

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE GUANÁBANA
(*ANNONA MURICATA*) Y MADREDO (*GLIRICIDIA SEPIUM*) OBTENIDOS POR
EXTRACCIÓN SOXHLET FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS*
*AUREUS***

POR:

BILLY JOEL CASTILLO FLORES

PROYECTO DE TESIS



CATACAMAS

OLANCHO

NOVIEMBRE, 2024

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE GUANÁBANA
(*Annona muricata*) Y MADREADO (*Gliricidia sepium*) OBTENIDOS POR
EXTRACCIÓN SOXHLET FRENTE A *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

POR:

BILLY JOEL CASTILLO FLORES

M. Sc. ZOILA ESPERANZA FLORES HERNANDEZ

Asesor Principal

PROYECTO DE TESIS

PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

CATACAMAS

OLANCHO

NOVIEMBRE, 2024

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, por su apoyo incondicional, por su amor y ejemplo de perseverancia. Gracias por creer en mí y ser siempre mi mayor inspiración; su sacrificio y dedicación me motivan a alcanzar mis metas y a dar lo mejor de mí cada día.

A mis hermanos menores, por ser una fuente constante de alegría y motivación. Su energía, curiosidad y amor han llenado mi vida de momentos especiales y me impulsan a ser un mejor ejemplo para ellos.

A mi abuela, que ya no se encuentra con nosotros, pero cuyas, enseñanzas, consejos y recuerdos siguen siendo una guía y en mi vida. Gracias por inspirarme a ser una mejor persona y por dejar una huella imborrable en mi corazón.

A mis amigos, cuya compañía y aliento hicieron de este proceso una experiencia más llevadera y enriquecedora. Su apoyo y comprensión en momentos de dificultad han sido fundamentales para lograr esta meta.

Y a todas las personas que me brindaron su tiempo, sus conocimientos y su apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Su ayuda y orientación fueron clave en cada paso de este camino, y les estoy profundamente agradecido.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios, fuente de fortaleza, sabiduría y esperanza, por guiar cada paso de mi camino. Su presencia constante me ha dado el valor necesario para superar cada desafío y alcanzar esta meta con dedicación y perseverancia.

Agradezco sinceramente a la Universidad Nacional de Agricultura por brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente en un entorno que promueve el conocimiento y el compromiso con la excelencia. Ser parte de esta institución ha sido un privilegio que me ha marcado de manera significativa.

Quiero extender un especial agradecimiento a los docentes que me apoyaron a lo largo de este proceso. Su dedicación, paciencia y profundo conocimiento fueron claves para mi desarrollo y comprensión. Gracias por compartir su tiempo, por sus enseñanzas y por motivarme a esforzarme cada día más. Su apoyo y guía han sido esenciales para el logro de este proyecto, y por ello les estoy muy agradecido.

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo General:.....	2
2.2. Objetivo Específicos:	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. <i>Annona muricata</i>	3
3.1.1. Composición química y propiedades de <i>Annona muricata</i>	4
3.1.2. Flavonoides.....	4
3.1.3. Acetogeninas	5
3.2. <i>Gliricidia sepium</i>	6
3.2.1. Composición química y propiedades de <i>Gliricidia sepium</i>	7
3.3. Microorganismos de importancia alimentaria	7
3.4. <i>Escherichia coli</i>	8
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
3.6. Compuestos antibacterianos	9
3.7. Extracción Soxhlet.....	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Lugar de investigación.....	10
4.2. Materia prima.....	10
4.3. Preparación del extracto de las hojas de <i>A.muricata</i> y <i>G. sepium</i>	10
4.3.1. Limpieza y desinfección del material vegetal.....	10
4.3.2. Deshidratado del material vegetal.....	10
4.3.3. Macerado del material seco	11
4.3.4. Medición de pH para el material vegetal	11

4.3.5. Extracción mediante el método Soxhlet	11
4.3.6. Preparación del inóculo	12
4.3.7. Preparación de los discos con el extracto	13
4.4. Escala de Mcfarland.....	13
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
6.1 Rendimiento del material vegetal	15
6.2 pH del material vegetal seco	15
6.3 Rendimiento del extracto etanólico de <i>A. muricata</i> y <i>G. sepium</i>	16
6.4 Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos.....	16
VI. CONCLUSIONES	20
VII.RECOMENDACIONES.....	21
VIII.BIBLIOGRAFIA.....	22
IX. ANEXOS	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de guanábana (Maneirar 2018).....	3
Figura 2. Estructura básica de flavonoides y sistema de numeración (Benítez 2006).	5
Figura 3. Estructura química de las acetogeninas (Sosa Crespo et al. 2022).	6
Figura 4. Árbol de madread (Flickr)	7
Figura 5. Partes del extractor Soxhlet	9
Figura 6. Final del proceso de extracción	12
Figura 7. Halos inhibitorios para E coli de A. muricata y G sempium	17
Figura 8. Halos inhibitorios para S. Aureus de A. muricata y G. sepium	18

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>Anona muricata</i>	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica del madreño.....	7
Tabla 3. Concentraciones de la escala de Mcfarland	14
Tabla 4. Rendimientos del material vegetal en porcentajes	15
Tabla 5. pH del material vegetal seco de <i>A. muricata</i> y <i>G. sepium</i>	15
Tabla 6. Diámetros promedio de los halos inhibitorios para <i>A. muricata</i>	16
Tabla 7. Diámetros promedio de los halos inhibitorios para el extracto de <i>G. sepium</i>	17

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Limpieza y desinfección del material vegetal	25
Anexo 2. Deshidratado del y triturado del material vegetal.....	25
Anexo 3. Extracción Soxhlet	26
Anexo 4. Discos embebidos con los extractos etanolicos.....	27
Anexo 5. Siembra de las bacterias en el agar Mueller-Hinton.....	27
Anexo 6. Incubación de las placas petri con las bacterias y los discos con los diferentes extractos	28
Anexo 7. Placas después de 24horas de incubación a 37°C	28

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE GUANÁBANA (*ANNONA MURICATA*) Y MADREADO (*GLIRICIDIA SEPIUM*) OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN SOXHLET FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. Tesis. Ing., en Tecnología Alimentaria, Catacamas, Olancho, Honduras. Universidad Nacional de Agricultura. 38 p.

RESUMEN

La creciente preocupación por la seguridad alimentaria, debido al aumento de la resistencia antimicrobiana, ha motivado la investigación de alternativas naturales para el control de patógenos. La guanábana es conocida por sus compuestos bioactivos, como las acetogeninas y los flavonoides, que se le atribuyen propiedades antimicrobianas, mientras que el madreño posee altos niveles de fenoles con potencial actividad antibacteriana. En el presente trabajo se evaluó el efecto antibacteriano de extractos etanólicos de guanábana (*Annona muricata*) y madreño (*Gliricidia sepium*) obtenidos mediante extracción Soxhlet, contra dos bacterias de relevancia alimentaria: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El estudio consistió en la preparación y caracterización de los extractos mediante métodos estandarizados de extracción y evaluación en cultivos bacterianos. Se analizaron dos concentraciones (500 mg/ml y 1000 mg/ml) para determinar su efectividad. Los resultados indicaron que ninguno de los extractos en las diferentes concentraciones mostró halos de inhibición significativos frente a *E. coli* ni *S. aureus*. Esto podría explicarse por la complejidad de la pared celular de las bacterias Gram negativas, la variabilidad de la actividad de los compuestos bioactivos, o la degradación térmica durante el proceso de extracción Soxhlet. Además, los resultados subrayan que la actividad antibacteriana de extractos vegetales puede depender de factores como la concentración de compuestos, el tiempo de exposición y las condiciones del cultivo bacteriano. A pesar de la falta de inhibición observada, el estudio contribuye al conocimiento sobre el uso de extractos vegetales como agentes antimicrobianos.

Palabras clave: Compuestos bioactivos, resistencia antimicrobiana, bacterias, temperatura.

I. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es una preocupación creciente a nivel global, especialmente debido a la resistencia antimicrobiana de microorganismos patógenos transmitidos a través de los alimentos. Este fenómeno impulsa la investigación de agentes antimicrobianos naturales como alternativa a los conservadores sintéticos. Las plantas medicinales, entre ellas *Annona muricata* (guanábana) y *Gliricidia sepium* (madreado), han sido ampliamente estudiadas por su contenido de compuestos bioactivos, que pueden desempeñar un papel importante en el control de bacterias de importancia alimentaria.

La guanábana contiene acetogeninas y alcaloides con propiedades antimicrobianas documentadas, (Carballo et al. 2019). Por su parte el madreado es rico en flavonoides y fenoles, los cuales también presentan efectos antibacterianos. En este contexto, los métodos de extracción de compuestos bioactivos, como la extracción Soxhlet con etanol, permiten la obtención de concentrados de estos componentes con potencial actividad antibacteriana.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de guanábana y madreado contra dos bacterias relevantes en la industria alimentaria: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, la investigación busca contribuir al desarrollo de alternativas naturales para la preservación de alimentos y la seguridad alimentaria mediante el uso de extractos vegetales con propiedades antimicrobianas.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General:

- Evaluar el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de guanábana (*Annona muricata*) y madreño (*Gliricidia sepium*); obtenidos mediante el método de extracción Soxhlet, frente a microorganismos de importancia alimentaria, como lo son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

2.2. Objetivo Específicos:

- Comparar la efectividad antibacteriana de los extractos de *Annona muricata* y *Gliricidia sepium* para determinar cuál es más eficaz contra cada microorganismo.
- Evaluar el efecto de la concentración de los extractos de *Annona muricata* y *Gliricidia sepium* sobre la inhibición del crecimiento bacteriano.
- Calcular el rendimiento del material vegetal y extracto etanolico de *Annona muricata* y *Gliricidia sepium*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. *Annona muricata*

Annona muricata conocida comúnmente en Honduras como guanábana, es un árbol de hoja perenne que se ve en zonas tropicales y subtropicales (Liu et al. 2016). Es originaria de América y África tropical, y debido a la llegada de los españoles a América fue distribuida en los trópicos y hoy en día es posible encontrarla en el oeste de la India, en norte y Suramérica, islas del pacífico y en el sureste de Asia (Gordillo et al. 2012). La guanaba, pertenece a la familia Annonaceae, es un árbol pequeño y ramificado, con hojas gruesas y siempre verdes, brillantes en la parte inferior, de amplia distribución, como se muestra en la figura 1.



Figura 1. Árbol de guanábana (Maneirar 2018).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Anona muricata*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magniolopsida
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Genero	Anona
Especie	<i>A muricata</i>

Fuente: (Arroyo et al.2005)

3.1.1. Composición química y propiedades de *Anona muricata*

Este árbol ha sido ampliamente cultivado en muchos países tropicales y tradicionalmente es utilizado para diferentes enfermedades y dolencias, tales como en tratamientos contra infecciones por parásitos, bacterias y virus, calmante, insecticida, en el combate a convulsiones, altos niveles de azúcar en la sangre y otros usos según la parte de la planta que se utilice (Liu et al. 2016). En diferentes partes de la planta podemos encontrar compuestos fenólicos y acetogeninas que a estas se le atribuyen propiedades antioxidantes y en el ámbito de este trabajo, propiedades antibacterianas.

3.1.2. Flavonoides

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo (Carballo et al. 2019). Dentro de los fenoles encontramos los flavonoides que son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal. Se distribuyen en las plantas vasculares de manera ubicua y la variedad de sus propiedades biológicas ha llamado

poterosamente la atención de los investigadores, de modo que, hoy día, es el grupo de polifenoles más estudiado (Ezequiel and Francisco 2003) En las plantas, los flavonoides se encuentran en estado libre o en forma de heterósidos, que es lo más frecuente. Estos heterósidos son generalmente solubles en agua, mientras que sus geninas o agliconas (parte no azucarada del heterósido) son sólo ligeramente. Los flavonoides presentan actividad, antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6', como se aprecia en la Figura 2 (Herrera Calderón 2014).

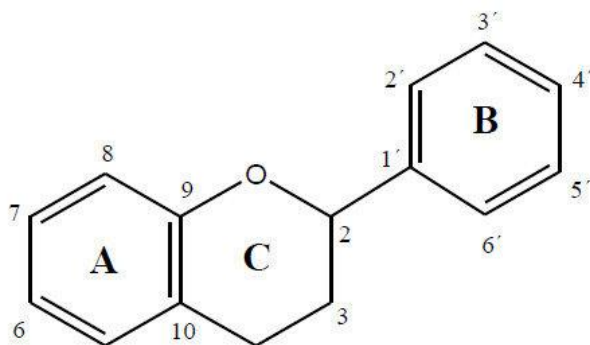


Figura 2. Estructura básica de flavonoides y sistema de numeración (Benítez 2006).

3.1.3. Acetogeninas

Muchos compuestos químicos y sustancias activas han sido encontrados en la guanábana, en su mayoría acetogeninas (ACG's) anonáceas. Estas sustancias son fitoquímicos producidos tanto en tallos, como en las hojas del árbol. Se producen en corteza, raíces y semillas de los frutos (Sosa Crespo et al. 2022). A las ACG's también se les atribuye importantes propiedades antimicrobianas, estas ejercen su efecto a nivel del complejo NADH - ubiquinona oxidoreductasa, afectando el tránsito de iones cargados negativamente a través de la cadena respiratoria. Dichos compuestos modulan la producción de ATP, gracias a los

anillos tetrahidrofurano (THF) y γ -lactona que presentan. Además, bloquean las cascadas de protones y con ello la respiración celular, afectando la viabilidad de las células (Hernández et al. 2021).

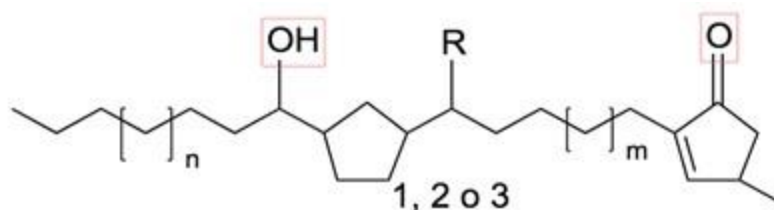


Figura 3. Estructura química de las acetogeninas (Sosa Crespo et al. 2022).

3.2. *Gliricidia sepium*

Gliricidia sepium, conocido comúnmente como madreaje es un árbol caducifolio, perteneciente a la familia de las leguminosas, nativo de Meso América, Centroamérica y del norte de Sudamérica, que logra alcanzar alturas de hasta 12 metros como se muestra en la figura 3 (González-Cuello et al. 2021). La palabra *Gliricidia* puede traducirse como veneno para ratas y describe el conocido uso de sus hojas o corteza molida mezcladas con maíz cocido como rodenticida (Juanico et al. 2023). A nivel local, los ganaderos lo utilizan para alimentación, cercas vivas, en ámbito medicinal los extractos de hojas se utilizan como remedio para el picor, las erupciones cutáneas, las infecciones de la piel, mientras que las decocciones y los extractos de brotes se utilizan para tratar heridas, irritaciones de la piel e incluso la tiña.



Figura 4. Árbol de madrean (Flickr)

Tabla 2. Clasificación taxonómica del madrean

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Genero	Gliricidia
Especie	<i>Gliricidia sepium</i>

Fuente: (Carballo et al. 2019)

3.2.1. Composición química y propiedades de *Gliricidia sepium*

Carballo et al. 2019, encontraron que el madrean cuenta con un alto contenido de fenoles, entre estos un alto contenido de flavonoides, lo que le dan propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

3.3. Microorganismos de importancia alimentaria

La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro

de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo)(Nereyda y Saucedo 2011). Dentro de los microorganismos patógenos podemos encontrar, la *salmonella*, *E. coli*, *staphylococcus aureus*, *clostridium*, de los cuales en la investigación se experimentara con *E. coli* y *staphylococcus aureus*.

3.4. Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) es el microorganismo predominante en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, siendo un patógeno común transmitido por los alimentos en humanos en todo el mundo. La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales; sin embargo, algunas cepas causan infecciones gastrointestinales, mientras que otras causan infecciones urinarias, nerviosas y sistémicas (Lencina et al. 2024).

E. coli es un bastoncillo gramnegativo que no forma esporas y comprende un grupo grande y diverso de bacterias. *E. coli* puede, sobrevivir largos períodos en el medio ambiente y proliferar en la mayoría de los productos alimenticios. Su transmisión se produce cuando se consumen alimentos o agua que están contaminados (Ekonomou et al. 2024).

3.5. Staphylococcus aureus

El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega staphyle (racimo de uvas) para describir las características de crecimiento en grupos semejantes a uvas. Los estafilococos son cocos Gram positivos que miden cerca de 1 µm de diámetro, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa. El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes (Velázquez Meza 2005). Este es un tipo de bacteria patógena que puede causar diversas infecciones en humanos, desde infecciones leves de la piel y tejidos blandos hasta enfermedades graves y potencialmente mortales como endocarditis y neumonía (Tao et al. 2024).

3.6. Compuestos antibacterianos

Según, (Andrés et al. 2014) la actividad antimicrobiana está estrechamente ligada a los compuestos bioactivos presentes en las partes herbales de las plantas. Muchos alimentos contienen compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos.

3.7. Extracción Soxhlet

De acuerdo a (Bayardo et al. 2018), la extracción Soxhlet se fundamenta en el siguiente proceso: La colocación del solvente en un balón, la ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo, el condensado que cae sobre el recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior, el ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que devuelve el solvente con el material extraído al balón. Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada, lo extraído se va concentrando en el balón del solvente.



Figura 5. Partes del extractor Soxhlet

IV. MATERIALES Y MÉTODO

4.1. Lugar de investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología y laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Agricultura. Ubicada en la Carretera a Dulce Nombre de Culmi, Kilómetro 215, Barrio El Espino Catacamas, Olancho, Honduras.

4.2. Materia prima

Se selecciono un kilogramo de hojas de *A.muricata* y *G. sepium* que no presentaban daños por insectos, contaminación por hongos o bacterias y que no presentaban daños por el sol. El material vegetal se obtuvo de la sección de cultivos industriales en la Universidad Nacional de Agricultura.

4.3. Preparación del extracto de las hojas de *A.muricata* y *G. sepium*

4.3.1. Limpieza y desinfección del material vegetal

Se agrego el material vegetal en recipiente separados que contenía hipoclorito de sodio al 2%, en una relación de cuatro ml de hipoclorito de sodio por un litro de agua destilada. El material vegetal se dejó con la solución por un tiempo de cinco minutos, para luego ser enjuagadas con agua destilada, como se muestra en el anexo 1.

4.3.2. Deshidratado del material vegetal

Estando las hojas desinfectadas pasaron a un horno de convección, donde estuvieron por 24hrs a una temperatura de 60°C, se ingresó un 1kg de cada una de las muestras del material vegetal, (ver anexo 2). A continuación, se muestra la fórmula que se utilizó para calcular el rendimiento

$$\text{Rendimiento}(\%) = \left(\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \right)$$

4.3.3. Macerado del material seco

El material vegetal seco se trituro utilizando una procesadora marca Oster. Las hojas pulverizadas y pesadas se colocaron dentro de bolsa esterilizadas para su posterior análisis.

4.3.4. Medición de pH para el material vegetal

Para la realización de este paso se utilizó un pH-metro marca Hanma. Se realizo una dilución de 10/100 m/v. Se pesaron 5g del material vegetal de *A. muricata* y *G. sepium*, y se agregaron a beakers, a los cuales se les agregaron 90ml de agua destilada, se agitaron y se dejaron reposar por 10min. Posteriormente se pusieron los beakers en electrodo del pH-metro para su evaluación, se realizaron 3 repeticiones para cada una de las muestras.

4.3.5. Extracción mediante el método Soxhlet

En este método se procedió a pesar el material vegetal triturado en la balanza electrónica. Se colocaron 200 ml de etanol grado absoluto en el balón de fondo redondo de 250 ml. Se introdujeron 4g del material vegetal triturado en el cartucho de papel filtro que va en el interior de la cámara Soxhlet, 90°C de temperatura, cabe resaltar que se llevó hasta esta temperatura ya que la plancha con que se contaba no tenía para regular la temperatura, iniciando de esta manera la extracción con el equipo Soxhlet. En el momento en que la cámara de extracción se llena con el disolvente y llega a la parte superior del sifón, el disolvente drena hacia el matraz y por el efecto de la temperatura el disolvente volvió a la cámara de extracción, repitiéndose este ciclo continuamente, ver anexo 3.

El número de ciclos del extracto puede variar en función de la cantidad y calidad de la muestra. Se dio seguimiento durante un tiempo de 8h hasta que el disolvente quedo en una tonalidad verde claro (ver figura 6), pasado esto, se dio por terminada la extracción.



Figura 6. Final del proceso de extracción

Cuando se finalizó, el proceso de extracción, se desmonto el equipo para su limpieza y se procedió a separar por medio del baño maría, -la mezcla binaria extracto -disolvente que se obtuvo en la extracción, se le regulo la temperatura para lograr la ebullición del disolvente a 80 °C.

Cuando finalizo la separación se pesó la cantidad de extracto obtenido y se depositó en el frasco recolector, se etiqueto con todos los datos requeridos y luego se dejó en reposo en un lugar adecuado libre de contaminación. A continuación, se muestra la fórmula que se utilizó para calcular el rendimiento

$$\text{Rendimiento}(\%) = \left(\frac{\text{Masa inicial de la muestra}}{\text{Masa del extracto obtenido}} \times 100 \right)$$

4.3.6. Preparación del inculo

Las bacterias de *E. Coli* y *staphylococcus* ya aisladas fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Agricultura. Posteriormente se emplearon placas Petri conteniendo agar Müller-Hinton con previo control de esterilidad. Los inóculos bacterianos se sembraron por separado utilizando hisopos estériles (dispersión en la superficie de las placas), ver anexo 5.

4.3.7. Preparación de los discos con el extracto

Se utilizaron discos estériles, de un tamaño de 6mm, de papel filtro. Los discos estériles se embebieron con el extracto etanólico a las diferentes relaciones (500mg/ml), (1000mg/ml) y la solución salina fisiológica estéril (control negativo). Luego los discos impregnados se colocaron en una superficie estéril dentro de una campana de flujo laminar, donde se mantuvieron por cuatro horas hasta que no quedo liquido en los discos, este proceso garantiza que la actividad antibacteriana se deba al extracto del material vegetal y no al etanol.

Posteriormente, cada disco se colocó sobre el agar a una distancia promedio de 20 mm entre sí y se dejaron reposar por 20 minutos, para luego incubarse a 37°C por 24 horas. Transcurridas 24 horas, se midió la longitud de las zonas de inhibición observadas incluyéndose el diámetro del disco (mm), como se muestra en el anexo 4 y 6.

4.4. Concentración microbiana (Escala de Mcfarland)

Los estándares de McFarland son patrones de turbidez basados en suspensiones de sulfato de bario. Cada patrón se prepara mezclando Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% y Cloruro de bario ($BaCl_2$) al 1,175%. Esta escala se utiliza para estimar la densidad bacteriana de una suspensión, donde se compara visualmente la turbidez con la de los patrones de McFarland.

Primeramente, necesitamos preparar las disoluciones de H_2SO_4 y $BaCl_2$. Para ello, utilizaremos un matraz de 500ml y otro de 50ml. El H_2SO_4 lo necesitaremos al 1%, por tanto, tenemos que poner 5ml de H_2SO_4 y 495ml de agua destilada. Para el $BaCl_2$, que lo queremos al 1,175%, utilizaremos un matraz de 50ml, teniendo que pesar 0,5875 gramos de $BaCl_2$, y enrasar el matraz con agua destilada.

Una vez tengamos preparados los matraces con las distintas disoluciones, rotulamos cada tubo, correspondiendo a su turbidez determinada. Calcularemos la cantidad de cloruro de bario y ácido sulfúrico necesario para alcanzar la turbidez deseada en cada tubo, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de la escala de Mcfarland

Nº	BaCl ₂ 0,048M ml	H ₂ SO ₄ 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	$1,5 \cdot 10^8$
1	0,1	9,9	10	$3 \cdot 10^8$
2	0,2	9,8	10	$6 \cdot 10^8$
3	0,3	9,7	10	$9 \cdot 10^8$
4	0,4	9,6	10	$12 \cdot 10^8$
5	0,5	9,5	10	$15 \cdot 10^8$
6	0,6	9,4	10	$18 \cdot 10^8$
7	0,7	9,3	10	$21 \cdot 10^8$
8	0,8	9,2	10	$24 \cdot 10^8$
9	0,9	9,1	10	$27 \cdot 10^8$
10	1	9	10	$30 \cdot 10^8$

De la tabla anterior se trabajó con una concentración de 1.5×10^8 , siendo esta la concentración más baja, teniendo la escala lista se procedió a preparar dos tubos de ensayo con 4cc de solución salina estéril, con un haza esterilizada se agregó al primer tubo *E. coli*, y al segundo *S. aureus*, agitando constantemente hasta que la turbidez de los mismos se igualo con la escala

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El deshidratado se realiza con el objetivo de eliminar el agua, reduce la actividad de microorganismos (bacterias, hongos) y enzimas que podrían descomponer los compuestos bioactivos antes de su extracción.

6.1 Rendimiento del material vegetal

Se ingreso un kilogramo de hojas de *A. muricata* y *G. sepium*, pasadas las 24hr de deshidratación se pesó el material obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4. Rendimientos del material vegetal en porcentajes

	Peso inicial	Peso Final	Rendimiento
<i>A. muricata</i>	1000g	200g	20%
<i>G.sepium</i>	1000g	300g	10%

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de rendimiento para las dos muestras del material vegetal seco triturado; donde se observa que *A. muricata* tuvo un mayor rendimiento (20%), frente a 10% que se obtuvo de *G.sepium*.

6.2 pH del material vegetal seco

Tabla 5. pH del material vegetal seco de *A. muricata* y *G.sepium*

	pH
<i>A. muricata</i>	5.98
<i>G.sepium</i>	6.03

6.3 Rendimiento del extracto etanolico de *A. muricata* y *G. sepium*

Se agregaron 4 gramos de *A. muricata* al extractor Soxhlet, donde después de terminar el proceso de extracción y baño maría se obtuvieron 1.61g de extracto del mismo, lo que nos da como resultado un rendimiento del 40.25%. Por otro lado, se agregó la misma cantidad del material vegetal seco de *G. sepium*, del cual terminado el proceso se obtuvieron 1.33g, dando un rendimiento de 33,25%.

6.4 Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos

Se evaluaron dos concentraciones de los extractos de *anona muricata* sobre las bacterias de *E. Coli* y *S. aureus*. El extracto etanolico de *anona muricata* no presento inhibición alguna frente a las bacterias de *E coli* y *s aureus*.

Tabla 6. Diámetros promedio de los halos inhibitorios para *A. muricata*

Concentración del extracto (mg/ml)	Promedio de halos de inhibición para <i>A. muricata</i> (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. Coli</i>
500	No presento	No presento
1000	No presento	No presento

El extracto etanolico de *A. muricata* no presento inhibición alguna frente a las bacterias de *E coli* y *S aurus*.

Tabla 7. Diámetros promedio de los halos inhibitorios para el extracto de *G. sepium*

Promedio de halos de inhibición para <i>G.sepium</i> (mm)		
Concentración del extracto (mg/ml)	<i>S. aureus</i>	<i>E. Coli</i>
500	No presente	No presente
1000	No presente	No presente

El extracto etanólico de *G sepium* no presento inhibición alguna frente a las bacterias de *E coli* y *S aurus*.

En la figura 7, se muestran las placas Petri, donde se encuentran los discos embebidos con el extracto de *A. muricata* y *G. Sepiuma*, con las diferentes concentraciones, frente a *E. coli*.

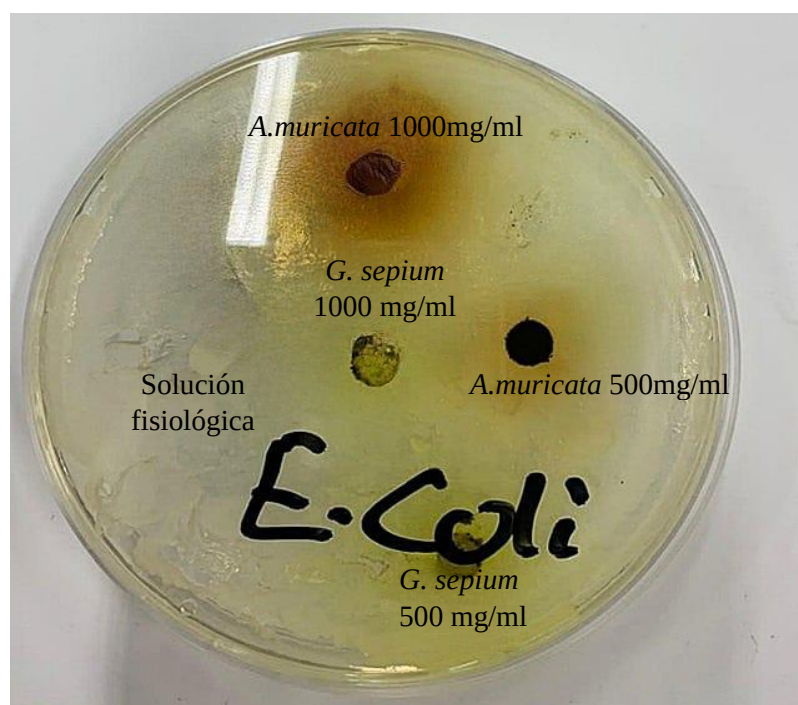


Figura 7. Halos inhibitorios para *E coli* de *A. muricata* y *G sepium*

En la figura 8, se muestran las placas Petri, donde se encuentran los discos embebidos con el extracto de *A. muricata* y *G. Sepium*, con las diferentes concentraciones, frente a *S. aureus*.

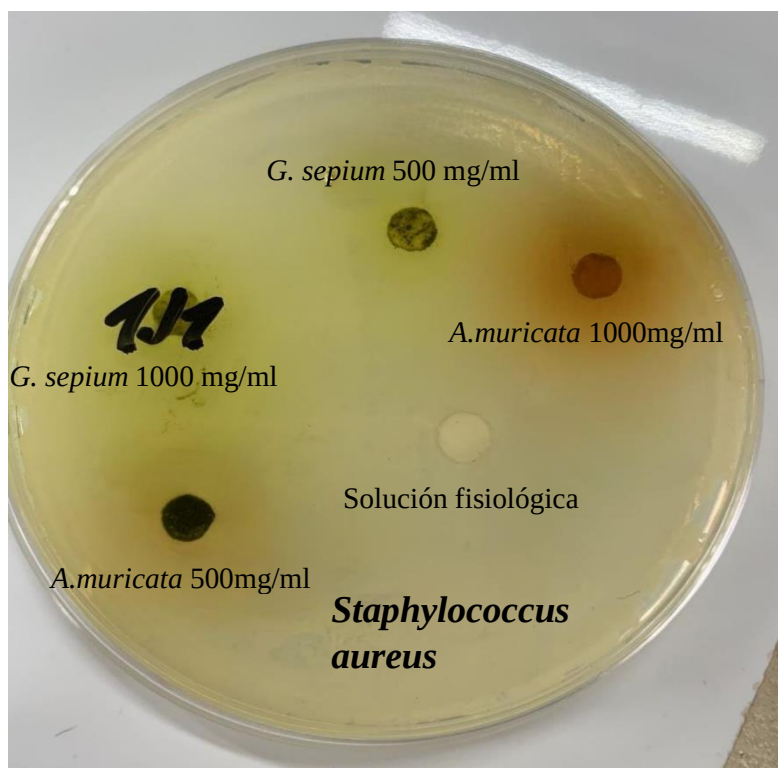


Figura 8. Halos inhibitorios para *S. Aureus* de *A. muricata* y *G. sepium*

Según (Bayardo et al. 2018), una de las desventajas que presenta la extracción por medio del equipo Soxhlet es la descomposición térmica de los analitos termolábiles, ya que la temperatura del disolvente orgánico está próxima a su punto de ebullición, sumado a esto es necesaria una etapa final de evaporación del disolvente para la concentración de los analitos.

Estudios como el de (Hernández et al. 2021) han evidenciado que *E coli* al ser una especie Gram negativa, se ha observado una resistencia significativa, lo cual coincide con los hallazgos de esta investigación. Esto podría explicarse por la presencia de una pared celular con una estructura más compleja. La membrana externa, de naturaleza lipopolisacárida, y las porinas actúan como barreras que limitan el paso de metabolitos secundarios. Además, los compuestos anfipáticos pueden funcionar como bombas que impiden el ingreso de estas

sustancias(Troncoso et al. 2017). Otros factores que también influyen incluyen el tipo de especie bacteriana, la aparición de mutaciones, el tiempo de desarrollo de la planta, las condiciones del suelo donde crece y la cantidad de componentes químicos extraídos. Para el caso de *G. sepium* no se encontraron estudios que evidenciarían su actividad antibacteriana.

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados del estudio mostraron que los extractos etanólicos de guanábana (*Annona muricata*) y madreño (*Gliricidia sepium*) obtenidos mediante el método de extracción Soxhlet no presentaron actividad inhibidora significativa contra los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en las concentraciones evaluadas (500 mg/ml). y 1000 mg/ml).
- Las concentraciones evaluadas (500 mg/ml y 1000 mg/ml) de ambos extractos no lograron inhibir el crecimiento de las bacterias probadas, lo que podría deberse a la baja actividad de los compuestos extraídos mediante el método de Soxhlet.
- La evaluación del rendimiento de los extractos etanólicos *Annona muricata* y *Gliricidia sepium* permitió observar diferencias en su rendimiento, obteniendo *Annona muricata* el mayor rendimiento (40.25%), sobre un (33.25%) que obtuvo *Gliricidia sepium*. Esto resalta que la guanábana puede ser una fuente más eficiente en términos de rendimiento comparada con el madreño.

VII. RECOMENDACIONES

- Optimización de las condiciones de extracción: Se sugiere ajustar variables como la temperatura, tiempo de extracción y el tipo de disolvente utilizado para maximizar la recuperación de compuestos bioactivos de *Annona muricata* y *Gliricidia sepium*.
- Exploración de métodos de extracción alternativos: Considerar otras técnicas de extracción, como la extracción por ultrasonido o extracción con fluidos supercríticos, que podrían preservar mejor los compuestos activos y mejorar su eficacia antimicrobiana.
- Realización de ensayos con concentraciones mayores: Evaluar extractos a concentraciones superiores para determinar si el incremento en la concentración influye en la actividad antimicrobiana contra bacterias de importancia alimentaria.
- Análisis de estabilidad térmica: Realizar estudios para determinar la estabilidad térmica de los compuestos bioactivos durante el proceso de extracción Soxhlet, con el objetivo de minimizar la posible degradación.
- Ampliar la gama de microorganismos evaluados: Investigar la actividad antibacteriana de los extractos frente a un mayor número de bacterias, incluyendo otros patógenos relevantes en la industria alimentaria, para obtener un panorama más amplio de su potencial.
- Evaluación de sinergias con otros compuestos naturales: Estudiar la combinación de los extractos de *Annona muricata* y *Gliricidia sepium* con otros compuestos naturales para identificar posibles sinergias que potencien su actividad antimicrobiana.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Andrés, N; Angélica, S; Longas, FF. (2014). Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*) Antioxidant and antimicrobial potential of aqueous and hidroalcoholic extracts of granadilla (*Passiflora ligularis*). s.l., s.e.

Arroyo, J; Prashad, M; Vásquez B, Y; Li, E; Tomás, G. (2005). Actividad citotóxica in vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. 22. s.l., s.e.

Bayardo, BJ; López, M; Germán, B; Herrera, AZ. (2018). Extracción de aceite de la semilla de guanábana (*Annona muricata* L) a nivel de laboratorio, aplicando los métodos de extracción soxhlet y arrastre con vapor de agua. Nicaragua, s.e.

Carballo, LF; Aparecida, TJ; Díaz Solares, M; Sande Santos, D; Durán Osorio, NP; Blandón Osorio, AM; Castro Cabrera, I; Morales Lugo, Y; Altugana Pérez, N. 2019. Actividad antioxidante de extractos etanólicos, aceites esenciales de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. y propóleos de *Melipona beecheii* Bennett.

Ekonomou, SI; Kageler, S; Ch Stratakis, A. 2024. The effect of 3D printing speed and temperature on transferability of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* during 3D food printing (en línea). Food Microbiology 122:104561. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104561>.

González-Cuello, R; Guardo-Palomino, F; Quintana-Martínez, S. 2021. Active biofilms of aqueous extract of *Gliricidia sepium* and its influence on the microbiological shelf life of coastal cheese. Revista U.D.C.A Actualidad and Divulgacion Cientifica 24(1). DOI: <https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1467>.

Gordillo, J; Ortiz, D; Larahondo, J; Mirian, S; Panchón, H. 2012. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.): una revisión bibliográfica (en línea). 11(2):111-126. Disponible en www.blacpma.usach.cl.

Hernández, CLC; Senmache, JGA; Cruz-López, CYS; Carrasco-Solano, FA; Moreno-Mantilla, M. 2021. Antibacterial effects of *Annona muricata* ethanolic extract on clinically important microorganisms. *Gaceta Medica Boliviana* 44(1):29-33. DOI: <https://doi.org/10.47993/GMB.V44I1.219>.

Herrera Calderón, O. 2014. Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. «lucraco» en línea celular de cáncer de próstata DU-145.

Juanico, MP; Purnamasari, L; Hwang, SG; De la Cruz, JF. 2023. The Potential of *Gliricidia sepium* Plant Extract as Antibacterial and Antifungal: A Review. *European Journal of Veterinary Medicine* 3(3):1-6. DOI: <https://doi.org/10.24018/ejvetmed.2023.3.3.95>.

Lencina, FA; Bertona, M; Stegmayer, MA; Olivero, CR; Frizzo, LS; Zimmermann, JA; Signorini, ML; Soto, LP; Zbrun, MV. 2024. Prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* in foods and food-producing animals through the food chain: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 10(5). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26579>.

Liu, N; Yang, HL; Wang, P; Lu, YC; Yang, YJ; Wang, L; Lee, SC. 2016. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of Ethnopharmacology* 189:210-217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>.

Nereyda, E; Saucedo, R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas natural antimicrobial agent use in the preservation of fruits and vegetables. 7. Mexico, s.e.

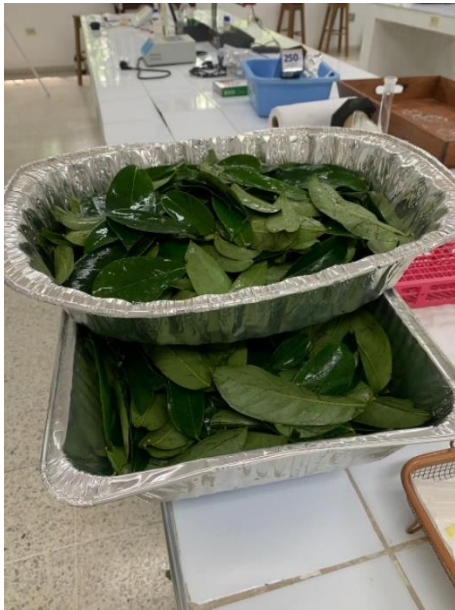
Sosa Crespo, I; Pareja Aguiñaga, JA; Mugarte Moguel, AJ; Chel Guerrero, LA; Betancur Ancona, DA. 2022. Propiedades, beneficios y efectos de la guanábana (*Annona muricata* L.) sobre la glucemia y el cáncer. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales* 9(2):86-101. DOI: <https://doi.org/10.23850/24220582.4976>.

Troncoso, C; Mónica Pavez; Santos, A; Salazar, R; Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica Structural and Physiological Implications of Bacterial Cell in Antibiotic Resistance Mechanisms. 35. s.l., s.e.

Velázquez Meza, ME. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Limpieza y desinfección del material vegetal



Anexo



2.

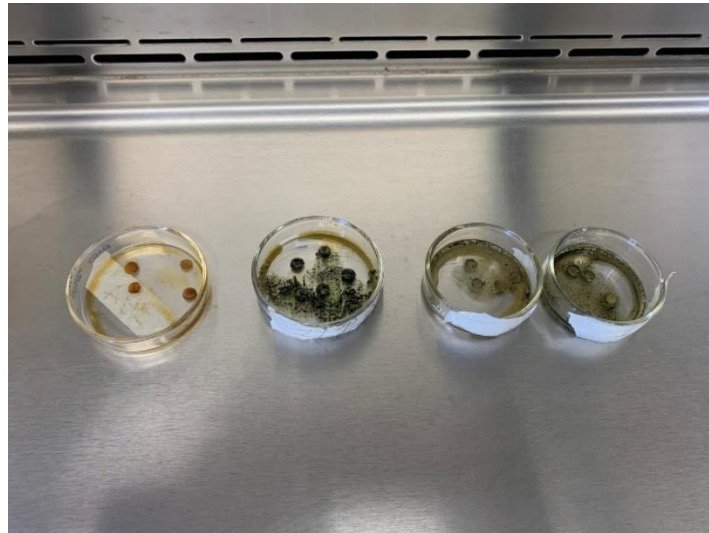
Deshidratado del y triturado del material vegetal



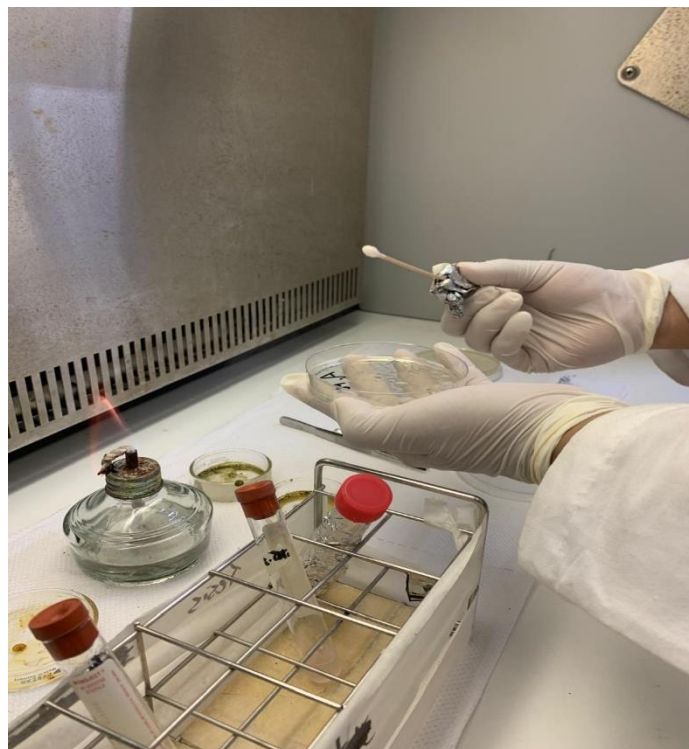
Anexo 3. Extracción Soxhlet



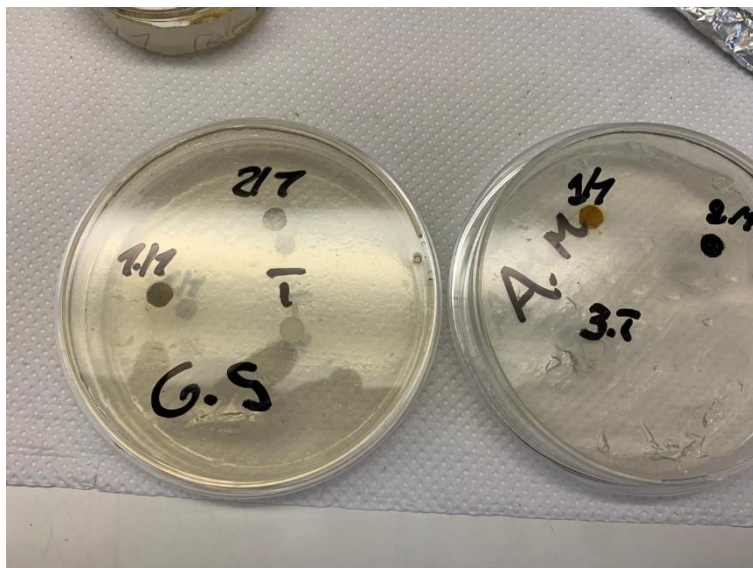
Anexo 4. Discos embebidos con los extractos etanolicos



Anexo 5. Siembra de las bacterias en el agar Mueller-Hinton



Anexo 6. Incubación de las placas petri con las bacterias y los discos con los diferentes extractos



Anexo 7. Placas después de 24 horas de incubación a 37°C

