



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

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER
EN AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

RELACIÓN DEL EXTRACTO DE *Piper carpunya* Y *Momordica charantia* SOBRE LA INHIBICIÓN DE PATÓGENOS *IN VITRO* Y EL TIPO DE INTERACCIÓN

AUTORES:

**HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA
GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE**

TUTOR:

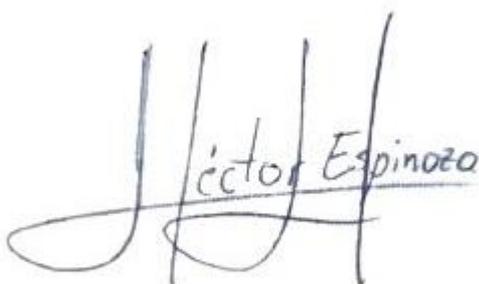
ING. ROSANNA KATERINE LOOR CUSME, Mg.

CALCETA, FEBRERO DE 2022

DERECHOS DE AUTORÍA

HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA y **GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE** declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumimos la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA



GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE

CERTIFICACIÓN DE LA TUTORA

ING. ROSANNA KATERINE LOOR CUSME, MG, certifica haber tutelado el trabajo de titulación **RELACIÓN DEL EXTRACTO DE *Piper carpunya* Y *Momordica charantia* SOBRE LA INHIBICIÓN DE PATÓGENOS *IN VITRO* Y EL TIPO DE INTERACCIÓN**, que ha sido desarrollado por **HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA** y **GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE**, previo a la obtención del título de Magíster en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. ROSANNA KATERINE LOOR CUSME, Mg

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **RELACIÓN DEL EXTRACTO DE *Piper carpunya* Y *Momordica charantia* SOBRE LA INHIBICIÓN DE PATÓGENOS *IN VITRO* Y EL TIPO DE INTERACCIÓN**, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por **HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA** y **GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE**, previa la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de la unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. DAVID MOREIRA VERA, PhD
MIEMBRO

Mg. NELSON MENDOZA GANCHOZO
MIEMBRO

ING. ELY SACÓN VERA, PhD.
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por todo aquello que hace todos los días por mí y a Guisella Elizabeth Pincay Aguirre por todo.

HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme las fuerzas necesarias y permitirme cumplir cada meta propuesta.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria 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 Sra. Mariana Aguirre Mateus y Lic. Manuel Pincay Solórzano (+) por haber sido mi fortaleza en esta maravillosa etapa. A mis hermanos Andrea, Joan, Nicholle, Oscarín, Andrés y Samira por estar en los momentos más difíciles y estar pendientes en mi proceso como maestrante.

A mi amigo y compañero de tesis Héctor Espinoza por su gran apoyo en este proceso. A mis amigas Katherine Macas y Andrea Morejón por motivarme y acompañarme en las gestiones de mi tesis, muchas gracias, las quiero mucho.

A nuestra tutora, Mg. Rosanna Katerine Loor Cusme por su valiosa orientación en el desarrollo de la tesis. A los docentes y amigos en la maestría por su gran amistad.

GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE

DEDICATORIA

A Dios por permitirme hacer este tipo de cosas que, de un modo u otro, a pesar de las dificultades, serán buenas para mí en un futuro y a Guisella Elizabeth Pincay Aguirre, gracias.

HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía en todo momento, a mis padres y hermanos por brindarme su apoyo incondicional, a mi gatita Lunita por soportar mis días de estrés y llenarme de cariño, a mi amigo y compañero de tesis gracias por su gran apoyo en este proceso.

GUISELLA ELIZABETH PINCAY AGUIRRE

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICADO DE LA TUTORA	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4. HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN ALIMENTOS	6
2.1.1. TIPOS DE ETAS	6
2.1.2. BACTERIAS PATÓGENAS	6
2.2. CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS.....	7
• UTILIZACIÓN DE CONSERVANTES NATURALES.....	8
2.2.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	9
2.2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	9
• MEDICIÓN DE PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS EXTRACTOS	12
2.2.3. METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE <i>P. carpunya</i> Y <i>M. charantia</i>	13
2.3. COMBINACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES QUE SUGIEREN INTERACCIÓN ENTRE SUS COMPONENTES	14
• TIPOS DE INTERACCIONES ENTRE EXTRACTOS VEGETALES	15
2.3.1. MECANISMOS A TRAVÉS DE LOS CUALES SE PRODUCEN LAS INTERACCIONES SINÉRGICAS	16
2.3.2. ESTUDIO IN VITRO DE COMBINACIONES DE EXTRACTOS FRENTE A <i>S. aureus</i> Y <i>E. coli</i>	17
2.3.3. TÉCNICA DE ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	19
PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)	19
2.4. MATERIAL DE LA INVESTIGACIÓN	20
2.4.1. <i>P. carpunya</i>	20
2.4.2. MELÓN AMARGO (<i>M. charantia</i>).....	21
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	22
3.1. UBICACIÓN	22
3.2. DURACIÓN.....	22
3.3. FACTORES EN ESTUDIO	22
3.3.1. NIVELES DE FACTOR.....	22
3.4. TRATAMIENTOS	23
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL	24
3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO	24
3.7.1. PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PINKU Y MELÓN AMARGO	24

3.7.2....PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	26
3.7.3. DIAGRAMA DE PROCESO EN LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS Y EXPERIMENTO IN VITRO	27
3.9. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS	28
3.9.1. MÉTODOS APLICADOS EN LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS	28
3.9.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	28
3.9.3. MÉTODOS QUÍMICOS	30
3.10. VARIABLE RESPUESTA Y MÉTODO DE EVALUACIÓN	30
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. EFECTO INHIBITORIO DE LA MEZCLA DE EXTRACTO DE HOJAS DE PINKU Y MELÓN AMARGO	32
4.2. COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS FRENTE A LOS TESTIGOS	39
4.3. TIPO DE INTERACCIÓN ENTRE LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO DE PINKU Y MELÓN AMARGO	40
4.4. CONTENIDO FENÓLICO EN LA MEJOR RELACIÓN DE EXTRACTO DE PINKU Y MELÓN AMARGO	43
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
5.1. CONCLUSIONES.....	46
5.2. RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍAS	48
ANEXOS	54

CONTENIDOS DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

Tablas

Tabla 1. Niveles del factor	22
Tabla 2. Combinaciones de los niveles de los factores en estudio	23
Tabla 3. Esquema del ADEVA bifactorial.....	23
Tabla 4. Esquema del ADEVA para tratamientos y testigos	24
Tabla 5. Métodos utilizados en la obtención de los extractos de hojas de pinku y melón amargo .	28
Tabla 6. Prueba de normalidad para los diámetros de los halos de inhibición	32
Tabla 7. Prueba de homogeneidad para los diámetro de halos de inhibición	32
Tabla 8. Prueba de los efectos inter – sujetos en relación a la variable dependiente (ADEVA)	33
Tabla 9. Subconjuntos homogéneos para los niveles el factor A.....	34
Tabla 10. Prueba de normalidad (tratamientos y testigos).....	39
Tabla 11. Subconjuntos homogéneos de las medias de los tratamientos y testigos	39

Figuras

Figura 1. Diagrama de proceso de extracción y experimento in <i>vitro</i>	27
Figura 2. Medias de inhibición (mm) presentados por <i>S aureus</i> y <i>E. Coli</i>	35
Figura 3. Diferencias entre tratamientos	37
Figura 4. Halos de inhibición de los tratamientos t1, t2, t3 y t4 en contraste con los testigos	41
Figura 5. Halos de inhibición de los tratamientos t5, t6, t7 y t8 en contraste con los testigos	42

Anexos

Anexo 1. Materias primas y proceso de extracción	55
1-A. Hojas de <i>momordica charantia</i> (melón amargo)	55
1-B. Hojas de <i>piper carpubya</i> (pinku)	55
1-C. Extracción por el método soxhlet.....	55
1-D. Obtención de extractos etanólicos.....	55
Anexo 2. Análisis in vitro por el método de kirby- bauer	56
2-A. Preparación de medios de cultivo mueller hinton	56
2-B. Purificación de cepas bacterianas	56
2-C. Preparación de combinaciones de extracto e impregnación en discos	56
2-D. Discos con extractos listos para inocular	56
Anexo 3. Halos de inhibición de los tratamientos y testigos (réplicas)	57
Anexo 4. Prueba de hipótesis de los tratamientos y testigos	58
Anexo 5. Determinación de flavonoides totales a la mejor relación de extracto etanólico de pinku y melón amargo	59

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el tipo de interacción producido a partir de la relación del extracto etanólico de hojas de *Piper capunya* (pinku) y *Momordica Charantia* (melón amargo) frente a la inhibición de *E. coli* y *S. aureus in vitro*. Para el efecto se utilizó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Se aplicó un diseño factorial AxB + 2 con ocho tratamientos y tres réplicas por cada uno, donde A corresponde a cuatro relaciones entre extractos vegetales (pinku y melón amargo), B a dos patógenos (*S. aureus* y *E.coli*) y 2 a los testigos de los extractos por separado. Tanto las relaciones como los testigos se establecieron en base a 50 µg/mL, mientras que la concentración para cada patógeno en función de los tratamientos fue de 30×10^5 UFC/mL. La variable respuesta fue el diámetro (mm) de los halos de inhibición formada por los tratamientos y los testigos. Los resultados demostraron que la relación de 37 µg/mL de pinku + 13 µg/mL de melón amargo (T1, T2) presentó los mayores halos de inhibición frente a los dos patógenos, siendo más efectiva para la bacteria *S. aureus* (9,66 mm – T1). En la comparación de los milímetros de los halos de inhibición del mejor tratamiento y testigos, se demostró una interacción aditiva, debido a que halos (mm) de la relación 37 µg/mL de pinku + 13 µg/mL (T1) no superaron los del testigo de pinku el cual se posicionó como el mejor con 12,16 mm para *S. aureus*.

PALABRAS CLAVES

E. coli, *S. aureus*, extractos etanólicos, halos de inhibición, interacción aditiva.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the type of interaction produced from the relationship of the ethanolic extract of leaves of *Piper capunya* (pinku) and *Momordica Charantia* (bitter melon) against the inhibition of *E. coli* and *S. aureus* in vitro. For this purpose, the Kirby-Bauer disk diffusion method was used. An AxB +2 factorial design was applied with eight treatments and three replicates for each one, where A corresponds to four relationships between plant extracts (pinku and bitter melon), B to two pathogens (*S. aureus* and *E.coli*) and 2 to the witnesses of the extracts separately. Both the relationships and the controls were established based on 50 µg/mL, while the concentration for each pathogen depending on the treatments was 30×10^5 CFU/mL. The response variable was the diameter (mm) of the inhibition halos formed by the treatments and the controls. The results showed that the ratio of 37 µg/mL of pinku + 13 µg/mL of bitter melon (T1, T2) presented the greatest inhibition halos against the two pathogens, being more effective for the *S. aureus bacterium* (9, 66mm – T1). In the comparison of the millimeters of the inhibition halos of the best treatment and controls, an additive interaction was demonstrated, because halos (mm) of the ratio 37 µg/mL of pinku + 13 µg/mL (T1) did not exceed the of the pinku control which was positioned as the best with 12.16 mm for *S. aureus*.

KEY WORDS

E. coli, *S. aureus*, ethanolic extracts, inhibition halos, additive interaction.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la industria agroalimentaria, la seguridad microbiológica de los alimentos es un aspecto de suma importancia, no solo por sus efectos directos sobre la vida útil de un alimento sino por sus implicaciones en la salud pública. A través del consumo de los alimentos, uno de los principales riesgos es la transmisión de microorganismos patógenos al ser humano. Entre las bacterias más frecuentemente implicadas se encuentran *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, siendo, por esto, reconocidos como microorganismos de vital importancia para la salud pública (Cáseres et al., 2013).

A pesar de esto, Castro (2019) menciona que la alternativa habitual ha sido el uso de antimicrobianos, práctica común en la industria de los alimentos, utilizando por muchos años agentes sintetizados químicamente; sin embargo, algunos de estos son peligrosos para la salud del consumidor al ser utilizados en concentraciones elevadas, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar nuevos agentes inhibidores de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados, provenientes de plantas, hierbas, especias y productos de origen biológico.

Los extractos vegetales han sido utilizados desde hace mucho tiempo por habitantes indígenas de varias regiones de Ecuador, utilizando una amplia variedad de vegetales como agentes medicinales para tratar diferentes padecimientos y en el curado de varios de sus alimentos. Estos principios activos se vienen utilizando en forma de esencias, aceites y extractos para minimizar o eliminar el uso de productos químicos artificiales, siendo algunos de estos utilizados como ingredientes nutricionales, así como para el control de microorganismos patógenos (Montero et al., 2017).

De acuerdo con López (2017) una de las plantas endémicas del Ecuador es la especie *Piper carpunya*, la cual ha sido utilizada principalmente por los Tsáchilas con fines medicinales y otros usos etnobiológicos destacando sus propiedades alelopáticas con una diversidad de metabolitos secundarios como: lignanos,

neoliganos, piperolidas, flavonas y flavonona entre otras, recientemente se ha publicado una revisión de los compuestos aislados de especies del género *Piper*, donde se enfatiza la actividad biológica por los diferentes metabolitos aislados, sobre bacterias patógenas (Medina et al., 2019).

Otra especie de planta destacada es la *Momordica charantia*, conocida popularmente como cundeamor o melón amargo. Maulide (2012) manifiesta que en investigación preliminares se ha logrado identificar cualitativamente en las hojas de *Momordica* diferentes compuestos como: flavonoides, taninos, resinas, saponinas y alcaloides, sin especificar el tipo de compuesto del que se trata, mientras que a los alcaloides y resinas se les atribuye propiedades antimicrobianas, antisépticas y antiinfecciosas.

Los agentes antimicrobianos de origen natural se vuelven imprescindibles debido a su efectividad inhibitoria frente a diversos patógenos frecuentes en la industria de alimentos como lo son la *E. coli* y *S. aureus*. Según Rivera y Quispe (2018) la OMS emitió un informe “Antimicrobial resistance: global report on surveillance” sobre la resistencia a antimicrobianos, el primero de carácter mundial que reconoce la realidad de este problema y aunque diferentes extractos vegetales han demostrado tener efectos positivos sobre microorganismos patógenos específicos, persisten problemas, debido al bajo espectro e intransigencia de las cepas.

Los diferentes extractos de plantas medicinales poseen un efecto antimicrobiano inherente; sin embargo, su accionar se multiplica al trabajar en conjunto con otros compuestos, potenciando su efecto, a lo que llamamos sinergia (Gómez et al., 2019). El estudio del sinergismo entre los compuestos de las plantas medicinales es un campo de investigación muy amplio, complejo y prometedor, ya que algunas sustancias, al trabajar en conjunto, facilitan la asimilación de los principios activos, así como su biodisponibilidad potenciando su efecto.

En los últimos años, diversos extractos de plantas se han convertido en tema de investigación para ayudar a la industria alimentaria puesto que han demostrado una importante actividad inhibitoria frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos como *E. coli* y *S. aureus*, siendo de los más recurrentes en la

contaminación de alimentos por lo que una alternativa de solución frente a esta problemática es la combinación de metabolitos secundarios de diferentes plantas como la *P. carpunya* y *M. charantia*.

Por lo antes expuesto, se plantea la pregunta de investigación. ¿De qué manera la relación de extractos de hojas de pinku y melón amargo influyen sobre la interacción e inhibición de *E. coli* y *S. aureus*?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los patógenos *E. coli* y *S. aureus*, debido a su ubicuidad e incidencia, se han convertido en el blanco de acción de los diferentes sistemas de aseguramiento de la calidad en la industria alimentaria. En este sentido, aquellos mecanismos habituales de conservación, empleados en la mayoría de los alimentos se han basado en distintas tecnologías que comprenden la aplicación de procesos físicos hasta la adición de sustancias químicas, que generalmente son artificiales; sin embargo, el uso indiscriminado de estos antimicrobianos sintéticos y su consumo crónico tienen diversas consecuencias sobre la salud humana (Guayllas, 2019).

Una alternativa frente a esta problemática, es el uso de extractos vegetales y Ecuador, con su gran diversidad vegetal y su amplia riqueza cultural, cuenta con especies vegetales que son de interés para el estudio de su bioactividad (Sánchez, 2017). Ecuador cuenta con aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas, de las que se estima que 300 solamente han sido estudiadas y si bien la información sobre las mismas abunda en la literatura etnobotánica, las investigaciones sobre su utilización comercial actual son incipientes (Quijije, 2017).

Las especies vegetales *P. carpunya* y *M. charantia*, debido a sus metabolitos secundarios y sus diversas propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas y antimicóticas se vuelven una alternativa de estudio referentes a sus extractos en el control de microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. aureus*.

Los estudios biológicos y fotoquímicos de plantas medicinales se reportan en forma individual pero muy poco sobre sus mezclas, no obstante, esta actividad está teniendo gran importancia respecto a su aplicación, debido a los resultados positivos frente a la inhibición de microorganismos patógenos (Butassi, 2017). Los estudios realizados sugieren sinergismo entre extractos, es una hipótesis aceptada por muchos investigadores. Se considera que los compuestos se complementan entre sí para dar una potencia mayor a la suma de cada uno de los componentes de las mezclas (Azahuanche et al., 2010).

La susceptibilidad *in vitro* de estos extractos ha sido probada ante una amplia gama de patógenos, lo que convierte a esta investigación en una oportunidad para aprovechar la biodiversidad biológica y el potencial invaluable de las plantas medicinales de Ecuador, como el pinku y melón amargo, que, en combinación de sus metabolitos, presenten mejor y mayor espectro inhibitorio frente a *E. coli* y *S. aureus*.

Este trabajo se orienta al llamado de consolidar el camino hacia una estructura productiva, sostenida y diversa, con actividades de mayor valor agregado e intensidad tecnológica que, simultáneamente, responda a los acuerdos sobre la sostenibilidad ambiental como lo manifestado en la conferencia de las Naciones Unidas sobre el cambio climático (COP21), para de esta forma, encaminarnos a una producción más limpia y eficiente (Dietsche, 2017).

Por lo antes mencionado, se presentan grandes desafíos en el desarrollo de investigaciones enfocadas en tratar de optimizar la diversidad vegetal del país, en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que puedan ser utilizados por la industria alimentaria y poder entonces, establecer bases actuales sobre la interacción entre extractos vegetales y su utilización respecto a los agentes químicos de uso frecuente y a la resistencia que presentan la *E. coli* y *S. aureus* frente a otros extractos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el tipo de interacción producido a partir de la relación del extracto etanólico de hojas de pinku y melón amargo frente a la inhibición de *E. coli* y *S. aureus in vitro*

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la relación entre el extracto etanólico de hojas de pinku y melón amargo que logre la mayor inhibición de *E. coli* y *S. aureus in vitro* por disfunción en disco.
- Determinar el tipo de interacción producido por la mejor relación de extracto etanólico de hojas de pinku y melón amargo.
- Establecer por espectrofotometría UV-VIS el contenido de flavonoides totales presentes en la mejor relación entre extracto etanólico de hojas de pinku, melón amargo.

1.4. HIPÓTESIS

Las relaciones entre el extracto de hojas de pinku y melón amargo presentan inhibición positiva (sinergismo) frente a los patógenos *E. coli* y *S. aureus*.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN ALIMENTOS

De acuerdo con Rodríguez et al. (2015) algunas enfermedades transmitidas a través de los alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia en el mundo y, al mismo tiempo, una de las razones que influye de manera negativamente sobre la economía de un país y sus empresas por efectos adversos en la productividad. Según Alarcón et al. (2017) se ha descrito un aumento significativo de ETA, a nivel mundial, estimándose que entre el 15 y 70% de los casos infecciosos estomacales presentados en niños menores de cinco años se debe a alimentos contaminados.

2.1.1. TIPOS DE ETAS

De acuerdo con Rodríguez et al. (2015) la contaminación, en este contexto se define como la presencia de cualquier material anormal en el alimento que comprometa su calidad para el consumo humano indicando que, la naturaleza de estos contaminantes es amplia y heterogénea, tanto, que se han descrito más de 250 tipos de ETA; sin embargo, la mayoría de casos reportados a causa de este problema, se deben a una amplia gama de representantes bacterianos responsables de las toxiinfecciones, lo que ha posibilitado que se les diferencie en infecciones e intoxicaciones alimentarias.

2.1.2. BACTERIAS PATÓGENAS

De acuerdo con Rincón et al. (2010) los principales microorganismos patógenos involucrados en brotes de ETA son; *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, aunque la *Shigella* spp también se han asociado a brotes de enfermedades por consumo de diversos alimentos. Por su parte Zendejas et al. (2014) indican que la bacteria *S. aureus* es uno de los patógenos más frecuente en el deterioro de los alimentos, encontrándose presente en el aire, la leche, el agua potable, aguas residuales y, desde luego, la comida y los equipos y utensilios donde los alimentos se han elaborado.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la carga mundial de ETA es comparable con las principales enfermedades infecciosas: VIH/sida, paludismo y tuberculosis. Las razones más frecuentes de enfermedades transmitidas por agentes bacterianos a través de los alimentos son producidas generalmente por: *Salmonella entéricas*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter* spp, *Taenia solium*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *E. coli*, *Shigella* sp y *L. monocytogenes*, haciéndolos responsables de una alta mortalidad (Zúñiga y Caro, 2017).

- ***E. coli***

Este patógeno es utilizado como indicador de una posible contaminación fecal y presencia de bacterias en el agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos, así como de animales, caracterizándose también por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente se mueve a través de flagelos peritricos (Soto y Rosales, 2016). Esa bacteria produce la toxina Shiga (STEC), misma que está asociada a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), pudiendo causar desde diarrea sanguinolenta (DS) hasta enfermedades severas en el hombre (Zotta et al., 2016).

- ***S. aureus***

Según Alarcón et al. (2017) es una bacteria anaerobia facultativa, no esporuladas, Gram positiva, algunas especies de *Staphylococcus* son productores de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular, conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SE) que poseen termorresistencia, incluso a 100°C. Este patógeno produce alrededor de once serotipos distintos de SE, enterotoxinas que son causantes de intoxicaciones comunes, mismas que se transmiten principalmente por la ingesta de alimentos contaminados

2.2. CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Sabando (2020) manifiesta que se han utilizado diferentes métodos para frenar la proliferación de microorganismos de agentes patógenos, con el fin de proveer inocuidad a los alimentos. En la misma línea, Pastrana et al. (2017) indican que el

uso de antimicrobianos como conservantes también ha sido de gran importancia, al permitir alargar la vida útil de los productos en anaquel, evitando la colonización por microorganismos patógenos.

De acuerdo con García y Herrera (2007) en los alimentos, la seguridad microbiológica es un aspecto de vital importancia para la industria agroalimentaria, no sólo por sus efectos directos sobre la vida útil de un alimento sino por sus repercusiones en la salud. En este sentido, los métodos de conservación regularmente empleados en la mayoría de los alimentos se apoyan en diferentes tecnologías que van desde la aplicación de procesos físicos hasta la adición de químicos, generalmente artificiales; sin embargo, el uso indiscriminado de ellos y su consumo crónico tienen diversas consecuencias sobre la salud humana.

- **UTILIZACIÓN DE CONSERVANTES NATURALES**

Rodríguez (2011) manifiesta que los antimicrobianos continúan entre los aditivos alimentarios más importantes; sin embargo, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural. Este mismo autor indica que por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (causando daño en la salud de los consumidores), redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones como los antimicrobianos de origen natural.

Según Martínez et al. (2015) la utilización de ciertos suplementos y aditivos manejados en la producción animal, tales como: coccidiostatos e histomoniatos así como antibióticos, han sido restringidos por repercusiones en la salud de los comensales, se ha tenido que buscar alternativas en productos naturales y plantas medicinales que tengan efectos similares, sin que representen un riesgo para el consumidor. Los extractos que se obtienen de diversas plantas, pueden ser una alternativa.

Por su parte Scalvenzi et al. (2016) hacen referencia en que en la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación, esto debido a que se

ha asociado el consumo de conservantes químicos con intoxicaciones por los que la demanda de productos frescos mínimamente tratados está aumentando, así como el interés por los agentes antimicrobianos de origen natural (derivados de vegetales) que, aunque no es nueva es de gran aceptación actual hacia el uso de conservantes naturales.

2.2.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Guayas et al. (2020) indican que los diferentes métodos de extracción, tienen por objetivo extraer total o parcialmente los componentes biológicamente activos a partir de material vegetal o animal, mediante el empleo de solventes adecuados.

Estos procesos dinámicos comprenden 3 importantes etapas.

- Difusión del solvente en el interior de la célula.
- Solubilización de los diferentes componentes activos en el solvente.
- Difusión del solvente y los metabolitos al exterior de la célula.

- **MÉTODO SOXHLET**

Es un procedimiento que se basa en la diferencia de los puntos de ebullición entre el solvente y los metabolitos extraídos, se emplea un solvente orgánico con temperatura de ebullición relativamente baja, mismo que puede ser etanol o comúnmente éter, este solvente se evapora y condensa continuamente entrando en contacto con la droga vegetal varias veces dando así una extracción continua (Guayas et al., 2020).

2.2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS

- **ALCALOIDES**

Estos compuestos poseen una estructura heterocíclica que presentan nitrógeno conformando su anillo el mismo que les da características básicas dando origen su nombre. Son además derivados de aminoácidos, tienen un sabor amargo y se localizan en los tejidos periféricos de las plantas en forma de sales de ácidos orgánicos (Jaramillo et al., 2016). Son usualmente insolubles en agua, pero

solubles en sustancias orgánicas como. Etanol, éter, cloroformo, metanol, hexano, etc. La actividad biológica de estos compuestos no es conocida totalmente; sin embargo, se cree que tiene acción antimicrobiana mediante intercalación entre la pared celular y el ADN microbiano (Nunez et al., 2018).

- **FENOLES**

Estos compuestos son un amplio grupo de componentes orgánicos derivados especialmente de los ácidos cinámico y benzoico que tienen al menos una función carboxílica y un hidroxilo fenólico. Los fenoles simples como: catecol y guayacol son escasos, mientras que aquellos derivados del ácido benzoico como el ácido gálico son más frecuentes en la mayoría de plantas tanto en su forma libre como en forma de heterósidos o ésteres. Son también solubles en solventes orgánicos polares, carbonato de sodio y disoluciones de hidróxido de sodio; también presentan solubilidad en agua y alcoholes como etanol y metanol (Guayas et al., 2020).

Las propiedades farmacológicas de los fenoles simples son de muy poco interés terapéutico debido a que se les atribuyen propiedades antisépticas, se les da un mayor uso como antiinflamatorios a los derivados salicílicos. Los ésteres heterósidos presentan son de gran interés terapéutico, pues se les atribuye propiedades inhibitoras de enzimas como la fosfodiesterasa, la 5-lipooxigenasa y aldosa reductasa (Gordo, 2018).

- **FLAVONOIDES**

Son compuestos polifenólicos formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena lineal de tres carbonos. En las plantas cumplen la función de ser pigmentos, existiendo muchos tipos de flavonoides, cada uno otorga un color diferente a la planta, y se encuentran principalmente en flores, frutos y hojas. Son poco solubles en agua, solubles en solventes orgánicos apolares, etanol, metanol, diclorometano, etc. Se les atribuye propiedades farmacológicas como vasoactivas, es decir, son capaces de disminuir la permeabilidad de capilares sanguíneos, también se les atribuye propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Guayas et al., 2020).

- **ANTOCIANINAS**

Son compuestos polifenólicos que en su estructura tienen un glúcido, se encuentran distribuidos en todas las plantas y cumplen la función de ser colorantes y protectores contra la luz ultravioleta, se los encuentra en todos los tejidos, especialmente en hojas, tallos y frutos (Liang & He, 2018). Presentan solubilidad en alcoholes como etanol y metanol, también son solubles en agua y esta aumenta con la temperatura. Son de gran interés por su potencial antioxidante contra las especies reactivas del oxígeno, aunque no se tiene suficiente evidencia, también se les ha atribuido propiedades antiinflamatorias y vaso-activas (Ballistreri et al., 2019).

- **TRITERPENOS**

Son un grupo de compuestos químicos con estructura esteroideal, los triterpenos presentan una similitud estructural con los esteroides vegetales. En este grupo se incluyen moléculas como los heterósidos cardiotónicos, sapogeninas, saponósidos (Ghosh, 2016). Son solubles en solventes orgánicos polares como hexano, triclorometano, éter; poco solubles en alcoholes y prácticamente insolubles en agua. Los compuestos de mayor importancia son los heterósidos cardiotónicos; tienen gran potencial terapéutico en campos como: antivirales; citostáticos, antiinflamatorios y analgésicos (Bahrami & Franco, 2016)

- **SAPONINAS**

Son compuestos moleculares derivados de los esteroides y tiene además un radical glucósido, se llaman así debido a sus propiedades que son similares a las del jabón común. Tienen función de defensa contra microorganismos, en especial los de origen fúngico (Khakimov et al., 2016). Presentan solubilidad en agua misma que se ve aumentada con el aumento de la temperatura, aunque son susceptibles a hidrólisis pudiéndolos extraer con etanol o metanol. Su característica principal es ser hemolíticos, debido a su interacción con los esteroides de la membrana del eritrocito (Zhu et al., 2018).

- **TANINOS**

Son compuestos polifenólicos y se derivan del ácido gálico formando ésteres con un azúcar, están presente en la mayoría de plantas cumpliendo función protectora contra microorganismos invasores. Son también solubles en agua formando coloides, también en acetona y alcoholes; aunque generalmente se extraen con mezclas de agua y acetona. El interés terapéutico de los taninos se debe principalmente a su capacidad de formar complejos con macro-moléculas, en especial proteínas, lo que le otorga propiedades antimicrobianas, inhibidores enzimáticos y antivirales. Se han usado también como antioxidantes, en especial, para evitar la peroxidación lipídica (Guayas y Lazo, 2020).

- **MEDICIÓN DE PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS EXTRACTOS**

De acuerdo con López et al. (2017), las técnicas cromatográficas son de las más utilizadas en la medición de las propiedades químicas en los extractos. Estas permiten el análisis simultáneo de varios componentes presentando mayor precisión, exactitud y especificidad comparado con el resto de metodologías propuestas. De las técnicas cromatográficas, está la cromatografía de gases, de capa fina, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

CROMATOGRAFÍA DE GASES: Es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, misma que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física de acuerdo con Parrales et al. (2012) quienes además manifiestan que es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo propósito es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Durante la cromatografía de gases (GC), la muestra pasa por un proceso de volatilización y después, esta se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La llamada elución se produce a través de un flujo de una fase móvil de un gas inerte, a diferencia de las demás cromatografías, esta fase móvil no interacciona con las múltiples moléculas del analito, debido a que solo debe transportar el analito a través de la columna.

En este sentido, existen dos cromatografías de gases: la de gas-sólido (GSC) y la de gas-líquido (GLC). Esta última (gas-líquido) tiene aplicación en casi todos los campos científicos y su denomina como cromatografía de gases (GC) (Andrade, 2015).

2.2.3. METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *P. carpunya* Y *M. charantia*

Semeniuk et al. (2018) en su investigación "*Composición fitoquímica y nutricional de M. charantia y actividad antioxidante*" encontraron en una evaluación preliminar la presencia de taninos, fenoles, flavonoides, lípidos, hidratos de carbono, antraquinonas, saponinas y proteínas en este material vegetal. En este caso, las semillas demostraron tener un mayor contenido de proteínas y grasas, aportando así un gran valor energético. Por otra parte, las hojas mostraron una mayor composición de fenoles totales y de cenizas. Los frutos en cambio mostraron los valores más altos de contenido en humedad y de carbohidratos (Maulide, 2012).

Aricapa (2012) reportó algunos compuestos fitoquímicos del género *Piper*, especialmente; taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas y fenoles. Cárdenas et al. (2016) en su investigación "*Fitoquímica de extractos de Ocotea quixos (canela amazónica) y P. carpunya (guaviduca, pinku), potenciales fungocontroladores*" de similar manera, indican que algunos de estos metabolitos secundarios fueron encontrados en la investigación antes mencionada para la especie *P. carpunya*, mismos que son responsables de la inhibición de algunos microorganismos patógenos.

López (2017) en su investigación "Identificación y caracterización de los metabolitos secundarios específicos de *P. carpunya*, con acción anti fúngica" mediante dos métodos de extracción; macerado e hidrodestilación y empleado cuatro solventes (etanol comercial, etanol de caña, agua y hexano) identificaron, mediante un tamizaje fotoquímico la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas y quinonas.

2.3. COMBINACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES QUE SUGIEREN INTERACCIÓN ENTRE SUS COMPONENTES

El control de los agentes patógenos se hace cada vez más difícil debido especialmente al desarrollo de resistencia hacia los principios activos utilizados, frente a dicha situación, la investigación científica está orientada a la búsqueda de compuestos activos más efectivos contra los patógenos y a la vez más amigables con el medio ambiente, en este sentido, los extractos vegetales, junto a sus principios activos, son considerados una alternativa prometedora para controlar el efecto de los agentes patógenos (Scalvenzi et al., 2016).

Las plantas medicinales proporcionan extractos que por sí solos efectos antimicrobianos; sin embargo, su accionar se multiplica al trabajar en conjunto, potenciando así su efecto, lo que llamamos sinergia. Este sinergismo y los metabolitos de las plantas medicinales abarcan un amplio campo de investigación muy vasto, prometedor y complejo, debido a que algunas sustancias, al trabajar en conjunto, facilitando la asimilación de los biocompuestos y su biodisponibilidad, mientras que otras sustancias en cambio pueden ser antagónicas o a su vez pueden ayudar a evitar efectos secundarios en el organismo (Gómez et al., 2019).

De su lado, Jácome (2019) indica que actualmente existe una búsqueda de combinaciones de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando así la población microbiana, permitiendo con esto, productos más saludables, con menos aditivos, aunque se aclara que la velocidad de deterioro microbiológico no solo está en dependencia de los microorganismos presentes, sino también de la combinación química inherente del producto, así como del tipo de carga microbiana inicial.

Azahuanche et al. (2010) menciona que los estudios biológicos y fotoquímicos de plantas medicinales se reportan en forma individual pero muy poco sobre sus mezclas. Además, existe evidencia de que los curanderos folclóricos utilizaban recetas y formulaciones basadas en diferentes mezclas de extractos de plantas medicinales como remedios efectivos para curar o aliviar una determinada

enfermedad, lo que da campo para las numerosas mezclas que se pueden investigar. Los diferentes estudios efectuados sobre mezcla de extractos de plantas medicinales sugieren que existe sinergismos entre extractos.

Las plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que incluyen gran variedad de compuestos químicos cuya presencia varía de acuerdo a la familia, especie, localización geográfica y parte de la planta. Estos metabolitos pueden tener actividades biológicas sobre microorganismos (Jiménez y Mosquera, 2014). Buldain et al. (2017) consideran que los compuestos en mezcla de los aceites esenciales, se complementan entre sí para dar una potencia mayor a la suma de cada uno de los componentes; en este sentido, no se puede descartar la posibilidad de la formación de un nuevo compuesto.

Se han estudiado extractos naturales y/o aceites esenciales en combinación y se han encontrado resultados prometedores. También se han publicado patentes principalmente conteniendo aceites esenciales en combinación (Langeveld et al., 2014).

• TIPOS DE INTERACCIONES ENTRE EXTRACTOS VEGETALES

Ulrich (2014) menciona que pueden existir diferentes tipos de interacciones entre los componentes que forman parte de una combinación:

Sinérgica: es una interacción positiva, en la cual el efecto combinado de ambos componentes es mayor que la suma de los efectos individuales.

Antagónica: interacción de tipo negativa, en la cual el efecto combinado de ambos componentes es marcadamente menor que la suma de las contribuciones individuales.

Aditiva o indiferente: cuando entre los componentes de la mezcla no hay interacción, ya que el efecto de la combinación es igual a la suma de las contribuciones individuales.

2.3.1. MECANISMOS A TRAVÉS DE LOS CUALES SE PRODUCEN LAS INTERACCIONES SINÉRGICAS

Las respuestas sinérgicas pueden producirse a través de distintos mecanismos: (a) efectos sinérgicos multidiana, (b) efectos fisicoquímicos o farmacocinéticos, (c) supresión parcial o total de los mecanismos de resistencia y (d) neutralización o destrucción de un compuesto tóxico (Wagner & Ulrich, 2009).

Efectos sinérgicos multidiana: Zimmerman, et al. (2009) manifiesta que se producen cuando los constituyentes de una mezcla afectan no sólo una, sino varias dianas. Las combinaciones que afectan varios blancos simultáneamente, son menos propensas a desarrollar resistencia y aumentan la eficacia. Por ejemplo, aquellas combinaciones entre equinocandinas con azoles y polienos podrían ser sinérgicas debido a que afectan la pared y la membrana celular simultáneamente (Wagner, 2011).

Efectos fisicoquímicos o farmacocinéticos: Se producen cuando un extracto de la combinación afecta la biodisponibilidad del segundo (aumentando su solubilidad o ayudando a la primera droga a alcanzar su blanco). Por ejemplo, el alcaloide piperina, cuando está presente en una combinación, ha mostrado aumentar la biodisponibilidad de los otros componentes en la mezcla. También timol y/o carvacrol actúan como permeabilizadores de las membranas de los microorganismos, aumentando en forma sinérgica el efecto de los otros componentes (Spitzezer et al., 2017).

Supresión parcial o total de los mecanismos de resistencia: Sun et al. (2009) manifiestan que un buen ejemplo sobre esta interacción es el ácido retigérico de *Lobaria kurokawae* (Lobariaceae) que combinado con fluconazol, ketoconazol e itra mostró una fuerte potenciación frente a cepas de *C. albicans* resistentes a azoles, actuando como facilitador de la captación de azoles o como reparador del daño de la membrana asociado con la acción a estos compuestos.

Neutralización o destrucción de un compuesto tóxico: No es un efecto sinérgico propiamente dicho, sino que se produce cuando uno o varios constituyentes de la mezcla elimina un compuesto tóxico, logrando un menor daño en el huésped comparado con el extracto solo (Butassi, 2017).

2.3.2. ESTUDIO IN VITRO DE COMBINACIONES DE EXTRACTOS FRENTE A *S. aureus* Y *E. coli*

Valverde (2015) en su investigación referente a la inhibición de *S. aureus* y *E. coli* mediante aceites esenciales de diferentes materiales vegetales entre estos *P. carpunya* a nivel *in vitro*, mediante la técnica de difusión en agar, a una concentración de aceite esenciales de 40 mg/mL, demostraron una actividad bacteriana positiva contra los microorganismos patógenos *E. coli* y *S. aureus*.

Pastrana et al. (2017) estudiaron el efecto antimicrobiano de dos aceites esenciales (clavo de olor y canela) sobre los patógenos *E. coli* y *S. aureus* manejando como técnica el método difusión sobre agar. Los aceites estudiados bajo la metodología de difusión en agar Muller Hinton, en sus concentraciones más elevadas (100 y 150 mg/mL), mostraron efecto antimicrobiano sobre *E. coli* y *S. aureus*, clasificándose como sensibles frente a estos extractos.

Azuero (2016) en su investigación “Análisis del efecto antimicrobiano de 12 plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador” de entre las que se encuentra las especies *P. carpunya* y *M. charantia*, evaluaron la actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *S. aureus*. El análisis de bioactividad antimicrobiana a los extractos arrojó que las mismas exhibieron el crecimiento de estos patógenos. El efecto antibacteriano de las plantas medicinales contra la cepa *E. coli* comprobó que todas mostraron efecto obteniendo valores que de entre 6.9 mm hasta 10.2 mm.

Salamanca y Galiano (2016) en su investigación “Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Piper* y elucidación estructural de sus aceites esenciales” reportaron que el aceite esencial y extracto etanólico de *P. carpunya*

presentó halos de inhibición entre 13 y 16 mm frente a las cepas *S. aureus*. Estos mismos autores indican que en otras investigaciones de similares índoles, también han demostrado que el aceite esencial a las concentraciones de 10%, 50% y 75% de esta planta presentan ligera sensibilidad frente a *S. aureus*.

En el antes descrito estudio ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico de *P. carpunya* estudiados, presentaron actividad significativa frente a *E. coli*. En relación a la concentración mínima inhibitoria, el aceite esencial de *P. carpunya* presentó buena actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Jácome (2019) valoró el efecto antimicrobiano de tres aceites esenciales, canela (*Cinnamomum veru*), Jengibre (*Zingiber officinale*) y clavo de olor (*Syzguim aromaticum*) así como sus mezclas a nivel *in vitro* a través del método de difusión en agar Muller Hinton frente a patógenos como *S. aureus* y *E. coli*. El aceite esencial de canela a una concentración de 5 µL demostró la mayor capacidad de inhibición con 42,33 mm frente a *S. aureus* y 29,89 mm para *E. coli* en sus halos de inhibición.

Ortega (2018) en su investigación *in vitro* referente al efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) en *S. aureus* mediante el método de sensibilidad de discos, utilizaron concentraciones de aceite esencial de 10, 25, 50, 75 y 100% logrando inhibición (32.5 mm) en la mayor concentración, comprobando así, el efecto antimicrobiano frente al patógeno antes mencionado. Estos mismos autores establecieron la concentración mínima inhibitoria (CMI), estableciendo que, para el AE de orégano, es del 0.12% mientras que para el AE de tomillo de 0.25% frente a *S. aureus*.

Torres et al. (2008) en su investigación "Efecto sinérgico del aceite esencial del *O. vulgare* a la gentamicina en cultivos de *E. coli*" determinaron efecto sinérgico antibacteriano entre el aceite esencial de *O. vulgare* y la gentamicina mediante el método *in vitro* de Kirby Bauer estableciendo gentamicina y aceite esencial de orégano al 75%; y un grupo control. Los halos de inhibición del grupo experimental resultaron 22.375 mm, mayores que los del grupo control (20.75 mm) concluyendo

un efecto sinérgico antibacteriano *in vitro* entre el aceite esencial de *O. vulgare* y la gentamicina en *E. coli*.

Buldain et al. (2017) en su investigación “*Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de Melaleuca armillaris frente a S. aureus*” valoraron la interacción farmacodinámica establecida al combinar aceite esencial de *Melaleuca armillaris* con cloxacilina en busca de un efecto sinérgico que maximice la actividad del antibiótico frente a *S. aureus*. Las concentraciones del AE fueron desde 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ hasta 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los resultados demostraron una clara actividad antimicrobiana del aceite esencial frente a *S. aureus*.

2.3.3. TÉCNICA DE ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

- **PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)**

De acuerdo a Sabando (2020) la prueba cuantifica 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 de extractos que son: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio del agar. Se acondicionan en cajas de Petri, soluciones del extracto en diferentes concentraciones y los discos de papel de acuerdo al diámetro establecido, son sumergidos. La eficacia del extracto 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.

Este mismo autor indica que 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, existiendo varias categorías para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, la misma que es fundada en la respuesta *in vitro* que tiene un microorganismo frente a un antibiótico.

- **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
- **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 se concentre fisiológicamente en el tejido infectado. El punto de corte intermedio es de 8-16 $\mu\text{g/mL}$ y de 15-19 mm de diámetro de los halos de inhibición.
- **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.

2.4. MATERIAL DE LA INVESTIGACIÓN

2.4.1. *P. carpunya*

Descripción: Planta de unos 2-3 m. de alto con tronco nudoso, corteza externa con anillos horizontales. Posee ojas simples, dísticas y alternas, lanceoladas hasta elípticas, además, tienen con ápice acuminado, base aguda, de 9-14 cm de longitud y 4-7 cm de ancho, peciolo de 8-10 mm de longitud alargada en la base. Inflorescencias en espigas de color blanco a verde, erguidas, de 7 a 11 cm de longitud y 3 mm de diámetro, se agrupan densamente en bandas transversales con pedúnculo de 6- 8 mm de longitud. Flores pequeñas rodeadas por brácteas ovoides hasta redondas, corta y fuertemente fimbriadas en los márgenes; anteras con tecas de 0.2 mm de longitud, poseen estigmas largos y sésiles (Salamanca y Galiano, 2016).

- **Clasificación taxonómica:**

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Magnoliidae*

Orden: *Piperales*

Familia: *Piperaceae*

Género: *Piper*

Especie: *Piper carpunya*

Usos de la especie: Las hojas de *P. carpunya* son ampliamente utilizadas en la medicina popular de los países tropicales y subtropicales de América del Sur como antiinflamatorio, antiulceroso, antidiarreico y antiparasitario, así como para las dolencias de irritaciones de la piel. En la recolección, las hojas se muelen y se aplican sobre heridas, mismas que actúan como un desinflamante, adicionalmente con éstas se puede preparar un “caldo de carpundia” que es utilizado como digestivo, carminativo y antiflatulento. En infusión, estas hojas son tomadas por los pobladores como tratamiento para combatir resfríos y constipados. También es utilizada para el tratamiento de bronquitis (Salamanca y Galiano, 2016).

2.4.2. MELÓN AMARGO (*M. charantia*)

El melón amargo (*M. charantia*), conocido alrededor del mundo como; cundeamor, balsamin, calabaza amarga, pera del bálsamo, karela, papala, entre otros más, forma parte de la gran familia de los melones, calabazas y pepinos. La *M. charantia* es originaria de África, utilizada por todo el mundo como una planta alimenticia y medicinal, principalmente en la India, China, Malasia, Japón y el Sur de América.

M. charantia, se considera como una especie de planta tropical, la cual pertenece a la familia de las cucurbitáceas, también se caracteriza por ser la planta más amarga de todas las hortalizas, sin embargo, es ampliamente comercializado por su fruto comestible, el cual se lo consume crudo, cocinado, frito o curtido, de igual manera que sus raíces, flores y arilo de las semillas maduras (Semeniuk et al., 2018).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Química General y Microbiología de la carrera de Agroindustria en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” (ESPAM MFL), ubicada en el sitio El Limón, Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, con sus coordenadas: 0°49'27 Latitud sur, 80°10'47.2 Longitud oeste y una Altitud de 15 m.s.n.m (Espinoza & Mendieta, 2018). La fase analítica correspondiente a la cuantificación de los flavonoides totales en la mejor relación de extracto etanólico de hojas de pinku y melón amargo se llevó a cabo en los laboratorios LASA ubicado en Juan Ignacio Pareja Oe5 – 97 y Simón Cárdenas en la ciudad de Quito.

3.2. DURACIÓN

El presente estudio se desarrolló en el lapso de seis meses a partir de la aprobación del proyecto en el mes de enero hasta junio de 2021

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

FACTOR A: Relaciones de extractos vegetales

FACTOR B: Patógenos

3.3.1. NIVELES DE FACTOR

Los niveles del factor A y B se presentan en la tabla 1, indicando que las relaciones de los extractos de hojas de pinku y melón amargo, se plantearon en relación con 50 µg/mL, relación que además se utilizó por cada uno de los extractos como testigos para ayudar a determinar el tipo de interacción entre las relaciones.

Tabla 1

Niveles del factor

Código	FACTOR A Relación de extracto de pinku y melón amargo	Código	FACTOR B Patógenos
C ₁	37 – 13 µg/mL	S E	S. Aureus E. Coli
C ₂	18 - 32 µg/mL		
C ₃	25 - 25 µg/mL		
C ₄	32- 18 µg/mL		

3.4. TRATAMIENTOS

La combinación de los niveles de los factores en estudio dio como resultado ocho tratamientos, mismos que se muestran en la tabla 2, incluidos los testigos.

Tabla 2

Combinaciones de los niveles de los factores en estudio

Tratamientos	Codificación	Concentración de extracto de pinku y melón amargo respectivamente	Patógenos bacterianos en estudio
T1	C ₁ ·S	37 – 13 µg/mL	<i>S. aureus</i>
T2	C ₁ ·E	37 – 13µg/mL	<i>E. coli</i>
T3	C ₂ ·S	18 – 32 µg/mL	<i>S. aureus</i>
T4	C ₂ ·E	18 – 32 µg/mL	<i>E. coli</i>
T5	C ₃ ·S	25 – 25µg/mL	<i>S. aureus</i>
T6	C ₃ ·E	25 – 25 µg/mL	<i>E. coli</i>
T7	C ₄ ·S	32 - 18 µg/mL	<i>S. aureus</i>
T8	C ₄ ·E	32 – 18 µg/mL	<i>E. coli</i>
Testigo 1	Pinku	50 µg/mL	<i>S. aureus</i>
Testigo 2	Melón amargo	50 µg/mL	<i>E. coli</i>

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la evaluación de los datos relacionados a la variable de estudio, se empleó un arreglo factorial A*B analizado por la vía de un Diseño Completamente al Azar (DCA), con ocho tratamientos y tres réplicas por cada uno de estos. En la tabla 3 se muestra el esquema del análisis de varianza bifactorial A*B.

Tabla 3.

Esquema del ADEVA bifactorial

Fuente Variación	gl
Total	23
Factor A	3
Factor B	1
AB	3
Error	16

Por otra parte, en vista de los testigos manejados en la investigación (2), para su análisis de comparación en relación con los tratamientos, en la tabla 4 se presenta el esquema del análisis de varianza.

Tabla 4.

Esquema del ADEVA para tratamientos y testigos

Fuente Variación	gl
Total	35
Tratamientos	9
Error	26

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituida por 50 µg/mL entre extracto etanólico de pinku y melón amargo y una concentración de 30×10^5 UFC/mL de *E. coli* y *S. aureus* de acuerdo a los tratamientos, réplicas y testigos planteados.

3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en esta investigación se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

Es importante mencionar que, los procesos descritos a continuación referentes a la obtención de los extractos etanólicos de hojas de pinku y melón amargo, se realizaron por separado; sin embargo, se acogieron a la misma metodología de extracción.

3.7.1. PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PINKU Y MELÓN AMARGO

RECEPCIÓN Y CLASIFICACIÓN: Las hojas de pinku fueron obtenidas en Santo Domingo de los Tsáchilas en la comuna Chiguilpe, mientras que las de melón amargo se tomarán de la zona norte del cantón Tosagua. Se compilo 3 kg de material vegetal por cada planta y se procedió a realizar la recepción, limpieza y clasificación de las hojas pinku y melón amargo, seleccionando las hojas en mejor estado fitosanitario, libres de daños por insectos y plagas.

LAVADO: Una vez obtenido el mejor material vegetal para ambas variedades, este se lavó mediante inmersión en agua destilada con la intención de retirar impurezas y restos de suciedad, proceso que se repitió por tres ocasiones para cada variedad de planta.

DESECACIÓN: Tanto las hojas de pinku y melón amargo, fueron colocadas sobre papel absorbente para retirar el agua de las superficies de las hojas. Posteriormente, estas hojas se desecaron en una estufa Conterm LED digital a una temperatura de 60°C durante 20 min. Este procedimiento se realizó en base a la metodología de Sabando (2020).

MOLIDO DE MATERIAL VEGETAL: Por cada material vegetal se disminuyó el tamaño de partícula hasta obtener un polvo. Esto se realizó con una licuadora tomando en cuenta la ley de Fick, la cual 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 que, durante la destilación en el proceso de extracción, el etanol entrará en íntimo contacto con el tejido de las hojas.

PESADO: Reducido el tamaño de partícula de las hojas de pinku y melón amargo, se pesaron 5 g de estas en una balanza analítica marca Sartorius modelo CP2245 y se colocaron en un cartucho elaborado de papel filtro de papel filtro el cual se selló con grapas. Esto se realizó por cada variedad de planta y realizaron 5 cartuchos para obtener la cantidad de extracto necesario para el análisis *in vitro*.

MACERACIÓN, EXTRACCIÓN POR MÉTODO SOXHLET y EVAPORACIÓN: Se utilizó el método de maceración con la intención de extraer los principios activos sin someter los extractos a altas temperaturas por tiempos prolongados, considerando la existencia de principios activos termolábiles. Este proceso se realizó con cartuchos de 5 g de muestra (material vegetal) y 200 mL de etanol al 98% de pureza, maceración que se llevó a cabo en una estufa Conterm LED digital. durante 48 h a 30°C. Transcurrido este tiempo se trasvasó esta maceración al equipo Soxhlet marca GERMANY donde se utilizaron temperaturas de 150°C hasta lograr que el solvente (etanol al 98%) empezará a calentarse, así, los vapores ascendieron y se condensaron en el refrigerante, que luego cayó en el cuerpo extractor impregnando el material vegetal que se encontraba en el cartucho, arrastrando consigo los metabolitos secundarios. Los componentes del extractor se llenaron lentamente de líquido hasta que llegar al tope del sifón y después se descargó en el matraz, proceso que se conoce como sifonada, este procedimiento

se repitió automáticamente hasta que la extracción se completó, misma que realizó por cinco ocasiones por cada muestra de material vegetal.

Luego de tener el material vegetal en mezcla con el etanol, se procedió a ubicar en la estufa a una temperatura de 65°C hasta evaporar la mayor cantidad de etanol y así obtener el extracto.

ENVASADO: Obtenido los extractos por cada variedad, se envasaron en tubos de ensayos esterilizados y se envolvieron en papel aluminio para evitar que la luz altere las propiedades del extracto. Este almacenamiento se realizó a una temperatura de entre 4 y 7°C.

3.7.2. PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

ACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS *S. aureus* Y *E. coli*: Las cepas bacterianas fueron reactivadas y purificadas en medio de cultivo Agar nutriente, antes de su utilización debido a que venían de un proceso de almacenamiento a -18°C.

PREPARACIÓN DE INÓCULO BACTERIANO 0,5 EN ESCALA MCFARLAN: Una vez reactivadas las cepas bacterianas se procedió a preparar los inóculos por cada unidad experimental a una concentración de 30×10^5 UFC/mL. Esto para cada cepa en estudio, hasta su utilización, utilizando agua peptonada. Esto en relación a lo estipulado por Pastrana et al. (2017).

INOCULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS EN CAJAS DE PETRI: En el medio de cultivo Muller Hinton ya solidificado en las cajas Petri, se inocularon las cepas bacterianas a una concentración de 30×10^5 UFC/mL, esparcido homogéneamente por una espátula de Digrafsky.

INOCULACIÓN DE RELACIONES DE EXTRACTOS EN DISCOS: Transcurrido 15 minutos después de la inoculación de las bacterias, se procedió a colocar cuatro discos de papel filtro, mismos que contenían las relaciones de extractos establecidas, esto para cada tratamiento incluido sus réplicas. A más de esto, se llevaron a cabo pruebas *in vitro* por cada uno de los extractos como controles en el

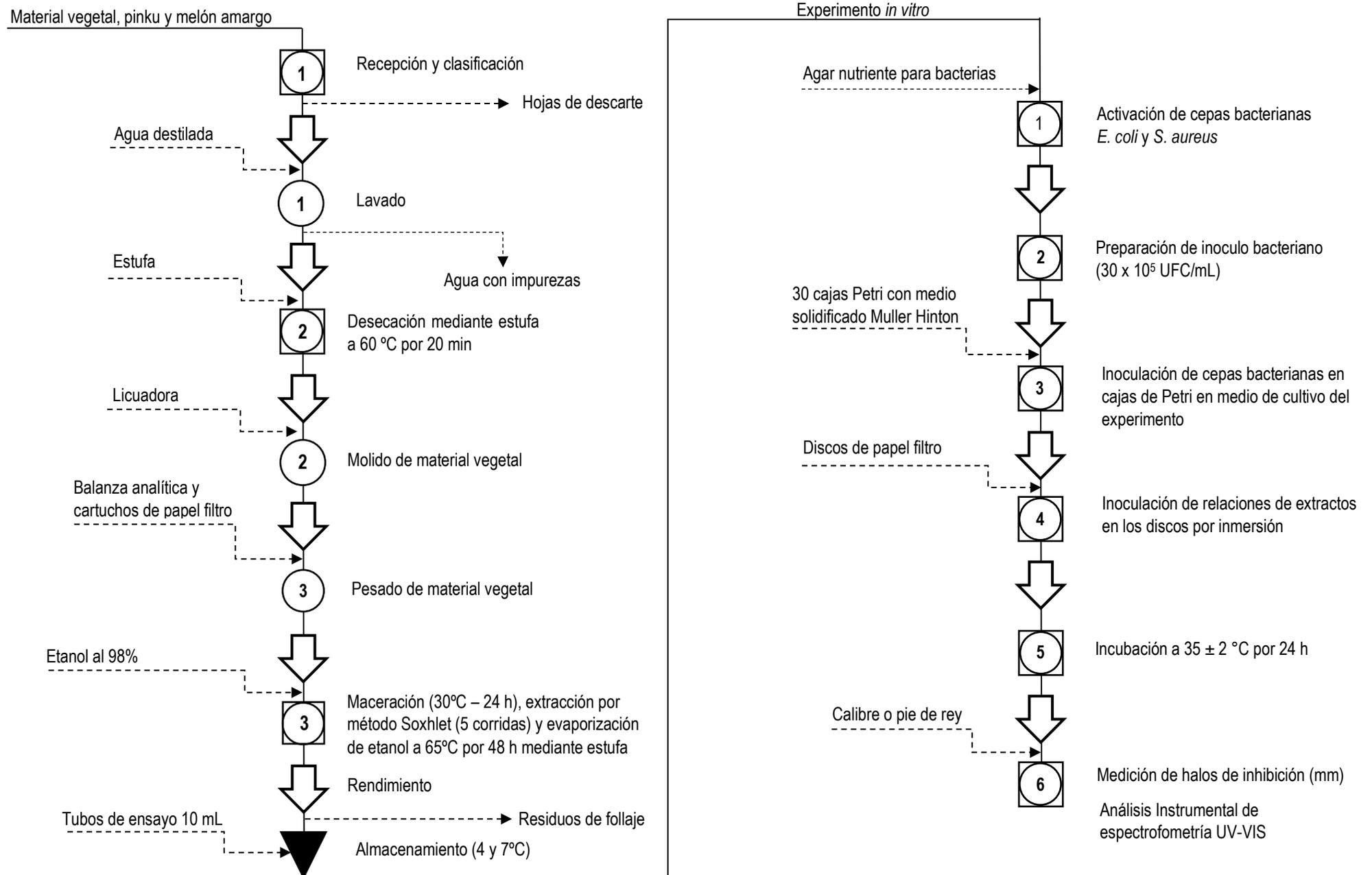
proceso, utilizando la concentración base (50 µg/mL) con la intención de determinar el tipo de interacción entre los extractos en mezcla.

INCUBACIÓN A $35 \pm 2^\circ\text{C}$ /24 h: Posteriormente, se introdujeron todas las unidades experimentales en una estufa (cajas Petri). Una vez transcurrido el tiempo establecido se procedió a medir la distancia de los halos de inhibición (mm) formados alrededor de los discos de papel filtro impregnados en las cajas con la ayuda de un calibrador Vernier.

3.7.3. DIAGRAMA DE PROCESO EN LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS Y EXPERIMENTO IN VITRO

Figura 1

Diagrama de proceso de extracción y experimento *in vitro*



3.9. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS

3.9.1. MÉTODOS APLICADOS EN LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Una vez obtenidos los materiales vegetales (hojas) de pinku y melón amargo (Anexo 1-A, 1-B), estos se sometieron a los siguientes métodos y técnicas descritos en la **tabla 5**.

Tabla 5

Métodos utilizados en la obtención de los extractos de hojas de pinku y melón amargo

MÉTODO	UNIDAD	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
MACERACIÓN	mL	Proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (material vegetal) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante (etanol al 98%) que son los que se extraen.	(Guayas et al., 2020)
SOXHLET	...	Basado en la diferencia de los puntos de ebullición entre el solvente y los metabolitos extraídos, se emplea un solvente orgánico con temperatura de ebullición relativamente baja	(Guayas et al., 2020)

3.9.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Con la finalidad de dar cumplimiento al primer objetivo específico planteado en la presente investigación se llevaron a cabo los procedimientos descritos a continuación:

- **REACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS *E. coli* Y *S. aureus***

Las bacterias *S. aureus* y *E. coli* fueron tomadas del cepario del laboratorio de Biología Molecular del área Agropecuaria y almacenadas a -18°C, las cuales, antes de su utilización, fueron reactivadas y purificadas en medio de agar nutritivo. Estos procedimientos se realizaron en los laboratorios de microbiología del área de Agroindustria de la ESPAM “MFL”.

- **PREPARACIÓN DE AGAR MULLER HINTON**

Para las pruebas *in vitro* se utilizó el medio de cultivo *Muller Hinton* (38 g/L), mismo que se disolvió en agua destilada y ajustó a las características de pH especificadas

por el fabricante (34 g en 1000 mL con pH 7.4 +/- 0.2). El medio de cultivo preparado se llevó a ebullición para su disolución y esterilización bajo presión a 121°C por 15 minutos (autoclave), para posteriormente ser adicionado en relación de 15 mL por caja de Petri hasta su solidificación.

- **ACTIVIDAD INHIBITORIA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)**

Este procedimiento se efectuó en cajas de Petri de 90 x 16 mm en condiciones *in vitro* donde se evaluó el poder de inhibición de los extractos etanólicos en mezcla de pinku y melón amargo. En primera instancia, se inocularon los patógenos *E. coli* y *S. aureus* por separado, sobre la superficie del agar Muller Hinton a una concentración de 0,5 patrón de McFarland. Posteriormente, transcurridos 15 min se impregnaron las relaciones de los extractos de pinku y melón amargo establecidas por inmersión (ver anexo 2-C, 2-D) en discos estériles de papel filtro (NM 615. Ø 125 mm) de 5 mm de diámetro, cuatro por cada unidad experimental y se colocaron sobre la superficie de la placa de agar donde previamente habían sido inoculados los patógenos descritos anteriormente. Esto, de acuerdo con cada tratamiento y sus réplicas en estudio, basado en la técnica de Pastrana et al. (2017).

El procedimiento descrito anteriormente también se aplicó a cada uno de los extractos por separado, utilizando la relación 50 µg/mL, tomada como base para establecer las mezclas. Esto con la intención de determinar el tipo de interacción que produce la mejor relación de extractos etanólicos de pinku y melón amargo en relación a la inhibición de *E. coli* y *S. aureus*.

Culminado el proceso para cada uno de los tratamientos incluidos el análisis *in vitro* para cada extracto, todas las cajas Petri fueron incubadas de manera invertida a 35 ± 2°C durante 24 h, posteriormente se midieron los halos de inhibición (mm) formados alrededor de los discos con la ayuda de un calibrador Vernier.

3.9.3. MÉTODOS QUÍMICOS

- **ESPECTROFOMETRÍA UV-VIS**

Con la finalidad de dar cumplimiento al tercer objetivo específico planteado en esta investigación, se determinaron los flavonoides totales presentes en la mejor relación de extracto etanólico de hojas de pinku y melón amargo; para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrofotómetro de masas, las corridas cromatográficas se hicieron en una columna no polar, con el propósito de obtener resultados cualitativos y cuantitativos del respectivo compuesto.

3.10. VARIABLE RESPUESTA Y MÉTODO DE EVALUACIÓN

Las principales variable respuesta fueron:

- Diámetro de los halos de inhibición (mm) de las relaciones de extracto de pinku y melón amargo frente a *E. coli* y *S. aureus*
- Tipo de interacción entre el extracto de pinku y melón amargo (mejor relación)

La inhibición de la relación entre el extracto de pinku y melón amargo se demostró por la distancia de la zona de inhibición formada alrededor del disco, mismo que se midió en milímetros, utilizando un calibrador Vernier.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los datos de la principal variable respuesta (diámetro de los halos de inhibición (mm)), se les efectuó los supuestos del ADEVA, normalidad con el test estadístico de Shapiro - Wilk y Homogeneidad con el de Levene.

De acuerdo con los resultados estadísticos, se realizaron pruebas paramétricas, ADEVA y Tukey al 5% de error.

Los análisis antes mencionados se realizarán en el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 21 (Sabando, 2020).

Se utilizaron gráficos de cajas y bigotes para estimar las medias de los niveles del factor B y gráficos de barras para las medias de los tratamientos, utilizando el programa Microsoft Excel 2016.

A la variable respuesta (diámetro de los halos de inhibición (mm)) de los tratamientos y los testigos, se les efectuó el supuesto del ADEVA de Shapiro – Wilk.

Posteriormente, las diferencias entre tratamientos y testigos fueron estimados mediante la prueba no paramétrica de Friedman.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO INHIBITORIO DE LA MEZCLA DE EXTRACTO DE HOJAS DE PINKU Y MELÓN AMARGO

Como se muestra en la tabla 6, en la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk), no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las medias de la variable respuesta, es decir que, los diámetros de los halos de inhibición (mm) de las relaciones de extracto etanólico de hojas de pinku y melón amargo sobre las cepas bacterianas *S. Aureus* y *E.coli*, se distribuyen de manera normal.

Tabla 6

Prueba de normalidad para los diámetros de los halos de inhibición

Variable respuesta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de los halos de inhibición (mm)	0,952	24	0,303

A raíz de los resultados anteriores, se comprobó la homogeneidad (Levene) de los datos de la variable respuesta, demostrando que la varianza de la variable dependiente es la misma en el conjunto de la población definida por la combinación de los factores ($p > 0,05$), tal y como se observa en la tabla 7.

Tabla 7

Prueba de homogeneidad para los diámetros de halos de inhibición

Test de Levene			
Variable dependiente: Diámetro de halos de inhibición (mm)			
F	df1	Df2	Sig.
1,067	11	24	,425

Como se presenta en tabla 8 existe variabilidad significativa ($p < 0,05$) en los efectos principales del modelo estadístico, donde el factor A (Relaciones de extractos vegetales) presenta diferencias significativas ($p < 0,05$), es decir, en sus niveles, incidió sobre la variable respuesta, lo que ciertamente fue así, debido a que en la prueba *in vitro* de Kirby- Bauer, se demostró que todas las relaciones de extractos etanólicos de pinku y melón amargo propuestas, presentaron mm de inhibición diferentes, mismo que se pone de evidencia en el anexo 3.

Por otra parte, el Factor B (Patógenos), también presentó diferencias significativas en todos sus niveles ($p < 0,05$), lo que demostró que las bacterias utilizadas en esta investigación (*S. Aureus* y *E.coli*) incidieron sobre la capacidad inhibitoria de la combinación de los extractos de pinku y melón amargo, lo cual se vio reflejado en los mm de los halos de inhibición presentado por un patógeno y otro, aun cuando se utilizaron las mismas relaciones de extractos y condiciones en las pruebas *in vitro* (ver anexo 3). En cuanto a la interacción de ambos factores, el análisis (ADEVA) demostró que este efecto lleva asociado un nivel crítico significativo ($p < 0,05$), lo cual indicó que la relación de los extractos y los patógenos, poseen un efecto explicativo sobre la variable respuesta (diámetro de halos de inhibición mm).

Tabla 8.

Prueba de los efectos inter – sujetos en relación a la variable dependiente (ADEVA)

Variable dependiente: Diámetro de halos de inhibición (mm)

Origen	gl	Tipo III de suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
Factor A: Relaciones de extractos	3	9,750	3,250	28,364	,000
Factor B: Patógenos	1	8,167	8,167	71,273	,000
Relaciones de extractos * Patógenos	3	,250	1,044	,727	,000
Error	16	1,833	,115		
Total	24	1754,000			

a. R al cuadrado = ,908 (R al cuadrado ajustada = ,868)

Para demostrar las diferencias entre los niveles del factor A (relaciones de extractos vegetales), se utilizó la prueba de Tukey al 5% de error, mismo que se muestra en la tabla 9, donde la relación de extracto de 37 $\mu\text{g/mL}$ de pinku + 13 $\mu\text{g/mL}$ de melón amargo (T1 y T2), se ubicó en el primer subconjunto con la mayor media de inhibición ($>$ mm de halos), mientras que en el subconjunto 2 se posicionaron las relaciones de: 32 $\mu\text{g/mL}$ + 18 $\mu\text{g/mL}$ (T7 y T8) y 25 $\mu\text{g/mL}$ + 25 $\mu\text{g/mL}$ de pinku y melón amargo (T5 y T6), las cuales comparten categorías, indicando que no existen diferencias significativas entre sus medias, dejando a la relación 18 $\mu\text{g/mL}$ de pinku + 32 $\mu\text{g/mL}$ (T3 y T4) con la menor media de inhibición ($<$ mm de halos).

Tabla 9.

Subconjuntos homogéneos para los niveles el factor A

Variable dependiente: Diámetro de halos de inhibición (mm)				
DHS de Tukey				
Combinaciones pinku + melón amargo	N	Subconjunto		
		1	2	3
18 µg/mL de pinku + 32 µg/mL de melón amargo	6	7,5833		
25 µg/mL de pinku + 25 µg/mL de melón amargo	6		8,3333	
32 µg/mL de pinku + 18 µg/mL de melón amargo	6		8,75	
37 µg/mL de pinku + 13 µg/mL de melón amargo	6			9,3333
Sig.		1	0,185	1

En los resultados obtenidos se pudo comprobar que las relaciones que tenían en mayor proporción el extracto de pinku presentaron mayor capacidad de inhibición frente a los patógenos estudiados en esta investigación, mismo que podría estar relacionado con los metabolitos secundarios y la cantidad de estos presentes en este extracto (pinku), tal y como lo indica López (2017), quien indica que en la especie *Piper carpunya* (pinku), se han determinado compuestos como: lignanos, neolignanos, piperolidas, flavonas y flavonona, mismos que han ejercido una actividad antimicrobiana en patógenos Gram positivos y negativos.

Esto concuerda con lo estipulado por Salamanca y Galiano (2016) en su investigación "Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Piper* y elucidación estructural de sus aceites esenciales" donde realizaron un análisis fitoquímico al aceite esencial de *P. carpunya* (pinku) encontrando metabolitos secundarios abundantes de antraquinonas (++) , así como de taninos (++) y muy abundante de flavonoides (+++). Compuestos que según estos autores ejercieron una actividad inhibidora importante sobre *S. aureus* y *E.coli*, con halos de inhibición de entre 10 y 18 mm.

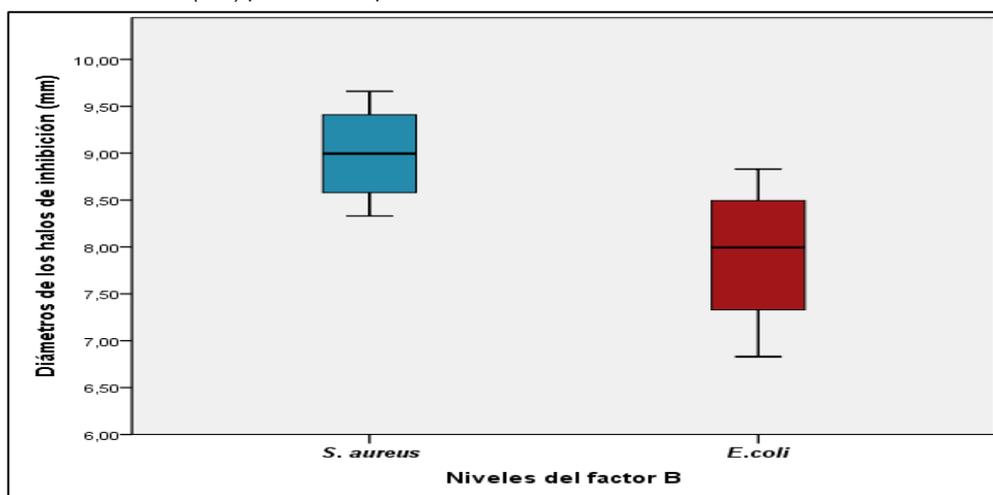
Por su parte López (2017) indica que, en la especie *Piper carpunya*, se han determinado algunos metabolitos secundarios, de entre los que destacan los flavonoides, mismos que han ejercido una actividad antimicrobiana en patógenos gram positivos y negativos, lo cual es corroborado por Medina et al. (2019), quien asegura que, compuestos aislados en la especie *Piper carpunya* como: lignanos, neolignanos, piperolidas, flavonas y flavonona, han demostrado una actividad antimicrobiana sobre bacterias patógenas.

Por otra parte, en el extracto etanólico de *M. charantia*, conocida también como melón amargo, Maulide (2012), en su investigación relacionada a la inhibición *in vitro* de patógenos como *S. aureus* y *E.coli*, logró identificar cualitativamente en las hojas compuestos como: flavonoides, taninos, resinas, saponinas y alcaloides, sin especificar el tipo de compuesto del que se trata; sin embargo, estos mismo autores destacan que las cantidades de estos metabolitos secundarios son escasas en esta parte de la planta (hojas), por lo que la poca disponibilidad de estos compuestos pudo influir en que este extracto presentara menor capacidad de inhibición en comparación con el extracto de pinku, condicionando así, las relaciones que conformaban los tratamientos que poseían *M. charantia* (melón amargo), lo cual se lo puede corroborar viendo el anexo 3.

En relación a los efectos del factor B, específicamente a las diferencias entre sus niveles (patógenos) en relación a la variable respuesta (diámetro de halos de inhibición (mm)), en la figura 2 se presenta las medias de inhibición dadas para cada una de las bacterias, donde claramente *S. aureus* y *E.coli* condicionaron la capacidad de inhibición de las relaciones de los extractos etanólicos de pinku y melón amargo; sin embargo, se observa que la *E. coli* ejerció mayor resistencia (7,91 mm) frente a las diversas relaciones de extractos, presentando menores medias de inhibición en comparación a los de *S. aureus* (8,99 mm).

Figura 2

Medias de inhibición (mm) presentados por *S aureus* Y *E. coli*



Los resultados *in vitro* demostraron que la bacteria *E.coli* mostró mayor resistencia (< mm en los halos) que la *S. Aureus*, aun cuando fueron evaluadas bajo las

mismas dosificaciones de extractos, llegando incluso a utilizar una misma concentración de patógenos para ambos casos de: 30×10^5 UFC/mL. De este modo, esta resistencia se atribuye a la estructura celular y comportamientos inherentes de esta bacteria hacia los extractos, recordando además que los patógenos objeto de estudio en esta investigación, son diferentes, siendo así la bacteria *E.coli*, Gram negativa y la *S. aureus*, Gram positiva.

De acuerdo a Padgett et al. (2011) todas las bacterias, tanto *S. aureus* como *E. coli* son capaces de desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos. Entre los mecanismos que ejercen esta resistencia, los adquiridos y transmisibles son los más importantes y se basan en la producción de enzimas que inactivan estos agentes (antimicrobianos). Estos mismos autores indicaron que una cepa bacteriana puede desarrollar diversos mecanismos de resistencia frente a los agentes inhibidores y del mismo modo, estos pueden ser inactivados por distintos procesos.

Es así que, Rodríguez et al. (2014) en su investigación donde estudiaron las mismas bacterias (*S. aureus* y *E.coli*) a nivel *in vitro* utilizando extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis*, encontraron que este patógeno Gram negativo (*E. coli*) tiene una pared con naturaleza hidrófoba, es decir, actúa como barrera de difusión a moléculas grandes lo que le otorga mayor impermeabilidad, a esto se le agrega que dicha resistencia frente a los extractos podría deberse a la presencia de un material extracromosómico; en cambio las Gram positivas (*S. aureus*) muestran mayor sensibilidad a los productos en función a la permeabilidad que ofrecen sus envolturas (pared celular y membrana citoplásmica). Esta última afirmación explicaría porque la bacteria *S.aureus* en esta investigación, mostró mayor sensibilidad en presencia de los extractos de pinku y melón amargo.

De igual forma, Corzo, (2012) en su investigación "Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium Kunt*" llegó a la misma deducción, enfatizando que los mecanismos de resistencia de la bacteria *E. coli* pueden presentarse como alteración de la disminución en la permeabilidad de la pared celular por poseer una pequeña capa de peptidoglicano. De la misma manera Pérez et al. (2021) en su investigación referente a la "Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico crudo de las hojas de *Origanum vulgare*, en contraste

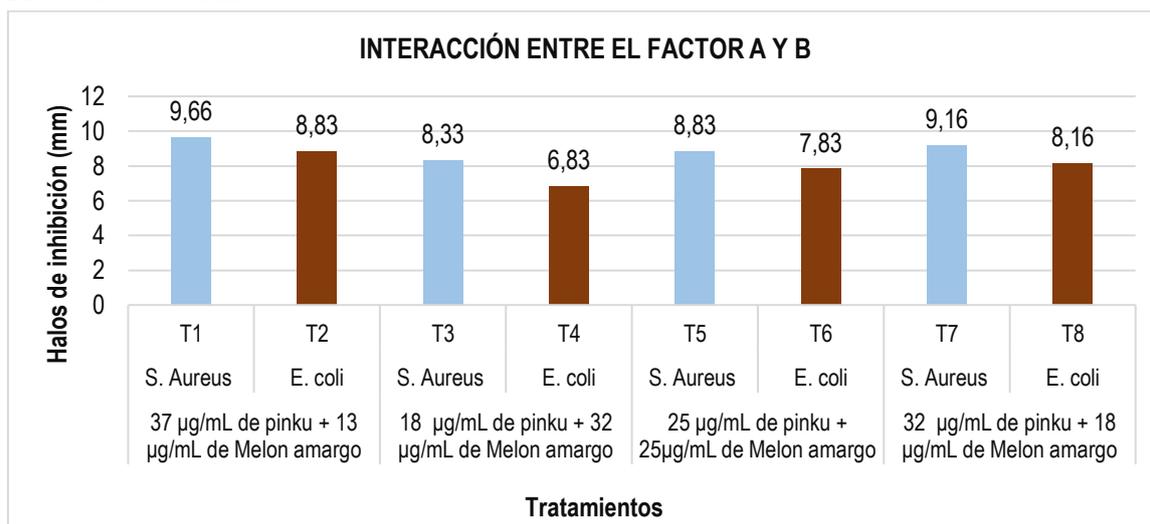
con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, y *Escherichia coli* ATCC 25922" observaron que las cepas Gram negativas ofrecen menor susceptibilidad frente a los agentes antimicrobianos.

Por lo antes expuesto se reitera la resistencia de la bacteria *E.coli* frente a las relaciones de extractos etanólicos establecidas y no se puede decir que esto solo está relacionado a los diferentes metabolitos secundarios presentes en el extracto de pinku y melón amargo, sino también a la naturaleza misma de cada una de las bacterias, debido a que, como se mencionó anteriormente, se manejaron iguales relaciones y condiciones en las pruebas *in vitro*.

En la figura 3 se puede evidenciar las medias de los diámetros de inhibición de los halos calculados en cada subgrupo resultante de combinar cada nivel de los factores A y B, donde se reitera que la relación de 37 µg/mL de pinku + 13 µg/mL de melón amargo es la que mayor capacidad inhibitoria presentó frente a los dos patógenos.

Figura 3

Diferencias entre tratamientos



Valverde (2015) en su investigación referente a la inhibición de *S. aureus* y *E. coli* mediante aceites esenciales de diferentes materiales vegetales entre estos, *P. carpunya* a nivel *in vitro*, mediante la técnica de difusión en disco, a una concentración de aceite esencial de 40 mg/mL, demostró una actividad bacteriana positiva contra los microorganismos patógenos en estudio, con halos de inhibición de aproximadamente 12mm, valores que no solo concuerdan con los de esta

investigación, sino que además pone en evidencia la capacidad de inhibición del extracto de pinku, debido que a mayor proporción de este en la relaciones que conformaban los tratamientos, se observó mayores diámetros en los halos de inhibición (>mm).

Por otra parte, Pastrana et al. (2017) estudiaron el efecto antimicrobiano de dos aceites esenciales (clavo de olor y canela) sobre *E. coli* y *S. aureus* utilizando el mismo método *in vitro* y en sus concentraciones más elevadas (100 y 150 mg/mL), mostraron efecto antimicrobiano sobre estas bacterias (*E. coli* y *S. aureus*), con halos de inhibición de entre 10 y 15 mm, presentando más sensibilidad en la bacteria *S. aureus*, lo cual concuerda con lo reportado en la presente investigación donde se dio mayor inhibición para esta misma bacteria aun cuando se utilizaron las mismas dosificaciones para ambos patógenos (*S. aureus* y *E. coli*).

Por su parte, Azuerdo (2016) en su investigación “Análisis del efecto antimicrobiano de 12 plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador” de entre las que se encontraba las especies *P. carpunya* y *M. charantia*. En el efecto antibacteriano determinó que estos patógenos a una concentración de 40 mg/mL de cada uno estos extractos, presentaron sensibilidad con valores que van desde 6.9 hasta 10.2 mm respecto a los halos de inhibición, donde se demostró que la bacteria *E. coli*, debido a la impermeabilidad de su pared celular, presentó resistencia frente a estos extractos y dosificaciones, lo cual concuerda con lo reportado en este estudio donde de la misma manera la *E. coli* desarrolló menor susceptibilidad frente a los extractos vegetales de pinku y melón amargo.

Así mismo, Jácome (2019) estudio el efecto inhibidor de tres aceites esenciales: Jengibre (*Zingiber officinale*), canela (*Cinnamomum veru*) y clavo de olor (*Syzguim aromaticum*) a nivel *in vitro* mediante el método de difusión en agar frente a patógenos como *S. aureus* y *E. coli*. El aceite esencial de canela a una concentración de 5 µL demostró la mayor capacidad de inhibición con 42,33 mm frente a *S. aureus* y 29,89 mm para *E. coli* en sus halos, donde se sigue viendo esa diferencia entre estas bacterias por lo que se puede decir, que estas conjeturas y afirmaciones coinciden con las de esta investigación, en relación a los patógenos.

4.2. COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS FRENTE A LOS TESTIGOS

Para demostrar las diferencias entre los tratamientos y los testigos en relación con el diámetro de los halos de inhibición (mm), se utiliza la prueba paramétrica de Dunnett; sin embargo, antes de esto se realizaron los supuestos del ADEVA, donde el test estadístico de Shapiro-Wilk indicó que los datos de la variable respuesta para los tratamientos y los testigos, eran estadísticamente significativos ($p < 0,05$), mismo que se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Prueba de normalidad (tratamientos y testigos)

Variable respuesta	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Diámetros de inhibición (mm)	0,885	36	0,001

En vista de que no se cumplieron los supuestos del ADEVA, estos datos pasaron a ser analizados mediante la prueba alternativa no paramétrica de Friedman para muestras relacionadas, misma que mediante el análisis de hipótesis, demostró diferencias entre los tratamientos y los testigos (ver anexo 4), las cuales, mediante subconjuntos homogéneos, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11

Subconjuntos homogéneos de las medias de los tratamientos y testigos

SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS DE FRIEDMAN				
Categorización de tratamientos y testigos	Subconjunto			
	1	2	3	4
T4(18 µg/mL p+ 32 µg/mL m.a) - <i>E.coli</i>	6,83			
T6(25 µg/mL p + 25 µg/mL m.a) - <i>E.coli</i>	7,83	7,83		
T8(32 µg/mL p + 18 µg/mL m.a) - <i>E.coli</i>	8,16	8,16		
Testigo melón amargo (50 µg/mL) - <i>E.coli</i>	8,16	8,16	8,16	
T3(18 µg/mL p + 32 µg/mL m.a) - <i>S.aureus</i>	8,33	8,33	8,33	
T2(37 µg/mL p + 13 µg/mL m.a) - <i>E.coli</i>	8,83	8,83	8,83	8,83
Testigo melón amargo (50 µg/mL) - <i>S.aureus</i>	8,83	8,83	8,83	8,83
T5(25 µg/mL p + 25 µg/mL m.a) - <i>S.aureus</i>	8,83	8,83	8,83	8,83
Testigo pinku (50 µg/mL) - <i>E.coli</i>		9,16	9,16	9,16
T7(32 µg/mL p+ 18 µg/mL m.a) - <i>S.aureus</i>		9,16	9,16	9,16
T1(37 µg/mL p + 13 µg/mL m.a) - <i>S.aureus</i>			9,66	9,66
Testigo pinku (50 µg/mL) - <i>S.aureus</i>				12,16

Los subconjuntos homogéneos se basan en significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Cada casilla muestra el rango de media de muestras.

p. (extracto de pinku); m.a (extracto de melón amargo)

En la categorización mediante subconjuntos homogéneos, el testigo se pinku se posicionó en la categoría 4 con la mayor media de inhibición para la bacteria *S. aureus* (12,16); sin embargo, compartió categorías con los tratamientos T2, T5, T7, T1 y los testigos de melón amargo para *S. aureus* y pinku para *E. coli*.

Esta categorización corroboró lo demostrado en las pruebas *in vitro*, donde se evidenció que cuanto mayor era la proporción del extracto de pinku en las relaciones que conformaban los tratamientos, mayor inhibición se daba (> mm de inhibición) frente a los patógenos, lo cual además se comprobó con los testigos que hacían referencia a estos extractos por separado bajo las mismas dosis y condiciones, donde el de pinku en relación al de melón amargo, presentó mayor capacidad inhibitoria frente a las bacterias *S.aureus* y *E. Coli*. Estas diferencias inhibitorias entre los extractos y, por ende, tratamientos y testigos, se pudo deber a tres factores principales como: el tipo de patógeno a inhibir, los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos y la cantidad de estos, enfatizando que estos fueron evaluados bajo las mismas circunstancias.

El primero de estos factores fue probado anteriormente; donde ya se indicó que las bacterias Gram negativas, presentan mayor resistencia a los agentes inhibidores (*E.coli*); sin embargo, el tipo de metabolito secundario y la cantidad de estos presentes en los extractos, también es determinante y en apartados anteriores, se mencionó que el extracto de pinku al parecer, presentó una mayor cantidad de metabolitos aun cuando se trata del mismo compuesto. Estas afirmaciones se pueden confirmar si se observa las medias de los diámetros de los halos de inhibición de los testigos que se muestran en la tabla 11, donde se puede observar que, a una misma dosificación para cada uno de los extractos, ambos presentan diferencias inhibitorias.

4.3. TIPO DE INTERACCIÓN ENTRE LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO DE PINKU Y MELÓN AMARGO

En la figura 4 y 5 se presentan las diferencias cualitativas de inhibición (diámetros) de las relaciones de extractos etanólicos de hojas de pinku y melón amargo que hacen referencias a los diferentes tratamientos (centro), donde además se puede

apreciar las diferencias entre estos y los testigos (M y P), lo cual fue determinante para determinar el tipo de interacción dada entre estos extractos.

Figura 4

Halos de inhibición de los tratamientos t1, t2, t3 y t4 en contraste con los testigos



Nota. Método de difusión en disco. En las cajas Petri se observa la distribución de los diferentes discos con los extractos. En el centro (T) se presenta el tratamiento con la relación de extracto combinado. (P) testigo 1, pinku. (M) testigo 2, melón amargo. (-) control negativo

Figura 5.

Halos de inhibición de los tratamientos t5, t6, t7 y t8 en contraste con los testigos



Nota. Método de difusión en disco. En las cajas Petri se observa la distribución de los diferentes discos con los extractos. En el centro (T) se presenta el tratamiento con la relación de extracto combinado. (P) testigo 1, pinku. (M) testigo 2, melón amargo. (-) control negativo.

De acuerdo a Ulrinch (2014), existen tres diferentes tipos de interacciones entre los componentes que forman parte de una combinación. En primera instancia se puede dar sinergismo, mismo que hace referencias a una interacción positiva, en la cual el efecto combinado de ambos componentes es mayor que la suma de los efectos individuales. Por otra parte, está la interacción antagónica, la cual es de tipo negativa, ya que explica que, el efecto combinado de ambos componentes es marcadamente menor que la suma de las contribuciones individuales y finalmente está la aditiva, la cual indica que cuando entre los componentes de la mezcla no hay interacción, el efecto de la combinación aparte es igual a la suma de las contribuciones individuales.

De las cuatro combinaciones de extracto etanólico establecidas la de 37 µg/mL de pinku+ 13 µg/mL melón amargo, fue la que mayor diámetro de inhibición presentó en el contraste con la bacteria *S.aureus* (T1-9,66 mm), sin embargo, estos diámetros no fueron mayores que los demostrados por el testigo de pinku para el mismo patógeno (12,16 mm). Por otra parte, lo que respecta al testigo de melón amargo, éste presentó menor capacidad inhibitoria en comparación al testigo antes mencionado, incluso a la mejor relación. En este sentido y de acuerdo a lo establecido por Ulrinch (2014) anteriormente, el tipo de interacción formada por las combinaciones de estos extractos en esta investigación, fue aditiva, debido a que, el efecto de la combinación entre el extracto de pinku y melón amargo, es aparentemente igual a la suma de las contribuciones de forma individual.

La interacción de las combinaciones pudo ser antagónica de acuerdo a las conceptualizaciones antes presentadas, ya que esta se da cuando el efecto combinado de ambos extractos es marcadamente menor que la suma de las contribuciones individuales; sin embargo, no se cumplió esta condición debido a que la diferencia en los diámetros de los halos de inhibición entre los tratamientos y los testigos no fueron marcada y de hecho, en algunas comparaciones los tratamientos presentan una mayor inhibición en relación al testigo de melón amargo por lo que se reitera que la interacción dada entre los extractos, fue aditiva. En este sentido y en vista de los resultados dados, se rechaza la hipótesis planteada en la presente investigación, donde se esperaba una interacción sinérgica

4.4. CONTENIDO FENÓLICO EN LA MEJOR RELACIÓN DE EXTRACTO DE PINKU Y MELÓN AMARGO

En la determinación de flavonoides totales por espectrometría UV – VIS a la mejor relación de extracto etanólico de pinku y melón amargo (37 µg/mL de pinku + 13 µg/mL), se cuantificó un total de 92 mg/L EQ de estos compuestos (ver anexo 5). Donde más del 50% de estos metabolitos secundarios fueron otorgados por el extracto de pinku al estar en mayor proporción (37 µg/mL) y además por lo manifestado anteriormente por Salamanca y Galiano (2016), quienes mediante análisis fitoquímico encontraron abundante composición de flavonoides (+++), no así para el extracto de melón amargo, debido a que según Maulide (2012), aunque

se ha logrado identificar cualitativamente en las hojas compuestos como flavonoides, esto no se encuentran en abundancia; sin embargo, no se descarta la presencia de otros compuestos que también se han reportados como abundantes en estos extractos, tales como: taninos, antraquinonas (pinku) y saponinas, alcaloides (melón amargo).

La composición de metabolitos secundarios en los extractos y sobre todo en la combinación es de suma importancia debido a que esto está relacionado con la interacción entre estos, sobre todo con la sinérgica, debido a que, según Wagner & Ulrich, (2009), este efecto está asociado a cuatro factores, entre los que se destaca: efectos sinérgicos multidiana y efectos fisicoquímicos o farmacocinéticos.

De acuerdo a Zimmerman et al. (2009), el primero de estos factores se produce cuando los constituyentes de una mezcla (metabolitos secundarios) afectan no sólo una diana, sino varias dianas. Las combinaciones de metabolitos que afectan varios blancos simultáneamente, son menos propensas a desarrollar resistencia y aumentan la eficacia. Por ejemplo, las combinaciones de equinocandinas (antimicóticos) con azoles y polienos podrían ser sinérgicas ya que afectan la pared y la membrana celular del microorganismo simultáneamente. Esto explica porque el extracto de pinku ejerció mayor inhibición, debido a que sus componentes estuvieron en mayor proporción; sin embargo, no fueron suficiente para afectar varias dianas simultáneamente. Esto también se asocia a que el extracto de melón amargo no aportó los suficientes metabolitos por lo que la dosificación es de suma importancia en estos procesos.

Por otra parte, Spitezer et al. (2017) indica que los efectos fisicoquímicos o farmacocinéticos relacionados a las interacciones positivas, se producen cuando un extracto de la combinación afecta la biodisponibilidad del segundo (aumentando su solubilidad o ayudando a la primera droga a alcanzar su blanco). Por ejemplo, el alcaloide piperina, cuando está presente en una combinación, ha mostrado aumentar la biodisponibilidad de los otros componentes en la mezcla. También timol y/o carvacrol actúan como permeabilizadores de las membranas de los microorganismos, aumentando en forma sinérgica el efecto de los otros

componentes. En esta investigación, tampoco se descarta esta probabilidad entre el extracto de pinku y melón amargo, recordando que estos extractos no solo poseen flavonoides, incluso, en uno de ellos (melón amargo) se ha identificado alcaloides, pero se enfatiza que la dosificación del extracto sigue siendo determinante.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- En el análisis *in vitro* por el método de difusión en disco probando cuatro relaciones de extractos etanólicos de hojas pinku y melón amargo (tratamientos), se obtuvo una mayor capacidad de inhibición (mm) frente a *S. aureus* y *E. coli* en la de 37 µg/mL de pinku y 13 µg/mL de melón amargo correspondiente al tratamiento 1 (9,66 mm) y 2 (8,83 mm).
- El testigo de pinku en relación de 50 µg/mL presentó los mayores halos de inhibición en esta investigación para la bacteria *S. aureus* con una media de 12,66 mm de diámetro.
- El tipo de interacción formada por la combinación entre los extractos etanólicos de pinku y melón amargo frente a *S. aureus* y *E. coli* fue aditiva, por lo que se rechazó la hipótesis planteada en la presente investigación donde se pretendía una interacción sinérgica.
- El contenido de flavonoides totales presentado por la mejor relación de extractos etanólicos de 37 µg/mL de pinku y 13 µg/mL de melón amargo, fue de 92 mg/L EQ, cantidad que en su mayoría fue aportada por el extracto de *P. carpunya* (pinku).

5.2. RECOMENDACIONES

- La relación de extracto etanólico de 37 µg/mL de pinku y 13 µg/mL puede ser utilizada en la inhibición de patógenos Gram positivos como *S. aureus*.
- Estudiar el uso de extractos de pinku y melón amargo obtenidos mediante otros métodos de extracción que permitan obtener mayores rendimientos de sus metabolitos secundarios y otras concentraciones para obtener una mayor capacidad de inhibición frente a patógenos Gram positivos y negativos.

- El uso de extracto de pinku en otras concentraciones, superiores a 50 µg/mL sería una gran alternativa en la inhibición de patógenos debido que presentaría una mayor capacidad de inhibición frente a patógenos positivos y negativos.
- El uso de concentraciones de bacterias o bien el estándar de McFarland frente a análisis *in vitro* es de suma importancia al momento de determinar el efecto inhibitorio de uno o más extractos frente a patógenos.
- La capacidad de inhibición del extracto etanólico de pinku, siempre y cuando se compruebe que no es un riesgo para la salud del ser humano, es una alternativa no solo para el sector agroindustrial sino también para el agrícola, específicamente en el área de cosecha y post cosecha en la constante búsqueda de agentes antimicrobianos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, M., Oyarzo, C., Escudero, C., Leal, F., y Valenzuela, F. (2017). Portación de *Staphylococcus aureus* enteroxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica Chile*, 145, 1559 - 1564.
- Andrade, M. (2015). (Tesis de pregrado). Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia origanoides* y sinergismo en combinación con timol. 87. Venezuela. Obtenido de Universidad de Los Andes - Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Recuperado de: <http://aq-bie20.serbi.ula.ve/>
- Aricapa, A. (2012). (Tesis de pregrado). Estudio fitoquímico de *Piper pesaresanum* y *Piper crassinervium* (Piperaceae). Obtenido de la Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Tecnología Química. Pereira, Colombia.
- Azahuanche, F., Rodríguez, F., León, M., y Malca, G. (2010). Mezcla de extractos de plantas medicinales: ¿sinergismo o reacción química? *Revista Pueblo Continente*, 240.
- Azuero, A. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, Vol.9(Número 20), 11 - 18. doi:2528 – 7737
- Bahrami, Y., & Franco, C. (2016). Acetylated triterpene glycosides and their biological activity from holothuroidea reported in the past six decades. *Marine drugs*, 14(8), 147.
- Ballistreri, G., Fabroni, S., Romeo, F., Timpanaro, N., Amenta, M., & Rapisarda, P. (2019). Anthocyanins and Other Polyphenols in Citrus Genus: Biosynthesis, Chemical Profile, and Biological Activity In Polyphenols in Plants . *Academic Press*, 191-215.
- Buldain, D., Buchamer, A., Marchetti, L. A., Borja, C., y Mestorino, N. (2017). Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*. *Revista Analecta Vet*, 37(2), 33 - 39.
- Butassi, E. (2017). (Tesis doctoral). Combinación de extractos de plantas entre sí y con antifúngicos comerciales como medio de potenciar la actividad contra hongos patogénicos para el humano. Obtenido de Centro Científico Tecnológico CONICET – Rosario. Rosario, Argentina.
- Cárdenas, C., Pozo, W., Almirall, E., y Roque, A. (2016). Fitoquímica de extractos de ocotea quixos (canela amazónica) y piper carpunya (guaviduca, pinku), potenciales fungocontroladores. *Revista Qualitas*, 11, 56 - 83.
- Cáseres, I., Colorado, R., Salas, E., Muñoz, L., y Hernández, L. (2013). Actividad Antifúngica in vitro de Extractos Acuáticos contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp. *Penicillium digitata*. *Revista mexicana de fitopatología*, Vol. 31(2), 105 - 106.

- Castro, M. (2019). (Tesis de maestría). Caracterización de propiedades físicas y antimicrobianas *in vitro* de un recubrimiento comestible a base de moyuyo (*Cordia Lutea Lam*) y Quitosano. Obtenido de Universidad ESPAM "MFL"- Calceta. Calceta, Manabí, Ecuador.
- Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunt. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 81 - 85.
- Dietsche, E. (2017). New industrial policy and the extractive industries (No. 161). *World Institute for Development Economic Research (UNU - WIDER)*, 6, 110 - 121.
- Espinoza, H., & Mendieta, E. (2018). (Tesis de pregrado). *Efectos de la fermentación láctica del lactosuero y alcohólica del mucílago de cacao en la concentración final de una bebida alcohólica*. Obtenido de la Universidad ESPAM "MFL", Calceta, Manabí, Ecuador .
- García, R., y Herrera, F. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. *BISTUA: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 5(2), 68 - 79.
- Ghosh, S. (2016). Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 82(4), 1189-1210.
- Gómez, C., Carbay, Y., Sorroza, L., y Rivera, L. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibrios en sistema productivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*). *Revista metropolitana de ciencias aplicadas*, 92 - 93.
- Gordo, D. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis y Actividad Biológica. *Revista RIAA*, 9(1), 4.
- Guayllas, J. (2019). (Tesis de pregrado). *Uso de Piper carpunya como antioxidante para la industria alimentaria*. Obtenido de Universidad UTPL- Loja. Loja, Ecuador.
- Guayas, J., Lazo, P., y Israel, P. (Tesis de pregrado). *Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de Uncaria tomentosa; Piper aduncun; Artemisa absinthium frente a Escherichia coli ATCC 25922*. Obtenido de Universidad de Cuenca – Bioquímica y Farmacia. Cuenca, Ecuador.
- Jácome, J. (2019). (Tesis de pregrado). *Evaluación del efecto bactericida de aceites esenciales de canela (Cinnamomum veru), Jégibre (Zingiber officinale) y clavo de olor (Syzygium aromaticum) para aplicaciones agroindustriales*. Obtenido de la Universidad de Las Américas – Ecuador.
- Jiménez, E., y Mosquera, O. (2014). Actividad antifúngica *in vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinera* (Moho gris). *Revista Salud Sociedad UPTC*, 1(2), 16 - 21.

- Jaramillo, C., Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L., y Astudillo, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171-1184.
- Khakimov, B., Tseng, L., Godejohann, M., Bak, S., & Engelsens, S. (2016). Screening for triterpenoid saponins in plants using hyphenated analytical platforms. *Molecules*, 21(12), 1614.
- Langeveld, W., Veldhuizen, E., & Burt, S. (2014). Synergy between oil components and antibiotics: a review. *Crit. Microbiol.*, 40, 76-94.
- Liang, J., & He, J. (2018). Protective role of anthocyanins in plants under low nitrogen stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(4), 946-953.
- López, A., Segovia, I., y García, E. (2017). (Tesis de pregrado). *Determinación de aminos biógenas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Obtenido de Universal Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- López, L. (2017). (Tesis de pregrado). *Identificación y caracterización de los metabolitos secundarios específicos de Piper Carpunya, con acción anti fúngica*. Obtenido de la Universidad ESPE – Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Martínez, R., Ortega, M. H., Kawas, J., Zarate, J., y Robles, R. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Revista Interciencia*, 40(11), 744 - 750.
- Maulide, R. (2012). (Tesis de maestría). *Obtención y caracterización de extractos de Momordica balsamina L.* Obtenido de Universidad Autónoma de Madrid – Facultad de Ciencias. Madrid, España.
- Medina, M., D'Armas, H., Jaramillo, C., y San Martín, D. (2019). Análisis del contenido fúngico de algunas especies vegetales cultivadas en Ecuador. *Revista FACSALUD - UNEMI*, 4.
- Montero, M., Revelo, J., Avilés, D., Valle, E., y Guevara, D. (2017). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum Zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella. *Rev Inv Vet Perú*, 28(4), 987-993
- Núñez, D., Balboa, N., Quilaqueo, N., Alvear, M., y Paredes, M. (2018). Evaluación de la Actividad Inmunomoduladora de Extractos Metanólicos y de Alcaloides de *Berberis darwinii* H.(Berberidaceae). *International Journal of Morphology*, 36(2), 454-460.
- Ortega, A. (2018). (Tesis de pregrado). *Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (Thymus vulgaris) y orégano (Origanum vulgare) frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC: 12600*. Obtenido de Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, Ecuador.
- Padgett, D., Luque, M., Riviera, D., Galindo, C., Zepeda, L., y Hernández, A. (2011). Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Aisladas en el Instituto Hondureño

- de Seguridad Social. *Rev Medica Hondureña*, 79(3), 1 - 5. Obtenido de <http://65.182.2.244/RMH/pdf/2011/pdf/Vol79-3-2011-3.pdf>
- Parrales, A., Vera, M., y Tobas, W. (2012). (Tesis de Pregrado). Cromatografía del gas natural. Obtenido de *Escuela Superior Politécnica del Litoral*.
- Pastrana, Y., Durango, A., y Acevedo, V. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 56 - 65.
- Pérez, O., Alvarado, R., y Yacarini, A. (2021). Actividad antibacteriana in vitro de extracto etanólico crudo de las hojas de *Origanum vulgare*, frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922. *Revista Journal of the Selva Andina Research Society*, 12(1), 21 - 29. doi: 143/JSARS/2020
- Quijije, M. (2017). (Tesis de pregrado). *Identificación de plantas utilizadas en la medicina tradicional por las familias de la comunidad Andil del cantón Jipijapa*. Obtenido de Universidad Estatal del sur de Manabí. Jipijapa, Manabí, Ecuador.
- Rincón, G., Ginestre, M., Romero, S., Castellano, M., y Ávila, Y. (2010). Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *Revista Ksmera*, 38(2), 97 - 105. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/>
- Rivera, F., y Quispe, C. (2018). (Tesis de maestría). *Evaluación de la actividad antimicrobiana "in vitro" del extracto hidroetanólico de hojas de *Vermonanthura patens*(Liritaco) sobre *Echerechia coli**. Obtenido de Universidad UNIANDES. Ambato, Ecuador.
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista Ra Ximhai*, 7(1), 153 - 170.
- Rodríguez, Y., Espinoza, S., y Vergara, M. (2014). Efecto Inhibitorio *In Vitro* del Extracto Etanólico de *Rosmarinus Officinalis*. "Romero" Sobre el Crecimiento de *Streptococcus Pyogenes*, *Staphylococcus Aureus* y *Pseudomonas Aeruginosa*. *Rev. Salud & Vida Sipanense*, 1(1), 63 - 72. Obtenido de <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/65/64>
- Rodríguez, H., Barreto, G., Sedrés, M., Bertot, J., Martínez, S., y Guevara, G. (2015). Las enfermedades transmitidas por los alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(8), 1 - 27.
- Sabando, L. (Tesis de pregrado). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de hojas de Icaco en bacterias mesófilas (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*)*. Obtenido de Universidad ESPAM "MFL" – Calceta. Calceta, Manabí, Ecuador.
- Salamanca, S., y Galiano, M. (2016). (Tesis de pregrado). *Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Piper* y elucidación estructural de sus aceites esenciales*. Obtenido de la Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Lima, Perú.

- Sánchez, D. (2017). El uso gastronómico y medicinal de las plantas nativas del centro cultural UNI-SHU de la comunidad Chiguilpe de Santo Domingo de los Tsáchilas. *Revista Científica Multidisciplinaria*, 124.
- Scalvenzi, L., Yaguache, B., Cabrera, P., y Guerrini, A. (2016). Actividad Antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm y *Piper aduncum* L. *Revista Bioagro*, 28(1), 39 - 46.
- Semeniuk, L., Bela, A. V., Romero, M., & Nuñez, M. (2018). Composición fitoquímica y nutricional de *Momordica charantia* y actividad antioxidante. *Revista Domingueza*, 34(1), 39 - 44.
- Semeniuk, L., Bela, A., Vonka, C., Romero, M., y Nuñez, M. (2018). Composición fitoquímica y nutricional de *Momordica charantia* y actividad antioxidante. *Revista Domingueza*, 34(1), 39 - 44.
- Soto, M., y Rosales, 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*. *Revista Ciencias y Tecnología*, 18(4).
- Spitezer, M., Robbins, N., & Wright, G. (2017). Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*, 8, 169-185.
- Sun, L., Sun, S., Cheng, A., Wu, X., Zhang, Y., & Lou, H. (2009). In vitro activities of retigeric acid B alone and in combination with azole antifungal agents against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 53, 1586-1591.
- Torres, L., Días, F., Escalante, G., y Estrada, E. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *Revista CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 13(2), 45 - 48.
- Ulrich, G. (2014). Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products-Potential and challenges for drug development. *Synergy*, 1, 59-69.
- Valverde, P. (2015). (Tesis de pregrado). *Composición química, potencial antimicrobiano y letal de los aceites esenciales de las hojas de hierba luisa (cymbopogon citratus), mastrante (ageratum conyzoides), guabiduca (Piper carpunya), ajeno (Artemisia absinthium) y cedrón (Lippia citriodora). Obtenido de Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.*
- Wagner, H. (2011). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. *Fitoterapia*, 82, 34 - 37.
- Wagner, H., & Ulrich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 82, 97 - 110.
- Zendejas, G., Avalos, H., y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*. Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomedica*, 25(3), 129 - 143. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

- Zhu, Y., Hong, J., Bao, F., Xing, N., Wang, L., Sun, Z., & Wu, H. (2018). Triterpenoid saponins from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their biological activity. *Archives of pharmacal research*, 41(12), 1117-1130.
- Zimmerman, G., Avery, W., Finelli, A., Farwel, M., Fraser, C., & Borisy, A. (2009). Selective amplification of glucocorticoid anti - inflammatory activity through synergistic multi - target action of a combination drug. *Arthritis Res. Ther*, 11, 12.
- Zotta, C., Lavayén, S., Nario, F., y Piquín, A. (2016). Detección de *Echerichia coli* productor de toxina Shiga en vísceras en animales bovinos y pollos destinados para el consumo humano. *Revista Journal of the Selva Andina Research Society*, 7, 2 - 9.
- Zúñiga, I., y Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95 - 104.

ANEXOS

ANEXO 1. Materias primas y proceso de extracción

1-A. Hojas de *Momordica charantia* (melón amargo)



1-B. Hojas de *Piper carpubya* (pinku)



1-C. Extracción por el método Soxhlet



1-D. Obtención de extractos etanólicos



ANEXO 2. Análisis in vitro por el método de Kirby- Bauer

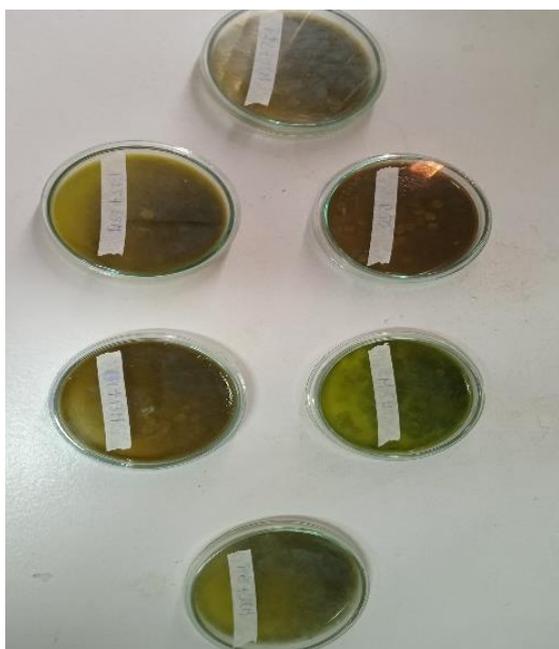
2-A. Preparación de medios de cultivo Mueller Hinton



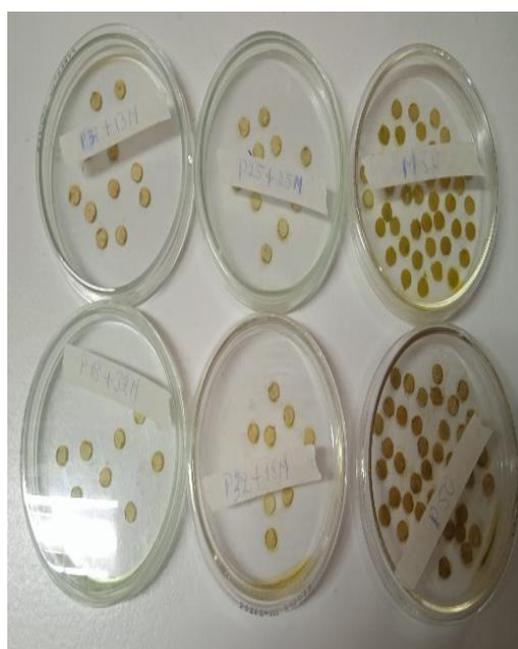
2-B. Purificación de cepas bacterianas



2-C. Preparación de combinaciones de extracto e impregnación en discos



2-D. Discos con extractos listos para inocular



Anexo 3. Halos de inhibición de los tratamientos y testigos (réplicas)

COMBINACIÓN		Tratamientos y replicas	Diámetro de halos (mm)
1: 37 µg/mL de pinku + 13 µg/mL de melón amargo	<i>S. Aureus</i>	T1 R1	9,5
		T1R2	10
		T1 R3	10
	<i>E. coli</i>	T2 R1	8,5
		T2 R2	9
		T2 R3	9
2: 18 µg/mL de pinku + 32 µg/mL de melón amargo	<i>S. Aureus</i>	T3R1	8
		T3R2	8
		T3R3	9
	<i>E. coli</i>	T4R1	7
		T4 R2	6,5
		T4R3	7
3: 25 µg/mL de pinku + 25µg/mL de melón amargo	<i>S. Aureus</i>	T5R1	9
		T5R2	8,5
		T5R3	9
	<i>E. coli</i>	T6R1	8
		T6R2	8
		T6R3	7,5
4: 32 µg/mL de pinku + 18 µg/mL de melón amargo	<i>S. Aureus</i>	T7R1	9,5
		T7R2	9
		T7R3	9,5
	<i>E. coli</i>	T8R1	8,5
		T8R2	8
		T8R3	8
Testigo pinku	<i>S. Aureus</i>	R1	12,5
		R2	12
		R3	12
	<i>E. coli</i>	R1	9
		R2	9,5
		R3	9
Testigo melón amargo	<i>S. Aureus</i>	R1	8,5
		R2	9
		R3	9
	<i>E. coli</i>	R1	8,5
		R2	8
		R3	8

Anexo 4. Prueba de hipótesis de los tratamientos y testigos

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las distribuciones de T1, T2, T3,T4, T5,T6,T7, T8, Testigo pinku (<i>S. aureus</i>), Testigo pinku (<i>E. coli</i>), Testigo melón amargo (<i>S. aureus</i>) y Testigo melón amargo (<i>E. coli</i>) son las mismas.	Análisis de dos vías de Friedman de varianza por rangos de muestras relacionadas	,002	Rechazar la hipótesis nula.
Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.				

Anexo 5. Determinación de flavonoides totales a la mejor relación de extracto etanólico de pinku y melón amargo



INFORME DE RESULTADOS

INF LASA-18-06-21-2459
ORDEN DE TRABAJO No. 21-2626

INFORMACIÓN DEL CLIENTE		
SOLICITADO POR: ESPINOZA VACA HECTOR ANIBAL	DIRECCIÓN: MANABÍ	
TELÉFONO/FAX: 0985555118	TIPO DE MUESTRA: ALIMENTO	PROCEDENCIA: TOSAGUA
IDENTIFICACIÓN: EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE PINKU Y MELÓN AMARGO		CODIGO INICIAL: M1 - FE: 06/06/2021 CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO DE 37 µg/ml DE PINKU Y 13 µg/ml DE MELÓN AMARGO

Información suministrada por el cliente

INFORMACIÓN DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA DE MUESTREO: -	INGRESO AL LABORATORIO: 10/06/2021
FECHA DE ANÁLISIS: 10-18/06/2021	FECHA DE ENTREGA: 18/06/2021	NÚMERO DE MUESTRAS: Una (1)
CÓDIGO DE MUESTRA: 21-6989	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE U (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	FLAVONOIDES TOTALES	mg/l EQ	92	-	^b ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS *

Los ensayos marcados con * NO están incluidos en el alcance de acreditación del SAE

Los ensayos marcados con (b) NO están incluidos en el alcance de acreditación de A2LA.

EQ: Equivalentes de quercetina

QUÍM. PABLO SAAVEDRA
JEFE DE DEPARTAMENTO

Prohibida la reproducción parcial por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio

LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio

Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.

El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)

