

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos
aislados de la semilla de *Persea americana* Mill. “palta
jass” frente a *Escherichia coli*. ATCC 35218, Ayacucho
2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:
Bach. ROMANI SANCHEZ, LIA

AYACUCHO - PERÚ
2016

A mis padres Inocencio y Berta
gracias a su esfuerzo diario, su
amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por cumplir la gran responsabilidad de mantener y mejorar el liderazgo en la educación superior a través del mejoramiento continuo de la calidad de los servicios, por su apertura y apoyo a los estudiantes.

De manera muy especial quiero agradecer a aquella persona pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo al Mg. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ, y al Dr. Q.F. Edwin Carlos ENCISO ROCA, por su valiosa colaboración y asesoramiento.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Actividad antimicrobiana	5
2.3. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana	6
2.4. Extracto	7
2.5. Método de extracción	7
2.6. Compuestos polifenólicos	8
2.7. Antibacterianos naturales	10
2.8. Agentes antibacterianos	10
2.9. Especie vegetal	11
2.10. Microorganismo patógeno	14
2.11. Tratamiento	15
2.12. Antimicrobiano	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de taninos y microorganismos sensibles	9
Tabla 2. Cantidad de compuestos fenólicos encontrados en la <i>Persea americana</i> “hass”	9
Tabla 3. Clasificación científica de la palta jass (<i>Persea americana</i> Mill.)	11
Tabla 4. Composición química aproximada de la pulpa de palta	12
Tabla 5. Clasificación científica de la <i>Escherichia coli</i>	14
Tabla 6. Antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias	15
Tabla 7. Herramienta de recolección de datos de la investigación	25
Tabla 8. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	28
Tabla 9. Ensayos químicos de los compuestos fenólicos aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	29
Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	30
Tabla 11. Absorbancia de los espectros ultravioleta visible (UV-vis) de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	31
Tabla 12. Promedio de halos de inhibición (mm) de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2016	32
Tabla 13. Porcentaje de halos de inhibición (mm) de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” en cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, frente al estándar ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016	33
Tabla 14. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2016	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de acción del ciprofloxacino	16

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Variación de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones del extracto fenólico aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho, 2016	35
Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del extracto fenólico aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 en comparación con el ciprofloxacino, Ayacucho 2016.	36

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación sistemática de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”.	52
Anexo 2. Certificado de identificación sistemática de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.	53
Anexo 3. Reconocimiento de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	54
Anexo 4. Reconocimiento de metabolitos secundarios en la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	55
Anexo 5. Inhibición de cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 por la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	56
Anexo 6. Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos de las semillas de <i>Persea americana</i> Mill. “palta jass”.	57
Anexo 7. Datos descriptivos de los halos de inhibición de la fracción de acetato de etilo aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2016	58
Anexo 8. Resultados del análisis de varianza de los halos de inhibición de la fracción de acetato de etilo aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2016	59
Anexo 9. Resultados de las comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición de la fracción de acetato de etilo aislado de las semillas de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	60
Anexo 10. Molienda de las semillas seleccionadas del fruto de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” en un Molino casero	61
Anexo 11. Proceso de aislamiento de compuestos fenólicos de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	62

Anexo 12. Compuestos fenólicos aislados por cromatografía en capa fina por espectrofotometría ultravioleta del extracto de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	63
Anexo 13. Proceso de replicación, inoculación de las bacterias de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2016	64
Anexo 14. Preparación del medio de cultivo e inhibición por la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. “palta jass”, Ayacucho 2016.	65
Anexo 15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria al 10% y 15% de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta Jass”, Ayacucho 2016.	66
Anexo 16. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida al 10% y 15% de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.	67
Anexo 17. Curvas cromatograficas de la fracción de acetato de etilo aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill “palta jass” en espectro Uv-vis, Ayacucho 2016.	68
Anexo 18. Matriz de consistencia	69

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo (FAE) aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” realizado en los laboratorios de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias de la Salud y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en los meses de Abril a Setiembre del 2016. El tipo de investigación fue básica experimental. Para la obtención de los extractos, las semillas fueron colectadas en la provincia de Huanta y sometidas a un proceso de extracción etanolica, desengrasado con éter de petróleo y extracción de los fenoles con acetato de etilo. Los compuestos fenólicos fueron aislados por cromatografía en capa fina por espectrofotometría ultravioleta. El extracto contiene: taninos, flavonoides, saponinas, fenoles y triterpenos. Se empleó el método de difusión de discos de Kirby Bauer utilizando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218; la cuales fueron ensayadas a concentraciones de 1%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, como control se utilizó el ciprofloxacino 30 µg. Los resultados muestran dentro de los parámetros fisicoquímicos: porcentaje de Humedad igual a 10,6%, Cenizas igual a 3,9%, pH 5. Se encontró que la fracción de acetato de etilo (FAE) aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” muestra una actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 35218. Alcanzando un 81,5% de inhibición al 10%; CMI de 0,625 mg/ml y CMB de 1,250 mg/ml. Se concluye que la fracción de acetato de etilo (FAE) aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” tiene actividad antibacteriana frente a la cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 35218.

Palabras clave: *Persea americana* Mill, compuestos fenólicos, *Escherichia coli* ATCC 35218, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB)

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de las plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como material base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. En la actualidad estamos expuestos a muchas enfermedades de índole microbiana que son tratados con medicamentos comerciales, que al no ser consumidos en forma correcta producen una resistencia de la bacteria a dicho fármaco, por lo que con mayor frecuencia el medicamento resulta ineficiente. En las distintas actividades humanas, tanto domésticas como industriales, existe generación de residuos diversos que, a causa del volumen alcanzado y eventual peligrosidad, deben ser manejados adecuadamente con el fin de minimizar su impacto ambiental.^{1,2,3}

Por tanto, la caracterización de los residuos es imprescindible no sólo con el fin de determinar la metodología apropiada para su disposición final, sino también para su evaluación como potenciales materias primas en otros procesos de producción o para la recuperación del potencial valor nutricional final. De este modo, es posible obtener productos a partir de residuos, aumentando la rentabilidad global del proceso productivo.³

Los compuestos polifenólicos son sustancias biológicamente activas y existen numerosas evidencias, epidemiológicas, estudios *in vitro*, estudios en modelos animales e intervenciones en humanos, que indican que estos compuestos proporcionan un beneficio al organismo en contra de diversas enfermedades.⁴

Los compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antibacteriana generalmente son compuestos fenólicos y polifenoles en las que se encuentran quinonas, flavonoides, taninos.⁵ Las comunidades rurales utilizan tradicionalmente las plantas como medio para curar sus enfermedades. Ellos han recibido de generación en generación un bagaje de conocimientos que se

ha acumulado desde tiempos inmemoriales sobre selección, manejo, conservación y uso de las diferentes especies de plantas que crecen en nuestro país y en los últimos años los habitantes de las ciudades están utilizando por lo que se puede decir que está en auge la medicina tradicional. En el área andina se cultivan diversas frutas y hortalizas, entre las que se encuentra la palta, que se consume principalmente en forma natural sin mayor grado de procesamiento. La revalorización de estas frutas como de sus residuos o desechos vegetales, son poco conocidas o desconocidas fuera de sus regiones de origen, la que sería de gran beneficio para el poblador rural del interior del Perú que se encuentra entre los grupos poblacionales más pobres de Latinoamérica.^{5,6}

La palta (*Persea americana* Mill) pertenece a la familia de las Lauráceas y es originaria de Guatemala, México y parte de Centro América, es cultivada actualmente en casi todos los países de clima cálido y templado incluido el Perú que cuenta con una serie de microclimas, uno de ellos con características aptas para el desarrollo de la especie *Persea americana* Mill, palta jass, particularmente en nuestra región, en zonas cálidas de la provincia de Huanta, y el Valle del Rio Apurimac, Ene y Mantaro (VRAEM).¹

Partiendo de estas premisas el objetivo general del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislados de la semilla de *Persea americana* Mill. frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana.

Los objetivos específicos son:

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill.
- Identificar los parámetros fisicoquímicos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria CMI y Concentración Mínima Bactericida CMB de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill. frente a *Escherichia coli*. ATCC 35218

De esta manera realizar aportes en cuanto a las potencialidades de uso de la especie como agente antimicrobiano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La *Persea americana* Mill también conocida como aguacate, es una planta perteneciente a la familia de las Lauráceas. Originario de Guatemala, parte de Centro América y México, el aceite esencial de *Persea* tiene propiedades antibacterianas, el aceite fijo es emoliente e hipocolesteremiante. Es interesante destacar que no sólo en su zona de origen (mesoamérica) el aguacate tiene una gran variedad de usos médicos, sino también en todos los países que han adoptado su cultivo; así, la corteza se utiliza por sus propiedades vermífugas y la semilla, como antihelmíntico.⁷

Chávez P, ha desarrollado su tesis de grado con la investigación titulada “Evaluación antioxidante y antimicrobiana en extractos de residuos de aguacate *Persea americana* Mill”; Realizó extracciones metanólicas y acetónicas de cáscara y semilla de aguacate pulverizadas en forma fresca, cada extracto se concentró al 20% en volumen con rotavapor y Baño María para ser conservados en congelación hasta su uso. Los extractos obtenidos fueron evaluados para determinar su capacidad antioxidante, fenoles, flavonoides, clorofilas y carotenoides totales. Así como, su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Esta investigación concluye que para determinar la capacidad antioxidante resultó más eficiente la extracción polifenólica. En las pruebas fitoquímicas obtuvieron información relevante sobre la composición de los residuos de aguacate y con respecto a la capacidad antimicrobiana se observó mayor actividad en extractos de semilla.⁸

Najarro V, desarrolló un trabajo de tesis titulado “Actividad biológica de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill. “palto” frente a cepas de enterobacterias”; utilizó extractos etanólicos de cada parte de la planta frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 23122, *Salmonella entérica* 14028 y *Shigella*

sonnei ATCC 25931, ensayadas a concentraciones de 0,5%; 1,0%; 3,0%; 5% y 10%; como control utilizó ciprofloxacino de 5 µg; en los extractos se encontraron taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas y/o cumarinas, quinonas, catequinas, azúcares reductores, alcaloides, triterpenos y/o esteroides; el extracto de la semilla muestra una actividad frente a *Escherichia coli* de 34,2% de inhibición al 10%, con una CMI DE 0,039 mg/ml y CMB de 0,078 mg/ml, frente a *Shigella sonnei* el halo de inhibición fue de 51,2% con una CMI DE 0,002 mg/ml y CMB de 0,005 mg/ml, frente a *Salmonella enterica* el halo de inhibición fue de 14,9% al 10%; CMI DE 0,313 mg/ml y CMB de 0,625 mg/ml.⁹

Escobar M. et al, desarrollaron un trabajo de investigación titulado “Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de la palta *Persea americana* y Buganvilla *Bougainvillea glabra*”, evaluaron la actividad antibacteriana y antidiarreica de los extractos de *Bougainvillea glabra* y *Persea americana* frente a cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. La actividad antibacteriana fue evaluada mediante la prueba de sensibilidad por la técnica de difusión en doble capa; la prueba de la actividad antidiarreica fue evaluada a través de pruebas por inducción bacteriana que producen diarrea en ratas de la cepa *Winstar*. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de las hojas de buganvilla presenta actividad antibacteriana y antidiarreica a una concentración de 0,763 g/Kg peso, contra *Escherichia coli* y el extracto de la semilla de palto a una concentración de 0,688 g/kg peso, contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. Así también se determinó que los compuestos responsables de la actividad antibacteriana y antidiarreica son principalmente taninos y flavonoides, presentes tanto en hojas de buganvilla y semilla de palto.⁶

Ilozue M. et al, desarrollaron una investigación titulada “Anti-Microbial and Phytochemical Screening of the Seed Extracts of *Persea Americana* (AVOCADO PEAR)”, artículo extraído del Journal, en la que se resume la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* se llevó a cabo utilizando las técnicas de difusión en disco. El extracto de acetato de etilo demostró actividad pronunciada contra los organismos de prueba. La actividad del extracto de metanol frente a *Staphylococcus aureus* fue (31 mm) mientras que la de éter de petróleo era (5 mm) contra *Escherichia coli*. Sin embargo, *Staphylococcus typhi* y *Escherichia coli*, fueron resistentes al extracto cloroformico y metanólico. La

actividad de los extractos de éter de petróleo, cloroformo y metanol se comparó favorablemente con la de la eritromicina, antibiótico utilizado como estándar. Las actividades antimicrobianas mostradas por los diversos extractos se podrían atribuir a la presencia de metabolitos secundarios identificados en el cribado fitoquímico y también significa el potencial de las semillas de *Persea americana* como un agente terapéutico anti-microbiano.¹⁰

Owusu N. et al, desarrollaron una investigación titulada “Fitoconstituyentes, propiedades antimicrobianas y antioxidantes de las hojas de *Persea americana* Mill cultivadas en Ghana”, en este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana y antioxidantes del extracto de metanol, acetato de etilo, cloroformo y éter de petróleo de *Persea americana*. Estos extractos representan actividades antimicrobianas variables en microorganismo específico. El extracto metanólico muestra las actividades antimicrobianas más potentes con las mayores zonas de inhibición (0-1,8 mm) en el ensayo de difusión en agar y con la más baja Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en el ensayo de dilución en caldo contra un panel de microorganismos que incluye *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los datos apoyan el uso etnomedicinal de las hojas de *Persea americana* para el tratamiento de las infecciones y de otros síntomas cuya etiología puede estar relacionado con el estrés oxidativo.¹¹

2.2. Actividad antimicrobiana

Actividad antimicrobiana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de población bacteriana o para eliminarla, se puede expresar cuantitativamente con pruebas *in vitro*. Entre los factores que inciden sobre la actividad antimicrobiana se encuentran: Tiempo de contacto, concentración, temperatura, reacción de medio (pH), influencia de sustancias presentes, espectro antimicrobiano, estabilidad del desinfectante, resistencia microbiana, incompatibilidades.¹²

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides, los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas y proteínas.¹²

Los compuestos utilizados como antimicrobianos atacan varios sitios dentro de las células microbianas y dependiendo de las concentraciones utilizadas en los alimentos, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos.¹²

Los compuestos antimicrobianos de las plantas pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos, sus sitios de acción sobre la célula microbiana, incluyen a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de ciertos microorganismos.¹³

2.3. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares.^{14, 15}

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland.¹⁵

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Müeller Hinton y agar tripticase soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras.¹⁵

2.3.1. Métodos de difusión

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la

concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia.¹⁵

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables.^{2, 15}

2.4. Extracto

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.¹⁶

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas está comprendido dentro de los llamados metabolitos secundarios, los cuales son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, distribución restringida y características de fuentes botánicas específicas a diferencia de los metabolitos primarios que son universalmente distribuidos y participan en la actividad celular.¹⁷

2.5. Método de extracción

2.5.1. Maceración

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el menstuo constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el menstuo actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular.¹⁸

Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se le protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse

continuamente (tres veces por día aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. A partir de este método no se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento”.^{18, 19}

2.6. Compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos (CPF) son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Los CPF se clasifican como ácidos fenólicos (AF), flavonoides (FLA) y taninos (TAN).²⁰

Los compuestos polifenólicos son un grupo diverso de fitoquímicos que no se identifican como nutrientes esenciales, pero se les atribuyen efectos positivos sobre la salud de quienes los consumen habitualmente en la dieta, especialmente por su actividad como antioxidantes. Sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos ha sido tema de múltiples estudios y debates, ya que poseen numerosos efectos biológicos incluyendo regulación de la expresión de genes y actividad de diversas enzimas, entre otros. Sin embargo, sus potenciales efectos biológicos dependen de numerosos factores que aún no son bien comprendidos, como su absorción o metabolismo, que a su vez depende de la naturaleza química del compuesto.²¹

2.6.1. Flavonoides

Los flavonoides tienen dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ($C_6C_3C_6$).²² Se distribuyen ampliamente en las plantas, donde cumplen muchas funciones, entre ellas la producción de pigmentos de color amarillo o rojo – azul en las flores y la protección ante los ataques de microorganismos e insectos. Existe una fuerte evidencia experimental de su capacidad de modificar la reacción del cuerpo a los alérgenos, virus y agentes carcinógenos. Estos resultados ponen de manifiesto su actividad antialérgica, antimicrobiana y anticancerígena.²³

2.6.2. Taninos

Los taninos son compuestos poliméricos más complejos que se clasifican en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa.²¹

Los taninos hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa. En cambio, los taninos

condensados resultan de la condensación de unidades de flavan-3-oles, tales como la catequina que tienden a polimerizarse.²¹

Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, además de que se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacteriana o bacteriostática. In vivo se ha observado el efecto bacteriostático del jugo de arándano, atribuido a los taninos condensados presentes. El jugo de arándano no solo mantiene saludable el tracto urinario por la acidificación del medio, sino además las proantocianidinas presentes en el jugo exhiben actividad antibacteriana, impidiendo la adhesión de *Escherichia coli* a superficies celulares del tracto urinario.²²

Tabla 1 Clasificación de taninos y microorganismos sensibles.²³

Taninos	Microorganismos sensibles	
Taninos condensados	Antibacterial	<i>S. mutans</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
	Antiviral	Influenza A virus HSV virus del herpes simple tipo 1
Taninos hidrolizables	Antibacterial	<i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> <i>Clostridium</i> , <i>Helicobacter</i>
	Antiviral	Virus del herpes HSV -1 y HSV-2
	Antifúngico	<i>Candida parapsiosis</i>

2.6.3. Compuestos fenólicos presentes en el género persea

Ana F, Moreira J y Barreira S, determinaron los parámetros fisicoquímicos y la composición fitoquímica de la *Persea americana*, en la tabla se resume la cantidad de componentes bioactivos determinados en cada parte del fruto y se resume que la semilla presenta una alta concentración de fenoles totales.²⁴

Tabla 2. Cantidad de compuestos fenólicos encontrados en la *Persea americana* "hass"²⁴

Avocado fracción var. "Hass"			
Componentes bioactivos	Pulpa	Cascara	Semilla
Fenólicos totales	410.2 ±69.0	679.0 ±117.0	704.0 ±130.0
Flavonoides	219 ±1.0	44.3 ±3.1	47.9 ±2.7
Carotenoides	0.815± 0.201	2.585 ±0.117	0.966±0.164
Vit C	1.2 ±0.7	4.1 ±2.7	2.6 ±1.1
Vit. E	5.36 ±1.77	2.13 ±1.03	4.82 ±1.42

Ilozue N, Ikezu U y Ugwu P, realizaron un screening fitoquímico del extracto de la semilla de *Persea americana* y determinaron la presencia de alcaloides, flavonoides (responsables de la actividad antibacteriana) y taninos.¹⁰

Idris S, Ndukwe G y Gimba C, determinaron la presencia de saponinas, flavonoides, taninos, esteroides, alcaloides y terpenoides en un estudio fitoquímico preliminar del extracto de la semilla de *Persea americana* Mill.²⁵

2.7. Antibacterianos naturales

Simultáneamente al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano.²⁶

Se debe destacar que los fármacos a base de derivados de productos naturales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos siempre están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse biológicamente entre sí, de forma que en general no se acumulen en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de derivados de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. En el ámbito farmacéutico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación, con el fin de descubrir y avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de las plantas y productos naturales.²⁷

2.8. Agentes antibacterianos

Los antibacterianos son compuestos químicos capaces de inhibir el crecimiento e incluso destruir especies bacterianas, de forma específica y a bajas concentraciones sin toxicidad (o muy baja para el organismo humano).²⁸

Los antibióticos son considerados los principales agentes antibacterianos debido a que estos son originados del metabolismo de algunos microorganismos. En la práctica, el término antibiótico ha adquirido uso como sinónimo de agente antibacteriano en general, natural o sintético.²

2.9. Especie vegetal

2.9.1. *Persea americana* Mill.

Tabla 3. Clasificación científica de la palta jass (*Persea americana* Mill.)

Categoría taxonómica	Clasificación
DIVISION	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	MAGNOLIIDAE
ORDEN	LAURALES
FAMILIA	LAURACEAE
GENERO	<i>Persea</i>
ESPECIE	<i>Persea americana</i> Mill.
VARIEDAD	<i>Jass</i>
N.V.	“Palto”, “aguacate”

Fuente: certificado emitido por el Herbarium Huamangensis – 2016 (Anexo 1)

2.9.2. Descripción

Árbol siempre verde de hasta 15 metros de altura, de tronco recto, corto y corteza rugosa. Hojas grandes, verdes, simples, alternas, de 6 - 30 cm de largo, que forman un ramaje denso y muy abundante. Flores pequeñas, arracimadas, fragantes, blanco-verdosas, 1 - 3 cm de ancho. Fruto comestible en forma de drupa esférica o piriforme, cáscara gruesa de color variable: verde, amarillo o violeta. La pulpa es grasosa, amarillenta o verde; semilla única, dura, ovalada, oleosa.²⁹

2.9.3. Hábitat

Árbol originario de Mesoamérica donde recibe generalmente el nombre de aguacate, palabra derivada del término en lengua nahuatl auácatl, que significa “testículo”. Las principales variedades de cultivo son: Bacon, Edranol, Fuerte, Hass, Negra de la Cruz y Chilena Mejorada. Según la variedad, el palto puede crecer en clima cálido, templado o frío, en suelos arcilloso arenosos, drenados, fértiles; el régimen de lluvia debe fluctuar entre 900 y 2.500 mm al año. Se propaga por semillas o injertos en viveros; germina en aproximadamente 3 semanas; se trasplanta a las 5-6 semanas; comienza a fructificar a los 4-5 años.²⁹

2.9.4. Actividad farmacológica

Todas las partes de esta planta han sido investigadas, en especial el aceite esencial, el aceite fijo, las hojas y el fruto (en este último el mesocarpio, pulpa, por sus magníficas cualidades alimenticias y la calidad de su aceite fijo,

además del epicarpio y la semilla); el aceite esencial de *Persea* tiene propiedades antibacterianas, el aceite fijo es emoliente e hipocolesteremiante. Es interesante destacar que no sólo en su zona de origen (mesoamérica) el aguacate tiene una gran variedad de usos médicos, sino también en todos los países que han adoptado su cultivo; así, la corteza se utiliza por sus propiedades vermífugas y la semilla, como antihelmíntico; se ha encontrado compuestos hepatoprotectores en esta planta; en Cuba, numerosas formulaciones homeopáticas se preparan a partir de sus diferentes partes. En nuestro país las hojas frescas o secas se emplean principalmente en tratamientos de afecciones respiratorias: tos, catarro, bronquitis, resfríos; malestares estomacales, enfermedades de la piel y en menstruaciones difíciles y dolorosas; como dato curioso, hasta no hace mucho tiempo, la semilla era empleada como tinta indeleble para “marcar” ropa.³⁰

Tabla 4. Composición química aproximada de la pulpa de palta ³⁰

Parte comestible	60%
Calorías	127
Agua	79.7
Proteína	1.6 g
Grasa	13.3 g
Carbohidratos	3.0 g
Fibra	1.6 g.
Cenizas	0.8 g

Algunos extractos de las semillas del aguacate poseen actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Mycrococcus Pyogenes*, *Sarcina lutea* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, los compuestos alifáticos de cadena larga, aislado de la cascara del fruto como el 1,2,4 trihidroxi-n-hepadeca-16-eno, han demostrado actividad bactericida sobre microorganismos gram positivos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus*.³¹

Se ha reportado la actividad cancerosa de extractos de hojas y de tallos frescos de aguacate en animales con tumores trasplantables de adenocarcinoma 755 y las propiedades citotóxicas, in vitro, de algunos de los compuestos químicos aislados del fruto. El aguacate se incluye frecuentemente en dietas y reciente evidencia sugiere que son muy efectivos en la modificación de los perfiles lipídicos.³¹

2.9.5. Composición química y usos de la semilla

La semilla de *Persea americana* tiene una aplicación diversa en la etnomedicina, que van desde el tratamiento de la diarrea, la disentería, dolor de muelas,

parásitos intestinales a la zona de tratamiento de la piel y embellecimiento, las hojas de *Persea americana* se ha informado que poseen actividades anti-inflamatorias y analgésicas. Las semillas son ricas en taninos y los carotenoides. Composición química de la semilla. Una vez separada la pulpa comestible del fruto, quedan como residuos la cáscara y la semilla. Dependiendo de las variedades esta única semilla alcanza entre 15 a 18% del peso total del fruto tipo baya. El epispermo de la semilla es una fina capa fibrosa de color marrón oscuro. La semilla posee menor porcentaje de lípidos que la pulpa por lo cual no se considera de interés para el proceso de obtención de aceite a nivel industrial. Sin embargo, algunos estudios han revelado que el aceite de semilla presenta mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que el aceite de pulpa. Además, de la semilla es posible obtener enzimas y sustancias con propiedades antibióticas. Estas últimas tendrían posibles usos en la conservación de la carne, en productos medicinales y productos cosméticos. Es posible también extraer taninos y pigmentos de la semilla.³²

González y col. (2010) sostienen que la semilla de aguacate posee algunas sustancias químicas (principios biológicamente activos) antinutricionales como el ácido cianhídrico, glucósidos cianogénicos, polifenoles condensados y algunos taninos, que podrían actuar adversamente sobre la posibilidad de su utilización como aceite comestible de consumo humano. Sin embargo, la mayoría de dichas sustancias son termolábiles, por lo que un tratamiento térmico adecuado (cocción) las destruiría.³³

2.9.6. Usos tradicionales de la semilla.

Según el tratado sobre plantas medicinales del Perú, el epispermo de la semilla de palta se toma en infusión acuosa por tres días para expulsar parásitos nematodos; los mismos autores refieren que la semilla se utiliza como tónico capilar en la caída del cabello, siendo también muy eficaz en enterocolitis diarreicas; finalmente, refieren que existen estudios que demuestran las propiedades antimicrobianas del extracto acuoso de la semilla contra bacterias Gram positivas y negativas, hongos y micobacterias.^{33, 34}

González y col. (2010) refieren que en años recientes los laboratorios cosméticos han empezado a interesarse en el aceite de palta por su elevado contenido insaponificable, por sus propiedades hidratantes, reestructurantes y antioxidantes y por su especial capacidad de aumentar la síntesis de colágeno;

posee además importantes cualidades de “penetración” y “mantenimiento”, lo que le hace eficaz como vehículo en cremas nutritivas.³³

2.10. Microorganismo patógeno

2.10.1. *Escherichia coli*

En 1885 Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli* en su homenaje y desde entonces ha sido uno de los seres vivos más estudiados, de hecho gran parte de los conocimientos sobre la biología celular fueron adquiridos en estudios con este microorganismo.³⁵

Según el Manual Bergey de bacteriología sistemática son bacterias Gram negativas cilíndricas con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. Conforme a la definición general de la familia Enterobacteriaceae a la que pertenecen, son bacterias quimioheterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito. El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *Escherichia coli*, *Escherichia hermanni*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris* y *Escherichia blattae*. La especie tipo es *Escherichia coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *Escherichia hermanni*, y *Escherichia vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional.³⁵

Tabla 5. Clasificación científica de la *Escherichia coli*

REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Enterobacteriales
FAMILIA	Enterobacteriaceae
GENERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>E. Coli</i>

Fuente: área de bacteriología microbiología UNSCH -2016

2.11. Tratamiento

Tabla 6. Antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias. ³⁶

ANTIBACTERIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10µg	£ 13	14 – 16	>17
CEFALOSPORINAS				
Cefalotina	30µg	£ 14	15 – 17	>18
Ceftriaxona	30µg	£ 13	14 – 20	>21
AMINOGLUCOCIDOS				
Gentamicina	10µg	£ 12	13 – 14	>15
Amikacina	30µg	£ 14	15 – 16	>17
QUINOLONAS				
Norfloxacino	10µg	£ 12	13 – 16	>17
Ciprofloxacino	5µg	£ 15	16 – 20	>21
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30µg	£ 14	15 – 18	>19

2.12. ANTIMICROBIANO

2.12.1. CIPROFLOXACINO

2.12.2. Mecanismo de acción

Para llegar al sitio blanco las quinolonas deben atravesar la membrana externa de las bacterias Gram negativas a través de canales en la membrana llamados Porina F. Una vez dentro de la bacteria las quinolonas ejercen su efecto bactericida impidiendo la síntesis de ADN al inhibir la acción de las enzimas ADN girasa y Topoisomerasa IV. Las moléculas de ADN están formadas por una doble cadena de nucleótidos, enrolladas una alrededor de la otra en forma helicoidal. En la naturaleza las moléculas de ADN son circulares y para formar estos círculos la doble hélice tiene que enrollarse en una nueva espiral (superhélice), de sentido contrario a las hélices primarias. Las cadenas de las moléculas de ADN deben separarse para poder replicarse o transcribirse. Para que las dos cadenas se puedan separar, deben desenrollarse y la superhélice debe enrollarse en sentido contrario. Para efectuar estos cambios es necesario efectuar cortes en las cadenas de nucleótidos y luego unirlos nuevamente. La ADN girasa es una enzima bacteriana dependiente de ATP, que cataliza la fractura y sellado de las cadenas de ADN. La ADN girasa de *Escherichia coli* consta de 4 subunidades, dos A (que catalizan las reacciones de fractura y

sellado) y dos B con actividad de ATPasa. Las quinolonas se unen a la subunidad A inhibiéndola y, por lo tanto, inhiben la síntesis de ADN de plásmidos y cromosomas. La inhibición de ADN cromosómico conduce a un efecto bactericida. Por la inhibición de ADN de plásmidos la resistencia codificada en estos no era esperable, pero ha sido observada. Se une a la subunidad B de la girasa y la inhibe, de una manera diferente a las quinolonas: estas inhiben las reacciones de fragmentación y sellado de las cadenas. La Topoisomerasa IV es la enzima encargada de separar las moléculas de ADN hijas que se producen como resultado de la replicación del ADN. Está compuesta por 4 subunidades: 2 subunidades C y 2 subunidades E. Para la mayoría de las bacterias Gram positivas, como el *Staphylococcus aureus*, la Topoisomerasa IV es el principal sitio blanco de las quinolonas, mientras que en las bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, el ADN girasa es el principal sitio de acción. La acción del ADN girasa en células eucariotas se lleva a cabo por la enzima Topoisomerasa II (las células eucariotas carecen de ADN girasa). Las quinolonas inhiben a la Topoisomerasa II a concentraciones mucho mayores que las necesarias para inhibir al ADN girasa y a la topoisomerasa IV.^{37, 38}

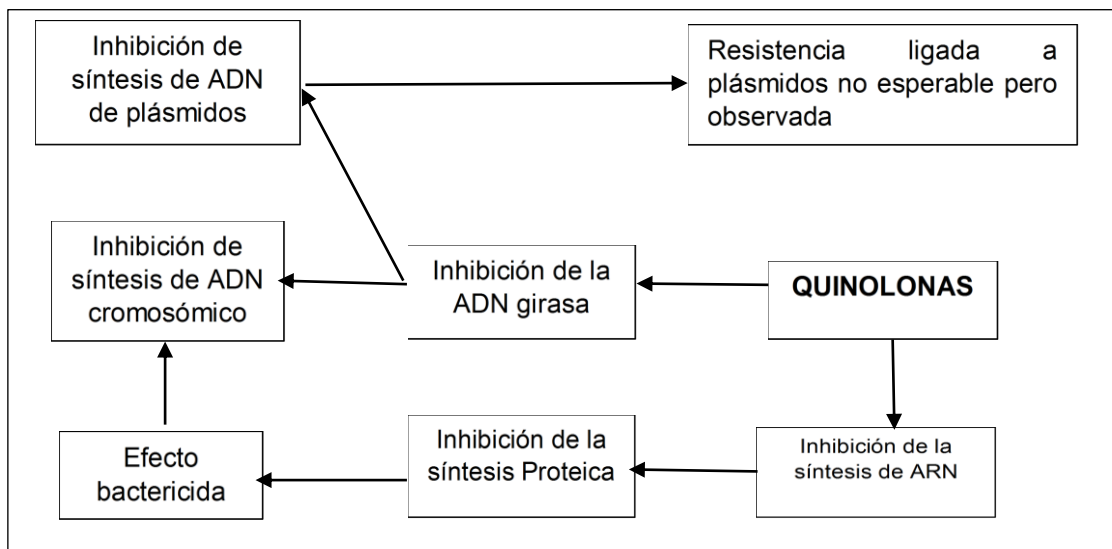


Figura 1 Mecanismo de acción del ciprofloxacino³⁸

Dada su potente actividad contra especies Gram negativas, la buena actividad de algunas de las fluoroquinolonas contra Gram positivas, el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antianaerobios y su disponibilidad tanto por vía oral como parenteral, las quinolonas son en la actualidad ampliamente utilizadas en la práctica médica, situación que ha hecho emerger un número

importante de especies resistentes. La resistencia puede ocurrir por distintos mecanismos:³⁸

- Alteración en el sitio blanco: mutaciones en las subunidades A y B del ADN girasa, así como en las subunidades E y C de la topoisomerasa IV.
- Exclusión del antibiótico del sitio blanco: en ausencia de mecanismos de destrucción, modificación o secuestro del antibiótico, la concentración intracelular del antibiótico puede ser reducida disminuyendo la penetración del antibiótico dentro de la célula o aumentando la salida de este fuera de la célula. Ambos mecanismos están involucrados en la resistencia a las quinolonas. La disminución de la entrada del antibiótico a la célula ha sido observada en Gram negativos, los que presentan mutaciones en las porinas de membranas. En las bacterias Gram positivas, en cambio, se ha observado aumento del flujo hacia el exterior: mutaciones en genes que codifican para determinadas proteínas de transporte aumentarían la salida del antibiótico de la bacteria a través del estímulo de su síntesis o mutaciones en los genes represores de su expresión.³⁸

2.12.3. Efecto bactericida:

Como mencionamos anteriormente el efecto bactericida de las quinolonas se debe a la inhibición de la síntesis de ADN cromosómico. Este efecto requiere una concentración óptima de quinolonas, ya que se pierde con concentraciones muy bajas o muy altas de la droga. Las concentraciones altas inhiben la síntesis de ARN y en consecuencia, la de proteínas. Por un mecanismo desconocido, la inhibición de la síntesis proteica inhibe el efecto bactericida. Por este motivo se produce una curva concentración / respuesta en forma de campana: el efecto bactericida aumenta hasta cierta concentración y luego comienza a descender. Es decir, las quinolonas son bactericidas a menores concentraciones (pero superiores a la CIM) y bacteriostáticas a concentraciones mucho mayor. Esto se observa claramente in vitro, pero su relevancia in vivo es desconocida. Las quinolonas tienen un efecto post antibiótico (como los aminoglucósidos) que parece ser relevante.^{38, 39}

2.12.4. Espectro:³⁹

Por ser las fluoroquinolonas más usadas se detalla a continuación el espectro de la ciprofloxacina

- **Gram (-) Aerobias:** o *Enterobacterias: Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus mirabilis.* o *Neisseria gonorrhoeae* o *Pseudomona aureaginosa* o *Serratia sp.* o *Shigella sp.* o *Salmonella sp.*

- **Gram (+) Aerobias:** o *Staphylococcus aureus* metilino sensible o *Streptococcus pyogenes* y enterococo: moderada susceptibilidad o *Listeria monocytogenes*
- **Micobacterias:** o *Mycobacterium tuberculosis*
- **Otros Microorganismos:** o *Chlamidia trachomatis* o Micoplasma
- No es activa contra bacterias anaerobias.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la investigación.

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Área de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud y en los laboratorios del Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entre los meses de abril a setiembre 2016.

3.2. Tipo de investigación.

La tipología de la investigación corresponde a un estudio básico experimental.

3.3. Población y muestra.

3.3.1. Población.

Palta jass (*Persea americana* Mill.) de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

3.3.2. Muestra

3 kg de Palta jass (*Persea americana* Mill.), recolectado en el Mercado de Luricocha en el mes de abril del 2016, en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

3.4. Procedimiento metodológico

3.4.1. Recolección de la muestra

Seguir los procedimientos establecidos por Villar del Fresno.¹⁹ Se seleccionó las frutas intactas; se lavaron con abundante agua y se realizó una incisión del fruto separando las semillas y puestas a secar a la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel Kraft, aproximadamente por una semana, una muestra herborizada de la planta se envió al *Herbarium Huamangensis* de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su clasificación taxonómica.

3.4.2. Obtención del extracto hidroalcohólico.⁴⁰

2 kg de semillas desecadas fueron molidas en un mortero. Se extrajo por

maceración durante diez días con etanol de 96°. Luego se filtró y la solución hidroalcohólica se concentró a presión y temperatura reducidas en un Rotavapor, finalmente hasta sequedad en una estufa a una temperatura no mayor de 50°C.

3.4.3. Extracción de compuestos fenólicos.⁴⁰

Para obtener los compuestos fenólicos se suspendió en agua destilada el extracto etanólico seco. Se realizó el desengrasado con éter de petróleo hasta obtener una fracción desengrasada y luego se realizó una extracción líquido líquido con acetato de etilo, hasta obtener la fracción de acetato de etilo.

3.4.4. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del extracto.⁴⁰

Una vez obtenido el extracto, se evaluó los parámetros fisicoquímicos que determinó la calidad de los mismos, que a continuación señalamos:

a) Identificación de compuestos químicos.⁴⁰

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto etanólico aislado de la semilla de *Persea americana* “palta jass”, se realizó siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuéllar (2000).⁴⁰

b) Determinación de las características organolépticas.⁴⁰

Color: Se utilizó cantidad suficiente de muestra en una luna de reloj, se colocó en un fondo blanco, para observar y determinar el color.

Olor: Una cantidad suficiente de muestra se colocó en una luna de reloj, para percibir y determinar el tipo de olor.

Aspecto: Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj, se observó y se determinó el aspecto de la muestra.

c) Determinación de la solubilidad.⁴⁰

Solubilidad en agua: En un tubo de ensayo se tomó un mililitro de agua destilada, luego se añadió 0,5 g de muestra, agitándose fuertemente, y se observó que si es soluble en agua

Solubilidad en alcohol: En un tubo de ensayo se colocó un mililitro de alcohol etílico de 70 °C, luego se añadió 0,5 g de muestra, agitándose fuertemente y se observó

d) Determinación de pH.⁴⁰

Para determinar el pH de la muestra se utilizó tiras reactivas de pH, colocándose una determinada cantidad de muestra en un vaso de precipitado, el cual previamente es diluido para introducir la tira reactiva, se dejó reposar por unos minutos al cabo del cual se retiró el papel y se comparó con el estándar de referencia para determinar su acidez o basicidad.

e) Determinación del contenido de humedad.⁴⁰

Se pesó dos gramos del extracto de la muestra de ensayo con desviación permisible de 0,5 mg y se llevó a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante, seguidamente se llevó a desecar la muestra a 105 °C durante 3 horas. Después de un tiempo se retiró la cápsula, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.⁴⁰

Cálculo:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Dónde:

Hg = Pérdida en peso por desecación (%)

M = Masa de la cápsula vacía (g)

M₁ = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M₂ = Masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

100 = Factor matemático.

f) Determinación de cenizas.⁴⁰

Se procedió de acuerdo al método descrito por Miranda.⁴⁰

Se empleó 2,5 g de droga triturada, exactamente pesada, en un crisol de porcelana previamente calibrado. Se calibró suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta que se carbonizó en una cocina y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750° C durante dos horas y media. Se enfrió en una desecadora y se pesó, repitiéndose el proceso hasta que en dos pesadas sucesivas no defirió en más de 0,5 mg. Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesado fueron de 30 min. Al enfriar el residuo fue de color blanco o casi blanco

Cálculo:

$$C = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Dónde:

C = Porcentaje de cenizas totales (%)

M = Masa del crisol vacío (g)

M₁ = Masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M₂ = Masa del crisol con la ceniza (g)

100 = Factor matemático.

5.6. Tamizaje fitoquímico

Luego de obtenido la fracción de acetato de etilo se procedió a la identificación cualitativa de los componentes presente en la semilla de la *Persea americana* Mill a través de reacciones de coloración o precipitación.

a. Prueba de identificación de flavonoides.- La reacción de Shinoda se realizó tomando unas gotas de muestra, se le agregó ácido clorhídrico concentrado y trocitos de magnesio metálico. La presencia de una coloración naranja - rojiza es positiva.

b. Prueba de identificación de taninos y fenoles (Reacción con cloruro férrico).- A un mililitro de extracto, se le adicionó gotas del reactivo de cloruro férrico al 1%, visualizándose coloraciones azul verdosa, verde, para la prueba positiva.

c. Cromatografía en capa fina. (CCF)⁴¹

Se realizó la cromatografía en capa fina con TLC silicagel 60F 20 x 20 cm y cromatografía a escala preparativa con cromatofolios de un milímetro de espesor.

- La fracción de acetato de etilo se disolvió en 0,5 mL de metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria)
- Se utilizó como sistema de solventes (ácido acético, ácido fórmico, acetato de etilo) en la proporción de 4:1:5
- Se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente no sobrepase a la muestra aplicada y dejándose que el líquido ascienda por capilaridad.
- Se sacó la placa de CCF de la cámara cromatográfica cuando el eluyente llegue a 2 cm de la parte superior de la placa (frente del solvente).
- Se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó en la lámpara UV.
- Se reveló con cloruro férrico al 1%.
- Se observó la presencia de manchas.
- Cada banda será separada y reconstituida para su lectura espectrofotométrica UV-VIS

3.4.5. Preparación del medio de cultivo ⁴¹

- Se pesó la cantidad de medio (si el preparado contiene agar debemos añadirlo a una concentración de 15 g/L) y se rehidrato con agua destilada en un matraz.

- Se autoclavó.
- Se sacó de la autoclave y se introdujo en un baño a 40°C al menos durante 30 minutos.
- Se distribuyó el medio en las placas de Petri que están estériles dentro de una campana de flujo laminar o en las proximidades del mechero, flameando bien la boca del matraz para evitar las contaminaciones.
- Se dejó en el medio hasta que se solidifique.
- Se llevó al refrigerador por 24 horas.

3.4.6. Activación de las bacterias.⁴²

Para activar las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, se procedió a inocular en tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutritivo, incubar a una temperatura de 37°C por 18 horas.

3.4.7. Preparación del inóculo.⁴²

Con la cepa reactivada se procedió por separado a seleccionar 5 colonias en 5 mL de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C hasta que la turbidez sea visible (5 horas fase logarítmica). Y se ajustó la turbidez visualmente al estándar 0,5 de la escala McFarland.

3.4.8. Determinación del halo de inhibición.⁴²

- Se colocó a cada una de las placas de Petri 20 mL de agar Müeller Hinton previamente esterilizado y se dejó solidificar el medio.
- Con un hisopo estéril se sumergió en la suspensión y se eliminó el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo.
- Se inoculó la superficie de la placa de agar de Müeller Hinton con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie por tres direcciones. Por último, se pasó el hisopo por el perímetro externo del agar. Se dejó reposar por 5 minutos.
- Se colocó los discos impregnado con extracto a diferentes concentraciones sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar y con el control positivo (ciprofloxacino 30µg). se dejó las placas 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se incubó la placa en posición invertida a 37°C durante 24 horas
- Se midió los diámetros de la zona de inhibición con una regla utilizando luz refleja sobre fondo negro. Ocho repeticiones por grupo

Interpretación: la formación del halo de inhibición significa sensibilidad (S) y la no formación resistencia (R)

3.4.9. Determinación del porcentaje de inhibición.⁴¹

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Diametro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{Diametro del halo de inhibición del control}} \times 100$$

3.4.10. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).⁴¹

Se define como la cantidad o la concentración mínima de un agente químico antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo.

a. Procedimiento:

Para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se preparó 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al 15:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15, se agregó 1 mL de caldo nutritivo.
- Posteriormente se agregó 1mL de las concentraciones del extracto al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 mL al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1 mL y se descartó. El tubo N° 15 no recibió el extracto, siendo éste el control.
- Luego se agregó 1 mL del inóculo de *Escherichia coli* ATCC 35218 a todos los tubos y se llevó a incubar a 37°C por 24 horas.

b. Lectura: Se observó el crecimiento de la bacteria mediante la aparición de turbidez en el medio, o mediante cambio de color. Por lo que el punto final de la CMI, se definió a simple vista por la falta de turbidez en el caldo, para ello se comparó el tubo con el control de crecimiento.

c. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento, anotándose la concentración de dicho tubo.

3.4.11. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).⁴²

Se define como la concentración más baja de antibacteriano que produce la muerte del 99,9% del microorganismo probado y solo permite la supervivencia del 0,1% de dicho microorganismo en cultivo.

a. Procedimiento:

Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se procedió a partir de la CMI, realizándose de la siguiente manera:

- Una vez observada la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con la ayuda de un hisopo estéril, los caldos no turbios en las placas con agar Müller Hinton

• Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.

b. lectura: Se determinará la CMB verificando si hubo o no crecimiento de bacteria en las placas sembradas.

3.5. Diseño de investigación.⁴³

El diseño de investigación es experimental de tipo experimento puro diseño con post prueba únicamente y grupo control.

Dónde:

$$\begin{array}{ccc} G_e & X & O_e \\ G_b & - & O_b \end{array}$$

G_e : Grupo experimental (extracto)

G_b : Grupo blanco

O : Crecimiento bacteriano (halos de inhibición)

Complementariamente se realizara la comparación con un grupo control (cloranfenicol)

$$\begin{array}{ccc} G_e & C & O_e \end{array}$$

G_e : Grupo control (cloranfenicol)

Tabla 7. Herramienta de recolección de datos de la investigación

Grupos	Grupo Blanco	Grupo control (ciprofloxacino)	Grupo experimental Concentraciones					
			0,5%	1%	3%	5%	10%	
I	-	VIII	X					
repeticiones		X						
Crecimiento bacteriano (halos de inhibición)			X		X		X	
								X

3.6. Análisis de Datos

Los datos obtenidos fueron expresados en formas de medias y la desviación estándar representadas en forma de cuadros e histogramas para determinar la significancia estadística. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA y comparaciones múltiples de las diferentes concentraciones del extracto para la inhibición con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 empleando el paquete estadístico SPSS versión 21

IV. RESULTADOS

Tabla 8. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanolico de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración naranja – rojiza
Triterpenos y Esteroides	Lieberman-Burchard	+	Formación de dos fases la superior de color claro y la inferior color rosado
Fenoles y Taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración azul – verdosa oscuro
Saponinas	Espuma	+	Formación de espuma

Leyenda (-): Negativo (+): Escasa (++) : Buena (+++): Excelente

Tabla 9. Ensayos químicos de los compuestos fenólicos aislados de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.

Ensayo	Metabolitos secundarios	Resultados	Características
Cloruro férrico 5%	Fenoles y taninos	+++	Azul verdosa oscuro
Shinoda	Flavonoides	++	Naranja rojizo

Leyenda: (+) Escaso (++) Regular (+++) Abundante

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.

PARÁMETROS	ENSAYOS	RESULTADOS
Organoléptico	Color	Naranja rojizo
	Olor	<i>Sui generis</i>
	Sabor	Amargo
Solubilidad	Aspecto	Líquido homogéneo
	Agua	Soluble
	Etanol	Soluble
Humedad	Perdida por desecación	10,6%
Cenizas	Cenizas totales	3,9 %
pH	Determinación de acides.	5

Tabla 11. Absorbancia de los espectros ultravioleta visible (UV-vis) de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.

Máxima		Límite: 0,01 A	
Muestra 1: Azul			
1	210 nm	2,116 A	2 213 nm 2,087 A
			3 284 nm 0,614 A
4	305 nm	0,571 A	
Muestra 2: Verde			
1	207 nm	1,478 A	2 284 nm 0,380 A

Leyenda:

- 274 nm – 311 nm: presencia de cumarinas
- 300 nm – 330 nm: presencia de isoflavonas

Tabla 12. Promedio de halos de inhibición (mm) de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016

Concentración FAE %	Promedio de inhibición <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
1	0,80
2,5	0,85
5	0,81
10	0,94
15	0,86

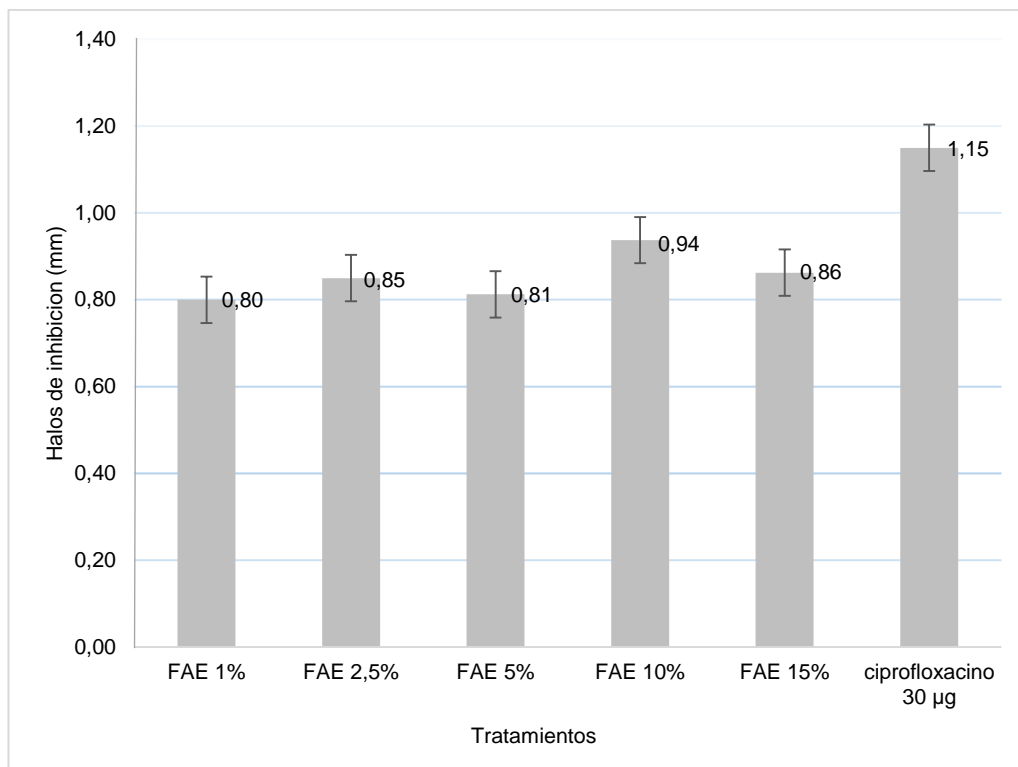
Tabla 13. Porcentaje de halos de inhibición (mm) de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” en cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, frente al estándar ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2016.

Concentración FAE %	Porcentaje de inhibición <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
1,0	69,6%
2,5	73,9%
5	70,7%
10	81,5%
15	75,0%

Tabla 14. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016

Número de tubos	FAE 10% C mg/mL	Inhibición y muerte de bacterias de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
1	2,500	-
2	1,250	** CMB
3	0,625	* CMI
4	0,313	+
5	0,156	+
6	0,078	+
7	0,039	+
8	0,020	+
9	0,010	+
10	0,005	+
11	0,002	+
12	0,001	+
13	0,0006	+

Leyenda: No hubo crecimiento (-) Hubo crecimiento (+) CMI (*) CMB (**)



ANOVA: $p < 0,05$

Gráfico 1. Variación de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho, 2016.

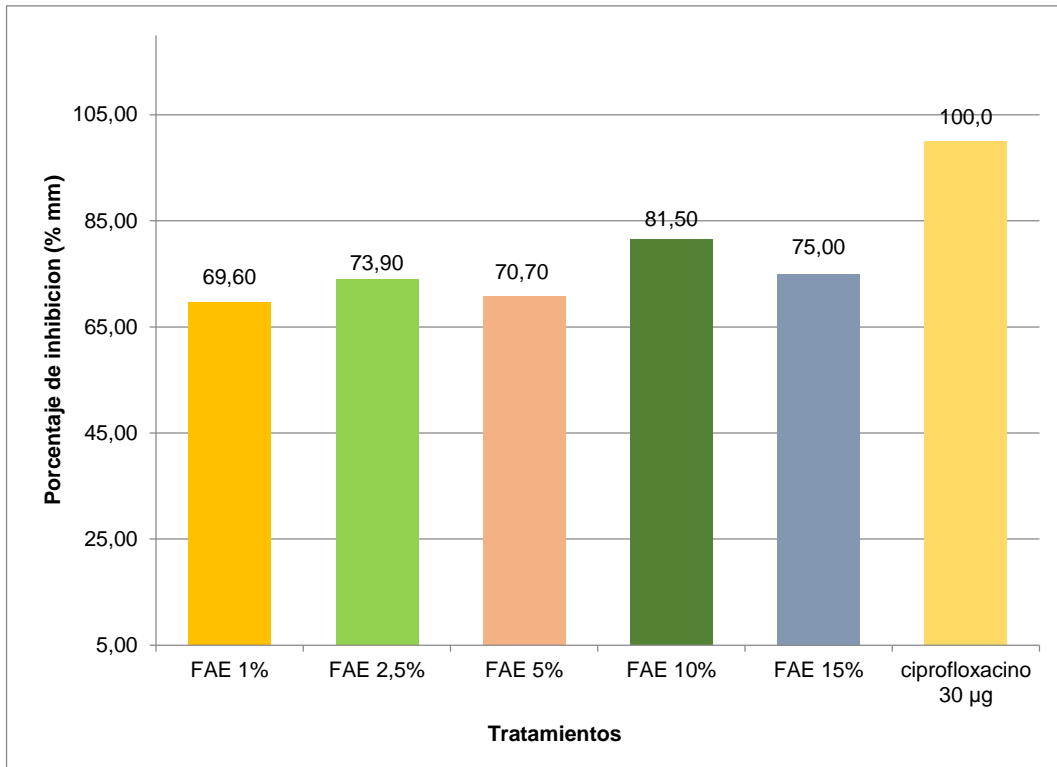


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill "palta jass" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 en comparación con el ciprofloxacino, Ayacucho 2016.

V. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, con el objetivo de comprobar la actividad antibacteriana del extracto fenólico aislado de las semillas de *Persea americana* Mill “palta jass” sobre este microorganismo, principal inductor de la afección gastrointestinal e infecciones. La actividad antibacteriana sobre este microorganismo está representada por la presencia de los halos de inhibición. Mientras mayor sean los halos de inhibición mejor será la actividad antibacteriana, razón a ello es que se procedió a realizar su estudio.

Para la extracción de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de *Persea americana* Mill “palta jass” las semillas fueron sometidas a un proceso de extracción hidroalcohólica, desengrasado con éter de petróleo y extracción de los flavonoides y otros con acetato de etilo; como nos muestra Villar del Fresno como un método de extracción. La tabla 8 y 9, muestra los resultados de la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes tanto en la fracción de acetato de etilo y extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”.

Del tamizaje fitoquímico de la fracción de acetato de etilo y etanólico de las semillas de *Persea americana* Mill “palta jass”, se puede apreciar presencia de taninos, flavonoides, saponinas, fenoles y triterpenos. Resultados similares fueron reportados por Chávez⁸ que determinó el contenido de fenoles en los extractos metanólicos, acetónicos y polifenólicos de cáscara y semilla de aguacate según la prueba de Folin Ciocalteu y cuyos resultados determinaron mayor presencia en el extracto polifenólico de semilla a diferencia de los dos extractos, los mismos resultados se observaron en el contenido de flavonoides. Rengifo⁴⁷ identificó triterpenos, quinonas, aminoácidos, flavonoides, compuestos fenólicos y trazas de lactonas; en aceite de la semilla de palta *Persea americana* Mill. Var. Hass fuerte. Escobar et al,⁶ identificó taninos y flavonoides presentes

en el extracto etanólico de la semilla de *Persea americana* y extracto etanólico de las hojas de la buganvilla. Najarro V,⁹ identificó taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides en extracto etanolico de las semillas de *Persea americana* Mill. y le responsabiliza la actividad antibacteriana a los flavonoides. Ilozue et al,¹⁰ identificaron en la semilla de *Persea americana* el cual se extrajo con cuatro disolventes diferentes (acetato de etilo, metanol, éter de petróleo y cloroformo), se sometió a un screening fitoquímico preliminar que reveló la presencia de esteroides, alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides y glucósidos cardiacos. Owusu et al,¹¹ determinaron que el extracto metanólico de las hojas de *Persea americana* Mill muestra las actividades antimicrobianas más potentes con las mayores zonas de inhibición (0 - 1,8 mm) en el ensayo de difusión en agar y con la más baja Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en el ensayo de dilución en caldo contra un panel de microorganismos que incluye *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Estos datos asemejados al obtenido apoyan el uso etnomedicinal de las hojas de *Persea americana* para el tratamiento de las infecciones y de otros síntomas cuya etiología puede estar relacionado con el estrés oxidativo.

Como se observa en la tabla 8, 9 y en el anexo 2, 3, hay presencia de taninos, flavonoides, saponinas, fenoles y triterpenos pero no la que se esperaba, en el corrido cromatográfico como se observa, se logró determinar según la fluorescencia y longitud de onda la presencia de flavonoides y taninos en anexo 16 y tabla 11; esto podría atribuirse al tipo de disolvente utilizado para la extracción ya que la polaridad del disolvente juega un papel clave en la mayor concentración de compuestos fenólicos, por lo general los disolventes menos polares se consideran adecuados para la extracción de fenoles lipófilos y que el etanol era el disolvente menos efectiva de acuerdo a nuestros resultados.

En la tabla 10 el extracto presenta 10,6% de humedad; 3,9% de cenizas. El extracto es de color naranja rojizo, de olor *sui generis*, sabor amargo y de aspecto homogéneo, soluble en agua y tiene un pH de 5. Resultados similares fueron determinados por Ceballos y Montoya, pero en muestra de consumo húmedo dando como resultado un porcentaje de Humedad de 65,39; porcentaje de cenizas de 3,19% en especie Booth;⁴³ mientras que Bressani determinó en muestra seca de semilla de palta jass un porcentaje de Humedad 7,66; porcentaje de cenizas de 3,85; casi semejante a los resultados obtenidos en el

ensayo en muestra seca de semilla de *Persea americana* Mill. "palta jass"; ⁴⁴ según Miranda y Cuellar⁴⁰ el porcentaje de humedad límite debe ser de 8 -14%, así como también están determinadas en las farmacopeas, para evitar el crecimiento microbiano; con respecto al límite de porcentaje de cenizas también hace referencia un valor límite < 5%.

Estos resultados podrían también explicarse por las diferentes condiciones de crecimiento de la planta, los factores ambientales, el estado de maduración y técnicas de procesamiento en la extracción de los metabolitos secundarios.

En caso de la actividad antibacteriana, el uso de la técnica de difusión en disco Kirby Bauer permite un análisis preliminar eficaz para demostrar efectos antibacterianos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill. "palta jass". Así la tabla 12 y tabla 13 muestra la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill. "palta jass" frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218; Chavez⁸ en su estudio realizado sobre evaluación antioxidante y antimicrobiana en extractos de residuos de aguacate, realizó extracciones metánolicas y acetonicas de cáscara y semilla de aguacate contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *staphylococcus aureus*, reportó que el extracto metanólico y acetónico de semilla mostró mayor capacidad antimicrobiana en los tres tipos de bacterias a diferencia de la cáscara, dicha actividad se debe a su alto contenido de fenoles y flavonoides. Así mismo Escobar y colaboradores,⁶ determinaron la actividad antibacteriana mediante la prueba de sensibilidad por la técnica de difusión en doble capa; la prueba de la actividad antidiarreica fue evaluada a través de pruebas por inducción bacteriana que producen diarrea en ratas de la cepa Winstar. En los resultados se muestran que el extracto etanólico de las hojas de buganvilla presenta actividad antibacteriana y antidiarreica a una concentración de 0,763 g/Kg peso, contra *Escherichia coli* y el extracto de la semilla de palto a una concentración de 0,688 g/kg peso, contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. Así también determinaron a los compuestos responsables de la actividad antibacteriana y antidiarreica; son principalmente taninos y flavonoides, presentes tanto en hojas de buganvilla y semilla de palto. Ilozue et al¹⁰ determinaron la actividad antimicrobiana del extracto con cuatro disolventes diferente de semillas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* se llevó a cabo utilizando las técnicas de difusión en disco. El extracto de acetato de etilo demostró una actividad

pronunciada contra los organismos de prueba. La actividad del extracto metanólico frente a *Staphylococcus aureus* fue alto, mientras que de éter de petróleo era mínima contra *Escherichia coli*. Sin embargo, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* fueron resistentes a los extractos de cloroformo y metanol. La actividad de los extractos etilactato, cloroformo y metanol se compara favorablemente con la eritromicina antibiótico utilizados como estándar.

Las actividades antimicrobianas que se muestran por los diversos extractos se podrían atribuir a la presencia de metabolitos secundarios como taninos y flavonoides. La variabilidad de la actividad antimicrobiana de los extractos de palta podría ser debido a la naturaleza de las sustancias antimicrobianas presentes en los extractos y de su mecanismo de acción sobre el microorganismo ensayado. La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos, taninos, terpenos y flavonoides están documentados en la literatura científica.

El mecanismo responsable del efecto antibacteriano de los fenoles puede estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacciones inespecíficas con las proteínas. La presencia de hidroxilos en los anillos le confiere a los flavonoides mayor actividad contra bacterias Gram positivas al inhibir la síntesis de ADN, en contraste con las Gram negativas, sobre las que la actividad es menor. La actividad de los taninos es debida probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y a nivel de la pared celular de la bacteria.¹⁹

Los espectros de la actividad antimicrobiana exhibida por el extracto se podrían atribuir a la presencia de estos fitoconstituyentes lo que podría significar que *Persea americana* Mill “palta jass” representa una fuente potencial de agentes terapéuticos. Es de esperar que el estándar de ciprofloxacino, por ser un fármaco de síntesis con un espectro de acción definido, muestre los resultados de inhibición esperado, es por ello que la eficacia antimicrobiana es superior a las concentraciones del extracto fenólico aislado de *Persea americana* Mill “palta jass”.²⁵

En la tabla 13 y gráfico 1 se puede observar el porcentaje de halos de inhibición y la variación de inhibición de las diferentes concentraciones frente a la cepa en estudio, por lo que se puede decir que todas las concentraciones en estudio muestran cierta actividad inhibitoria sobre la cepa empleada. En general las

plantas sintetizan sustancias químicas como factor defensivo, tal es el caso de los flavonoides que son conocidos por ser sintetizados en respuesta al ataque microbiano. En efecto se puede apreciar en el gráfico 2 que la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla muestra un porcentaje de inhibición de 67,17% frente a cepa de *Escherichia coli* a una concentración de 10%. Como se puede apreciar la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla muestra mayor porcentaje de inhibición ya que es el órgano donde se concentra la mayor parte de metabolitos secundarios activos con actividad antibacteriana seguida de las hojas y corteza. En este sentido, podría afirmarse, que se trata de los taninos y fenoles presentes en la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”. A pesar de la fuerte resistencia intrínseca de estos microorganismos a la mayoría de agentes antimicrobianos, es importante la inhibición lograda con *Persea americana* Mill “palta jass” ⁴⁶. Dado que la CMI 0,625 mg/mL y CMB 1,250 mg/mL como se observa en la tabla 14 sea baja para la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla, esto indica de que los fitoconstituyentes de las semillas de *Persea americana* Mill tiene un alto potencial terapéutico que incluso trabajos científicos preliminares como reporta Najarro en el extracto etanólico de la semilla inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*; de igual manera Gómez et al, en los extractos etanólicos y clorofórmico de la semillas inhibió el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, mostraron valores de CMI ≤ 50 g/mL respectivamente en sus resultados.⁴⁸

Afirmar con exactitud el metabolito secundario con actividad antibacteriana resultaría impreciso ya que, como se dijo, todos poseen cierta capacidad de actuar frente a muchos microorganismos y se han postulado múltiples formas de actuación de estos metabolitos sobre los microorganismos que conducen a la muerte de la bacterias

VI. CONCLUSIONES

1. La fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” tiene actividad antibacteriana a una concentración del 10% frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218.
2. Los metabolitos secundarios identificados en la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” fueron: flavonoides, saponinas, fenoles, taninos y triterpenos.
3. Los parámetros fisicoquímicos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” fueron: 10,9% de humedad; 3,9% de ceniza. El extracto fue de color naranja rojizo, de olor *sui generis*, de sabor amargo, aspecto homogéneo, soluble con el agua y tenía un pH 5.
4. La CMI y CMB de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” fue de 0,625 mg/mL y 1,250 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Para un mejor estudio y visualización de placas inhibidas por el extracto o aceite en prueba, se recomienda la utilización de una cámara o cabina oscura con luz alógena semejante a la cámara de espectro UV- vis, la cual ayude a identificar mejor el tamaño de halo.
2. Realizar estudios de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” frente a otros microorganismos Gram positivos y Gram negativos.
3. El alto porcentaje de residuos son principalmente desechados y no tienen una aplicabilidad a nivel nacional; sin embargo estos podrían contener compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carhuapoma M, Angulo P, Plantas medicinales en atención primaria de salud agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectivas de desarrollo de la región los libertadores Wari. Agencia cooperación; Perú 1999. Acceso el 28 de agosto del 2016 [<https://books.google.com.pe/books>]
2. Ryan K, George C, Microbiología medica una introducción a las enfermedades infecciosas IV ed. Editorial McGRAW – HILL. México 2004.
3. Arango M., Plantas medicinales: botánica de interés médico, Colombia 2006.
4. Torres L, Tapia M, Aguilar A, Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicanas para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Editorial graficas Rey, Barcelona 2005
5. Mercado G, Carrillo L, Medrano A , López J, Álvarez E, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México, *Nutr Hosp*;28(1):36-46, México 2013.
6. Escobar M, Pinto D, Zabalaga S, Escalante A, Bustamante Z, Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de palto (*Persea americana*) y buganvilla (*Bougainvillea glabra*), BIOFARBO U.M. de san Simón, Bolivia 2010. Acceso el 23 de abril del 2016. [<http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?>]
7. Granados A, Factores nutricionales que determinan el comportamiento productivo del aguacate (*Persea americana* Mill) Cv. Lorena en San Sebastián de Mariquita en el departamento del Tolima, Colombia 2013. Acceso el 23 de abril del 2016. [<http://www.bdigital.unal.edu.co/11825/1/33379727.2014.pdf>]
8. Chávez P, Evaluación antioxidante y antimicrobiana en extractos de residuos de aguacate Instituto Tecnológico de Sonora, México 2011. Acceso el 07 de marzo del 2016 [http://biblioteca.itson.mx/dac_new/tesis/309_chavez_pedro.pdf]
9. Najarro V, Actividad biológica del extracto etanólico de las hojas, corteza y semilla de *Persea americana* Mill, “palto” frente a cepas de enterobacterias, Perú 2013
10. Ilozue N., Ikezu U, Ugwu P., Anti-Microbial and Phytochemical Screening of the Seed Extracts of *Persea Americana* (AVOCADO PEAR), *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* Volume 9, Issue 2 Ver. VI (Mar-Apr. 2014, Nigeria), PP 23-25. Acceso el 25 de abril del 2016 [www.iosrjournals.org]
11. Owusu N, Ama S, Mensah J, Badu M, Arhinand S, Mensah M., Fitoconstituyentes, propiedades antimicrobianas y antioxidantes de las hojas de *Persea americana* Mill cultivadas en Ghana, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 9(36), pp. 933- 939, 25, Ghana 2015. Acceso el 24 de abril del 2016 [<http://www.academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/B13A36455396>]
12. Lilia G, El Uso Popular de las Plantas Medicinales en Uruguay La experiencia de los pequeños productores agroecológicos *Quaderni ZooBioDi* 2010, Pag 45. Acceso el 23 de abril 2016 [www.zoobiodi.it/doc/Atti_N6.pdf]
13. Githinji P, Githu L, Marete E, Githua M, Mugo M, Mbaka E, Quantitative Analysis of Total Phenolic Content in Avocado (*Persia Americana*) Seeds in Eastern Province of Kenya Vol.3 No.10, Kenya 2013 Acceso el 23 de agosto del 2016 [www.iiste.org/Journals/index.php/CMR/article/download/.../7655]


14. MINSA, Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de discos difusión INS, Perú 2008. Acceso el 12 de agosto del 2016.
[www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf]
15. Ramírez L, Castaño D, Metodologías para evaluar In vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, Universidad de Pereira, Scientia et Technica Año XV, No 42, Brasil 2009. Acceso el 23 de abril del 2016
[www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf]
16. Peredo H, Palou E, López A, Aceite esencial: método de extracción, departamento de Ingeniería Química, México 2009. Acceso el 20 de mayo de 2016. [[www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/Tsia-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/Tsia-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)]
17. Sergio M, Rodríguez M, Alcaraz L, Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas, I edición, editorial CiB, México 2012.
Acceso el 20 de abril 2016
[intranet.cibnor.mx/personal/bmurillo/docs/manual-aceites-esenciales.pdf].
18. Carrión A, García C, Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica, Universidad de Cuenca, Ecuador 2010. Acceso el 23 de abril del 2016. [cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/tq1005.pdf].
19. Villar del fresno A, Farmacognosia general, síntesis S.A. España 1999
20. Mercado G, de la Rosa L, Wall A, López J, Álvarez E, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México Nutr Hosp. México 2013. Acceso el 20 de setiembre del 2016. [<http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/6298.pdf>].
21. Vázquez A, Álvarez E, López J, Medrano A., De la Rosa A., Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo, Vol. VI, No. 2, México 2012. Acceso el 19 de agosto de 2016 [http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v6n2/data/Taninos_hidrolizables_y_condensados_naturaleza_quimicaventajas_y_desventajas_de_su_consumo.pdf]
22. Gimeo E, Compuestos fenólicos. Un análisis para sus beneficios para la salud. OFFARM, ámbito farmacéutico nutrición [revista online]. 2004; 23(6). Acceso el 12 de abril del 2017.
[www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=38&pident_articulo=13063508]
23. Daglia M, Polyphenols as antimicrobial agents, current opinión in biotechnology, 2012; 23: 174-181. Acceso el 12 de Abril 2016.
[https://www.researchgate.net/publication/51650287_Polyphenols_as_antimicrobial_agents]
24. Vinha A, Moreira J y Barreira S, Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.), Journal of Agricultural Science; Vol. 5, No. 12; Portugal 2013. Acceso el 13 de Agosto del 2016.
[www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/download/.../18624]
25. Idris S, Ndukwe G, Gimba E, Preliminary Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of seed extracts of *Persea americana* (Avocado Pear), Bajopas Volume 2 Number 1, Nigeria 2009. Acceso el 23 de Abril del 2016.
[<http://www.ajol.info/index.php/bajopas/article/view/58538>]
26. Zari G, Villalobos J. De los Ríos E, Ruiz S. Guía de prácticas de Farmacognosia II, Departamento de Farmacotécnica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNT. 1a ed. Trujillo-Perú; 2007. Acceso el 10 de abril del 2016.
[revistas.ucv.edu.pe/index.php/UCV-SCIENTIA/article/viewFile/405/286]

27. Rodríguez S, Elvia N, Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la conservación de Frutas y Hortalizas, Ra Ximhai, vol. 7, México 2011, pp. 153-170.
Acceso el 24 de abril 2016 [www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf]
28. Taylor M, Dawson J. Lo esencial en Farmacología. 2a ed. España: Elsevier; 2003.
Acceso el 23 de agosto de 2016. [<https://books.google.com.pe/books?id>]
29. MINAGRI, La palta producto estrella de exportación, edición digital MINAGRI – DGPA, Perú 2015. Acceso el 12 de abril 2016 [minagri.gob.pe/portal/.../analisis-2015]
30. Macías V, Actividad biológica (farmacológica) y/o etnomédica; y compuestos fitoquímicos aislados de algunas especies de los géneros: persea, laurus, lindera, aniba, phoebe, nectandra, cassytha, cinnamon, licaria, ravensara, pleurothyrium, dehaasia, apollonias, y neolitsea (lauraceae), Vol. 7 N° 1, DUAZARY 2010. Acceso el 12 de abril de 2016. [<http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/duazary/article/view/320>]
31. Quispe J, Suazo F, Efecto anticonceptivo del extracto etanólico de la semilla de persea americana (palta) en ratones hembras durante el periodo enero-marzo 2014; Lima 2014. Acceso el 12 de agosto de 2016 [cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3688/1/Quispe_yj.pdf]
32. Olacta J, Schwrtz M, Undurraga P, Contreras S, Utilización de la semilla de palta (*Persea americana Mill.*) cv Hass como producto agroindustrial. VI Congreso Nacional de Aguacate Chile 2007. Acceso el 12 de agosto del 2016. [www.avocadosource.com/WAC6/es/Extenso/4b-198.pdf]
33. Gonzales ME, Forero F, Sandoval A. Efecto del tratamiento enzimático de la extracción del aceite de aguacate. Ministerio de agricultura de Colombia. Asociación hortofrutícola de Colombia 2010; 2: 1-62.
Acceso el 12 de agosto de 2016. [<http://www.medellin.unal.edu.co/iicta2014/doc/Memorias%20IICTA%202014.pdf>].
34. Restrepo A, Alternativas para la conservación de aguacate (*Persea americana Mill*, variedad Hass) en la inhibición del pardeamiento enzimático, Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ingeniería Especialización en Alimentación y Nutrición Caldas (Ant.) 2012
Acceso el 12 de abril de 2016 [http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/913/1/Alternativas_conservacion_aguacate.pdf]
35. Plino L, Formación de Biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia. Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas, España 2010.
Acceso el 12 de abril de 2016 [<http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>]
36. Calvo J, Martínez L, Mecanismos de acción de los antimicrobianos, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España 2009, acceso el 24 de abril 2016 [<http://zl.elsevier.>]
37. Martínez J, Sánchez J Mecanismo de acción de los antibióticos, España 2007
38. Ventriglia M, Vives E, Medvedovsky D, Rothlin R, Farmacología II Quinolonas, 2003. Acceso el 12 de abril del 2016. [<https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quinolonas.pdf>]
39. Tinco A., Farmacología básica y avanzada, vol 1, Perú 2012
40. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000.

41. Lock O, investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales II edición Pontificia Universidad católica del Perú 1994.
42. Granados R, Villaverde P. Microbiología: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general, parasitología general. II ed. Thomson editores, España 2007
43. Sampieri R, Fernández C, Baptista P, Metodología de la investigación, 5 edición, editorial MC Graw- Hill, México 2010. Acceso el 02 de abril del 2016 [<https://www.esup.edu.pe/...investigacion/Metodologia%20de%20la%20investigacion>].
44. Ceballos A., Montoya S. Evaluación química de la fibra en semilla, pulpa y cáscara de tres variedades de aguacate, Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 11 No. 1 (103 - 112), Colombia 2013. Acceso el 24 de abril 2016 [www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n1/v11n1a13.pdf]
45. Bressani R., la composición química y capacidad antioxidativa y valor nutritivo de la semilla de variedades de aguacate, Proyecto fodecyt N6, Guatemala 2009. Acceso el 02 de agosto de 2016 [<http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.02.pdf>]
46. Niogret J, Epsky ND, Schnel R, Boza E, Kendra P, Heath R, Terpenoid variations within and among Half – sibling Avocado Tress, *Persea americana* Mill. (Lauracea). Plos one; 2013. Acceso el 03 de setiembre del 2016 <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.007360>
47. Rengifo P, Caracterización del aceite de la semilla de palta *Persea Americana* Mill. Var. Hass fuerte y medición de su actividad antioxidante, Perú 2014
Revisado el 02 de setiembre 2016
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3869/1/Rengifo_gp.pdf
48. Gómez R, Arzate C, Quintanilla R, Tamez P, Tamez R, Monreal E, Rodríguez C, Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Laurácea Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (spreng) Less (Astaraceae) leaf extracts and active fractions gainst *Mycobacterium tuberculosis*. Amer-Eur J Scient Res; 2008.
Acceso el 03 de agosto del 2016 [[http://www.idosi.org/aejsr/3\(2\)08/11.pdf](http://www.idosi.org/aejsr/3(2)08/11.pdf)]

ANEXO

Anexo 1. Certificado de identificación sistemática de *Persea americana* Mill “palta jass”.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE “SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA”

C E R T I F I C A


Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica **Srta. Lía, ROMANÍ SÁNCHEZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de CRONQUIST. A. (1988), y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	LAURALES
FAMILIA	:	LAURACEAE
GENERO	:	Persea
ESPECIE	:	<i>Persea americana</i> Mill.
VARIEDAD	:	jass
Nombre vulgar.	:	“palto” “aguacate”

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 8 de Abril del 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Biga. Laura Atcasimo Medina
JEFE

Anexo 2. Certificado de identificación sistemática de *Escherichia coli* ATCC 35218



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE MICROBIOLOGÍA

El jefe del Laboratorio de Bacteriología, del Área Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de huamanga:

CERTIFICA:

Que se ha proporcionado a la Srta. Lía ROMANÍ SÁNCHEZ, la Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica a fin de que pueda desarrollar la tesis titulada: "Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos aislados de la semilla de *Persea americana* Mill "palta jass" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016".

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que creas por conveniente.

Ayacucho, 01 de noviembre de 2016


Mg. Víctor-L. Cardenas López
Jefe del Laboratorio de Bacteriología
Área Académica de Microbiología

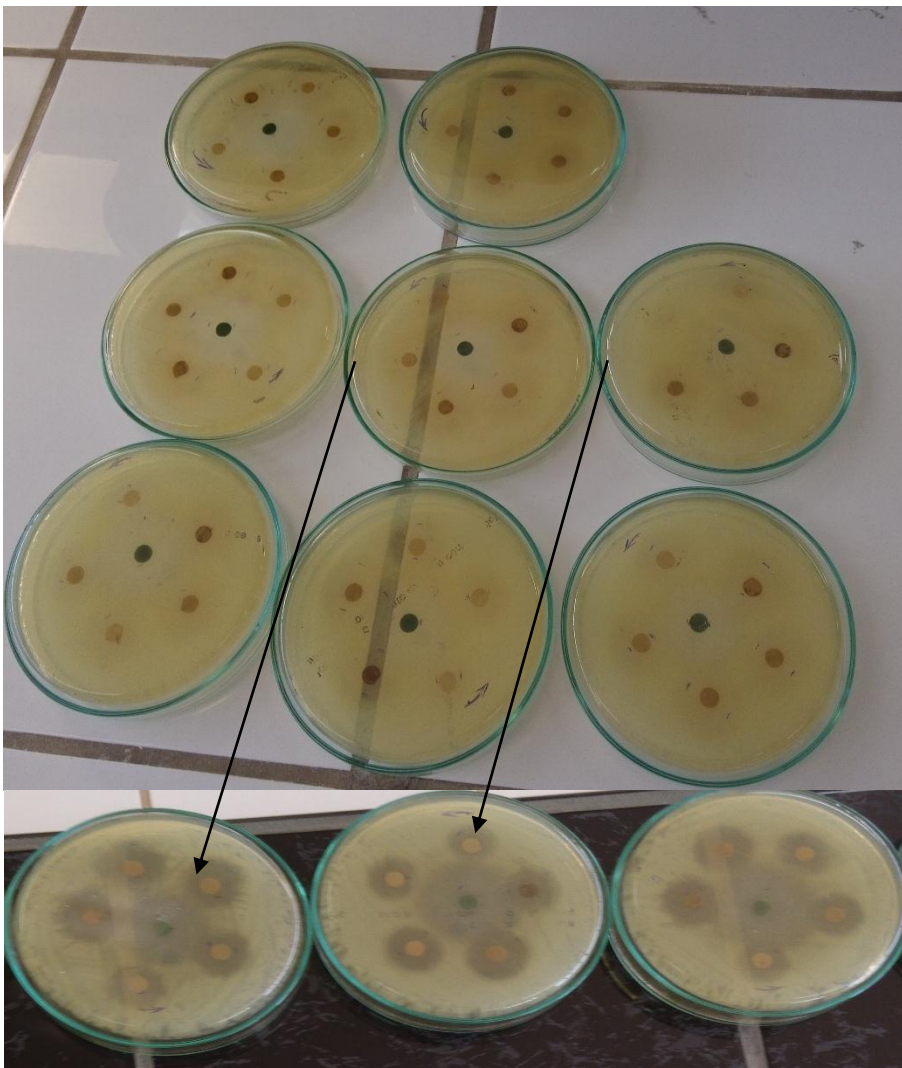
Anexo 3. Reconocimiento de metabolitos secundarios en el extracto etanolico de la semilla de *Persea americana* Mill, "palta jass".



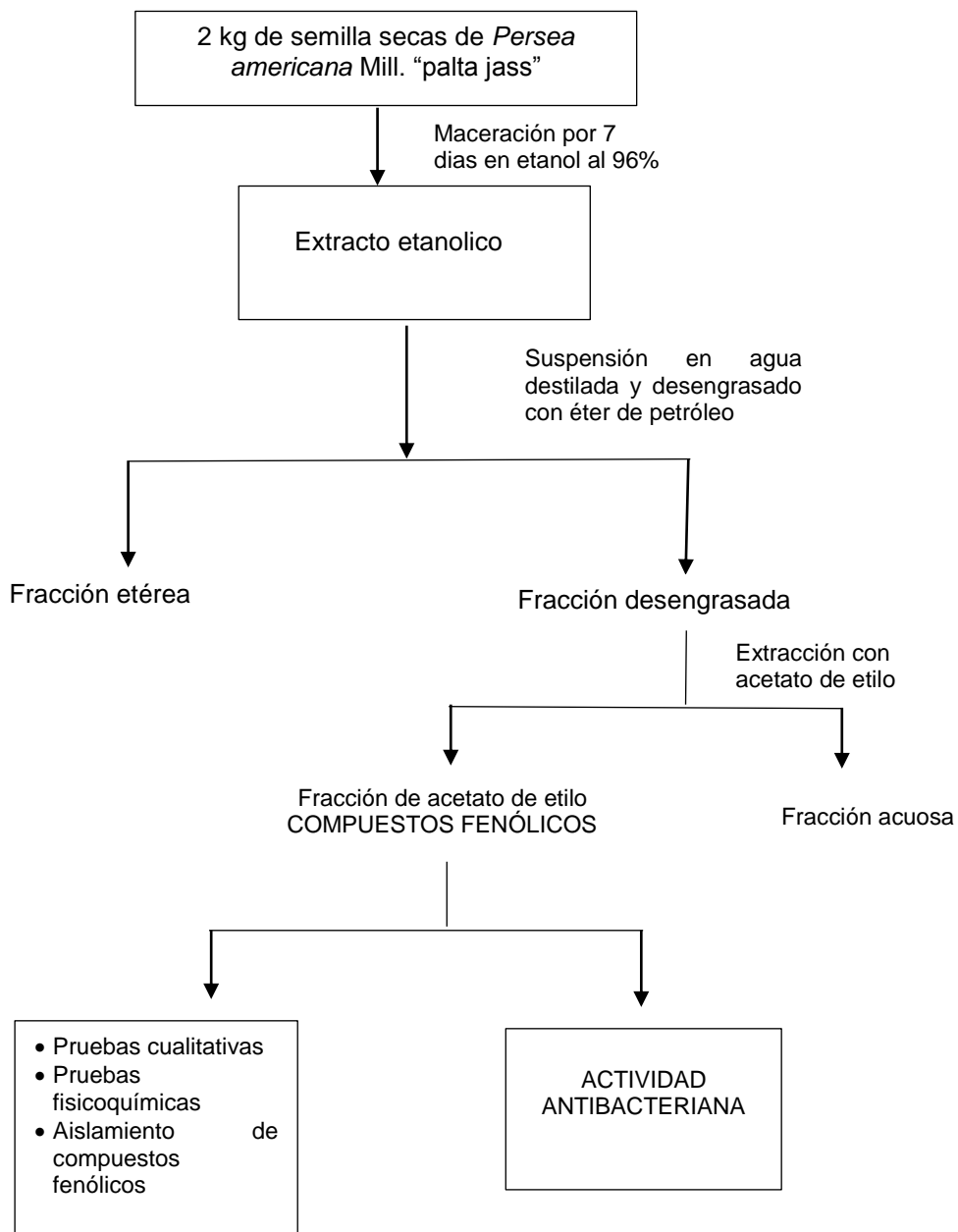
Anexo 4. Reconocimiento de metabolitos secundarios en la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill, "palta jass"



Anexo 5. Inhibición de cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 por la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill, "palta jass"



Anexo 6. Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos de las semillas de *Persea americana* Mill. "palta jass"



Anexo 7. Datos descriptivos de los halos de inhibición de la fracción de acetato de etilo aislados de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016.

(I) Trata- miento	(J) Trata- miento	Diferencia de medias (I- J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
FAE 1%	FAE 2.5%	-,05000	,09959	,996	-,3473	,2473
	FAE 5%	-,01250	,09959	1,000	-,3098	,2848
	FAE 10%	-,13750	,09959	,738	-,4348	,1598
	FAE 15%	-,06250	,09959	,988	-,3598	,2348
	Ciprofloxacino 30 ug	-,35000*	,09959	,013	-,6473	-,0527
FAE 2,5%	FAE 1%	,05000	,09959	,996	-,2473	,3473
	FAE 5%	,03750	,09959	,999	-,2598	,3348
	FAE 10%	-,08750	,09959	,950	-,3848	,2098
	FAE 15%	-,01250	,09959	1,000	-,3098	,2848
	Ciprofloxacino 30 ug	-,30000*	,09959	,047	-,5973	-,0027
FAE 5%	FAE 1%	,01250	,09959	1,000	-,2848	,3098
	FAE 2.5%	-,03750	,09959	,999	-,3348	,2598
	FAE 10%	-,12500	,09959	,807	-,4223	,1723
	FAE 15%	-,05000	,09959	,996	-,3473	,2473
	Ciprofloxacino 30 ug	-,33750*	,09959	,018	-,6348	-,0402
FAE 10%	FAE 1%	,13750	,09959	,738	-,1598	,4348
	FAE 2.5%	,08750	,09959	,950	-,2098	,3848
	FAE 5%	,12500	,09959	,807	-,1723	,4223
	FAE 15%	,07500	,09959	,974	-,2223	,3723
	Ciprofloxacino 30 ug	-,21250	,09959	,290	-,5098	,0848
FAE 15%	FAE 1%	,06250	,09959	,988	-,2348	,3598
	FAE 2.5%	,01250	,09959	1,000	-,2848	,3098
	FAE 5%	,05000	,09959	,996	-,2473	,3473
	FAE 10%	-,07500	,09959	,974	-,3723	,2223
	Ciprofloxacino 30 ug	-,28750	,09959	,063	-,5848	,0098
Cipro flox acino 30 ug	FAE 1%	,35000*	,09959	,013	,0527	,6473
	FAE 2.5%	,30000*	,09959	,047	,0027	,5973
	FAE 5%	,33750*	,09959	,018	,0402	,6348
	FAE 10%	,21250	,09959	,290	-,0848	,5098
	FAE 15%	,28750	,09959	,063	-,0098	,5848

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 8. Resultados del análisis de varianza de los halos de inhibición de la fracción de acetato de etilo aislados de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,684	5	,137	3,446	,011
Dentro de grupos	1,666	42	,040		
Total	2,350	47			

Anexo 9. Resultado de las comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición de la fracción de acetato de etilo (FAE) aislado de la semillas de *Persea americana* Mill “palta jass” frente a *Escherichia coli*, Ayacucho 2016.

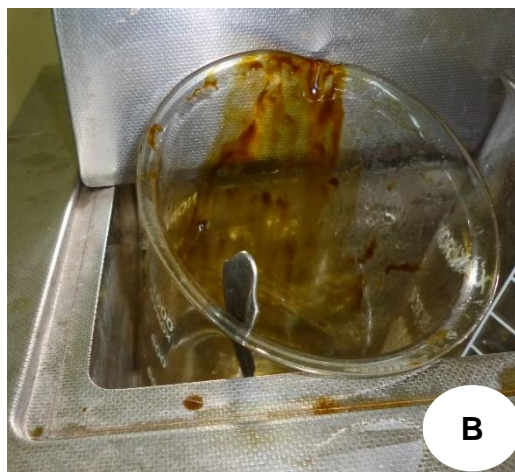
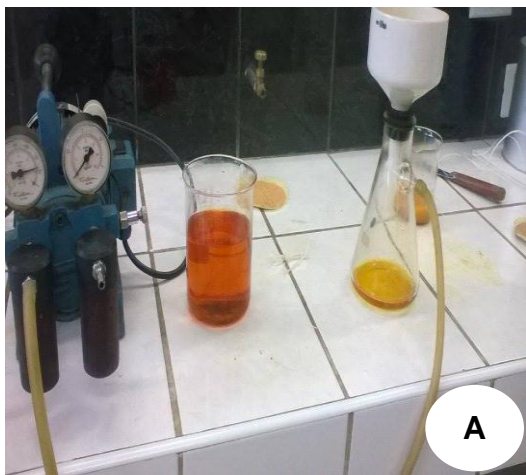
TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1%	8	,8000	
5%	8	,8125	
2,5%	8	,8500	
15%	8	,8625	,8625
10%	8	,9375	,9375
Ciprofloxacino 30 ug	8		1,1500
Sig.		,738	,063

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,000.

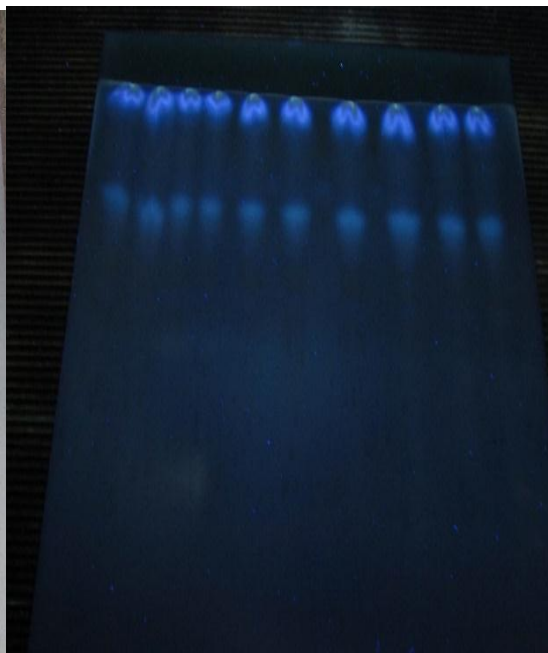
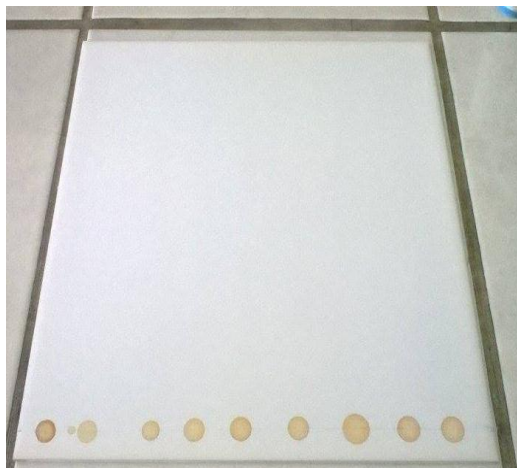
Anexo 10. Molienda de las semillas seleccionadas del fruto de *Persea americana*
Mill "palta jass" en un Molino casero



Anexo 11. Proceso de aislamiento de compuestos fenólicos de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.



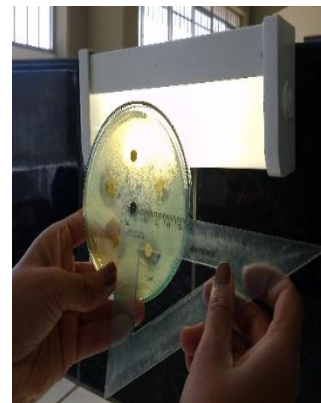
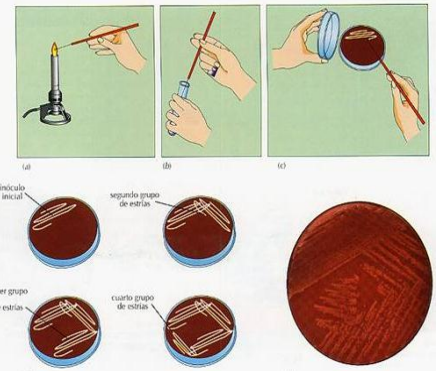
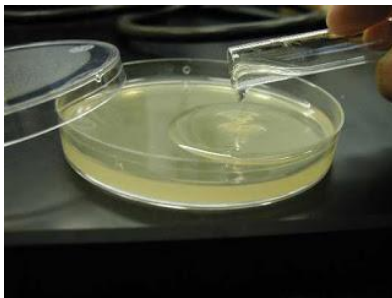
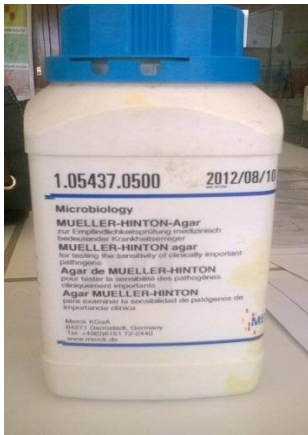
Anexo 12. Compuestos fenólicos aislados por cromatografía en capa fina por espectrofotometría ultravioleta, del extracto de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.



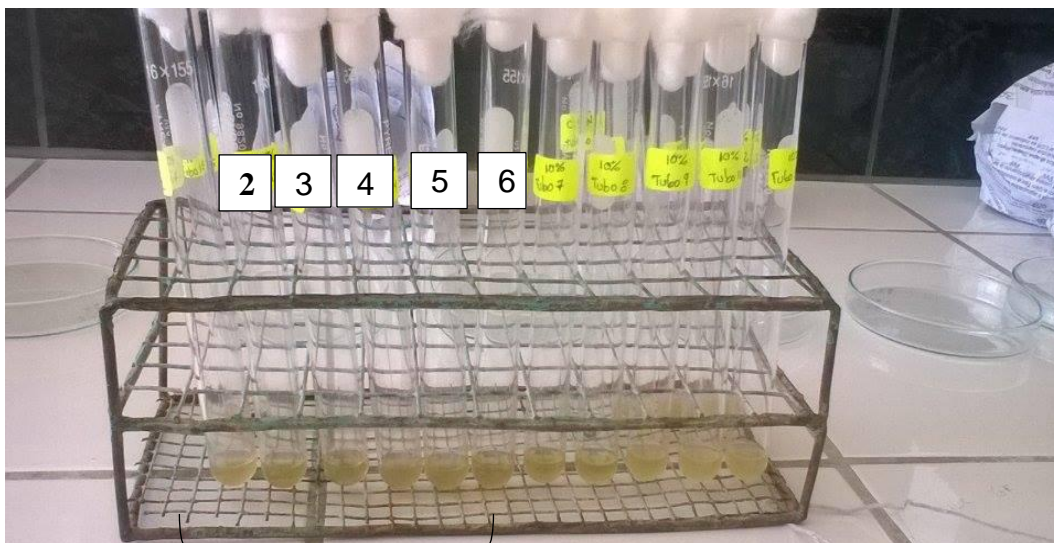
Anexo 13. Proceso de replicación, inoculación de las bacterias de *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2016



Anexo 14. Preparación del medio de cultivo e incubación de *Escherichia coli* ATCC 35218 e inhibición por la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill. "palta jass", Ayacucho 2016.



Anexo 15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria al 10% y 15% de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.

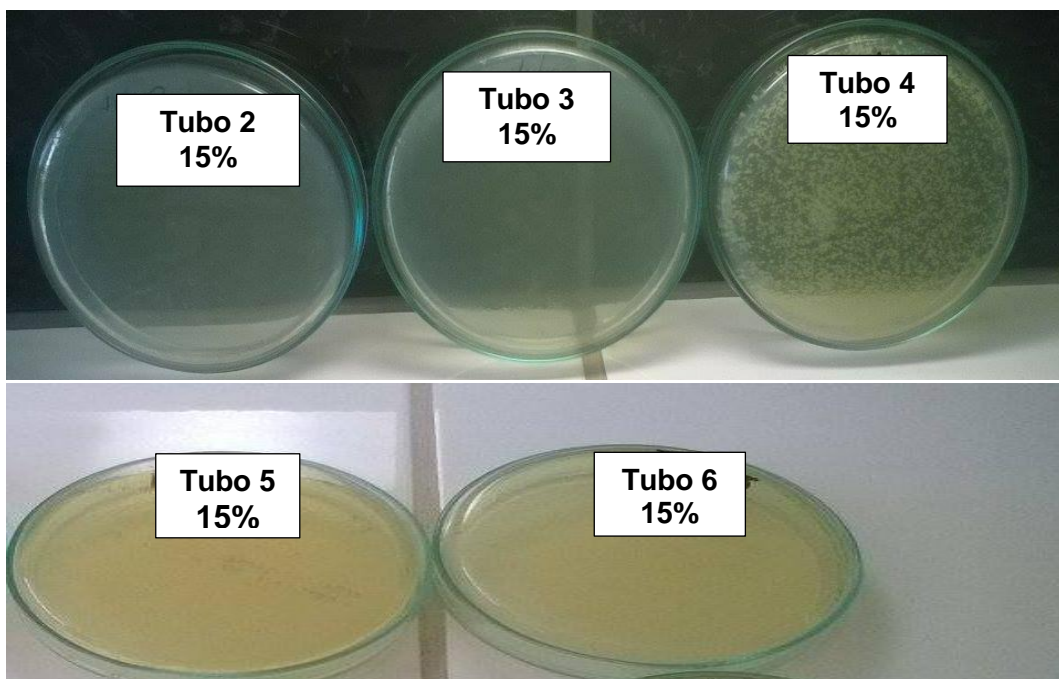
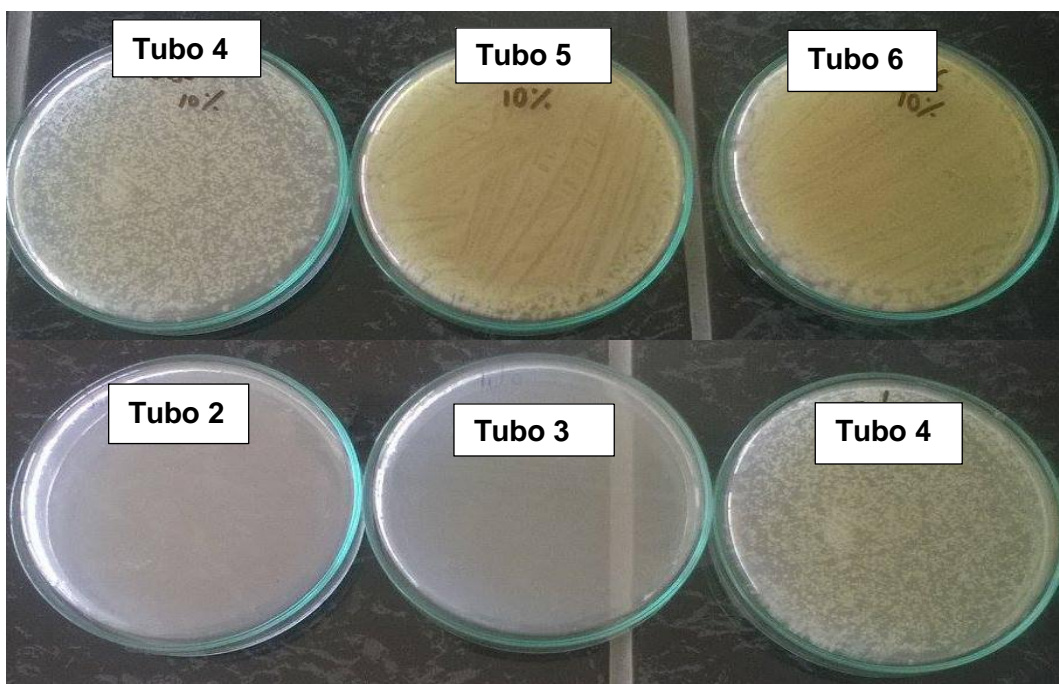


Sembrar



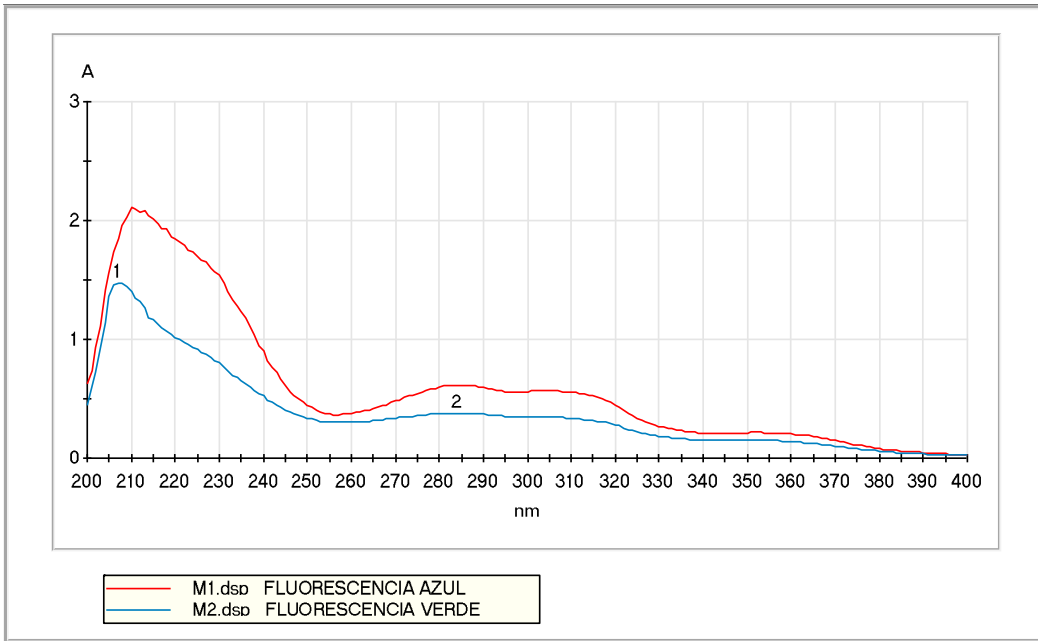
Sembrar

Anexo 16. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida al 10% y 15% de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass”, Ayacucho 2016.



Anexo 17. Curvas cromatografías de la fracción de acetato de etilo aislados de la semilla de *Persea americana* Mill “palta jass” en espectro Uv- vis, Ayacucho 2016.

Spectrum: M2.dsp
 Description: FLUORESCENCIA VERDE
 Operator: user/FARMACOGNOSIA
 Created: 26/07/2016 05:33:08 p.m.
 Spectrophotometer: GENESYS 6
 Serial number: 2M6H070001
 Firmware: 1.200



M1.dsp FLUORESCENCIA AZUL

Maxima Threshold: 0.01 A
 1 210 nm; 2.116 A 2 213 nm; 2.087 A 3 284 nm; 0.614 A
 4 305 nm; 0.571 A

M2.dsp FLUORESCENCIA VERDE

Maxima Threshold: 0.01 A
 1 207 nm; 1.478 A 2 284 nm; 0.380 A

Anexo 18. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos aislados de la semilla de *Persea americana* Mill. "palta jass" frente a *Escherichia coli*. ATCC 35218, Ayacucho 2016.
PERSONAL INVESTIGADOR: ROMANI SANCHEZ, Lía

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA
Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. "palta jass" frente a <i>Escherichia coli</i> . ATCC 35218, Ayacucho 2016.	¿Los compuestos fenólicos aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill tendrán actividad antibacteriana frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218?	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <p>Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana.</p> <p>OBJETIVOS ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar los metabolitos secundarios presentes en la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. Identificar los parámetros fisicoquímicos de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria CMI y Concentración Mínima Bactericida CMB de la fracción de acetato de etilo aislado de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. frente a <i>Escherichia coli</i>. ATCC 35218 	<p>La familia Lauraceae posee una variedad apreciable de especies, de las cuales en su mayoría son utilizadas en la medicina tradicional.</p> <p>La gran mayoría de estudios biológicos encontrados de acuerdo a los parámetros de búsqueda, se están haciendo sobre la especie <i>P. americana</i>. El aguacate, fruto de esta especie, presenta alrededor de 500 variedades las cuales difieren en la forma y color del fruto.</p> <p>Algunos estudios de actividad biológica reportan actividad citotóxica tripanocida, hipotensora, antifúngica, hipolipidémica, antioxidante, y antibacteriana.</p> <p>Antecedentes: Ilozue N, Ikezu U y Ugwu P, realizaron un screening fitoquímico del extracto de la semilla de <i>Persea americana</i> y determinaron la presencia de alcaloides, flavonoides (responsables de la actividad antibacteriana) y taninos. Idris S, Ndukwe G y Gimba C, determinaron la presencia de saponinas, flavonoides, taninos, esteroides, alcaloides y terpenoides en un estudio fitoquímico preliminar del extracto de la semilla de <i>Persea americana</i>.</p>	Los compuestos fenólicos aislados de la semilla de <i>Persea americana</i> Mill. presentan actividad antibacteriana frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<p>Variable independiente: Compuestos fenólicos</p> <p>Indicadores: Concentraciones del compuesto fenólico aislado de la semilla de la <i>Persea americana</i> Mill, 1%; 2,5%; 5%; 10%; 15%</p> <p>Variable Dependiente Efecto antibacteriano</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> Halo de inhibición mm Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Concentración Mínima Bactericida (CMB) 	<p>Tipo de Estudio: Básico experimental</p> <p>Población: Todas las paltas jass que se expandan en los mercados de la ciudad de Huanta</p> <p>Muestra: Compuesto fenólico aislado de las semillas de <i>Persea americana</i> Mill.</p> <p>Metodología: Para la extracción de los compuestos fenolicos se realizara mediante maceración de las semillas y la separación con disolventes Para evaluar la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión de disco en agar de kirby-Bauer</p> <p>Análisis de datos: Los datos obtenidos fueron expresados en forma de medias y la desviación estándar y son representados en forma de cuadros e histogramas para determinar la significancia estadística. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA y las diferencias entre concentraciones para la inhibición con la prueba de tukey con un nivel de confianza de 95% empleando el paquete estadístico SPSS versión 21</p>