



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial

TRABAJO DE TITULACIÓN

“APLICACIÓN DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y PUMIN (*Salvia squalenss*) PARA REDUCIR MICROORGANISMOS PATÓGENOS”

AUTORA:

Jennifer Stefania Guevara León

TUTOR:

Ing. Diego Moposita Vásquez MgS.

Riobamba – Ecuador. 2022

DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, **GUEVARA LEÓN JENNIFER STEFANIA**, con cédula de ciudadanía 0603877796, autor del trabajo de investigación titulado: **APLICACIÓN DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y PUMIN (*Salvia squalenss*) PARA REDUCIR MICROORGANISMOS PATÓGENOS**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 30 de noviembre de 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jennifer Stefania León', with a horizontal line underneath.

Guevara León Jennifer Stefania

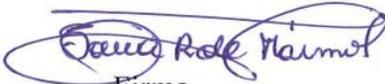
C.I: 0603877796

DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Tutor y Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación **APLICACIÓN DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y PUMIN (*Salvia squalenss*) PARA REDUCIR MICROORGANISMOS PATÓGENOS** por **JENNIFER STEFANIA GUEVARA LEÓN** con cédula de ciudadanía **0603877796**, bajo la tutoría de **Ing. Diego Moposita Vásquez Mgs.** certificamos que recomendamos la **APROBACIÓN** de este con fines de titulación. Previamente se ha asesorado durante el desarrollo, revisado y evaluado el trabajo de investigación escrito y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

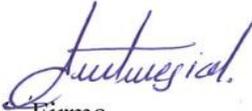
De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 30 de Noviembre del 2022

PhD. Sonia Rodas Espinoza
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



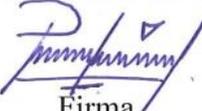
Firma

Dra. Ana Mejía López
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Firma

PhD. Paúl Ricaurte Ortiz
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Firma

Mgs. Diego Moposita Vasquez
TUTOR



Firma

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación **APLICACIÓN DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y PUMIN (*Salvia squalenss*) PARA REDUCIR MICROORGANISMOS PATÓGENOS** por **JENNIFER STEFANIA GUEVARA LEÓN** con cédula de ciudadanía **0603877796**, bajo la tutoría de **Ing. Diego Moposita Vásquez Mgs**; certificamos que recomendamos la **APROBACIÓN** de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 30 de Noviembre del 2022

PhD. Sonia Rodas Espinoza
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



Firma

Dra. Ana Mejía López
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Firma

PhD. Paúl Ricaurte Ortiz
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Firma



Dirección
Académica
VICERRECTORADO ACADÉMICO

en movimiento



UNACH-RGF-01-04-02.20
VERSIÓN 02: 06-09-2021

CERTIFICACIÓN

Que, **Jennifer Stefania Guevara Leon** con CC: **0603877796**, estudiante de la Carrera **Ingeniería Agroindustrial, NO VIGENTE**, Facultad de **Ingeniería**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**Aplicación de extractos obtenidos a partir de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Pumin (*Salvia squalens*) para reducir microorganismos patógenos**", cumple con el 4 %, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **URKUND**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 14 de noviembre de 2022

Mgs. Diego Moposita Vásquez
TUTOR(A) TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación dedico a Dios quien me ha dado fuerza y sabiduría para continuar y culminar mi etapa universitaria.

A mis padres Eduardo Guevara, Fanny León y a mi hermano Francisco Guevara ya que el presente trabajo no solo refleja mi esfuerzo sino también el de ellos, quienes han confiado en mí y me ha brindado su apoyo tanto moral, emocional como económico, pero sobre todo su amor reflejado en oraciones para alcanzar mis objetivos como persona. Todos mis logros se los debo a ellos.

Jennifer Guevara León

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres, a mis hermanos Francisco y Diego, a mi tía Eulalia, a mi abuela Yolanda y a mis ángeles en el cielo que son mis abuelos Maguito y Pachis por todo el apoyo incondicional que me han brindado durante todo el trayecto en la lucha de llegar a ser profesional y a quienes amo con todo el corazón.

Agradezco al Ing. Diego Moposita Vásquez MgS. director de tesis quien supo brindarme su apoyo, conocimiento y facilitó los medios necesarios para concluir este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional de Chimborazo, especialmente a la Facultad de Ingeniería, al grupo de investigación INVAGRO (Investigación Vegetal Agroindustrial), por permitirme ser parte de ellos, a la Carrera de Ingeniería Agroindustrial y docentes que con sus conocimientos y apoyo motivaron a forjarme como persona y llegar a ser excelente profesional y servir a la sociedad.

ÍNDICE GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	
DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL	
CERTIFICADO DE MIEMBROS DE TRIBUNAL	
CERTIFICADO URKUND	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE GRAFICOS.	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 ANTECEDENTES	15
1.1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	19
1.2 JUSTIFICACIÓN	19
1.3 OBJETIVOS	20
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO	21
2.1 ESTADO DEL ARTE	21
2.2 MARCO TEÓRICO	22
2.2.1 Extractos de plantas	22
2.2.2 Aplicación de extractos antimicrobianos	23
2.2.3 Chilca (<i>Baccharis latifolia</i>).....	23
2.2.4. Pumin (<i>Salvia squalens</i>)	25
2.2.5. Métodos de extracción	26
2.2.6. Métodos de separación de mezclas	26
□ <i>Evaporación</i>	26
□ <i>Destilación</i>	27
□ <i>Cromatografía</i>	27
□ <i>Sedimentación</i>	27
□ <i>Decantación</i>	28
□ <i>Filtración</i>	28
□ <i>Centrifugación</i>	28

2.2.7 Antibiogramas.....	28
2.2.8 Microorganismos	29
2.2.9 Peligros básicos causados por microorganismos	29
2.2.10 <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.11 <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.2.12 <i>Salmonella</i>	31
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	33
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	33
3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	33
3.2.1. Unidad estadística	33
3.2.2. Población y tamaño de la muestra	33
3.2.3. Materiales, equipos y reactivos.....	33
3.2.4. Formulación para la preparación de cultivos y antibiogramas.....	35
Nota: Formulación para los cultivos de microorganismos y el desarrollo de antibiogramas.	36
3.2.5. Diagrama de flujo para la obtención de extractos.....	36
3.2.6. Descripción del diagrama de flujo	37
3.2.7. Diagrama de flujo para la elaboración de antibiogramas.....	38
3.2.8. Descripción del diagrama de flujo	39
3.3 TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	44
3.3.1. VARIABLES	44
3.3.2. TÉCNICA DE ANÁLISIS.....	45
3.3.3. Técnicas Estadísticas	45
3.5.2. Técnicas de elaboración de antibiogramas.	45
3.5.3. Software estadístico	46
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. RESULTADOS	47
CAPÍTULO V	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1 CONCLUSIONES	56
5.2 RECOMENDACIONES.....	56
BIBLIOGRAFIA	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica <i>Baccharis latifolia</i>	24
Tabla 2: Clasificación taxonómica <i>Salvia squalens</i>	25
Tabla 3: Ejemplos de microorganismos utilizados en la industria	29
Tabla 4: Factores que afectan a la <i>E. coli</i>	30
Tabla 5: Factores que afectan a la <i>Listeria monocytogenes</i>	31
Tabla 6: Factores que afectan a la <i>Salmonella</i>	32
Tabla 7: Materiales equipos y reactivos.	36
Tabla 8: Siembra de cultivos y desarrollo de antibiogramas	38
Tabla 9: Variables descriptivas de la investigación.....	24
Tabla 10: Normar para los halos de inhibición.....	25
Tabla 11: Halos de inibición para el <i>E. Coli</i>	29
Tabla 12: ANOVA para <i>E. Coli</i>	24
Tabla 13: Turkey para halos de inhibición	25
Tabla 14: Supuestos para halos de inhibición.....	24
Tabla 15: Halos de inhibición para la <i>Salmonella</i>	25
Tabla 16: Anova para <i>Salmonella</i>	24
Tabla 17: Tukey para halos de inhibición.....	25
Tabla 18: Supuestos para halos de inhibición.....	24
Tabla 19: Halos de inhibición para la <i>Listeria</i>	58
Tabla 20: ANOVA para <i>Listeria</i>	59
Tabla 21: Tukey para halos de inhibición.....	58
Tabla 22: Supuestos para halos de inhibición.....	60

ÍNDICE DE GRAFICOS.

Grafico 1: Obtención de extractos	42
Grafico 2: Elaboración de antibiogramas	43
Grafico 3: <i>E. coli</i>	47
Grafico 4: <i>Listeria</i>	47
Grafico 5: <i>Salmonella</i>	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Elaboración de antibiogramas	66
Anexo 2: Antibiogramas obtenidos	68

RESUMEN

Los extractos en la actualidad se han considerado como productos naturales, siendo trascendental en la industria alimentaria y farmacéutica siendo una de las propiedades la acción antimicótica frente a los microorganismos, por tal motivo el trabajo de investigación se elaboró con la finalidad de evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos vegetales a partir de la Chilca (*Baccharis latifolia*) y Pumin (*Salvia squalenss*), conocidas por sus propiedades bactericidas frente a ciertos microorganismos reflejados en algunos estudios. La efectividad de los extractos se comprobó mediante el método de antibiogramas (disco – placa), frente a bacterias patógenas. La preparación de la materia prima vegetal consistió en un lavado y secado, posterior se empleó el método de maceración y la destilación simple donde se obtuvieron 4 diferentes extractos. Las pruebas de antibiogramas se emplearon a los microorganismos patógenos (*E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*), aplicando los cuatro tipos de extracto en cada disco de antibiograma con tres repeticiones, obteniendo doce unidades experimentales por cada microorganismo. Tras la aplicación de un análisis de varianza con medidas repetidas se identificaron como mejores tratamientos a los siguientes: para *E. coli*, se seleccionó al tratamiento DC2 (Destilado de Chilca), con un halo de inhibición correspondiente a 13.9333 mm, también se pudo identificar como tratamiento efectivo para *Listeria* al MC3 (Macerado de chilca) con un halo de inhibición correspondiente a 16.1333 mm y finalmente el tratamiento DP1 (Destilado de pumin) con una halo de inhibición de 15.0667 mm correspondiente para *Salmonella*. Una vez finalizada la investigación se pudo determinar que los extractos de chilca actúan de manera efectiva frente a las bacterias *E. coli* y *Listeria*.

Palabras claves: Extracción, capacidad antimicrobiana, *Baccharis latifolia*, *Salvia squalenss*, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*.

ABSTRACT

The extracts at present have been considered natural products, being transcendental in the food and pharmaceutical industry due to their antifungal action against pathogenic microorganisms; for this reason, the research work was elaborated to evaluate the antimicrobial capacity of the extracts. Vegetables from Chilca (*Baccharis latifolia*) and Pumin (*Salvia squalenss*) are known for their bactericidal properties against certain microorganisms reflected in some studies. The effectiveness of the extracts was verified through the antibiogram method (disc-plate) against pathogenic bacteria. The preparation of the vegetable raw material consisted of washing and drying, followed by the method of maceration and simple distillation, where four different extracts were obtained. Antibiogram tests were used for pathogenic microorganisms (*E. coli*, *Salmonella* and *Listeria*), applying the four types of extract to each antibiogram disc with three repetitions, obtaining twelve experimental units for each microorganism. After applying an analysis of variance with repeated measures, the following were identified as the best treatments: for *E. coli*, treatment DC2 (Chilca Distillate) was selected, with an inhibition halo corresponding to 13.9333 mm, it was also possible to identify MC3 (Chilca macerate) with an inhibition halo corresponding to 16.1333 mm and finally the DP1 treatment (pumin distillate) with an inhibition halo of 15.0667 mm corresponding to *Salmonella* as an effective treatment for *Listeria*. Once the investigation was completed, it was possible to determine that chilca extracts act effectively against *E. coli* and *Listeria* bacteria.

Keywords: Extraction, antimicrobial capacity, *Baccharis latifolia*, *Salvia squalenss*, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*.

Reviewed by:



Firmado electrónicamente por:
EDUARDO SANTIAGO
BARRENO FREIRE

Lic. Eduardo Barreno Freire.

ENGLISH PROFESSOR

C.C. 0604936211

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En un reporte de la Organización Mundial de la Salud se menciona que la carga mundial de enfermedades de transmisión por alimentos es similar con enfermedades infecciosas como la tuberculosis, paludismo, entre otras; las enfermedades principalmente transmitidas son a causa de agentes patógenos como: *Campylobacter app.*, *Salmonella entéricas*, *Salmonella typhi*, *taenia solium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringenes* *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y el virus de la hepatitis A son los responsables de un alto índice de mortalidad (Carrasco et al., 2017).

Los autores Hoffman et al y Scharff (2012) citados por (Rodriguez et al., 2016) manifiestan que más de 200 agentes patógenos afectan a los humanos a través de alimentos y bebidas que han sido contaminadas, de esta forma durante las últimas 6 décadas se han presentado cerca del 30% de enfermedades infecciosas a causa de microorganismos transmitidos en productos comestibles.

Los alimentos de origen animal son con mayor frecuencia los involucrados en epidemias y casos de enfermedades de transmisión por alimentos, entre los años de 1973 y 1987 el 48% de las epidemias ocurridas en Estados Unidos fueron causadas por consumo de carne bovina, huevos, carne porcina, carne de aves, pescado, crustáceos, moluscos y productos lácteos (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2021).

El desarrollo de los agentes patógenos o las toxinas que provocan la transmisión de enfermedades por ingesta alimentaria, requiere que estén presentes en los alimentos en cantidades suficientes para provocar una infección, además de poder sustentar la proliferación de patógenos, otro factor determinante para la reproducción de organismos patógenos es la exposición a temperaturas inadecuadas (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2021).

Las plantas tienen usos alternativos adicionales a los alimenticios, tales como los medicinales y rituales, prácticas ancestrales que tienen milenios de ejecución, y han empleado una variedad de plantas para la curación o tratamiento de enfermedades, pues cuando una sustancia entra en contacto con un organismo vivo modifica una o más funciones del mismo, de esta forma en la actualidad se emplea extractos de plantas a ciertos alimentos, buscando reducir la carga microbiana presente en los mismos (Suxo Tútila, 2014).

El uso de extractos de plantas medicinales permite la inactivación de células vegetativas de bacterias y levaduras en diversos alimentos, ya que se demostró que los análisis cromatográficos permitieron la visualización de flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles, quinonas y alcaloides, detectados con agentes antimicrobianos, la actividad encontrada fue que los extractos mostraron diferentes grados de inhibición frente a los microorganismos examinados como la *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella* (Rodríguez et al., 2017), en el caso de los extractos de plantas del género *Baccharis* han sido analizados para determinar la actividad antifúngica y antibacteriana utilizando extractos polares y no polares aplicados a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora palmivora*, y *Candida albicans* obteniendo como resultado que los extractos de este género tienen efecto inhibitorio frente a fitopatógenos y patógenos humanos (Martínez Tapia, 2010), se ha empleado también extractos acuoso, etanólico etéreo y dicloro metánico de las partes aéreas de la *Baccharis latifolia* a fin de determinar su actividad antimicrobiana, pues esta presenta estructuras de sesquiterpenos que poseen diferentes actividades farmacológicas, se determinó que su extracto metanólico presenta actividad antibacteriana con *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus* (Velásquez Aliaga, 2007); en el caso de la *Salvia squallens* un estudio obtuvo que esta actúa frente a *E. coli*, mostrando un halo de inhibición de 18 mm (Cruz-Carillo et al., 2010).

El uso de extractos de plantas para el análisis de la actividad antibacteriana es amplio, pues el reino vegetal es aquel que ofrece mayor variedad de sustancias aplicables a las enfermedades humanas, existe un gran número de sustancias naturales que poseen actividad frente a microorganismos, sin embargo, solo un pequeño porcentaje muestra una actividad relevante para ser utilizado en la medicina (Domingo & López-Brea, 2003). Los

principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana son los métodos de difusión en disco, difusión en pozo de agar, pruebas in vitro, métodos de dilución estos métodos se utilizan para determinar de forma cualitativa y cuantitativa los efectos antimicrobianos de los extractos (Sánchez-García et al., 2016).

Las pruebas de sensibilidad o antibiogramas determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del germen a estos fármacos. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para bacterias, hongos o virus. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco permiten predecir los resultados que se obtendrán con fármacos similares. Así, no todos los medicamentos potencialmente útiles necesitan probarse. Las pruebas de sensibilidad se realizan in vitro, y no tienen en cuenta numerosos factores que afectan al fármaco y que influyen en el éxito de un tratamiento. Por ello, las pruebas de sensibilidad no siempre predicen los resultados de la terapia. Las pruebas de sensibilidad pueden ser cualitativas, semicuantitativas o con métodos basados en los ácidos nucleicos. Las pruebas también pueden determinar el efecto de la combinación de distintos antimicrobianos. (Vasquez-Pertejo, 2020)

Por ende, en la presente investigación se obtuvo extractos a partir de la chilca y pumín mediante dos técnicas de extracción, los que fueron aplicados en las bacterias *E. coli*, *salmonella* y *Listeria*, mediante la técnica disco – placa (antibiogramas), con la finalidad de conocer el potencial antibacteriana.

1.1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria alimentaria tiene una relación directa de dependencia del medio ambiente, ya que requiere de los productos que la naturaleza produce para garantizar el suministro de materias primas, de tal forma que nos permitan obtener productos libres de contaminantes y sean adecuados para el consumo humano (Berkowitz, 2020).

La importancia de consumir alimentos que sean seguros y garanticen su origen e inocuidad alimentaria ha generado el desarrollo de investigaciones permitiendo que los productos destinados al consumidor final sean aptos para el consumo inmediato, libres de cargas microbianas causantes de enfermedades como *E coli*, *listeria* y *salmonella*.

Las enfermedades transmitidas a través de los alimentos han constituido a nivel mundial uno de los problemas con mayor repercusión sobre la salud en las personas, afectando a mujeres embarazadas, niños, ancianos y generalmente a personas de escasos recursos (Bayona, 2009), la Organización Mundial de la Salud considera a una serie de infecciones como prioritarias debido al daño que pueden generar en la salud de las personas entre las que tenemos *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, entre otras. La *escherichia coli* y *Salmonella* son bacterias que habitualmente se encuentra en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente, algunas de sus cepas pueden causar graves enfermedades por transmisión alimentaria, provocando cólicos, diarrea, fiebre y vómito, el contagio de la *Escherichia coli* se produce al consumir productos cárnicos poco cocidos y leche cruda, a su vez la *Salmonella* se contagia al momento de consumir alimentos de origen animal como huevos, carne, aves, leche y en ocasiones al consumir hortalizas contaminadas por estiércol (MSD Salud, 2019).

Los extractos y sustancias de origen vegetal forman parte de la actividad biológica y permiten el control microbiológico de los alimentos por lo que en la actualidad lo convierten en uno de los mayores generadores de reportes y el más prometedor buscador de extractos o compuestos que brinden una solución a los problemas fitosanitarios (Celis et al., 2008). Los productos naturales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para desarrollar nuevos productos que puedan ser utilizados para el control de agentes microbianos, sin embargo, dentro de nuestra sociedad el uso de plantas nativas para la investigación de sus propiedades ante agentes patógenos u otros es escaso casi nulo.

Las prácticas de manejo adecuado de la producción alimentaria y elaboración de productos cosméticos a lo largo del tiempo se ha ido tornando cada vez más importante, pues la innovación tecnológica en la industria alimentaria ha proporcionado las herramientas necesarias para satisfacer la demanda del consumidor de obtener alimentos

seguros desde el punto de vista microbiológico, con una elevada calidad y disponibilidad (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, 2018).

1.1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿De qué forma la aplicación de extractos obtenidos a partir de la Chilca (*Bacharris latifolia*) y Pumin (*Salvia Squalens*) ayudarán a reducir microorganismos patógenos?

1.2 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años debido a la alta tasa de resistencia a los patógenos microbianos, se ha llevado a cabo investigaciones a nivel mundial sobre terapias antimicrobianas como alternativa a los ya conocidos tratamientos antibióticos. El tratamiento de patologías es un tema importante que deben tratar los países como parte del desarrollo de la salud pública e investigaciones de las enfermedades, mediante la bioprospección y el uso de recursos naturales permitiendo desarrollar alternativas de tratamiento para crear nuevos compuestos antimicrobianos, así lo menciona la Organización Mundial de Salud, organizaciones internacionales (Rodríguez et al., 2017).

Durante los últimos años se ha incrementado la existencia de consumidores con mayor acceso a la información y conscientes de los productos que desean adquirir, demandando alimentos frescos, saludables, seguros y listos para el consumo. Este hecho ha obligado tanto a la industria como a la comunidad científica, a implementar prácticas de desarrollo continuo en la industria, los procesos tradicionales se han basado en el efecto de la temperatura, productos químicos, la reducción de la actividad del pH, y la adición de cloro en bajas cantidades, como medidas para garantizar la proliferación microbiana.

La innovación en los procesos de conservación conduce al desarrollo de tratamientos específicos, según el alimento, que maximizan el equilibrio en la balanza CALIDAD- SEGURIDAD, produciendo alimentos mínimamente procesados, nutritivos, organolépticamente atractivos y seguros a largo plazo.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto y posible actividad antimicrobiana de los extractos de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Pumin (*Salvia squalens*) con potencial antimicrobiano frente a importantes microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria* mediante pruebas de sensibilidad de placa con la técnica de antibiogramas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Aplicar extractos obtenidos a partir de Chilca (*Baccharis Latifolia*) y Pumin (*Salvia Squalens*) para reducir microorganismos patógenos.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos mediante maceración y destilación de la chilca y pumín.
- Desarrollar antibiogramas para validar la eficacia de los extractos frente a los microorganismos patógenos *E. coli*, *Listeria* y *Salmonella*.

CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO

2.1 ESTADO DEL ARTE

Los usos de los aceites esenciales de plantas y especies en diversos campos como la gastronomía, la medicina y la industria alimentaria son numerosos, de esta forma contamos con investigaciones sobre extractos y aceites esenciales del clavo de olor y su posible aplicación como agente antimicrobiano en alimentos. Su aceite esencial y extracto fueron analizados ya que tiene una amplia actividad contra una variedad de microorganismos causantes de diversas enfermedades que afectan a humanos, animales y plantas (Aguilar y López Malo, 2013).

Para la observación y determinación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico del anís estrellado (*Illicium verum*) y sus fracciones de cloroformo y acetato de etilo contra organismos patógenos de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermis*, se realizó una investigación en la ciudad de Bogotá, la misma que obtuvo como resultados que el extracto etanólico de *I verum* presentó mayor carga antimicrobiana ante el *E coli* y *B subtilis* con una concentración de 18.5 mg/ml, mientras que con una concentración de 10 mg/ml la fracción de acetato de etilo presentó un efecto antimicrobiano mejor sobre *E coli* y *S epidermis*, para la obtención de los extractos evaluados se utilizó la técnica de secado y molido, tratando los mismos por reflujo con etanol y posterior concentración a presión en rota evaporador (Pinzón Sánchez, 2010).

En el Ecuador en el año 2016 se llevó a cabo una investigación denominada “Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador”, las especies que intervinieron en el estudio son cedrón, altamisa, diente de león, mastrante, guaviduca, borraja, cilantro, toronjil, hierba luisa, ajenojo, achochilla, moringa, recolectada en las localidades de Machala y Santa Rosa; El proceso de las hojas fue lavado, secado, molido y extracción por maceración con metanol, para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de metanol obtenidos de la aplicación de la técnica de difusión de agar, mediante la cual fueron testeadas frente a bacterias Gram positivas a cepas de (*Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas de (*Escherichia coli* y *P*

aeruginosa), el extracto de diente de león y guaviduca mostraron un efecto antibacteriano alto contra E coli (Azüero et al., 2017).

Las enfermedades causadas por microorganismos es un problema de salud pública a nivel mundial que son generadas por cepas dañinas a través de la ingesta de alimentos, agua contaminada, es por ello la importancia de realizar investigaciones utilizando especies vegetales para obtener aceites o extractos y evaluar su capacidad antimicrobiana ante organismos patógenos, en la ciudad de Guayaquil se llevó a cabo una investigación denominada “Evaluación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de la mezcla de aceites esenciales de hierba buena y hierba luisa frente a *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia Coli*”, aplicando la técnica de hidrodestilación que sirvió para la evaluación de la carga antimicrobiana y antioxidante de las especies en estudio, obteniendo como resultado que la mejor mezcla para inhibir cargas microbianas de *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria*, demostrando que las mezclas de aceites contienen un gran poder microbiano y antioxidante (Giler y Perez, 2020).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Extractos de plantas

Las plantas y subproductos de la industria agroalimentaria son una excelente fuente de productos naturales biológicamente activos. Existe una gran cantidad de componentes químicos con las más variadas estructuras y propiedades físico químicas y biológicas, muchos de los beneficios de las plantas y los subproductos agrícolas se conocen desde la antigüedad y se utilizan como agentes antimicrobianos, insecticidas, antioxidantes, entre otros., estos efectos se deben a compuestos sintetizados por células vegetales que no son estrictamente necesarios para el crecimiento o la reproducción, su presencia ha sido probada genéticamente, fisiológicamente o bioquímicamente se denominan metabolitos secundarios, las técnicas de extracción permiten extraerlos y concentrarlos para diversos usos (medicina, alimentación, perfumería, entre otros) (Sáiz & López, 2010).

Los extractos son productos obtenidos directamente de los frutos, hojas, semillas o raíces de la planta, estos contienen componentes que con el procedimiento correcto

aportarían beneficios al organismo a través de la ingesta, como complemento alimenticio (aderezo), o con el uso tópico (Nutexa, 2017).

2.2.2 Aplicación de extractos antimicrobianos

Los extractos antimicrobianos alimentarios se encuentran presentes en los alimentos, se trata de compuestos químicos añadidos para retardar el crecimiento o provocar la muerte microorganismos de origen vegetal, la eficacia de la aplicación de extractos en los alimentos depende de factores como el pH, temperatura, tiempo, concentración del antimicrobiano, entre otros (Sáiz y López, 2010).

- **Mecanismos de acción y toxicidad de los antimicrobianos**

La utilización de agentes antimicrobianos para tratar infecciones generadas por gérmenes nocivos debe presentar como característica principal efectos letales para la bacteria y poca o ninguna toxicidad para tejidos humanos (Organización Mundial de la Salud, 2020).

- **Ventajas de los antimicrobianos naturales**

Los autores Sáiz y López, (2010), mencionan que las ventajas de los antimicrobianos naturales son que los consumidores no los asocian con aditivos artificiales, además de que los extractos pueden aportar un aroma y sabor adicional al producto, y su regulación es menor que los compuestos químicos puros.

2.2.3 Chilca (*Baccharis latifolia*)

La chilca es un arbusto que alcanza una altura de 1.5 a 2 metros, pertenece a la familia Asteraceae, conocida comúnmente como “chilco”, “chilca negra”, “chilca larga”, “azul chilco” o “trementina”, es nativo de la zona Andina de América Latina, se desarrolla generalmente a una altitud que va desde los 1600 hasta los 3800 msnm, dentro del Ecuador se lo puede encontrar en la región Sierra en provincias como Carchi, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Cañar, Azuay y Loja (Sandoval Velasco, 2021).

Tabla 1

Clasificación taxonómica Baccharis latifolia

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Baccharis
Especie	Baccharis latifolia

Nota: Contreras, 2016

- **Composición química de la Chilca**

Según el autor Yep (2008) citado por (Karol, 2018) menciona que los principales compuestos químicos encontrados en la planta de Chilca son terpénicos y esteroidales, además de compuestos como Felandreno, canfeno y óxido de cariofileno.

Las raíces presentan cuatro tipo de compuestos, escualen baccharis oxido, un derivado de tymol y 3 de p-hidroxiacetofenonas, gernacreno D, escualeno y un hidrocarburo (sesquiterpeno) (Velásquez Aliaga, 2007).

- **Ingredientes activos de la Chilca**

Se han encontrado galotaninos, rutina, quercitrina y endeusmano en las hojas de esta planta; su ceniza contiene sales de potasio. Los autores Correa y Berna (1990), mencionan que la planta contiene un aceite esencial y ácidos grasos, así como también una serie de alcoholes lineales saturados, triterpeno friedelina y dimetoxiflavon (Karol, 2018).

- **Usos**

Las hojas se utilizan para tratar hemorroides, reumatismos, golpes, esguinces y para desinfectar heridas; En forma de infusión se la utiliza para tratar la diarrea, dolores de

cabeza y muelas; la corteza se usa para curar el mal aire y espanto, además actúa como antiinflamatorio (Romoleroux et al., 2019).

2.2.4. Pumin (*Salvia squalens*)

La *salvia squallens*, su nombre “squallens” significa sucio mismo que es asociado con el follaje de la planta que es muy pegajoso y sirve de trampa para atrapar insectos, es una planta originaria de Perú y Ecuador, se desarrollan en lugares apartados de otras plantas, se reproducen en suelos rocosos (Bodero, 2010).

Tabla 2:

Clasificación taxonómica (*Salvia squalens*)

Reino	PLANTAE
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia squalens</i>

Nota: Contreras et al., 2016

• Composición química del Pumín

El Pumín está compuesto por aceites esenciales entre el 1 y 3%, alcanfor, acetato de linalilo, cariofileno, taninos, ácido rosmarínico, flavonoides y triterpenos, además de un componente denominado tuyona mismo que es contraindicado a mujeres embarazadas y lactantes por ser un bloqueador en la producción de leche (*Salvia | Qué Es, Composición, Usos, Beneficios, Propiedades | Planta*, 2014).

Las hojas del pumin presenta gran cantidad de metabolitos, presenta ácidos fenólicos como p-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico, rosmarínico, diterpenos fenólicos como ácido carnósico, carnosol, carnosato de metilo y flavonoides como luteolin-7-O-Glucósico,

apigenina-7-glucósido, luteolina, cirsimaritina, Salvigenina, apigenina, Genkwanin (Arcentales & Martínez, 2020).

- **Usos**

La planta de pumin es utilizada como un antiinflamatorio y antiséptico (Instituto Superior Tecnológico Dr. Misael Acosta Solís, 2020).

2.2.5. Métodos de extracción

Si se requiere separar un producto orgánico de una mezcla o de una fuente natural, la técnica a utilizar debe ser la extracción, entiendo por extracción a la separación de un componente de esta forma se separa el producto deseado, dejando los subproductos en la mezcla o viceversa, para esto hay dos tipos de extracción que son:

- **Extracción discontinua**

También llamada extracción líquida – líquida, esta consiste en transferir una sustancia de una fase a otra, se realiza entre dos líquidos no miscibles, consta de dos fases, la fase acuosa y la fase orgánica (Mejía, 2016).

- **Extracción continua**

Es conocida como extracción sólido – líquido, y consiste en la separación de uno o más componentes de una mezcla sólida aplicando un solvente líquido, se lo lleva a cabo en dos etapas: la primera entra en contacto el solvente con el sólido encargado de transferir el componente soluto al solvente y la segunda la disolución se separa del resto del sólido, una vez saturado el solvente, el sólido restante es separado aplicando filtración (Mejía, 2016).

2.2.6. Métodos de separación de mezclas

- **Evaporación**

Esta técnica consiste en aplicar un incremento en la temperatura de tal forma que se separe un sólido disuelto (UNAM, 2021) en un líquido, llevándolo a que el líquido hierva y

pase de estado líquido a vapor, el residuo del sólido permanecerá en forma de polvo seco y el líquido puede o no recuperarse (*MÉTODOS DE SEPARACION DE MEZCLAS*, 2021).

- **Destilación**

La destilación es un proceso utilizado para separar líquidos solubles entre sí, cuyas temperaturas de ebullición son completamente diferentes, como el caso del agua y el alcohol, la mezcla es vertida en un recipiente y expuesta a temperaturas hasta alcanzar el punto de ebullición, de tal forma que empiece a convertirse en vapor, pase por el refrigerante, se enfríe y condense, denominando al líquido resultante destilado (*Métodos de Separación de Mezclas*, 2017).

El proceso de destilación consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasen a ser un vapor, posteriormente se procede con el proceso de enfriamiento del vapor hasta recuperar los componentes en forma de líquido, este proceso se lo denomina de condensación (Zarza, 2021), la temperatura de ebullición recomendada por los estándares de la IUPAC consideran la presión atmosférica y el producto que se lleva a ebullición, por lo tanto se tiene un promedio de 100°C de temperatura para el agua.

- **Cromatografía**

La técnica más sencilla de la cromatografía es la que utiliza tiras de papel de filtro, esta técnica separa los componentes de una mezcla según sea la afinidad de cada uno de los componentes por el disolvente empleado (*Métodos de Separación de Mezclas*, 2017).

- **Sedimentación**

Esta operación se basa en la diferencia de densidades de los componentes que conforman una mezcla, lo que permite separa mezclas heterogéneas de un sólido en un líquido en reposo o precipitación (UNAM, 2021).

- **Decantación**

Es utilizada para separar líquidos con diferentes densidades y que son inmiscibles, un ejemplo de este caso es el agua y el aceite, para llevar a cabo este proceso se utiliza un embudo de decantación (*Métodos de Separación de Mezclas*, 2017).

- **Filtración**

El proceso de filtración se usa para separar un sólido que no puede ser disuelto de un líquido, para obtener la filtración pasamos la mezcla por un filtro de un tamaño de poro menos a la partícula que se desea separar, generalmente se emplea papel filtro adaptado al embudo (*Métodos de Separación de Mezclas*, 2017).

- **Centrifugación**

Se utiliza para separar un sólido de grano muy fino con una sedimentación difícil de un líquido, el proceso se realiza a través de un dispositivo llamado centrífuga, cuyo objetivo es aumentar la fuerza gravitacional al generar la sedimentación del sólido, una centrifugación conocida. el procedimiento es plasma sanguíneo (*MÉTODOS DE SEPARACION DE MEZCLAS*, 2021).

2.2.7 Antibiogramas

Un antibiograma es una prueba de laboratorio microbiológica, cuyo objetivo propósito es evaluar la respuesta de un microorganismo frente a uno o más agentes antimicrobianos o antibióticos. Este procedimiento se utiliza para medir la efectividad de un antibiótico y medir la destrucción que genera la bacteria causante de la infección (Savia, 2019).

- **Tipos de antibiogramas**

Las técnicas que se utilizan en los laboratorios para medir la sensibilidad o resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos pueden variar, por lo que se utilizan métodos como: el método de antibiograma disco – placa, método de Épsilon test, el método de dilución, el método de difusión y dilución aplicado a bacterias anaerobias, entre otros (Savia, 2019).

- **¿Cómo se realiza el antibiograma?**

El investigador debe solicitar la recolección de material biológico contaminado por microorganismos (*Escherichia coli*, *Salmonella* y *listeria*), para posteriormente ser llevadas a un laboratorio microbiológico en el cual se analice el microorganismo (Lemos, 2017).

2.2.8 Microorganismos

Los microorganismos son seres vivos diminutos que no se pueden observar a simple vista, se consideran vitales debido a su gran diversidad y distribución en el planeta (Mayoral & Reyes, 2018).

Tabla 3:

Ejemplos de microorganismos utilizados en la industria

PRODUCTO	MICROORGANISMO PRODUCTOR
CERVEZA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>shizosaccharomyces pombe</i>
INSULINA	<i>Escherichia coli</i>
NEOMICINA	<i>Streptomyces fradie</i>
PAN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PENICILINA	<i>Penicillium chrysogenum</i>
QUESO	<i>Lactobacillus lactis ssp, streptococcus thermophilus</i> y <i>penicillium roquefortii</i>
VINO	<i>Acetobacter</i>
YOGURT	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>

Nota: Lemos, 2017.

2.2.9 Peligros básicos causados por microorganismos

Los peligros biológicos transmitidos por los alimentos incluyen organismos como bacterias, virus y parásitos, estos organismos a menudo se asocian con el personal de manipulación y productos crudos contaminados en una instalación.

Varios de estos microorganismos están presentes de forma natural en el entorno en el que se producen los alimentos, muchos se inactivan con la cocción y otros se pueden controlar mediante prácticas adecuadas de manipulación y almacenamiento (higiene, temperatura, tiempo y otras prácticas). El almacenamiento y la manipulación inadecuados de estos alimentos pueden determinar un número significativamente mayor de microorganismos antes de cocinarlos, lo que pone en riesgo la seguridad alimentaria y la salud del consumidor (*OPS/OMS / Peligros Biológicos*, 2021).

2.2.10 *Escherichia coli*

El *Escherichia coli* o *E. coli* es un grupo de bacterias Gram negativas que habitualmente se encuentran en el intestino de personas o animales sanos, una variedad de sus cepas puede ocasionar infecciones digestivas, vías urinarias u otras partes del organismo (Bush et al., 2020).

Las bacterias de este grupo tienen la capacidad de seguir fermentando lactosa con producción de gas a 5.5 ° C (111,2113,9 ° F). En estas condiciones, los cultivos de *E. coli* 90% son positivos, mientras que solo algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella* mantienen esta característica (Bush et al., 2020).

Tabla 4:

Factores que afectan a la Escherichia coli

PARÁMETROS	VALORES
TEMPERATURA MÍNIMA	2.5°C (36,5°F)
TEMPERATURA MÁXIMA	49.4°C (121°F)
pH MÍNIMO	4.0
pH MÁXIMO	9.0
AW MÍNIMA	0.95
% MÁXIMA DE NaCl	DATO NO DISPONIBLE

Nota: pH (potencial de hidrogeno) y AW (actividad de agua), (*OPS/OMS / Peligros Biológicos*, 2021).

2.2.11 *Listeria monocytogenes*

La listeriosis es una infección causada generalmente al momento de consumir alimentos contaminados con la bacteria *listeria monocytogenes*, ocasionando que alrededor de 1600 personas contraigan listeriosis cada año y una tasa estimada de 260 que mueran por dicha enfermedad (*Listeria (Listeriosis) / Listeria / CDC En Español*, 2017).

Listeria monocytogenes es una bacteria grampositiva que se mueve a través de flagelos. Algunos estudios sugieren que entre 1 y 10 hombres son portadores intestinales de estas bacterias. Este microorganismo también se ha encontrado en al menos 37 especies de mamíferos (tanto domésticos como salvajes), en 17 especies de aves y en algunas especies de peces y mariscos (*OPS/OMS / Peligros Biológicos*, 2021).

Tabla 5:

Factores que afectan a la Listeria monocytogenes

PARÁMETROS	VALORES
TEMPERATURA MÍNIMA	0°C (32°F)
TEMPERATURA MÁXIMA	45°C (113°F)
PH MÍNIMO	4.3
PH MÁXIMO	9.6
AW MÍNIMA	0.83
% MÁXIMA DE NACL	7

Nota: pH (potencial de hidrogeno) y AW (actividad de agua), (*OPS/OMS / Peligros Biológicos*, 2021).

2.2.12 *Salmonella*

La salmonella se encuentra normalmente en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente, con menos frecuencia en peces, moluscos y crustáceos. Las fuentes de contaminación por salmonela son los animales domésticos, los seres humanos (tracto intestinal), las aves y algunos reptiles. *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi A*,

B y C generalmente causan bacteriemia y producen fiebre tifoidea e intestinal en humanos, respectivamente. La dosis de infección es inferior a 1520 células, pero depende de la edad y salud del huésped, así como de las diferentes cepas entre especies (*OPS/OMS / Peligros Biológicos*, 2021).

La salmonella causa más casos de la enfermedad de los que cree. Por cada caso de Salmonella confirmado por laboratorio, casi otros 30 casos no se notifican. Esto se debe a que la mayoría de las personas con síntomas de enfermedades transmitidas por los alimentos no van al médico ni envían una muestra al laboratorio, por lo que nunca sabemos qué microbio causó la enfermedad. El CDC estima que la Salmonella causa más de 1 millón de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos cada año (Departamento de Salud y Servicios Humanos USA, 2020).

Tabla 6:

Factores que afectan a la Salmonella

PARÁMETROS	VALORES
TEMPERATURA MÍNIMA	0 ± 2.0°C (32 ± 35.5°F)
TEMPERATURA MÁXIMA	45.6°C (114°F)
PH MÍNIMO	3.7
PH MÁXIMO	9.5
AW MÍNIMA	0.945
% MÁXIMA DE NACL	8

Nota: pH (potencial de hidrogeno) y AW (actividad de agua), (*OPS/OMS / Peligros Biológicos*, 2021).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El diseño de la investigación fue experimental y cuantitativo. La investigación planteada fue experimental, ya que se desarrollaron antibiogramas activados con extractos los cuales fueron destilados y macerados, cuyos resultados fueron observados en los laboratorios de la Universidad Estatal de Bolívar, Grupo de Investigación INVAGRO e Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Chimborazo. A demás yació una investigación cuantitativa ya que se manipularon variables numéricas.

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.2.1. Unidad estadística

Extracto destilado de Pumín, Extracto macerado de Pumín, Extracto destilado de Chilca y Extracto macerado de Chilca.

3.2.2. Población y tamaño de la muestra

La población se formó por 450g de Pumín y 450g de Chilca en estado natural, la cual se adquirió en la provincia de Chimborazo en el cantón Riobamba, en el mercado local “San Alfonso”.

3.2.3. Materiales, equipos y reactivos

Tabla 7:

Materiales, equipos y reactivos

Materiales	Equipos e instrumento	Reactivos e insumos	Materia prima
Vaso de precipitación de 600ml	Horno de THERMOLYNE FB410M Benchtop 240 V 50/60HZ (601) TYPE 1400	Metanol al 96 % grado químico	Pumin
Pipeta graduada de vidrio “EX” -	Estufa Serie DAF	Agua destilada pH 5,8 grado alimenticio	Chilca

Marienfeld (1 y 10 ml)		
Probeta graduada de vidrio (50, 100 y 250 ml)	Balanza (BALANZA ANALÍTICA, TD20002A, China)	Fenolftaleína
Espátula acero inoxidable	pH-metro (MILWAUKEE, Mi 151 HANNA®, México)	Hidróxido de sodio (NAOH)
Caja Petri de plástico	Mufla Thermolyne™ (Thermo Scientific, FB1414M, China)	Agar XLD
Matraces 250 ml	Autoclave DTS Sterilization Equipment	Aloa Agar
Asa de siembra	Camara de Flujo laminar AIR SCIENCE PURAIR VLF -72	Agar MULLer
Tubos de ensayo con rosca	Destilador Cherist XT	Caldo Rapapor
Gradilla		Agua Peptonada
Espatula		Verde Brillante
Bandejas		Nutri Agar
Piceta		Bacto Agar
Mechero de alcohol		Malto Agar
Frascos autoclavables		Agua Peptonada
		Nacl
Vidrio reloj	Termobalanza Laval lab.	Verde Brillante
Papel de aluminio		Violeta de Genciana
Fundas herméticas con cierre ZIP-ZAP		Lugol

Papel aluminio 200SQ-FT	Safranina
Varillas de agitación de vidrio	Aceite de inmersión Agua oxigenada (H ₂ O ₂)

Nota: Para la elaboración de la investigación se utilizó materiales, equipos y reactivos específicos.

3.2.4. Formulación para la preparación de cultivos y antibiogramas

La preparación de cultivos para *Listeria*, *E. coli* y *Salmonella* se realizó según establece la norma oficial Mexicana NOM 210 ssa1- 2014, posterior se efectuó los antibiogramas, según se detalla en la tabla 8.

Tabla 8:

Siembra de cultivos y desarrollo de antibiogramas.

Actividad	Cantidad	Descripción
	Agares	
<i>Escherichia coli</i>	100ml	Agua destilada
	2.3 g	Nutri Agar
	0.5 g	Bacto Agar
<i>Salmonella</i>	100 ml	Agua destilada
	5.5 g	Agar XLD
	0.5 g	Bacto Agar
Aloa Agar	100 ml	Agua destilada
	7.8 g	Aloa
	0.5 g	Bacto Agar
Caldo Rapapor	150 ml	Agua destilada
	3.4 g	Caldo Rapapor
Agar Muller	150 ml	Agua destilada
	5.6 g	Agar Muller

Agua Peptonada	1000 ml	Agua destilada
	1 ml	Agua Peptona
	8.5 g	NACL
Verde Brillante	100 ml	Agua destilada
	3.5 g	Verde brillante
Tinción GRAM		
	100ml	Agua Destilada
	1 ml	Violeta de Genciana
	1 ml	Lugol
	2 ml	Alcohol Potable 96%
	1 ml	Safranina
	1 ml	Aceite de inmersión
	1 ml	Agua oxigenada (H ₂ O ₂)
Discos de sensibilidad		
	30 ml	Agua Destilada
	Macerado de Chilca	1 ml
	Macerado de Pumin	1 ml
	Destilado de Chilca	1 ml
	Destilado de Pumin	1 ml
Antibiogramas		
	166.5 ml	Nacl 0.9 %
	133.2 ml	Agua destilada

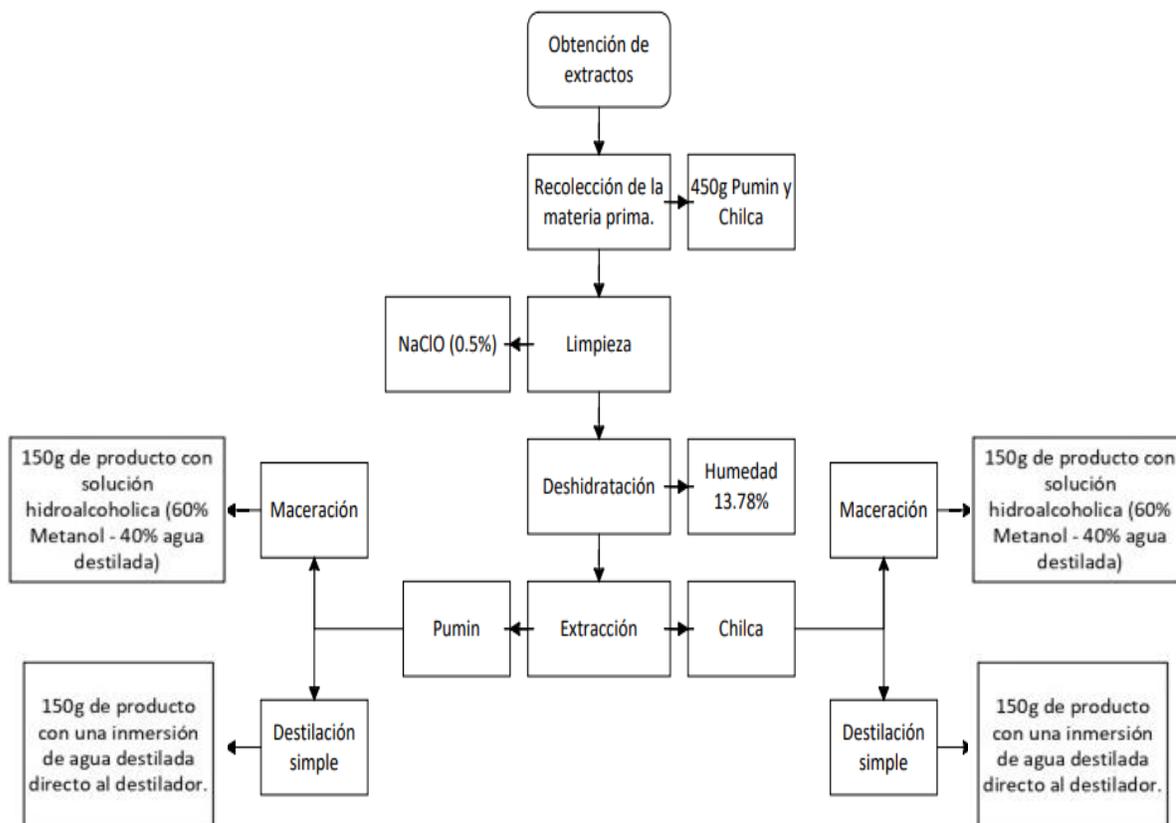
Nota: Formulación para los cultivos de microorganismos y el desarrollo de antibiogramas.

3.2.5. Diagrama de flujo para la obtención de extractos.

La obtención de extractos se efectuó mediante dos técnicas (maceración y destilación simple) como se evidencia en el grafico 1.

Gráfico 1.

Obtención de extractos



Nota: Diagrama para la elaboración de extractos macerados y destilados de chilca (*Baccharis latifolia*) y pumín (*Salvia squalenss*).

3.2.6. Descripción del diagrama de flujo

- Recolección de la Materia Prima y Almacenamiento:

Se recolecto dos tipos de plantas andinas, la chilca (*Baccharis latifolia*) y el pumín (*Salvia squalenss*) adquiridas en la provincia de Chimborazo en el cantón Riobamba en uno de los principales mercados de la ciudad “San Alfonso” donde se adquirió

aproximadamente 450g de cada una y se procedió a almacenar en fundas de papel tipo craft.

- Limpieza:

Se utilizó una toalla de cocina sumergida en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración del 0.5% partiendo de un cloro comercial 5.6%, con la finalidad de eliminar impurezas de las hojas y ramas.

- Deshidratación:

La materia prima vegetal se procedió a almacenar en fundas de papel craft por 48 horas hasta medir la humedad con la termo balanza (Laval Lab MS - 70), donde la humedad fue de 13.78%.

- Extracción:

Se utilizó dos métodos de extracción para para cada una de las muestras como se detalla a continuación:

Maceración: Se utilizó 50 ml de una solución hidroalcoholica (60% de Metanol al 98% y 40% de Agua destilada) y 150g de materia prima vegetal, el cual se introdujo en un frasco color ámbar, se mezclaron y se dejó macerar durante 15 días, con la finalidad de que se extraigan todos los componentes, se procedió a agitar diariamente.

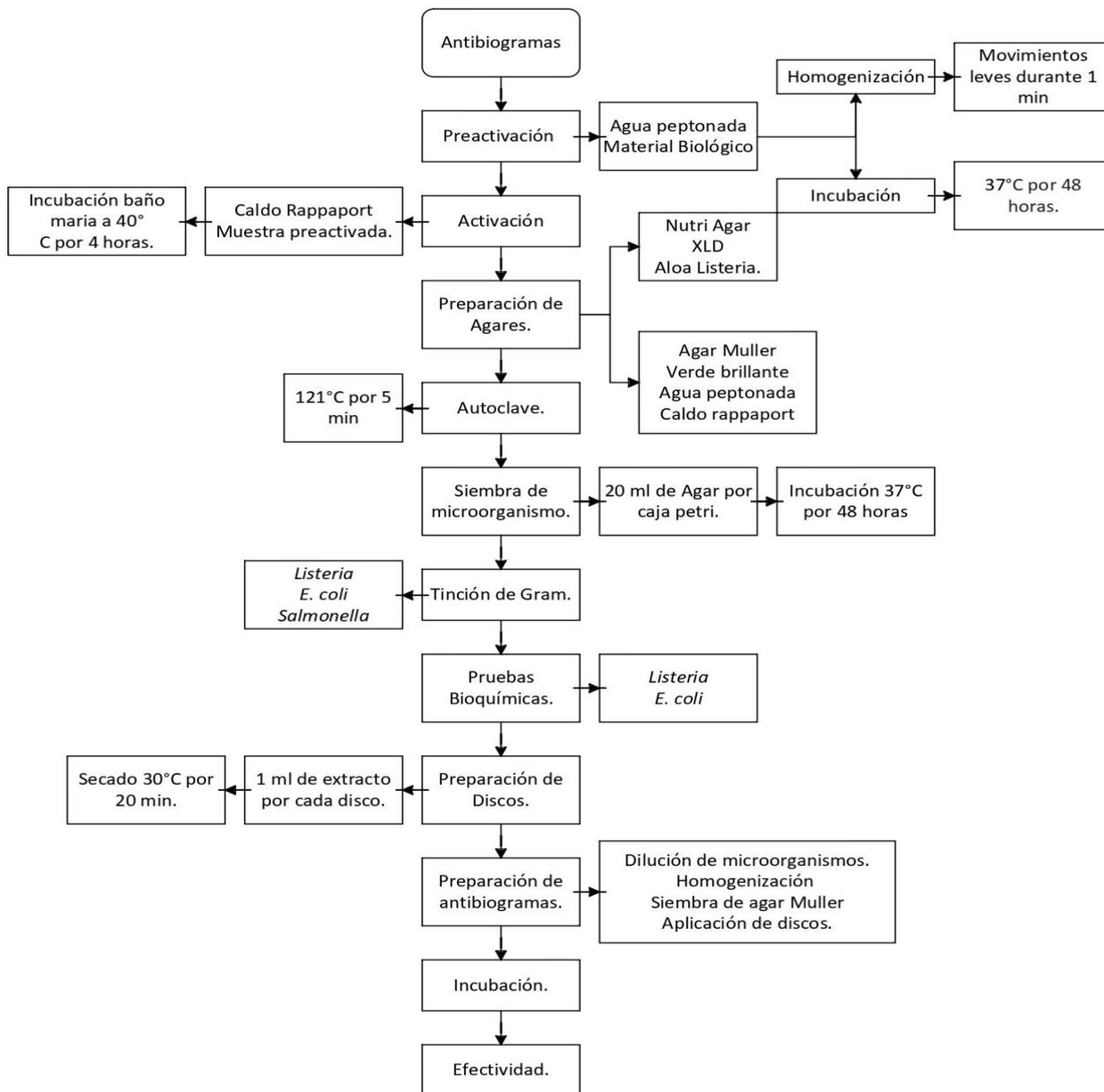
Destilación simple: En un balón de cristal para destilación se agregó 150g de materia prima vegetal, luego se procedió a incorporar agua destilada hasta cubrir totalmente la planta y se destilo en un equipo (CHERIST - XT) extrayendo todos los componentes activos de hojas y tallo para la obtención del extracto por medio de la destilación.

3.2.7. Diagrama de flujo para la elaboración de antibiogramas.

Con finalidad de efectuar los antibiogramas se desarrollaron discos de sensibilidad a partir de papel filtro como se detalla en el grafico 2.

Grafico 2:

Elaboración de antibiogramas.



Nota: Elaboración de antibiogramas a partir de extractos macerados y destilados de chilca y pumin.

3.2.8. Descripción del diagrama de flujo

- Pre activación de microorganismos

Se utilizó 250ml de Agua peptona para cada solución, en este caso *para E. coli, Salmonella y Listeria* con 25g de Eses de Conejo para *E. Coli*, 25g de Eses de Gallina para *Salmonella* y 25g de Carne de pescado descompuesta para *Listeria*, se procedió a

almacenarlas en fundas de pre activación tipo Ziploc y con la finalidad de mantener el ambiente estéril se utilizó un mechero.

Homogenización: Con todas las muestras listas se procedió a homogenizar con movimientos leves (agitando con las manos), con la finalidad de incorporar el material biológico con el Agua peptonada.

Incubación: se incubo en el horno (THERMOLYNE FB410M Benchtop 240 V 50/60HZ (601) TYPE 1400^a) a 37 °C por un tiempo de 48 horas, con la finalidad de pre activar los microorganismos y proceder a la activación.

- Activación:

Previa a la ejecución de esta actividad se prepararon las muestras de material biológico en 3 tubos de ensayo, en el cual se colocó 10ml de caldo Rappaport y 1 ml de la muestra pre activada (Materia biológico y agua peptonada amortiguada), se incubo en baño maría (MEMMERT -GmbH * Co. KG) a 40 °C por un tiempo de 20 horas, donde se etiqueto cada tubo de ensayo.

Con la finalidad de activar los microorganismos que posteriormente fueron aplicados en antibiogramas se codificaron las muestras como se detalla a continuación: Muestra 1: *E. coli*, Muestra 2: *Salmonella* y Muestra 3: *Listeria*.

- Preparación de agares.

Para cultivar *E. coli* se utilizó 2.3g de nutri agar, 100 ml de agua destilada y 0.5g de bacto agar; para la *Salmonella* 5.5g de agar XLD, 100 ml de agua destilada y 0.5g de bacto agar y para la *Listeria* 7.8g de aloa *Listeria*, 100 ml de agua destilada y 0.5g de bacto agar, con el fin de eliminar la presencia grumosa de cada una de las muestras, se llevó a ebullición por un tiempo de 2 min en un microondas común hasta alcanzar la solubilidad total.

Para la aplicación de antibiogramas se usó 150 ml de agua destilada y 5.6g de agar Muller, 150 ml de agua destilada y 3.4g de caldo Rappaport, 1000 ml de agua destilada 1 ml de agua peptona y 8.5g de cloruro de sodio (NaCl) y para la solución de verde brillante se utilizó 100 ml de agua destilada y 3.5g de verde brillante, para eliminar la presencia

grumosa de todas las muestras se llevó a ebullición por un tiempo de 2 a 3 min en un Microondas común hasta alcanzar la solubilidad total.

- Autoclave:

Se autoclavó en un equipo (DTS Sterilization Equipment) los agares en conjunto con los materiales a utilizar en la elaboración de los antibiogramas, la temperatura fue de 121°C durante 15 minutos.

- CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Siembra de microorganismos

Para *E.coli* se utilizó aproximadamente 60 ml de nutri Agar distribuidas de manera equitativa en 3 cajas Petri, para la *Listeria* 60 ml de aloa *Listeria* distribuidas de manera equitativa en 3 cajas Petri y para la *Salmonella* 60 ml de XLD distribuidas de manera equitativa en 3 cajas Petri, se obtuvo tres repeticiones de cada cultivo.

Agar Muller: Se utilizó aproximadamente 180 ml de agar Muller distribuidas de manera equitativa en 9 cajas Petri para la siembra y aplicación de antibiogramas.

- Incubación:

Se procedió a incubar todas las cajas Petri (18) en la estufa (Serie DAF) por 48h a una temperatura de 37 °C.

- Siembra de microorganismos activados en Agares.

Se tomó aproximadamente 1ml de las muestras activadas como indica en las muestras codificadas (Muestra 1: *E. coli*, Muestra 2: *Salmonella* y Muestra 3: *Listeria*), los que posteriormente fueron incluidas en una caja Petri, homogenizadas por todo el agar, rotuladas y finalmente llevadas a incubación en el horno (THERMOLYNE FB410M Benchtop 240 V 50/60HZ (601) TYPE 1400^a) a 37 °C por un tiempo de 48 horas.

- Tinción

Tinción de GRAM

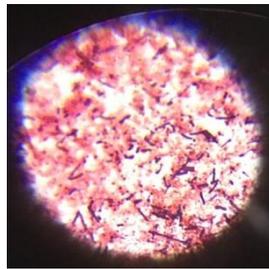
Se fijaron las muestras de *E. coli*, *Listeria* y *Salmonella* en el portaobjetos utilizando una aza, con una gota de agua destilada y se procedió a secar mediante el mechero, se cubrió la muestra con una gota de violeta de genciana y se esperó aproximadamente 1 minuto, transcurrido el tiempo se colocó una gota de lugol y se dejó aproximadamente 1 minuto más. Posterior se lavó con agua destilada y alcohol potable al 96 % y se colocó una gota de safranina, se esperó 30 segundos y se procedió a lavar con agua destilada y secar en el mechero, también se colocó en la placa una gota de aceite de inmersión, esto con la finalidad de amplificar la muestra al exponer al microscopio. Mediante el uso del microscopio con el lente 100X, se observó que el *E. Coli* corresponde al tipo de bacterias Gram –, con una morfología redonda de color rosado – rojizo, para la *Listeria* se pudo determinar que corresponde al tipo de bacterias Gram +, con una morfología de bastones de color violeta y para la *Salmonella* se determinó que corresponde al tipo de bacterias Gram – con una morfología alargada de color rosado, en las gráficas 3, 4 y 5 se evidencian las morfologías de las bacterias en estudio.

Grafico 3.



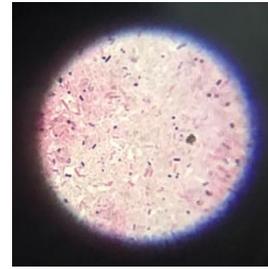
E. Coli.

Grafico 4.



Listeria.

Grafico 5.



Salmonella.

- Pruebas Bioquímicas

E.coli.

En un tubo de ensayo se agregó 10ml de verde brillante y 3 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli*, luego se procedió a homogenizar y finalmente se añadió la campana Durjam al tubo de ensayo y se incubó a 36 °C por un tiempo 48 horas.

Nota: Se observó la presencia de hidrogeno dentro de los tubos de ensayo, lo que indica la presencia de *E. coli* en las muestras.

Listeria

Con el aza se recolecto aproximadamente 3 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Listeria* los que se colocaron en el portaobjetos y se añadió a la placa una gota de agua oxigenada (H₂O₂).

Nota: La presencia de *Listeria* fue determinada por un campo efervescente al ponerse en contacto con el H₂O₂.

- Discos.

Para el diseño de los discos, se utilizó un papel filtro número 60, al que se realizó un corte tipo disco (redondo) de 6mm, los discos se llevaron al autoclave (DTS Sterilization Equipment) a 121 °C por 2 horas, se utilizó 12 discos en cada tubo de ensayo y se agregó 1ml de cada extracto en este caso 12 discos con 1 ml de macerado de chilca, 1 ml macerado de Pumin, 1ml de destilado de chilca y 1 ml de destilado de pumin. Posteriormente se colocó en papel aluminio separando cada disco y se secó en la estufa (Serie DAF) a 30 °C por 20 min.

- Preparación de Antibiogramas.

Para la elaboración de los antibiogramas se utilizó una solución de cloruro de Sodio al 0.5 % en el cual se colocó 10 ml en cada tubo, con la ayuda del aza se tomó aproximadamente 3 UFC tanto de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* y se colocó en cada tubo, correspondiente a cada microorganismo, se homogenizo utilizando un homogeneizador de tubos de ensayo.

Con la ayuda de un hisopo se introdujo en la solución de NaCl con los microorganismos activos de *E. coli*, *Listeria* y *Salmonella*, se realizó la siembra por estrías en el agar Muller, se utilizó 3 cajas Petri por cada microorganismo, dividiendo las cajas en 4 partes iguales, donde se colocó cada uno de los discos con diferentes características de extracto, en este caso macerado y destilado de chilca y pumin y finalmente se rotulo cada uno de los discos y las cajas Petri.

Al tener las cajas listas con los discos se procedió a incubar en la estufa (Serie DAF) por un tiempo de 48 horas a 36°C y se procedió a verificar la efectividad de los extractos.

- Efectividad

Según los datos obtenidos por las placas se puede deducir que, entre los extractos, el que tuvo mayor efectividad al momento de inhibir microorganismos fue el extracto de Chilca, tanto el macerado como el destilado.

3.3 TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1. VARIABLES

En la tabla 9 se evidencia las variables descriptivas de investigación.

Tabla 9:

Variables descriptivas de la investigación.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN	CATEGORÍAS
Extracto de Pumín mediante destilación	Solución líquida obtenida mediante el proceso de destilación	DP1
Extracto de chilca mediante destilación	Solución líquida obtenida mediante el proceso de destilación	DC2
Extracto de chilca mediante maceración.	Solución líquida obtenida mediante maceración (60% de Metanol al 98% y 40% de Agua destilada) y 150 g de materia prima vegetal	MC3
Extracto de Pumin mediante Maceración.	Solución líquida obtenida mediante maceración (60% de Metanol al 98% y 40% de Agua destilada) y 150g de materia prima vegetal	MP4

3.3.2. TÉCNICA DE ANÁLISIS

3.3.3. Técnicas Estadísticas

- ANOVA

La técnica también conocida como análisis de varianza (ANOVA), permitió comparar grupos de medias, normalmente se emplea para establecer semejanzas y diferencias entre tres o más grupos distintos (Javier Navarro, 2017).

- Anderson-Darling

El estadístico Anderson-Darling permitió verificar la normalidad entre los tratamientos para cada variable.

- Levene

Verifica el supuesto de homogeneidad de las varianzas de los residuos de los tratamientos.

- Rachas

Este contraste permitió verificar la independencia entre los residuos de los tratamientos. (William Mendenhall, 2010).

3.5.2. Técnicas de elaboración de antibiogramas.

- **Método del antibiograma disco - placa.**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby (2000), colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI)

obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS, El término "sensible" indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado su halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, según el tipo de infecciones y especies relacionadas. El término "intermedio" indica que el halo de inhibición traducido en valores se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables

Finalmente, el término "resistente" se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas (Picazo, 2018)

Tabla 10.

Normas para los halos inhibitorios

Resistente	Indeterminado	Sensible
11 mm	12 – 15 mm	16 mm
12 mm	13 – 16 mm	17 mm
12 mm	13 – 16 mm	17 mm

Nota: Clasificación de la Concentración mínima inhibidora (CMI) para cuantificar el diámetro frente al extracto o antibiótico en antibiogramas. Fuente: (Picazo, 2018)

3.5.3. Software estadístico

Se utilizó IBM SPSS Statistic.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.2. Resultados del estudio exploratorio de datos

Luego del proceso de elaboración de los antibiogramas, se realizó un análisis exploratorio de datos de los halos de inhibición en las bacterias *Listeria*, *E. Coli* y *Salmonella* utilizando cuatro tratamientos como son el macerado de pumín, macerado de chilca, destilado de chilca y destilado de pumín, los resultados se muestran a continuación.

4.1.3. Análisis estadísticos.

E. coli.

El siguiente modelo se construyó para el análisis de inhibición del *E. coli*.

Tabla 11:

Halos de inhibición para E. coli

TRATAMIENTOS	Promedio de halos de inhibición (mm)
DP1	11.93
DC2	13.93
MC3	7.86
MP4	13.03

Nota: Promedio de halos obtenidos mediante los antibiogramas en la bacteria de *E. coli*.

DP1: Destilado de Pumín; DC2: Destilado de chilca; MC3: Macerado de Chilca; MP4: Macerado de Pumín.

4.1.4. Análisis de varianza para *E. coli*

Se utilizó un ANOVA bajo el siguiente contaste.

HO: $\mu_{DP1} = \mu_{DC} = \mu_{MC} = \mu_{MP}$

H1= Al menos uno de los extractos es diferente.

$\alpha = 0.05$

Nota: μ = media

Tabla 12:

ANOVA para E. coli

ANOVA

HALOS DE INHIBICION					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	64.542	3	21.514	1985.923	.000
Dentro de grupos	.087	8	.011		
Total	64.629	11			

Análisis: Los resultados que se observa en la tabla 12, referente al p valor corresponde a $(0.00) < 0.05$, lo que indica un dato inferior al nivel de significancia, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que al menos un promedio de los tratamientos es diferente a los halos de inhibición para la bacteria *E. coli*.

Para identificar el mejor tratamiento se utilizó tukey, como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13:

Tukey para halos de inhibición

HALOS_INHIBICION

HSD Tukey

Subconjunto para alfa = 0.05					
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4
MC3	3	7.6667			
DP1	3		11.9333		
MP4	3			13.0333	
DC2	3				13.9333

Nota: Se visualizan las medias para los grupos de los subconjuntos homogéneos. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armonica = 3.000

Análisis: Con relación a la tabla 13, se observa cuatro grupos diferentes en relación a los halos de inhibición, el destilado de chilca consiguió inhibir la mayor cantidad de *E. coli* (13.93 mm), a continuación, se evaluaron supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia y sus valores p

Tabla 14:

Supuestos para halos de inhibición

Supuestos	Valor p	Decisión
Normalidad	0.637 > 0.05	Datos normales
Homocedasticidad	0.20 > 0.05	Varianzas homogéneas
Independencia	0.095 > 0.05	Independencia

Nota: Se evaluaron supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia

Análisis: En la investigación se encontro que el destilado de chilca (DC2) es el mejor tratamiento para eliminar *E. coli*, sin embargo en base a la tabla 14 se obtienen datos válidos para el experimento, por tanto quedaria a posterior realizar un estudio más profundo para una mejor inhibicion de microorganismos.

Salmonella.

El siguiente modelo se construyó para el análisis de inhibición de salmonella

Tabla 15:

Halos de inhibición para Salmonella.

TRATAMIENTOS	Promedio de halos de inhibición (mm)
DP1	15.06
DC2	6.3
MC3	12.96
MP4	6.76

Nota: Promedio de halos obtenidos mediante los antibiogramas en la bacteria de *Salmonella*. DP1: Destilado de Pumin; DC2: Destilado de chilca; MC3: Macerado de Chilca; MP4: Macerado de Pumin.

4.1.5. Análisis de varianza para *Salmonella*.

Se utilizó un ANOVA bajo el siguiente contraste.

HO: $\mu_{DP1} = \mu_{DC} = \mu_{MC} = \mu_{MP}$

H1= Al menos uno de los extractos es diferente.

$\alpha = 0.05$

Nota: $\mu =$ media

Tabla 16:

ANOVA para Salmonella.

ANOVA					
HALOS DE INHIBICION	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	174.943	3	58.314	2332.567	.000
Dentro de grupos	.200	8	.025		
Total	175.143	11			

Análisis: Los resultados que se observa en la tabla 16, referente al p valor corresponde a $(0.00) < 0.05$, por lo tanto, muestra un dato inferior al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que al menos un promedio de los tratamientos es diferente a los halos de inhibición para *Salmonella*.

Para identificar el mejor tratamiento se utilizó tukey, como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17:*Tukey para halos de inhibición***HALOS_INHIBICION**

HSD Tukey

		Subconjunto para alfa = 0.05			
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4
MC3	3	6.3000			
DC2	3		6.7667		
MP4	3			12.9667	
DP1	3				15.0667

Nota: Se visualizan las medias para los grupos de los subconjuntos homogéneos. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armonica = 3.000

Análisis: Con relación a la tabla 17, se observa cuatro grupos diferentes en relación a los halos de inhibición, el destilado de pumin (DP1) consiguió inhibir la mayor cantidad de Salmonella (15.06 mm), a continuación, se evaluaron supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia y sus valores p.

Tabla 18:*Supuestos para halos de inhibición*

Supuestos	Valor p	Decisión
Normalidad	0.363 > 0.05	Datos normales.
Homocedasticidad	0.053 > 0.05	Varianzas homogéneas
Independencia	0.130 > 0.05	Independencia

Nota: Se evaluaron supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia

Análisis: En la investigación se encontró que el destilado de pumin (DP1) es el mejor tratamiento para eliminar *Salmonella* sin embargo en base a la tabla 18 se obtienen datos válidos para el experimento, por tanto quedaría a posterior realizar un estudio más profundo para una mejor inhibición de microorganismos.

Listeria

El siguiente modelo se construyó para el análisis de inhibición de *listeria*.

Tabla 19:

Halos de inhibición para Listeria.

TRATAMIENTOS	Promedio de halos de inhibición (mm)
DP1	6.26
DC2	14.9
MC3	16.13
MP4	9.9

Nota: Promedio de halos obtenidos mediante los antibiogramas en la bacteria de Salmonella. DP1: Destilado de Pumin; DC2: Destilado de chilca; MC3: Macerado de Chilca; MP4: Macerado de Pumin.

4.1.6. Análisis de varianza para *Listeria*.

Se utilizó un ANOVA bajo el siguiente contaste.

HO: $\mu_{DP1} = \mu_{DC} = \mu_{MC} = \mu_{MP}$

H1= Al menos uno de los extractos es diferente.

$\alpha = 0.05$

Nota: $\mu =$ media

Tabla 20:

ANOVA para Listeria.

ANOVA

HALOS DE INHIBICION					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	187.847	3	62.616	2348.083	.000
Dentro de grupos	.213	8	.027		
Total	188.060	11			

Análisis: Los resultados que se observa en la tabla 20, referente al p valor corresponde a $(0.00) < 0.05$, por lo tanto, muestra un dato inferior al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que al menos un promedio de los tratamientos es diferente a los halos de inhibición para *listeria*.

Para identificar el mejor tratamiento se utilizó tukey, como se muestra en la tabla 21

Tabla 21:

Tukey para halos de inhibición

HALOS_INHIBICION

HSD Tukey

		Subconjunto para alfa = 0.05			
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4
MP4	3	6.2667			
DP1	3		9.9000		
DC2	3			14.9000	
MC3	3				16.1333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Nota: Se visualizan las medias para los grupos de los subconjuntos homogéneos. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armonica = 3.000

Análisis: Con relación a la tabla 21, se observa cuatro grupos diferentes en relación a los halos de inhibición, el macerado de chilca (MC3) consiguió inhibir la mayor cantidad de *Listeria* (16.13 mm), a continuación, se evaluaron supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia y sus valores p.

Tabla 22:

Supuestos para halos de inhibición

Supuestos	Valor p	Decisión
Normalidad	0.780 > 0.05	Datos normales
Homocedasticidad	0.368 > 0.05	Varianzas homogéneas
Independencia	0.084 > 0.05	Independencia

Nota: Se evaluaron supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia

Análisis: En la investigación se encontro que el macerado de chilca (MC3) es el mejor tratamiento para eliminar la *Listeria* sin embargo en base a la tabla 22 se obtienen datos válidos para el experimento, por tanto quedaria a posterior realizar un estudio más profundo para una mejor inhibicion de microorganismos.

Discusión de resultados

Existen productos alternativos se pudo extraer de las plantas que cumplen con funciones protectoras frente a patógenos que actúan como pesticidas por medio de mecanismos de defensa, según Cruz 2010 en la investigación “Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos” mediante la metodología de antibiogramas de disco – placa y difusión, determino que al comparar el porcentaje de inhibición relativo calculado para cada extracto en los dos protocolos, se evidencia que en la prueba de difusión en pozo los extractos exhiben mejor desempeño con relación a la difusión en disco, lo que concuerda con la literatura, donde se indica que la adición de los extractos realizados en el agar, concentra y difunde mayor cantidad, facilitando la evaluación de su potencial antibacteriano. Tomando en cuenta la tabla 13, 17 y 21 podemos determinar las medias para cada uno de los grupos de tratamientos y diferentes microorganismos, para eliminar el *E. coli* el mejor tratamiento fue el Destilado de chilca (DC2) con un halo de inhibición de (13.9333 mm), en la *Salmonella* el mejor tratamiento para su eliminación fue el destilado

de Pumin (DP1) con un halo de inhibición de (15.0667 mm) y para la eliminación de *Listeria* el mejor tratamiento fue el macerado de chilca (MC3) con un halo de inhibición de (16.1333 mm).

Con lo expuesto se puede mencionar que según Picazo 2018, existen normas para los halos de inhibición según el método de antibiogramas donde cada uno de los microorganismos entran en una clasificación según su halo de inhibición, siendo así el *E. coli* (13.9333 mm) y la *Salmonella* (15.0667 mm) muestra una categoría “Intermedia” donde se puede mencionar que se aproxima a los valores de las concentraciones de antimicrobianos alcanzables. Para la *Listeria* (16.1333) muestra una categoría “Sensible” es decir que el extracto logra obtener resultados de forma adecuada empleando la dosis habitual en el microorganismo, según el tipo de infección y especies relacionadas.

Referente a la investigación realizada en el presente proyecto se puede determinar que la mayor efectividad en relación a la eliminación microbiana fue la Chilca (*Bacharis Latifolia*), con mayor efectividad frente a las bacterias *E. coli* y *Listeria*, en comparación con el pumin que solo tuvo efectividad en la *Salmonella*, pudiendo mencionar que la efectividad del extracto de Chilca es superior.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La obtención de los extractos se realizó mediante maceración y destilación tanto para la chilca y pumin, donde se pudo identificar las propiedades bactericidas mediante antibiogramas.
- Para construcción de los antibiogramas se utilizó papel filtro N° 60, con un diámetro de 6mm, lo que fue sometida a un proceso de absorción de extracto, mediante el trabajo realizado se concluye que la Chilca como macerado y destilado es potente eliminador de bacterias *E. coli* y *Listeria* frente a los demás tratamientos, mismo que se pudo corroborar con los halos de inhibición de cada microorganismo. Por otro lado, el macerado de pumin logro mayor efectividad en la bacteria *Salmonella*, siendo así el extracto inhibidor de este microorganismo.

5.2 RECOMENDACIONES

- Elaborar estudios posteriores con diferentes concentraciones para conocer cuál es la mínima concentración para la inhibición de microorganismos.
- Enfocar investigaciones mucho más extensas sobre la Chilca y el Pumin para determinar los posibles efectos secundarios.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, A., & López Malo, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos Natural antimicrobials View project Problem solving learning environments for critical thinking View project. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7, 35–41. <https://www.researchgate.net/publication/339310008>

Arcentales, S., & Martínez, A. (2020). *Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante en extractos acuoso y etanólico de las hojas de la Salvia Squalens.*

Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D., & D'Armas, H. (2017). *Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador.* 9, 11–18. <http://scielo.sld.cu/pdf/mgi/v33n3/mgi01317.pdf>

Bayona, M. (2009). Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v12.n2.2009.654>

Berkowitz, D. (2020). Parte X: Sectores basados en Recursos Biológicos- INDUSTRIA ALIMENTARIA . In *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (3rd ed., Vol. 3, pp. 67.2-67.35).

<https://www.insst.es/documents/94886/161971/Capítulo+67.+Industria+alimentaria>

Bodero, M. V. (2010). *Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana (in vitro) de los extractos fluidos de arrayán y pumin y su aplicación en una pasta dentífrica* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/721/1/56T00239.pdf>

Bush, L., Charles E Schmidt College of Medicine, & FACP. (2020). *Infecciones por Escherichia coli - Infecciones - Manual MSD versión para público general.* <https://www.msmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-escherichia-coli>

Carrasco, Z., Renato, I., Lozano, C., Zúñiga Carrasco Av Tecnológico Mz, R., del Carmen, P., de Solidaridad, M., & Roo Dirección, Q. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud Foodborne diseases: a timely view for health personnel. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95–

104. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2017/ei173e.pdf>

Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97–106.

<http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1/v26n1a12.pdf>

Contreras, A., Noles, T., Mogrovejo, Á., Ortuño, W., Jiménez, J., & Castañeda, V. (2016). *TAXONOMIA_ Chilca – CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECIES VEGETALES*. https://taxonomiabilo.blog.ups.edu.ec/taxonomia_-chilca/

Cruz-Carillo, A., Rodríguez, N., & Rodríguez, C. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 13(2), 117–124. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a14.pdf>

Departamento de Salud y Servicios Humanos USA. (2020). *La Salmonella y los alimentos / Seguridad alimenticia / CDC*. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html>

Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385–393. https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/seq.es_seq_0214-3429_16_4_385.pdf

Métodos de separación de mezclas. (2019). - *Extracción* <https://metodosdeseparaciondemezclas.win/extraccion/>

Giler, I., & Perez, T. (2020). Evaluación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de la mezcla de aceites esenciales de Hierba Buena y Hierba Luisa frente a *Salmonella Typhimurium*, *Listeria Monocytogenes* y *Escherichia Coli*. In *Sustainability (Switzerland)*. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/51081/1/BINGQ-IQ-20P27.pdf>

Instituto Superior Tecnológico Dr. Misael Acosta Solís. (2020). *Pumin | Jardín Botánico ISTMAS*. <https://herbario.istmas.edu.ec/lamiaceae/pumin/>

Picazo, J. (2010). *Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos* - <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

Karol, M. (2018). *BACHARIS LATIFOLIA - Documentos de Investigación*.

<https://www.clubensayos.com/Ciencia/BACHARIS-LATIFOLIA/4373069.html>

Lemos, M. (2017). *Antibiograma: qué es, cómo se realiza e interpretación de resultados - Tua Saúde.* <https://www.tuasaude.com/es/antibiograma/>

CDC en Español. (2017). *Listeria (Listeriosis) | Listeria* | <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/index.html>

Martínez Tapia, H. (2010). *Estudio in vitro de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales del género Baccharis (CARRERA DE CIENCIAS QUIMICAS) sobre Microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO-BIOQUIMICAS), en el año 2010 [Universidad Mayor de San Andrés].* <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/3571/T-1790.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mayoral, S., & Reyes, D. (2018). *¿Qué son los microorganismos? – Conogasi.* <https://conogasi.org/articulos/que-son-los-microorganismos/>

Mejía, G. (2011). *QUIMICA ORGANICA: EXTRACCION.* <https://quimica-gabriel.blogspot.com/2011/08/extraccion.html>

METODOS DE SEPARACION DE MEZCLAS. (2021). <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/metodos-de-separacion-de-mezclas>

Métodos de separación de mezclas. (2017). Física y Química. https://www.blinklearning.com/Cursos/c737519_c38541499__Metodos_de_separacion_de_mezclas.php

MSD Salud. (2019). *Bacterias e infecciones más perjudiciales para la salud .* <https://www.msdsalud.es/cuidar-en/infecciones/infecciones-bacterianas/bacterias-e-infecciones-mas-perjudiciales-salud.html>

Nutexa. (2017). *Q&A Todo sobre los extractos vegetales.* <https://www.nutexa.com/2017/06/13/qa-todo-sobre-los-extractos-vegetales/>

OPS/OMS (2021). *Peligros biológicos.* https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es

Organización Mundial de la Salud. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos.* Who It. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (2021).** *OPS/OMS | Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP*.
https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es
- Pinzón Sánchez, J. (2010).** *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ANÍS ESTRELLADO (Illicium verum) CONTRA Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis Y Escherichia coli* [Pontificia Universidad Javeriana].
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8448/tesis416.pdf?s>
- Rodríguez, C., Zarate, A., & Sánchez, L. (2017).** *Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia.* 119–127.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000100119
- Rodriguez, H., Barreto, G., Sedrés, M., Bertot, J., Martínez, S., & Guevara, G. (2016).** *Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio.* *Redvet*, 16, 1–28.
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63641401002.pdf>
- Romoleroux, K., Cárata Tandalla, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2019).** *Baccharis latifolia.* *Plantas Vasculares de Los Bosques de Polylepis En Los Páramos de Oyacachi.*
[https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Baccharis latifolia](https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Baccharis%20latifolia)
- Sáiz, M. J., & López, N. (2010).** *Obtención y Aplicación De Extractos Naturales.* *Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria.*, 1–44.
<http://www.anfacos.es/fotos/biblioteca/docs/congresos/transferencia2011.pdf>
- Planta. (2014).** *Salvia | Qué es, composición, usos, beneficios, propiedades |*
<https://www.flores.ninja/salvia/>
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S. L., & García-Palencia, P. (2016).** *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.* *OmniaScience*, 77–100.
<https://doi.org/10.3926/oms.334>
- Sandoval Velasco, M. E. (2021).** *Análisis de las características fitoquímicas, propiedades farmacológicas usos y aplicaciones más comunes de la Chilca (Baccharis latifolia) en el Ecuador.* [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33670/1/BQ 290.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33670/1/BQ%20290.pdf)
- Savia. (2019).** *Antibiograma - Salud Savia.* <https://www.saludsavia.com/contenidos->

salud/otros-contenidos/antibiograma

Suxo Tútila, P. (2014). *Elaboración de una fórmula farmacéutica de uso tópico antiinflamatorio y analgésico en base a un extracto etanólico de baccharis latifolio (chillka)* [Universidad Mayor de San Andrés].

https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/05/997080/elaboracion-de-una-formula-farmacutica-de-uso-topico-antiinfla_6KnGOZv.pdf

Ucha, F. (2010). *Definición de Extracción» Concepto en Definición ABC.* <https://www.definicionabc.com/general/extraccion.php>

UNAM. (2021). *Métodos de separación de mezclas - Unidad de Apoyo Para el Aprendizaje.* http://uapas2.bunam.unam.mx/ciencias/metodo_separacion_mezclas/

Vasquez - Pertejo, M. (2020). Cultivos de antibiogramas. <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/cultivo>

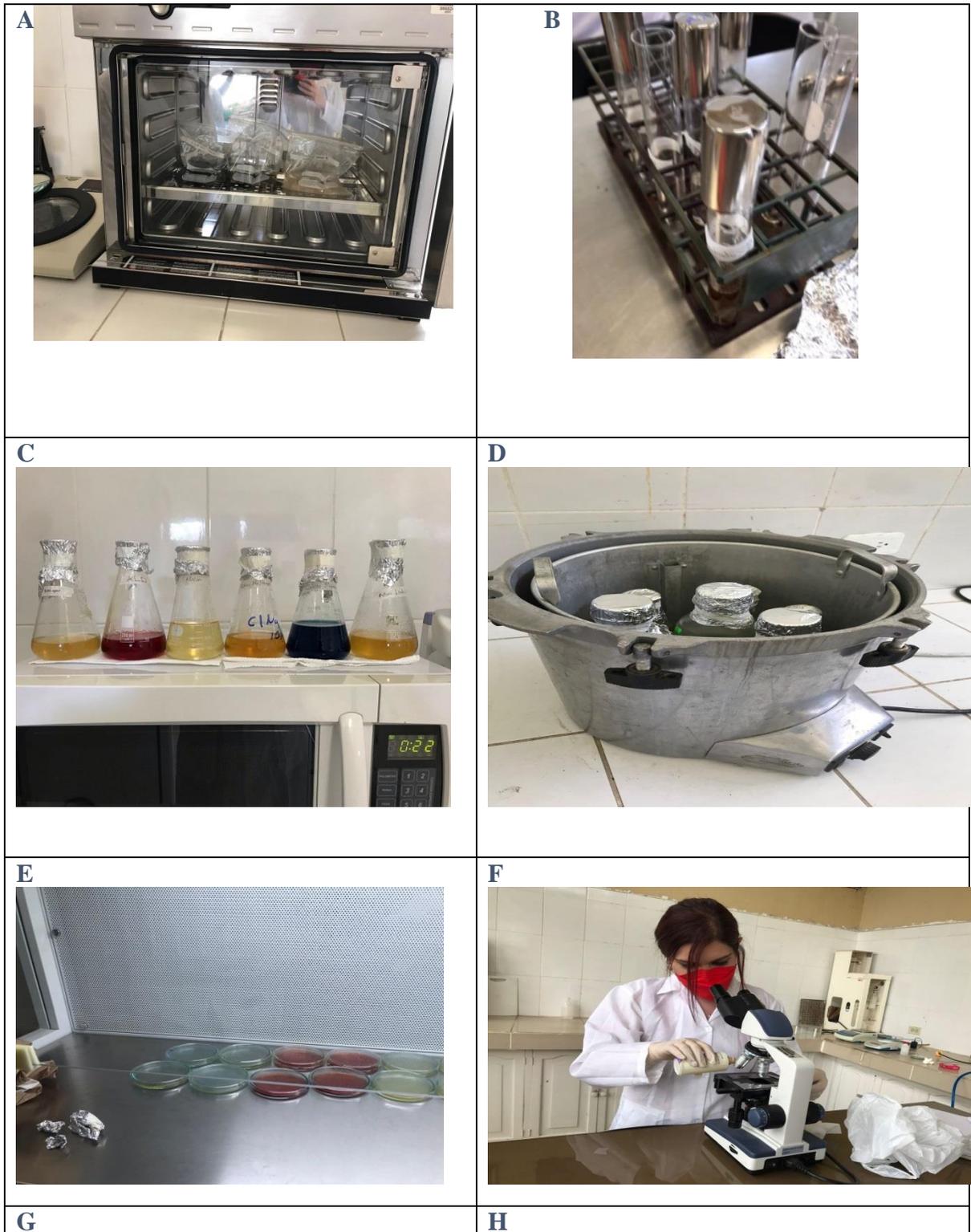
Velásquez Aliaga, L. (2007). *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE FRANSERIA ARTEMISIOIDES, RUMEX PALUSTRIS, BACCHARIS LATIFOLIA, CESTRUM PARQUI Y PIPER ASPERIFOLIUM FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y ENTEROCOCCUS FAECALIS* [Universidad Mayor de San Andrés].

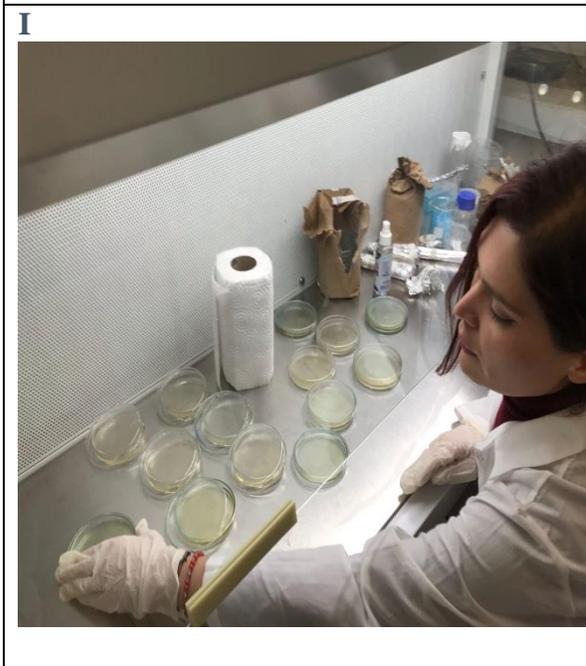
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/538/TN-973.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Zarza, L. (2021). *¿Qué es la destilación y para qué sirve?* . <https://www.iagua.es/respuestas/que-es-destilacion-y-que-sirve>

ANEXOS

Anexo 1. Elaboración de Antibiogramas.





Interpretación.

A: Pre activación (Agua peptonada + material biológico) incubación en (THERMOLYNE FB410M Benchtop 240 V 50/60HZ (601) TYPE 1400^a); B: Activación (Caldo Rappaport + material biológico pre activado) baño maría (MEMMERT -GmbH * Co. KG); C: Preparación de agares (Nutri agar, XLD, Aloa Listeria, Agar muller, Verde brillante, Agua peptonada, Caldo rappaport); D: Autoclave (Agares + Materiales) DTS Sterilization Equipment; E: Siembra de microorganismos 20 ml de Agar por cada caja Petri incubación

en (Serie DAF); F: Tinción de Gram (*Listeria E. coli* y *Salmonella*) Nikon Eclipse 2000; G: Pruebas bioquímicas (*E. coli* y *Listeria*); H: Preparación de discos (3 discos por cada extracto) secado en estufa (Serie DAF); I: Preparación de antibiogramas (Solución de NaCl + Microorganismos activados) colocación de discos con diferentes características de extracto; J: Efectividad: los discos con cada extracto tienen diferente impacto de inhibición en cada uno de los microorganismos como muestra la foto.

Anexo 2. Antibiogramas obtenidos.

Tratamiento	<i>E. Coli.</i>	<i>Listeria.</i>	<i>Salmonella.</i>
Fotografía			
DP1	11.93	6.26	15.06
DC2	13.93	14.9	6.3
MC3	7.86	16.13	12.96
MC4	13.03	9.9	6.76

Nota: Promedio de halos obtenidos mediante los antibiogramas