibacteriana se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición con ayuda de una regleta se realizó una tabla con aquellos resultados (Anexo 2-E y 2-F), (Anexo 4-A, 4-B y 4-C).

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las variables se utilizaron las siguientes técnicas:

- Supuestos del ANOVA: normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad (Levene).
- Análisis de varianza (ANOVA), el cual permitirá determinar la homogeneidad de las varianzas.
- Prueba de TUKEY, con el fin de determinar la magnitud de las diferencias entre los tratamientos, con una magnitud del 5%.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. FENOLES TOTALES

Cuadro 4.1. Cuantificación de Fenoles Totales

Muestra	Polifenoles R1 (g EAG/ 100g)	Polifenoles R2 (g EAG/ 100g)	Polifenoles R3 (g EAG/ 100g)	Método de ensayo
Icaco	1,98	2,01	2,05	Folin Ciocalteu 1927

g/ GAE= Gramos de ácido gálico
100g= Gramos de muestra analizada

El contenido total de polifenoles presente en la muestra del extracto de hojas secas de *C. icaco*, fue determinado mediante el método Folin Ciocalteu, el mismo que se realizó por triplicado como se muestra en el cuadro 4.1, presentando un contenido de 2010mg EAG/100g de muestra, resultados que se asemejan a los reportados por Villagra (2018) quién presentó un contenido de 57,75mg/mL en la infusión de hojas secas de esta misma especie, mientras que en la infusión de hojas fresca se obtuvo 12,42mg/mL. Fong *et al.* (2014) obtuvieron valores de $57,87 \pm 1,82$ mg Ac. Tánico/g de Fenoles totales en un extracto acuoso de hojas de *A. indica*. El contenido de polifenoles en la muestra de icaco fue considerable al reportado por la literatura debido a diversos factores, uno de ellos es la cantidad y estado de las hojas usadas, otro factor importante fue el uso del solvente (etanol 96-99%) que de acuerdo con Soto & Rosales (2016), indican que la concentración de etanol y la relación masa/volumen de solvente utilizado tienen un efecto significativo en la extracción de fenoles, debido que a mayor concentración de etanol, mayor es la concentración de fenoles totales.

4.2. RENDIMIENTO

El rendimiento del extracto etanólico obtenido mediante el uso del equipo Soxhlet y la aplicación de la fórmula 3.2 fue de 16,7%. El rendimiento fue mayor debido a que se disminuyó el tamaño de las hojas de *C. icaco* lo más fino posible basándose en ley de Fick que indica que mientras mayor es el grado de división de la muestra, mayor será la superficie entre las fases de extracción y por tanto mayor será la difusión a través de la membrana porosa; es decir para que durante la destilación el vapor entre en íntimo contacto con el tejido de la planta.

4.3. EVALUACIÓN DEL EXTRACTO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

Cuadro 4.2. Resultado de los halos formados por las muestras del extracto de hojas icaco.

Réplicas	Concentración del extracto de hojas de icaco ($\mu\text{g/mL}$)	Bacterias en estudio					
		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Diámetros de halos de inhibición					
		Promedio (mm)	Resultado (Kirby-Bauer)	Promedio (mm)	Resultado (Kirby-Bauer)	Promedio (mm)	Resultado (Kirby-Bauer)
R1	10	13,33	R	23,33	S	26,67	S
R2	10	17,33	I	10,00	R	20,67	S
R3	10	20,67	S	10,67	R	15,33	I
R1	1	11,33	R	9,33	R	10,67	R
R2	1	11,33	R	10,00	R	10,00	R
R3	1	12,00	R	10,00	R	10,67	R
R1	0,1	10,67	R	10,67	R	8,67	R
R2	0,1	11,33	R	10,00	R	9,33	R
R3	0,1	10,67	R	8,67	R	10,00	R

S (Sensible), I (Intermedio), R (Resistente).

Respecto a los resultados obtenidos con la técnica de discos de papel se observó que todas las bacterias evaluadas fueron sensibles a una de las muestras del extracto de hojas de icaco. Se evidenció mayor sensibilidad frente a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, seguido de *E. Coli* y *Salmonella* a concentraciones de $10\mu\text{g/mL}$, al disminuir esta concentración del extracto de hojas de icaco la actividad disminuyó contra esta cepa, así como también disminuyeron los halos frente a las cepas Gram negativas. Los halos de inhibición varían de 8,67 a 26,67mm de diámetro, de acuerdo a la concentración del extracto y a las bacterias en estudio, presentando resistencia a concentraciones de 1 y $0,1\mu\text{g/mL}$ tal como se lo muestra en el cuadro 4.2. En otro estudio realizado con extracto de icaco Villagra (2018) presentó actividad contra *Staphylococcus spp* a concentraciones de 160mg/mL con un diámetro máximo de halo de inhibición de 13,33mm para bacteria Gram positiva, mientras que para las Gram negativa presentó un máximo de 7,66mm de diámetro.

Cuadro 4.3. Análisis de Varianza (Suma de Cuadrados tipo III)

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Valor de P
Modelo	385,39	8	48,17	4,16	0,0057
Extracto	317,72	2	158,86	13,73	0,0002
Bacterias	23,75	2	11,87	1,03	0,3786
Extracto*Bacteria	43,93	4	10,98	0,95	0,4587
Error	208,33	18	11,57		
Total	593,72	26			
C.V.		27			26,75

C.V.= Coeficiente de Variación

En el Cuadro 4.3. Se presenta el análisis de varianza para el efecto antimicrobiano del extracto de hojas de icaco en los distintos factores de estudio y su interacción, no se observa diferencia significativa para la interacción extracto y bacteria en ninguna de las concentraciones evaluadas ($p > 0,05$). Esto refleja que la variable halo de inhibición microbiana del extracto de hojas de icaco no se ve afectada cuando dichos factores están combinados, además se observa evidente significancia del factor concentración ($p = 0,0002$), mientras que, para el factor bacterias, no se observa diferencias significativas ($p = 0,3786$).

Cuadro 4.4. Test de Tukey Alfa= 0,05

Error: 11,5739	gl:18	
Concentración	Medias	E.E.
10,00	17,56 ^a	1,13
1,00	10,59 ^b	
0,10	10,00 ^b	

ab= Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). (E. E= Error estándar).

Al analizar los resultados permiten aceptar la hipótesis planteada con respecto al efecto antimicrobiano del extracto de hojas de icaco que indica que; al menos uno de los porcentajes de extractos de las hojas de *C. icaco* tiene mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas de *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; mostrando mayor efecto la concentración de 10µg/mL con un valor de 17,56mm, mientras que las concentraciones de 1 y 0,1µg/mL no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) ya que presentan valores de 10,59 y 10mm respectivamente, tal como se lo muestra en el cuadro 4.4. El extracto de hojas de icaco utilizado para la presente investigación mostró resultados positivos al inhibir *in vitro* el crecimiento de las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *salmonella* y *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se establece que el extracto de hojas de icaco a concentraciones de 10µg/mL tiene mayor efecto antimicrobiano, debido a que presenta mayor sensibilidad en las muestras, con halos de inhibición de hasta 17,56mm de diámetro.
- El rendimiento del extracto etanólico obtenido mediante el uso del equipo Soxhlet fue 16,7% de muestra, también se pudo determinar y optimizar los parámetros de funcionamiento de este equipo los cuales son de mucha importancia ya que permitirán obtener mejores resultados de extracción.
- Las muestras del extracto de hojas de icaco mostraron mayor sensibilidad contra la bacteria Gram positiva: *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 10µg/mL, debido a que presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana en bacterias patógenas.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios utilizando concentraciones mayores a 10µg/mL tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas.
- Tener presente la concentración de etanol y la relación masa/volumen del tipo de solvente a utilizar puesto que estos factores influyen en la extracción de fenoles, permitiendo obtener un mayor rendimiento, además almacenar el extracto en un frasco ámbar y en refrigeración a una temperatura de 4°C, ya que la luz puede afectar las características del extracto.
- Disminuir el tamaño de la muestra lo más fino posible puesto que esto aumenta el rendimiento del extracto a obtener mediante el uso del equipo Soxhlet.
- Potenciar el uso de este extracto por su potencial efecto antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, J. (2014). *Spentamexico*. Obtenido de Spentamexico: [http://www.spentamexico.org/v9-n3/A17.9\(3\)195-204.pdf](http://www.spentamexico.org/v9-n3/A17.9(3)195-204.pdf)
- Aillón, L. (2014). *UPS*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9903/1/QT08034.pdf>
- Amaguachi, F., y Churuchumbi, E. (2018). *UPS*. Obtenido de UPS: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16149/1/UPS-QT13324.pdf>
- AMYS. (2017). *Microbiología y salud*. Obtenido de Microbiología y salud: <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/evaluacion-de-la-actividad-antimicrobiana-del-extracto-de-hoja-de-olivo-contra-patogenos-bacterianos-de-origen-alimentario/>
- Anzueto, C. R. (2015). Conservantes Naturales. *Industria y Alimentos*(68), 12-14.
- Arellano López, A. R., y Montesdeoca Nuñez, F. P. (2016). *UDLA*. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/5749/1/UDLA-EC-TIAG-2016-16.pdf>
- Castillo, A., Pascual, Y., Cunha, L., Lorente, C., y Cañete, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- CIPNABIOT. (2017). *La Química del Icaco*. Universidad Autónoma de Chiriquí, Chiriquí.
- FDA. (2018). *Administración de Alimentos y Medicamentos*. Obtenido de Administración de Alimentos y Medicamentos: <https://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>
- Fong, O., Berenguer, C., Vega, J., Wawoe, N., y Puente, E. (2014). Potencial antioxidante de un extracto acuoso de hojas del NIM (*Azadirachta Indica* A. Juss). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 205-207.
- Forero, Y., Galindo, M., y Ramírez, G. (2017). Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Chilena de Nutrición*. Obtenido de Scielo.
- Galán, K. (2018). *Pontificia Universidad Javeriana*. Obtenido de PUJ: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/39109/Kimberly%20Gal%C3%A1n%20TG.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). *UPV*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>
- Google Earth. (2019). *mapasamerica*. Obtenido de [mapasamerica: http://mapasamerica.dices.net](http://mapasamerica.dices.net)
- Hidalgo, L. (2018). *Manabí*. Obtenido de Manabí: <http://www.manabi.gob.ec/12198-prefecto-alcalde-manta-buscan-superar-contaminacion-quebrada-del-rio-muerto.html>
- INSHT. (2012). *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. Obtenido de Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>
- ISPCH. (2016). *Instituto de Salud Pública de Chile*. Obtenido de Instituto de Salud Pública de Chile: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSalmonella-23012017A.pdf>
- Jácome, E. (2017). 47% de alimentos de la calle incumple normas, según Secretaría de Salud. *El Comercio*.
- Jiménez, M. E., Méndez, E. S., Leshner, J. M., Molina, R. F., y Hernández, R. (2011). Una ventana al estudio del genoma del *Chrysobalanus icaco* L. *KUXULKAB*, XVII(33), 61.
- Lemmel, J. (2008). Conservantes. *Elsevier*, 27(1), 59-60.
- Lucas, J., Morales, S., Salazar, E., Eslava, C., y Alvarado, D. (2016). Contaminación por *Escherichia coli* Shigatoxigénica en Puestos de Expendio de Carne de Pollo en un Distrito de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 3(27), 618-625.
- Mahmood, A., Ngah, N., y Nor, M. (2011). Phytochemicals Constituent and Antioxidant Activities in *Musa x Paradisiaca* Flower. *European Journal of Scientific Research*, 66(2), 311-318.
- Malbrán, C. (2012). *Antimicrobianos.com*. Obtenido de http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf
- Marcano, M. (2018). *ISSUU*. Obtenido de https://issuu.com/mariamarcan1996/docs/la_investigacion_experimental_pdf

- Martínez, A., Terán, Y. M., Barazarte, H., Petit, D., y D' Aubeterre, R. (2016). Propiedades Físico-Químicas de la pulpa y semilla de Icacó (*Chrysobalanus icaco* L.) para su aprovechamiento agroindustrial. *ASA*, 3.
- Montesdeoca, C., Hernández, C., Orozco, J., García, A., Ávila, J., Ortiz, M., . . . Serrano, R. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Dalea carthagenensis* (JACQ.) J. F. MACBR. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 161-168.
- Morales, A. (2015). *Universidad Nacional de Colombia*. Obtenido de UNAL: <http://bdigital.unal.edu.co/50994/1/1044503145.2015.pdf>
- OMS. (2017). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- OPS. (2015). *Organización Panorámica de la Salud*. Obtenido de Organización Panorámica de la Salud: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es
- Patiño, L. (2017). *Plantas medicinales cultivadas en Chiriquí: composición química, usos y preparación*. Chiriquí: SIDIC.
- RAE. (2018). *RAE*. Obtenido de Real Academia Española: <https://dle.rae.es/?id=HO0IXUp>
- Reyes, S. (2017). Circunspecciones acerca de las enfermedades producidas por alimentos. *Dominio de las Ciencias*, 3, 302- 303.
- Rivera, V. (2016). *Universidad de las Américas*. Obtenido de UDLA: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/4967>
- Sánchez, E., Hernández, S., y García, P. (2016). Actividad Antimicrobiana. En E. Sánchez, S. Hernández, & P. García, *Investigación en plantas de importancia médica* (pág. 82). Barcelona : OmnisScience.
- Santizo, A. (2013). *Library*. Obtenido de Library: http://168.234.106.70/library/images/9/9e/FODECYT_2010.11.pdf
- Silvia, F. (2017). *BVSALUD.ORG*. Obtenido de http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/878615/capacidad-antioxidante-de-extractos-provenientes-de-hojas-y-fru_92SehfZ.pdf
- Soto García, M., y Rosales Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad

antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencias y tecnología*, 18(4).

Soto, M., Soto, K., Santos, A., y Moncayo, N. (2015). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. *Revista Química Viva*, 14(3), 63-67.

Soto, Z., Pérez, L., y Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Salud Uninorte*, 107 - 109.

Vargas, P. (2014). *Educación superior*. Obtenido de Educación superior: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4703/6/Anexo%206.pdf>

Veléz, R., D' Armas, H., Jaramillo, C., y Vélez, E. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *FACSALUD*, 31-39.

Vera, J. (2018). Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de Jengibre (*zingiber officinale*) y Cúrcuma (*curcuma longa*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600. Cuenca, Ecuador. Obtenido de UPS: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15045/1/UPS-CT007429.pdf>

Villagra, E. (2018). *Unachi*. Obtenido de Unachi: <http://repositorio.unachi.ac.pa:85/search>

Zendejas, G., Avalos, H., y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Biomed*, 25(3), 130.

ANEXOS

ANEXO 1

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ICACO



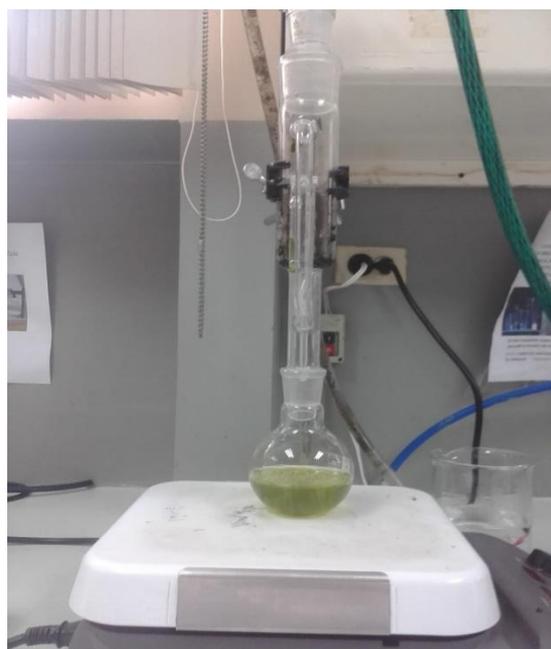
ANEXO 1-A recepción y selección de las hojas



ANEXO 1-B secado de las hojas en estufa



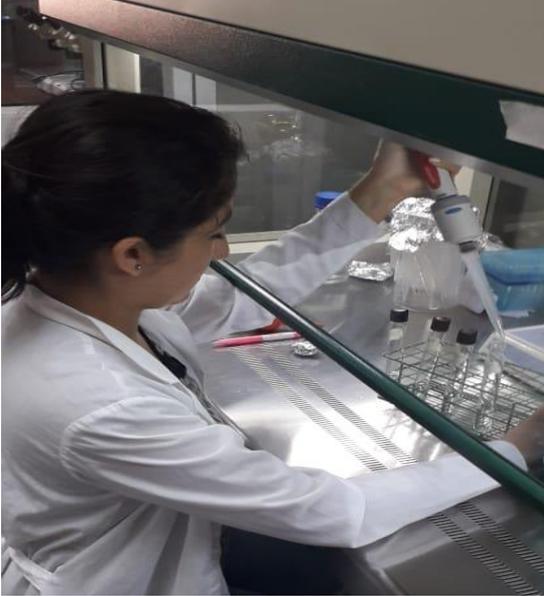
ANEXO 1-C Pesado de las muestras



ANEXO 1-D Obtención del extracto etanólico

ANEXO 2

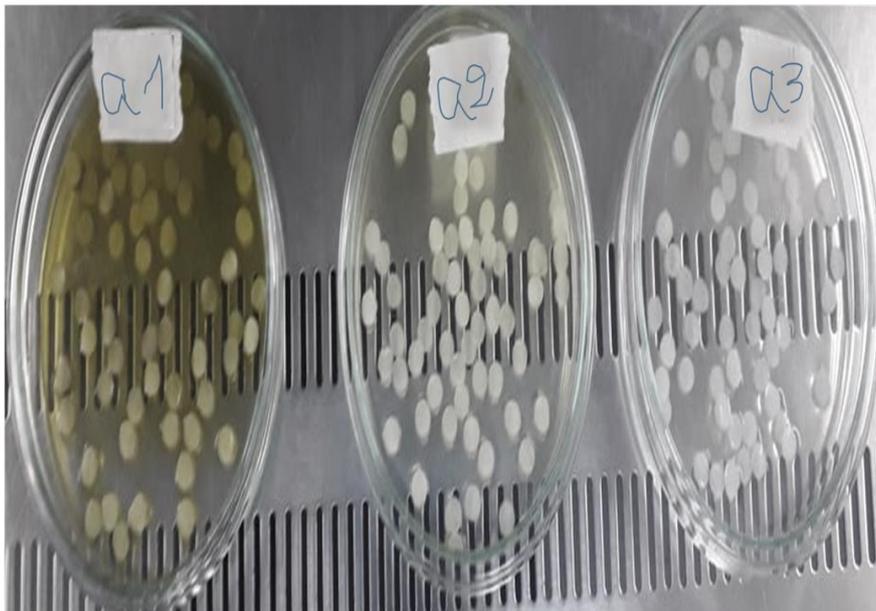
EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ICACO COMO UN AGENTE BACTERICIDA.



ANEXO 2-A Diluciones del extracto de hojas de icaco



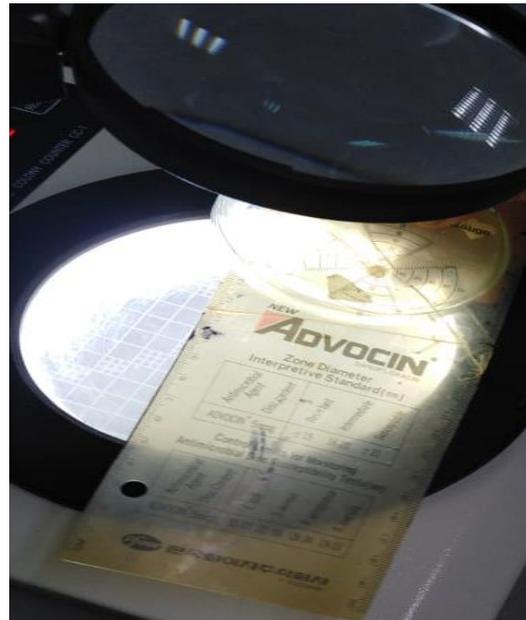
ANEXO 2-B Llenado de las cajas con el medio agar Mueller Hinton



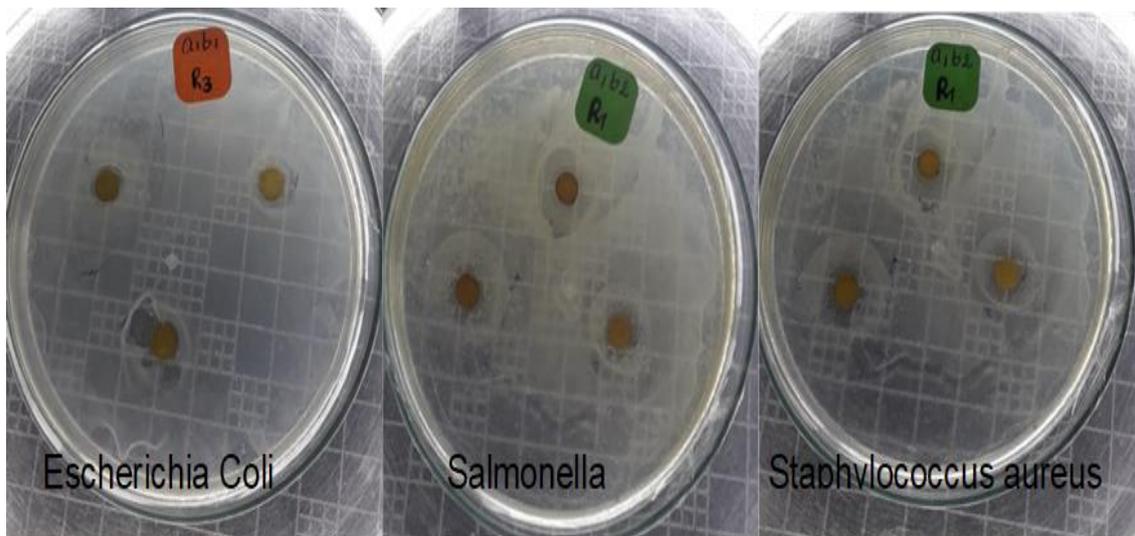
ANEXO 2-C Impregnación del extracto en los en discos de papel



ANEXO 2-D Incubación de las muestras



ANEXO 2-E Medición de los halos de inhibición



ANEXO 2-F Halos de sensibilidad de Escherichia Coli, salmonella y Staphylococcus aureus.

ANEXO 3

ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES



Lab. De Investigación de Alimentos

Facultad Ciencias Agropecuarias

Manta 28 de mayo de 2019

A Quien Corresponda

Ciudad. -

CERTIFICO: Que el análisis presentado en este informe corresponde a la estudiante **Lidia María Sobando Loor C.I. 131633037-0**, Estudiante de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM MFL.). El análisis fue realizado en el Lab. De Investigación de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la (ULEAM), siendo este el siguiente: (Cuantificación de Fenoles Totales, en hojas de Icaico) dicho análisis corresponde al trabajo de titulación "Efecto bactericida in vitro del extracto de hojas de Icaico en bacterias mesófilas (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*)".

Muestra	Polifenoles R1 (g EAG /100g)	Polifenoles R1 (g EAG /100g)	Polifenoles R1 (g EAG /100g)	Método de ensayo
Icaico	1,98	2,01	2,05	Folin Ciocalteau 1927

g/GAE= Gramos de ácido gálico

100g= Gramos de muestra analizada

Atentamente,



Ing. Marlon Castro

Téc. Responsable de Lab. De Tecnología de Lácteos
 Téc. Responsable de Lab. De Tecnología de Frutas y Hortalizas
 Téc. Responsable de Lab. De Investigación de Alimentos

www.uleam.edu.ec



ANEXO 3-A Resultados de cuantificación de fenoles totales

ANEXO 4

RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

  			
REPORT DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS			
Cliente:	Lidia María Sabando Loor	C.I	1316330370
Dirección:	Calceta		
Teléfono:	0982951670	N° de análisis	005
Nombre de la Muestra:	Antibiograma probando un extracto de hojas de Icaco	Fecha de recibido	21/10/2019
Cantidad Recibida:	1 ml	Fecha de análisis	21/10/2019
Examen Solicitado:	Antibiograma	Fecha de muestreo	23/10/2019
Objetivo del muestreo:	Control de calidad	Fecha de reporte	5/11/2019

RESULTADOS

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	
MUESTRA # 1 T ₁ R ₁ 10 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	13,33 mm	Resistente
MUESTRA # 1 T ₁ R ₂ 10 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	17,33 mm	Intermedio
MUESTRA # 1 T ₁ R ₃ 10 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	20,67 mm	Sensible
MUESTRA # 2 T ₂ R ₁ 1 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	11,33 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₂ 1 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	11,33 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₃ 1 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	12,00 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₁ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	10,67 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₂ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	11,33 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₃ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Scherichia coli</i>	10,67 mm	Resistente

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
Correo: labmicrob2018@gmail.com

ANEXO 4-A Resultados del diámetro del halo formado por muestras del extracto de hojas de icaco frente a *Escherichia coli*



ESPAM MFL
 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ



MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	
MUESTRA # 1 T ₁ R ₁ 10 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	23,33 mm	Sensible
MUESTRA # 1 T ₁ R ₂ 10 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	10,00 mm	Resistente
MUESTRA # 1 T ₁ R ₃ 10 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	10,67 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₁ 1 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	9,33 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₂ 1 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	10,00 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₃ 1 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	10,00 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₁ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	10,67 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₂ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	10,00 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₃ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Salmonella ssp</i>	8,67 mm	Resistente

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
 Correo: labmicrob2018@gmail.com

ANEXO 4-B Resultados del diámetro del halo formado por muestras del extracto de hojas de icaco frente a *Salmonella ssp*



Laboratorio
de
Microbiología



ESPAMMFL
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ



Laboratorio
de
Microbiología

MUESTRA POR TRATAMIENTO	PRUEBAS SOLICITADAS	RESULTADOS	
MUESTRA # 1 T ₁ R ₁ 10 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	26,67 mm	Sensible
MUESTRA # 1 T ₁ R ₂ 10 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	20,67 mm	Sensible
MUESTRA # 1 T ₁ R ₃ 10 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	15,33 mm	Intermedio
MUESTRA # 2 T ₂ R ₁ 1 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	10,67 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₂ 1 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	10,00 mm	Resistente
MUESTRA # 2 T ₂ R ₃ 1 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	10,67 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₁ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	8,67 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₂ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	9,33 mm	Resistente
MUESTRA # 3 T ₃ R ₃ 0,1 µg/ml	Determinación de <i>Staphylococcus</i>	10,00 mm	Resistente



Blgo. Johnny Navarrete Atava .MPA
COORDINADOR DEL LAB. DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL
Correo: labmicrob2018@gmail.com

ANEXO 4-C Resultados del diámetro del halo formado por muestras del extracto de hojas de icaco frente a *Staphylococcus aureus*