

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

### **EFFECTO ANTIMICROBIANO DE *Bixa orellana* “achiote”, *Genipa americana* “huito” y *Pistia stratiotes* “huama” SOBRE AGENTES QUE PRODUCEN INFECCIONES DERMICAS Y VAGINALES**



**TESIS PARA OPTAR EL TITULO  
PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

**AUTORES:            GISELA M. MESONES RAMIREZ**  
**LITA DONAYRE LINARES**

**ASESOR:             Dr. ALVARO B. TRESIERRA AYALA**

**COASESOR:        Dra. JUDITH V. CHIAN CHACON**

**IQUITOS – PERU**

**2007**

# **JURADO CALIFICADOR**



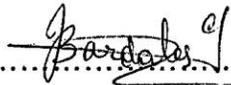
Blga. MILDRED M. GARCIA DAVILA

PRESIDENTE



Blga. MARIA E. BENDAYAN ACOSTA

MIEMBRO



Blga. Msc JULIA BARDALES GARCIA

MIEMBRO



Dr. ALVARO B. TRESIERRA AYALA

ASESOR



Dra. JUDITH V. CHIAN CHACON

COASESORA

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos al Doctor Roberto Incháustegui Gonzales; Director del Instituto de Medicina Tradicional por habernos permitido realizar el presente trabajo de tesis en las instalaciones del laboratorio de Control de Calidad de la institución que dirige y también por habernos facilitado los materiales y medios necesarios para el mismo.

Al Doctor Álvaro B. Tresierra Ayala por su asesoramiento y constante ayuda en el informe de tesis.

Así mismo nuestros agradecimientos a la Doctora Judith Chian Chacón por su asesoría en la parte experimental de la tesis y por su constante apoyo.

Al Químico Farmacéutico Ernesto Nina Chora por su orientación y apoyo en la preparación de los extractos.

A los Ingenieros Teodoro Cerruti S. y Jorge Villacrés por su ayuda en la obtención de información referente al tema.

En general a todos los trabajadores del Instituto de Medicina Tradición por las facilidades brindadas.

A Dios por ser mi guía en el  
transcurso de toda mi vida



A mis padres Humberto y Antonia por todo  
su amor y apoyo incondicional

A mis hermanas y a mi querida  
hermanita por todo su apoyo y cariño

Cita



mi querida mamita María  
toda su apoyo y cariño  
adicional



A mi mamá Rosaura a quien amo  
mucho por ser mi mejor amiga y la  
fuerza de mi vida

A mis hermanos Carlos y Carmen a  
quienes quiero mucho quienes de  
una u otra forma siempre me  
apoyaron

Gissela



## INDICE

	pág
I INTRODUCCION.....	01
II REVISION DE LITERATURA.....	03
2.1 Antecedentes.....	03
2.2 Identificación Taxonómica de las Plantas Usadas.....	07
III MATERIALES Y METODOS.....	16
3.1 Lugar de Estudio.....	16
3.2 Materiales.....	16
3.2.1 Plantas Medicinales.....	16
3.2.2 Microorganismos de Prueba.....	16
3.2.3 Medios de Cultivo.....	16
3.2.4 Materiales de Vidrio.....	17
3.2.5 Materiales de Metal.....	17
3.2.6 Materiales de Plástico.....	17
3.2.7 Equipos de Laboratorio.....	18
3.2.8 Materiales de Escritorio.....	18
3.2.9 Materiales de Limpieza.....	19
3.2.10 Otros.....	19
3.3 Metodología.....	19
3.3.1 Diseño Experimental.....	19
3.3.2 Colección y Procesamiento de las Plantas.....	20
3.3.3 Preparación de Extractos Acuosa.....	20
3.3.4 Preparación de las Diluciones Microbianas.....	23

3.3.5	Método de los Excavados.....	23
3.3.6	Prueba de Sensibilidad.....	24
IV	RESULTADOS.....	25
V	DISCUSION.....	29
VI	CONCLUSIONES.....	33
VII	RECOMENDACIONES.....	34
VIII	RESUMEN.....	35
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	37
X	ANEXOS.....	40

## **I INTRODUCCION**

Desde épocas remotas, el hombre ha aprovechado los recursos que la naturaleza le brinda, tanto para alimentación y vestido así como para usos medicinales. La selva Amazónica posee la más rica y fecunda diversidad de estos recursos, habiéndose calculado alrededor de 500 mil especies vegetales de las cuales unas 300 mil son consideradas de uso medicinal y muchas de ellas han sido empleadas por nuestros ancestros en el tratamiento de enfermedades (25)

Las propiedades medicinales de las plantas se deben a que contienen diversos principios activos cuyas concentraciones varían según algunos factores, entre los que destaca, la parte del vegetal (12). Además, la efectiva acción medicinal de las plantas depende del tiempo de cosecha y del modo de preparación del extracto, ya que esto influye en la pérdida o conservación de los principios activos.

Los trastornos orgánicos ocasionados por diversos agentes patógenos e inadecuados estilos de vida del hombre moderno, han dado origen a una corriente competitiva por la fabricación de fitofármacos, tanto a nivel nacional como internacional, donde la captación de información sobre las propiedades medicinales de las plantas se torna cada vez más exigente (11)

En nuestro medio, la medicina tradicional ha estado siempre presente, ahora más que nunca se le está dando cada vez mayor importancia, debido a las múltiples ventajas que aporta tanto en el aspecto medicinal como económico, sobre todo si se tiene en cuenta que la capacidad adquisitiva de la población es baja y el costo de los medicamentos es muy alto, es así que esta alternativa de tratamiento constituye la forma más barata y segura de mejoría, además posee la ventaja de presentar poco o ningún efecto secundario.

La posible existencia de capacidad antimicrobiana por parte de ciertas plantas tropicales, fue destacada en 1995 por Cáceres (4), tal es así que *Bixa orellana* "achiote" tiene una eficaz acción antibacteriana y antifúngica, además de muchos otros usos; igualmente para *Genipa americana* "huito", se reporta su uso como antiséptico (vaginal y dérmico) y contra hongos de la piel; y, en el caso de *Pistia stratiotes* "huama" se utiliza contra hongos de la piel, generalmente mohos (1).

Siendo *Escherichia coli* y *Candida albicans* unos de los agentes etiológicos más representativos de infecciones vaginales, y *Staphylococcus aureus* como *Pseudomonas aeruginosa*, conocidos como causantes de infecciones dérmicas; en el presente estudio se han seleccionado estos microorganismos para ser empleados en los bioensayos con extractos de las especies vegetales mencionadas en el párrafo anterior, los cuales han sido preparados tal como tradicionalmente lo hace el poblador común.

Por consiguiente, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

#### OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Determinar el efecto antimicrobiano de tres plantas tropicales de la Amazonía peruana empleadas en medicina tradicional.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Estudiar el efecto del extracto acuoso de *Bixa orellana* "achiote", *Genipa americana* "huito" y *Pistia stratiotes* "huama" sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y *Candida albicans* IMET-1.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) o la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos vegetales de *Bixa orellana*, *Genipa americana* y *Pistia stratiotes*.

## II REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes:

- ❖ En el año de 1995 se han publicado diversos trabajos vinculados con el presente estudio, tal es el caso del trabajo realizado por:
  - CACERES (4), afirma que la tintura de corteza y hojas de "achiote" es activa contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Shigella flexneri*; la tintura de sus hojas y de su corteza actúa también contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, y *Trichophyton rubrum*. Por otro lado, la infusión de sus hojas es activa contra *Trichomonas vaginalis*.
  - CACERES, *et al* (5), mencionan que el extracto de "achiote" muestra actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigela flexneri*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Trichophyton rubrum*.
  - LACAZE & ALEXAIDES (16), mencionan el uso del fruto verde hervido de "huito" como antiséptico y cicatrizante sobre heridas infectadas y el cordón umbilical de los bebés. El zumo del fruto verde también es empleado contra los hongos de la piel.
  - SILVA & CERRUTTI (25), informan que la planta de "huama" es utilizada para combatir las micosis mediante la preparación de una infusión de la

planta. Además reporta el uso del fruto cocido del “huito” para inflamaciones vaginales.

❖ En el año de 1996, se publicaron los siguientes reportes relacionados con el presente estudio:

➤ IROBI, *et al* (13) reportaron actividad antimicrobiana de hojas de “achiote” frente a diversas bacterias gram positivas como *Bacillus subtilis* con un halo de 10 mm, *Staphylococcus aureus* con un halo de 9 mm; así mismo reportan inactividad frente a *Candida utilis* y *Aspergillus niger*.

➤ MEJIA & RENGIFO (18), indican que las hojas de “achiote” son usadas para combatir infecciones de la piel y como antiséptico vaginal y cicatrizante.

❖ En el año de 1997 se publicaron algunos trabajos vinculados con el presente estudio, tal es el caso de los trabajos realizados por:

➤ MESTANZA (19) reportó actividad antimicrobiana de “achiote” contra *Escherichia coli* a concentraciones de 5 y 10 mg/ml. En cambio no reporta acción antimicrobiana del extracto de “huito”.

➤ RENGIFO & CERRUTTI (24), mencionan que el “achiote” es utilizado para combatir inflamaciones dérmicas y vaginales aplicando la maceración acuosa de las hojas. Además afirman que el “huito” es usado para hongos

de la piel (el zumo del fruto verde) y para inflamación vaginal (el cocimiento de los frutos como duchas vaginales).

- SILVA & GARCIA (26), refieren que las hojas de “achiote” son utilizadas para tratar inflamaciones vaginales, también como agente cicatrizante y para tratar quemaduras. Mencionan además que la planta de “huama” es utilizada contra la micosis dérmica.
  
- ❖ En 1998 se publicaron diversos trabajos relacionados con el presente estudio:
  - IPSS – IMET (10), reporta actividad antimicrobiana del extracto de “achiote” frente a *Candida albicans* a concentración de 400 mg/ml
  
  - IPSS – IMET (11), reporta el uso de las hojas de “achiote” como antiinflamatorio conjuntival y vulvo vaginal.
  
  - MESTANZA (20), reportó sensibilidad de *Candida albicans* frente al extracto de “achiote” a una concentración de 250 mg/ml.
  
- ❖ En el año de 1999, BRACK (1), destaca el uso del “achiote” por su actividad antiinflamatoria; así como por su capacidad antiséptica vaginal y para combatir las infecciones a la piel. También manifiesta que el uso de “huito” es útil para el tratamiento de inflamaciones genitales femeninas mediante la aplicación del cocimiento de los frutos en forma de duchas vaginales; además el fruto es usado para combatir hongos de la piel. Así mismo, hace referencia al uso de

la "huama" para el tratamiento de micosis dérmicas mediante la infusión de la planta.

- ❖ En el año 2000, CERRUTTI (6), reporta el uso de semillas trituradas del "achiote" como antiinflamatorio vaginal y cicatrizante en quemaduras.
  
- ❖ En el año 2003, PINTO *et al* (23), usando diversas partes de la planta de "achiote" encontraron actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp*, *Salmonella sp*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *Chromobacterium violaceum*. Reportaron además inactividad frente a *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.
  
- ❖ Diversas investigaciones han demostrado que el extracto de las hojas de "achiote" es un eficaz agente antibacteriano y fúngico (28).
  
- ❖ Los resultados de estudios farmacológicos han comprobado las acciones terapéuticas, diuréticas y antibacterianas, que refuerzan la acción benéfica del "achiote" sobre la próstata y las vías genitourinarias. Además, el "huito" es usado, entre otros, como antiséptico, cicatrizante y para eliminar hongos de la piel (27).

## 2.2 Identificación Taxonómica de las Plantas Usadas

© Sistema: Clasificación Arthur Cronquist (1988) (8)

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Sub-clase : Diilleniidae

Orden : Violales

Familia : Bixaceae

Género : *Bixa*

Especie : *B. orellana* L.

### Sinonimia:

- *Bixa odorata* R. & P. ex G. Don (1831)
- *Bixa urucurana* (Wild.) Kuntze ex Pilger (1858)

### Nombres Vernaculares

Abujo, abujo-majaricke, acosi (v. andoki), aciote, acafran, achiote, achote, achi-huiti, achotillo, aisiri (v. chontaquiro), anate, anatto (inglés), anotto, apijiri (v. piro), apo`e (v. ese eja), apisiri (v. chontaquiro), arnoto, atase (v. ticuna), ejuselma (v. karijona), gapÿru (v. piro, yine), huantura, irak (v. aguaruna), ipiácu (v. jíbaro), Joshin Mashe (v. shipibo-conibo), kachapo (v. candoshi), kuswé (surinam), lipstick tree (inglés), masce (v. cunibo), maxe (v. cashibo), mashe (v. shipico-conibo), mashu (v. arahuaca), manso de casa (Centro América), mantoro (v. huachipaeri), mosegneu, may-sá (v. tukano), muhubosa

(río Eno siona), noñoonya (v. ocaina), onoto y onotillo (Venezuela), orenotto y orlean (Europa), potsoti (v. matsigenka), pototsi y pottsote(v. campa), puchote y puchoti (v. antis), paipai (guajira: los nativos), pirrimapa (Amazona, Caquetá, Guainía y Vaupés: los nativos), rucu (v. cocama), roukou (Guayana francesa), sacha achote, shambre, shambu, shambuhuayo, shambu quiro, shambu shambu, su-nyo-bosa (río Eno-secoya), tuk-darán (frontera Colombo-venezolana), urcu, urcu achote, urucum, uñaño, urucurana (Amazonas, Caquetá, Guainía y Vaupés), urucú y uru-ura (Brasil), uxta (v. ticuna), vehirni (v. yura caré), yetsop (v. amuesha), y yobsaani (v. candoshi).(1)

### Distribución

En el Perú se encuentra distribuido en el departamento de Huánuco (Tingo María), Ucayali (Pucallpa), Loreto (Iquitos), Cusco (Quillabamba), Pasco (Oxapampa), Junín (Chanchamayo, Satipo), Tumbes, Piura, Lambayeque y San Martín.(9)

## Descripción Botánica



Árbol pequeño o arbusto con follaje denso, alcanza una altura de 3 a 5 m. pudiendo llegar hasta 10 m; tronco corto de 20 a 30 cm. de diámetro; corteza gris oscura con lenticelas en filas verticales. Hojas alternas acorazonadas, puntiagudas, de 10 a 20 cm. de largo y 5 a 10 cm. de ancho, de color verde en ambas caras, pecíolo alargado, presenta 5 nervaduras; estípulas deciduas. Inflorescencia en

panícula terminal. Flores con pétalos rosados o blancos, hermafroditas; cáliz con 5 pétalos; pétalos en número de 5, anchos y redondos; estambres numerosos, blancos o amarillentos.

Fruto cápsula dehiscente, bivalvado, se presenta en racimos, superficie cubierta con abundantes apéndices flexibles de color rojo, verdusco o pardo.

Semillas poliédricas de hasta 6 mm de largo, generalmente piramidales, cubierta con una membrana (arilo) pulposa de color rojo o anaranjado. (24)

## Componentes Químicos:

- ❖ Carotenoides: Bixina, norbixina, orellina, betacaroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína, mono y sesquiterpenos, entre lo que destaca el iswarane.

- ❖ Flavonoides: Glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, bisulfato de luteolina, bisulfato de hipolaetina, ácido tomentósico, vitaminas (A, B y C), proteínas, azúcares, celulosa, grasas, calcio, fierro y fósforo.

#### Propiedades Terapéuticas:

- Antidiarreico, antihemético, antihipertensivo, antiinflamatorio conjuntival, antiinflamatorio dérmico, antiinflamatorio vaginal, antimalárico, antipirético, cicatrizante, hepatoprotector, quemaduras.
- Otros usos: El achiote también es empleado como antiepiléptico, antivenéreo y en el tratamiento de cefaleas de diferente etiología. Asimismo, tiene propiedades afrodisíacas, diuréticas, hemostáticas, expectorantes y es considerada un buen antídoto en casos de envenenamiento por ácido cianhídrico.(9)

#### © Sistema: Clasificación Arthur Cronquist (1988) (8)

División	: Manoliophyta
Clase	: Magnolopsida
Sub-clase	: Asteridae
Orden	: Rubiales
Familia	: Rubiaceae
Género	: Genipa
Especie	: <i>G. americana</i> L.

### Sinonimia:

- *Genipa excelsa*
- *Genipa oblongifolia*

### Nombres vernaculares:

Huito, huitol, acuisho ana (v. antis), ana (v. asháninka, machiguenga, nomatsiguenga), genipa, huitu, jagua, janipa, jave (v. yagua), jidoro (v. huitoto), juraavuro (v. ocaina), lana, launa, nandi (v. shipibo-conibo), nane(v. cashibo), nanu (v. amahuaca), nso (v. piro), 'o (v. amarakaeri), ora (v. culina), tapuriba, tapuseba, uvito, witos, xagua, yaco huito, súa (v. aguaruna), palo colorado, palo de sangre, yaguajagua, acuisho (v. huayraya), akuisho y kuikuisho (v. ese-aja), bilito, caruto, chibará, chipará, genipapo, granado, guanapay, guayatil, guayatil colorado, huitoe, huito de agua, huito sua, isso (v. piro), jagua, janipa(v. cocama), jigua, nandé(v. amahuca), Higinio, pigio, totumillo, vito, vitoe, situ (v. shuti), xaguo, yayuhuito, sapote de monte.(1)

### Distribución

Originaria del norte de Sudamérica. Ampliamente distribuida desde México, sur de Florida y las Indias Occidentales hasta Paraguay. También se encuentra en el Caribe y tierras bajas de América tropical, desde la frontera Peruano-brasileña hasta las colinas de los Andes orientales.

En el Perú se le encuentra mayormente en la Amazonía, hasta 1200 msnm. y en la costa norte. (24)

## Descripción Botánica



Árbol de 10 a 25 m. y de 30 a 80 cm. de diámetro de copa cónica, redonda, con follaje concentrado en el ápice de las ramillas que son algo tetragonales, corteza bastante lisa o con ásperas lenticelas, de color bronceado claro o marrón rojizo. Hojas grandes de 10 a 30 cm. de longitud, concentradas en el ápice de las ramas, oblongas a ovadas, con el ápice agudo, bastante atenuada, brillantes, glabras en ambas caras, opuestas, coriáceas, con pecíolo corto, de 5 mm. de longitud, engrosados en su inserción. Inflorescencia en racimos axilares o terminales. Flores simples hermafroditas, grandes de hasta 2.5 cm. de diámetro, con corola tubular en la base con 5 o más pétalos de color blanco al principio y luego se tornan amarillos, vellosos y ligeramente perfumados. Fruto en baya subglobosa a ovoide, indehiscente, de 8 a 12 cm. de largo y 7 a 9 cm. de diámetro con un peso que oscila entre 200 y 400 g. de color parduzco, con resto del tubo del cáliz en el ápice, de cáscara amarillo-crema a marrón, con puntuaciones marrón oscuras; cuando madura tiene un pericarpio coriáceo, esponjoso, de color pardo amarillo, con pulpa astringente y jugosa de cerca de 1.5 cm. de espesor. Semillas numerosas, alrededor de 300 por fruto de 1cm de diámetro, achatadas, de color crema. (22)

### Componentes Químicos:

- ❖ Contenido en la parte comestible: Proteínas 1200 mg; carbohidratos 14000 mg; fibra 1600 mg; calcio 69 mg; fósforo 21 mg; hierro 0.5 mg; tiamina 0.03 mg; riboflavina 0.33 mg; niacina 0.54 mg; ácido ascórbico 1.1 mg.

Esta especie contiene genipita, manitol, taninos, metil-éster, caterina, hydatoína y ácido tánico. (9)

### Propiedades Terapéuticas:

- Antiinflamatorio vaginal, antitusígeno, hemético, en el tratamiento de la ictericia, antiséptico, cicatrizante, digestivo, diurético, tónico, vomitivo, antianémico, antihemorrágico, hidropesía, para hongos de la piel.
- Otros usos: La raíz de ésta planta es laxante, los frutos maduros se utilizan para el tratamiento de bronquitis. El jugo del fruto se emplea en el tratamiento del cáncer uterino. Los frutos verdes en cocimiento se considera que tienen efecto abortivo. También se emplea para la calvicie, como antiabortivo, contraceptivo, en extracción dental; entre otros.(9)

© Sistema: Clasificación Arthur Cronquist (1988) (8)

División : Magnoliophyta  
Clase : Liliopsida  
Sub-clase : Arecidae  
Orden : Arales  
Familia : Araceae  
Género : Pistia  
Especie : *P. stratiotes* L.

Sinonimia:

- *Pistia crispata*
- *Pistia minor*

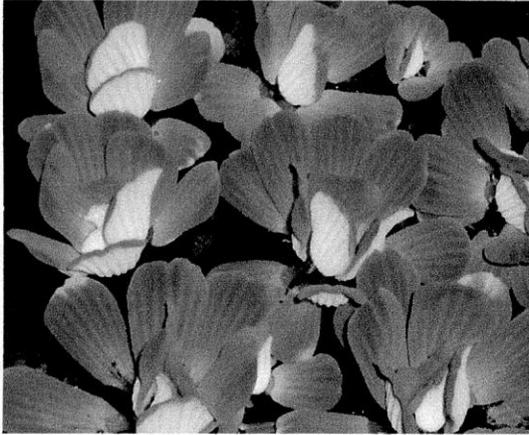
Nombres vernaculares

Guama, guamas, huama, lechuga cimarrona, lechuga de agua, repollito de agua, movu (v. arahuaca).

Distribución:

En la costa y Amazonía: Introducida en muchas partes del mundo. (1)

### Descripción Botánica:



Planta acuática flotante. Hojas espiralmente arrosetadas, pecioladas en la base, lámina abovada, truncada, de color verde pálido. Las inflorescencias son erectas o diseminadas; espata como hoja de

color blanca-verdosa; flores femeninas en la base del espádice; flores masculinas en el ápice. (9)

### Componentes Químicos:

En algunos géneros se han citado alcaloides de los tipos piridina o indol. Otros componentes encontrados son las saponinas, taninos, ácidos fenólicos, aminas y terpenoides. (9)

### Propiedades Terapéuticas:

Antimicótico dérmico.

Otros usos: Esta planta también es usada como vulneraria, antihemorroidal y contra la hematuria y hemoptisis. (9)

### III MATERIALES Y METODOS:

#### 3.1 Lugar de Estudio:

El presente trabajo de tesis se realizó en los ambientes del Laboratorio de Control de Calidad del Instituto de Medicina Tradicional (IMET), ubicado en Pasaje San Lorenzo # 205, distrito de San Juan.

#### 3.2 Materiales:

##### 3.2.1 Plantas medicinales:

- |                            |           |
|----------------------------|-----------|
| - <i>Bixa orellana</i>     | “achiote” |
| - <i>Genipa americana</i>  | “huito”   |
| - <i>Pistia stratiotes</i> | “huama”   |

##### 3.2.2 Microorganismos de prueba:

- |                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| - <i>Escherichia coli</i>       | ATCC 35218  |
| - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853  |
| - <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 6538 P |
| - <i>Candida albicans</i>       | IMET – 1    |

##### 3.2.3 Medios de Cultivo:

- Agar Müeller-Hinton
- Agar Sabouraud

#### **3.2.4 Materiales de Vidrio:**

- Placas de Petri (15 x 2 cm.)
- Placas de Petri (9 x 1.5 cm.)
- Tubos de ensayo (15 x 1.5 cm.)
- Probeta graduada (250, 500 ml)
- Matraces (50, 125 y 250 ml)
- Botellas (190 ml)
- Pipetas (1 y 5 ml)
- Picetas

#### **3.2.5 Materiales de Metal:**

- Coladores de malla metálica
- Ollas de fierro enlozado (5 litros)
- Espátula
- Cuchillo
- Gradillas
- Cilindros de metal (0.65 mm de diámetro)
- Asa bacteriológica de punta
- Tijeras

#### **3.2.6 Materiales de Plástico:**

- Embudo
- Baldes (6 litros)
- Bandejas (8 y 15 litros)

### **3.2.7 Equipos de Laboratorio:**

- Horno BIOLAB
- Autoclave modelo vertical-v, Tecnomed
- Estufa – ACO LINE 220 voltios
- Baño maría H.W KESSEL
- Balanza analítica H.W.Klenel
- Balanza mecánica (de 5 Kg)
- Congelador Friolux
- Liofilizador Thelco
- Cocina eléctrica Coxbelg (una hornilla)

### **3.2.8 Materiales de Escritorio:**

- Papel bond oficio (80 g)
- Papel despacho
- Papel aluminio Ranch wagon
- Cinta masking tape Shurtape
- Plumillas Faber Castell
- Lapiceros Faber Castell
- Corrector Faber Castell
- Diskettes Sony
- Rollos de película Kodak
- Cuaderno de apuntes
- Regla (30 cm)
- Fósforos

### **3.2.9 Materiales de Limpieza:**

- Detergente industrial
- Lejía Margot
- Escobillas para tubos
- Esponja lava vajilla

### **3.2.10 Otros:**

- Algodón hidrofílico (500 g)
- Gasa
- Guantes de látex
- Alcohol medicinal 90°
- Jeringas tuberculínicas
- Hilo pabilo
- Agua destilada
- Gas propano
- Gorro de tela
- Mascarillas descartables
- Cápsula de porcelana
- Papel filtro Wahuttnane N° 1

## **3.3 Metodología:**

### **3.3.1 Diseño experimental:**

El diseño usado en el presente trabajo de investigación fue de tipo descriptivo.

Pues estuvo dirigido a describir el comportamiento de los microorganismos de

prueba seleccionados, frente a las diferentes concentraciones de los extractos utilizados.

### 3.3.2 Colección y Procesamiento de las plantas:

Las diferentes plantas usadas fueron colectadas en las primeras horas de la mañana, posteriormente fueron llevadas al laboratorio donde se procedió al lavado y desinfección de las mismas, luego se procedió al picado de la estructura vegetal seleccionada.

### 3.3.3 Preparación de Extractos Acuosa:

La preparación de los extractos acuosos se realizó siguiendo las técnicas empleadas popularmente en la región:

**Extracto de *Bixa orellana*.**- Se usó 1Kg de hojas las cuales fueron sometidas al proceso de maceración acuosa (aproximadamente 400 hojas) en 2 litros de agua destilada durante 24 horas. Las hojas se estrujaron en el agua y se dejaron en reposo por 24 horas; luego, el líquido obtenido de la maceración se filtró, primero a través de algodón y luego a través de papel de filtro, el filtrado se llevó a congelación por 24 horas y luego fue liofilizado para obtener el extracto en una forma sólida concentrada a partir de la cual se obtuvieron las diferentes concentraciones usadas.

**Extracto de *Genipa americana*.**- Se utilizó el fruto maduro mediante cocimiento: 4050 g de frutos seccionados en cuadritos pequeños por 2 litros de agua destilada, puestos a cocción durante 2 horas (Anexo 2, foto 1). El líquido resultante se filtró y de éste se obtuvo la "solución madre"

**Extracto de *Pistia stratiotes*.**- Se usó la planta completa mediante infusión; 30 plantas por litro de agua. Se puso a hervir aproximadamente poco más de un litro de agua, se bajó luego del hervor y se pusieron las plantas de "huama" en el agua hervida por unos 15 minutos. Luego, se filtró con algodón y papel de filtro, siendo el filtrado llevado a congelación y posteriormente se liofilizó para obtener el extracto en una forma sólida concentrada a partir de la cual se obtuvieron las diferentes concentraciones usadas.

- \* Se determinó la concentración de sólidos totales presentes en el extracto (caso de "huito") sacando para ello unos 100 ml de éste y colocándolo en una cápsula previamente pesada, la cual se llevó al baño maría hasta que evaporó todo el líquido y luego se pesó nuevamente, de manera que por la diferencia de pesos se pudo determinar la concentración de sólidos totales.



269

★ Para determinar el valor de las otras concentraciones a usarse se empleó la fórmula de concentración por volumen:

$$C V = C' V'$$

**Donde:**

C : Concentración inicial

C' : Concentración final

V : Volumen inicial

V' : Volumen final

**Determinación de las diferentes concentraciones de los extractos usados:**

- *Genipa americana*: De la solución stock (correspondiente a la primera concentración), que contenía 3 mg/ml, se sacaron 30 ml a la cual se agregó 6 ml de agua destilada estéril obteniéndose una segunda concentración de 2.5 mg/ml; se siguió este procedimiento para obtener las demás concentraciones correspondientes a 2.0, 1.5 y 1.0 mg/ml.

- *Bixa orellana*: Del liofilizado obtenido (4.8 g) se preparó la primera concentración equivalente a 80 mg/ml al agregarle 60 ml de agua destilada estéril; a partir de ésta se obtuvieron las demás concentraciones correspondientes a 40, 20, 10 y 5 mg/ml.

- *Pistia stratiotes*: Del liofilizado obtenido (4.8 g), se obtuvo la primera concentración equivalente a 80 mg/ml al agregarle 60 ml de agua destilada estéril; a partir de ésta se obtuvieron las demás concentraciones correspondientes a 40, 20, 10 y 5 mg/ml.

#### 3.3.4 Preparación de las Diluciones Microbianas (15,21):

- Las cepas de los microorganismos de prueba se repicaron en tubos con agar Múeller-Hinton, un día antes de realizarse las diluciones, con el fin de obtener cultivos jóvenes.
- Se agregó agua destilada estéril en el tubo con el microorganismo repicado, se agitó ligeramente y se diluyó con agua destilada estéril hasta obtener una turbidez semejante a la del tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland ( $3.0 \times 10^8$  microorganismos/ml).
- Con la dilución obtenida se procedió a la parte experimental.
- Estos pasos se repitieron para cada microorganismo de prueba.

#### 3.3.5 Método de los Excavados (2, 3, 7,14 y 17):

- Se prepararon 100 ml de agar Múeller-Hinton para cada placa a usarse, en la cual se añadió 0.1ml de la dilución microbiana. Se mezcló por agitación suave y luego, se vació en las placas, éstas se dejaron solidificar y posteriormente con ayuda de los cilindros metálicos se realizaron cinco excavaciones por placa (Anexo 2, foto 2), en las cuales se añadieron 0.1 ml de extracto vegetal (Anexo 2, foto 3). Se incubó por 24 horas a 37°C.

- ❖ Este procedimiento se realizó con todas las diluciones microbianas, para cada concentración y tratamiento.

- ❖ Se realizó la lectura de las placas a las 24 horas de su incubación. Se determinó la Capacidad antimicrobiana tomando medidas de los halos de inhibición.

Para la determinación de la Concentración Bactericida Mínima se comprobó el crecimiento microbiano y/o supervivencia de los microorganismos mediante la siembra en agar Müeller–Hinton de una asada tomada del área del halo de inhibición.

### 3.3.6 Prueba de Sensibilidad:

- ★ Para determinar la Capacidad antimicrobiana: En el presente trabajo de investigación se consideró el siguiente rango o parámetros de sensibilidad (15):

0 – 9 mm	= Resistente
10 a 14 mm	= Intermedio
15 a más	= Sensible

#### IV. RESULTADOS

CUADRO N° 1

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE  
*Genipa americana* "huito" FRENTE A LOS MICROORGANISMOS DE  
PRUEBA SELECCIONADOS

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/ml)					DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	10,5	12,2	13,7	15,3	17,6	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	10,5	12,7	14,1	15,7	18,4	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1,5	7,8	10,3	12,0	12,7	
<i>Candida albicans</i> IMET-1	3,0	8,0	10,7	12,1	13,0	

De acuerdo a los parámetros de sensibilidad, el cuadro N° 1 muestra que *E. coli* es sensible al extracto de huito a concentraciones  $\geq 2.5$  mg/ml, mostrando un halo de inhibición  $\geq 15.3$  mm de diámetro; similar comportamiento se observa con *S. aureus*, sin embargo, tanto en *P. aeruginosa* como *C. albicans* éstas concentraciones no fueron tan eficaces puesto que a la concentración de 2.5 mg/ml, estos microorganismos mostraron un comportamiento intermedio en lo que se refiere a la resistencia frente al extracto (Anexo 2, fotos 4, 5, 6 y 7).

## CUADRO N° 2

### DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Bixa orellana* "achiote" FRENTE A LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA SELECCIONADOS

MICROORGANISMO  DE PRUEBA	CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/ml)					DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)
	5,0	10,0	20,0	40,0	80,0	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	—	9.1	10.5	12.1	15.2	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	—	8.4	10.2	11.2	13.9	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	—	—	—	—	—	
<i>Candida albicans</i> IMET-1	—	—	—	—	—	

De acuerdo a los parámetros de sensibilidad, el cuadro N° 2 muestra que *E. coli* es el único microorganismo de prueba seleccionado, que muestra sensibilidad a una concentración del extracto de achiote de 80,0 mg/ml, mostrando un halo de inhibición de 15,2 mm. de diámetro. Por otro lado, se observa que *Staphylococcus aureus* presenta una sensibilidad intermedia a una concentración de 20 mg/ml con un halo de 10,2mm.; mientras que *P. aeruginosa* y *C. albicans* son microorganismos resistentes a las diferentes concentraciones ensayadas del extracto de achiote. (Anexo 2, fotos 8 y 9).

### CUADRO N° 3

#### DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE *Pistia stratiotes* "huama" FRENTE A LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA SELECCIONADOS

MICROORGANISMO DE PRUEBA	CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/ml)					DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)
	5,0	10,0	20,0	40,0	80,0	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	—	—	—	—	—	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	—	—	—	—	—	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	—	—	—	—	—	
<i>Candida albicans</i> IMET-1	—	—	—	—	—	

Este cuadro muestra que ninguna de las concentraciones del extracto de huama ensayadas presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos de prueba seleccionados.

#### CUADRO N° 4

#### CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA (CBM) DE LOS EXTRACTOS USADOS FRENTE A LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA

MICROORGANISMO	HUITO	ACHIOTE	HUAMA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	2.5mg/ml	80 mg/ml	–
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	2.5mg/ml	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–
<i>Candida albicans</i> IMET-1	–	–	–

Este cuadro muestra que la CBM para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* es de 2.5mg/ml con el extracto de huito; en cuanto al extracto de achiote *Escherichia coli* presenta una CBM de 80.0 mg/ml. Las otras concentraciones de los extractos no tienen acción bactericida frente a los microorganismos de prueba.

## V DISCUSION

La medicina tradicional ha estado siempre presente en la cultura popular y actualmente ha adquirido una mayor importancia no sólo a nivel regional sino mundial, debido a la creciente resistencia de los microorganismos a los antibióticos comerciales. Con el fin de incrementar los conocimientos sobre las propiedades de las plantas con potencial antimicrobiano, diferentes laboratorios a nivel mundial tienen entre sus objetivos realizar investigaciones tendientes a demostrar la existencia de principios activos de vegetales que posean actividad antimicrobiana.

Respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, tal como se observa en los cuadros N° 2 y N° 4, el empleo del extracto de *Bixa orellana* "achiote", a una concentración de 80 mg/ml, fue activo frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, fenómeno que no se observó con los demás microorganismos de prueba empleados ya que éstos mostraron resistencia a las concentraciones empleadas de dicho extracto. Este hallazgo guarda relación con lo reportado por Mestanza (19), quién encontró que *E. coli* mostraba sensibilidad a concentraciones inclusive menores a las empleadas en este estudio (5 y 10 mg/ml de dicho extracto). Por otro lado, Irobi *et al.* (13) también afirmaron que el extracto de hojas de "achiote" presentaba actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas como era el caso de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*; sin embargo, cabe señalar que estos investigadores emplearon parámetros de sensibilidad diferente a los empleados en el presente estudio, ya que Irobi *et al.* (13), consideraron que un microorganismo era sensible a un determinado

extracto por la formación de halo, sin importar el diámetro que este mostrara. Adicionalmente, Pinto *et al.* (23) reportaron que el extracto liofilizado de diferentes partes de la planta de “achiote” presentaban actividad antimicrobiana mayormente frente bacterias Gram negativas, tal era el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus sp.* y *Chromobacterium violaceum*.

Estos resultados determinaron que el extracto de achiote es un producto que posee amplio espectro antimicrobiano, aunque también es conveniente tomar en consideración, ante el hecho de encontrar diferentes perfiles de resistencia de una determinada especie bacteriana, a que los microorganismos empleados pertenezcan a resistotipos distintos o tal vez que sean portadores de plásmidos poseedores de genes que le confieran resistencia al extracto vegetal empleado.

Aunque también habría que considerar que las variaciones en los resultados podrían deberse a características diversas del materia vegetal empleado: lugar de procedencia de las plantas, edad de la planta, parte utilizada de la planta, la metodología empleada, los medios de cultivo empleados en los bioensayos así como el tipo y concentración de los extractos utilizados; lo cual significa que los principios activos u otros factores con actividad antimicrobiana se encuentran en diferentes condiciones o estados.

Con respecto a *Candida albicans* IMET-1, como se muestra en los cuadros N° 1, N°2 y N° 4 no se observó sensibilidad frente a ninguna de las concentraciones del extracto de “achiote”, éste resultado es similar a lo reportado por Pinto *et al.* (23), quienes reportaron inactividad del extracto de *Bixa orellana* frente a *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*; resultado

que también fue reportado por Irobi *et al.* (13) empleando cepas de *Candida utilis* y *Aspergillus niger*. Sin embargo, Mestanza (20) a una concentración de 250 mg/ml de extracto de *B. orellana* determinó sensibilidad frente a *Candida albicans* y los investigadores del IPSS –IMET (10), reportaron que a 400 mg/ml de extracto de “achiote” se obtenía un halo de inhibición de 20 mm frente a esta levadura.

Como ya se mencionó, estas diferencias se deberían probablemente a las diferentes concentraciones empleadas en los ensayos y también a los diferentes rangos utilizados por los autores para medir la sensibilidad de los microorganismos frente a los extractos.

Al igual que Cáceres (5), tal como se ha descrito a lo largo de estos párrafos, el extracto de *Bixa orellana* “achiote” mostró actividad antimicrobiana; y el extracto empleado tanto por este investigador como en este trabajo procedieron de partes similares de la planta, corteza y hojas en el extracto de Cáceres y hojas en el extracto de este trabajo, aunque Cáceres demostró actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*; además afirmó que también actuaba contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Trichophyton rubrum*.

En relación al extracto de *Genipa americana* “huito”, en los cuadros N° 1 y N° 4 se puede observar que *E. coli* ATCC 35218 y *S. aureus* ATCC 6538 P, mostraron sensibilidad frente a una concentración de 2.5 mg/ml del extracto de dicho vegetal, mientras que Mestanza (19) determinó que el extracto de “huito”,

a una concentración de 0.5 mg/ml no producía sensibilidad en *E. coli*. Esta diferencia podría deberse a que Mestanza utilizó concentraciones del extracto más bajas que las empleadas en el presente estudio.

Asimismo, se observó que aunque *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* IMET-1 presentaban halos de inhibición, éstos no fueron lo suficientemente grandes como para considerarlas sensibles de acuerdo a los parámetros empleados en el presente trabajo de investigación. De haber sido así, los resultados podrían confirmar la efectividad del uso tradicional del fruto de "huito" como antiséptico vaginal, cicatrizante y contra la micosis dérmica, información reportada por Lacaze & Alexaides (16), Rengifo & Cerrutti (24) y Brack (1). Debe destacarse el hecho que *Genipa americana*, a una concentración de 3.0 mg/ml, produjo un halo de 13.0 mm de diámetro, el cual nos conllevó a concluir que *C. albicans* sea un microorganismo intermedio a la concentración empleada de dicho extracto.

En lo que concierne al ensayo con extracto de *Pistia stratiotes* "huama", a pesar que Brack (1) y Silva & García (26), mencionaron su utilidad contra las micosis dérmicas, en el presente trabajo no se reportó actividad antimicrobiana en ninguna de las concentraciones del extracto acuoso de la misma, lo cual no se contrapone con lo manifestado por Brack puesto que los agentes causantes de dermatomicosis son mohos y en este trabajo no se empleó ninguno de este tipo de microorganismos.

## VI CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de *Genipa americana* "huito" y *Bixa orellana* "achiote" poseen actividad antimicrobiana, aunque en diferente grado, sobre uno o más de los microorganismos de prueba usados, a diferencia del extracto acuoso de "huama" que no presentó ninguna actividad.
2. El extracto acuoso de *Bixa orellana* "achiote" mostró capacidad bactericida frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 a concentraciones altas.
3. El extracto acuoso de *Genipa americana* "huito" presentó capacidad bactericida mínima similar frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
4. El extracto acuoso de *Pistia stratiotes* "huama" no mostró acción antimicrobiana frente a ninguno de los microorganismos empleados.
5. Los microorganismos más sensibles a los extractos ensayados fueron *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; el más resistente fue *Candida albicans*.
6. Los extractos de "achiote" y "huito" pueden ser una alternativa en el empleo de los antibióticos.

## **VII RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda realizar y/o continuar pruebas semejantes a las desarrolladas en el presente trabajo utilizando otras plantas de la región para incrementar el conocimiento sobre la flora de nuestro medio.
2. Es conveniente liofilizar los extractos, pues de esta manera se pueden obtener mayores concentraciones y además se pueden conservar por mayor tiempo.
3. Sería bueno ensayar otras formas de obtención de extractos de las plantas a manera de probar una mayor eficacia de los mismos.
4. Se recomienda utilizar otras partes de las plantas estudiadas en este trabajo, para comprobar si presentan la misma o diferente actividad antimicrobiana.
5. Es mejor coleccionar las muestras en las primeras horas de la mañana para evitar cambios en la composición química de las plantas.

## VIII RESUMEN

Con el presente trabajo de investigación se comprobó el efecto antimicrobiano de tres especies de plantas medicinales (*Genipa americana* "huito", *Bixa orellana* "achiote" y *Pistia stratiotes* "huama") comunes en la región y que tradicionalmente son usadas con este fin.

Las plantas fueron recolectadas en horas de la mañana y procesadas a fin de obtener un extracto acuoso con cada una de ellas, los cuales fueron diluidos en diferentes concentraciones para la parte experimental.

Se prepararon 100 ml de agar Müller-Hinton y Sabouraud al cual se agregaron 0.1 ml de una suspensión microbiana ( $3 \times 10^8$  céls/ml.), para ser usados en las pruebas en placas mediante el método de los excavados. En cada excavado se agregó 0.1 ml de cada concentración del extracto y se incubó de 18 - 24 horas por 37°C.

El extracto de huito mostró un mayor efecto antimicrobiano frente a todos los microorganismos de prueba, pero sólo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* registraron un halo de inhibición considerado sensible de acuerdo al parámetro de sensibilidad usado.

En cuanto al extracto de achiote, presentó efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; pero sólo *E. coli* mostró un halo de inhibición considerado sensible.

La Concentración Bactericida Mínima (CBM) de *G. americana* frente a *E. coli* ATCC 35218 y a *S. aureus* ATCC 6538 P fue de 2.5 mg/ml. La CBM del extracto de *B. orellana* frente a *E. coli* ATCC 35218 fue de 80 mg/ml.

El extracto acuoso de *Pistia stratiotes* no presentó efecto antimicrobiano frente a ninguno de los agentes ensayados.

## IX REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRACK, A. 1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cuzco – Perú. 556 pp.
2. BORD, R. & HOREL, B. 1984. Microbiología Médica. Ed El Ateneo. Argentina. 475 pp.
3. BROOKS GF, BUTEL JS y MORSE SA. 1999. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 16ª Edición. Editorial El Manual Moreno S.A. México. 636 pp.
4. CACERES, A. 1995. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Ed. Universitaria. Guatemala. 402 pp.
5. CACERES, A. *et al.* 1995. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J. Ethnopharm.*, Amsterdam, V. 48, N. 2, p. 85-88
6. CERRUTTI, T. 2000. Plantas Medicinales “Cultivo, Importancia y Formas de Uso”. 1ª Edición. Iquitos – Perú. 107 pp.
7. COLLINS, C. 1969. Métodos Microbiológicos. Ed. Acribia. Zaragoza – España. 410 pp.
8. CRONQUIST, A. 1988. Outline of Classification of Magnoliophyta. The Evolution and Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden. Brox. New York. USA.
9. IPSS-IMET.1995. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana Iquitos-Perú. 255 pp.

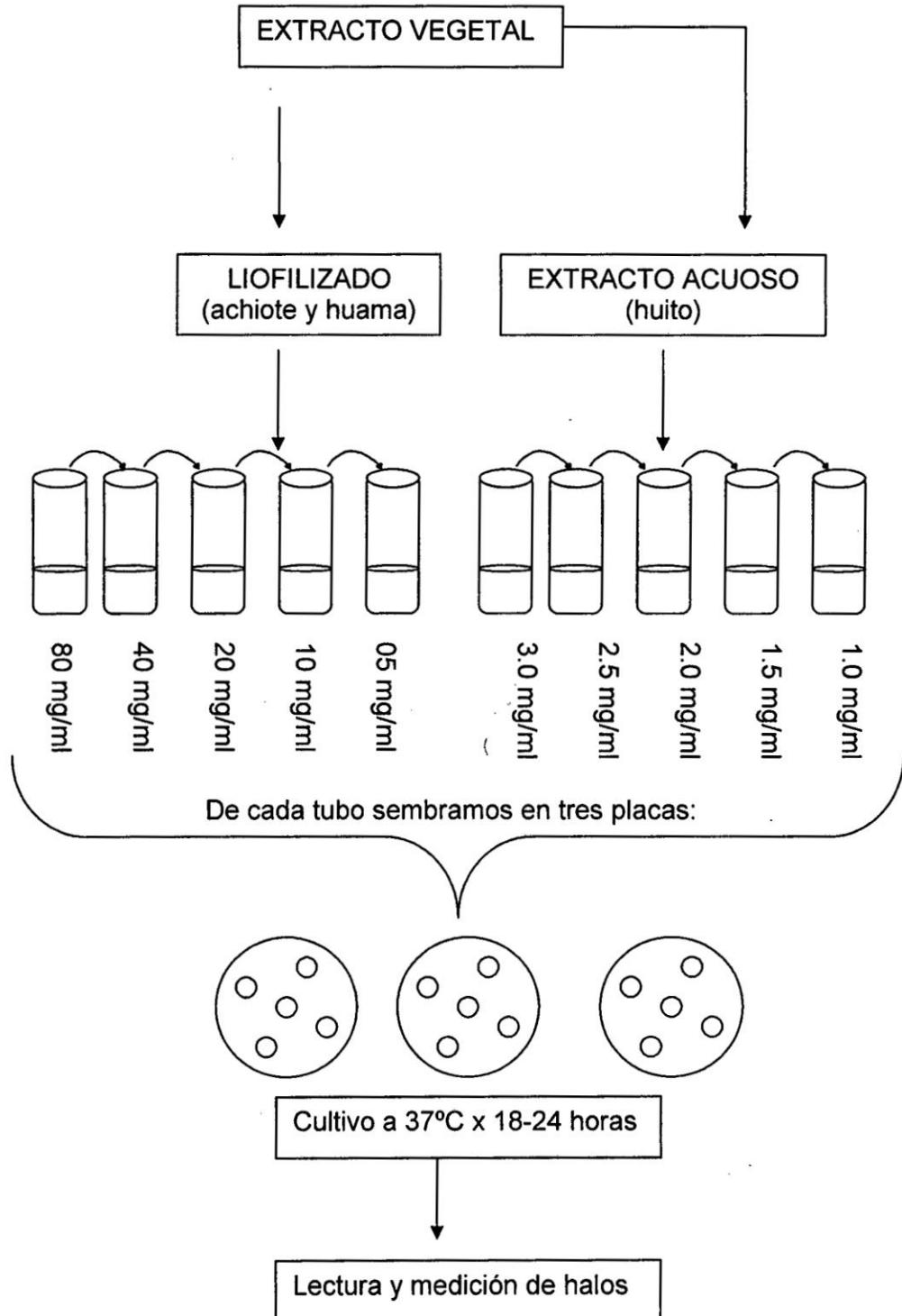
- 10.-----1998. *Bixa orellana* L. Monografías de Plantas Medicinales N°2. Iquitos-Perú. 64 pp.
- 11.-----1998. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana Utilizadas por los Curanderos, Chamanes y Herbolarios con fines Antiinflamatorios. Iquitos – Perú. 140 pp.
- 12.-----2000. Plantas Medicinales. “Cultivo, Importancia y Formas de Uso”. 1ª Edición. Iquitos-Perú. 107 pp.
- 13.IROBI, O *et al.* 1996. Antimicrobial activity of annato (*Bixa orellana*) extract. *Int. J. Pharmacog.*, V 34, N. 2, p 87 - 90.
- 14.KINGSBURY D., WAGNER G. y SEGAL G. 1989. Microbiología Médica. 1º Edición. Ed Limusa S.A. México. 505 pp.
- 15.KONEMAN, E.; ALLEN, S.; DOWELL, V.; SOMMERS, H. 1983. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. Ed. Médica Panamericana S.A. Argentina. 519 pp.
- 16.LACAZE, D. & ALEXAIDES, M. 1995. Salud para Todos; Plantas Medicinales y Salud Indígena en la Cuenca del Río Madre de Dios, Perú.
- 17.LENNETTE, E. *et al.* 1982. Manual de Microbiología Clínica 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires – Argentina. 1260 pp.
- 18.MEJIA, K. & RENGIFO, E. 1996. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía. 249 pp.
- 19.MESTANZA, M.1997. Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales. Iquitos-Perú. Datos no publicados.

20. \_\_\_\_\_ .1998. Actividad Antimicrobiana de *Bixa orellana* "Achiote". Iquitos – Perú. Datos no publicados.
21. PELCZAR, M. REID, R. Y CHAN, E. 1982. Microbiología. 2ª Edición. Ed. Mc Graw – Hill S.A. México. 826 p.
22. PINEDO, M. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Estudio de su Uso y Cultivo. 304 pp.
23. PINTO, A. *et al.* 2003. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). Revista Lecta, Bragança Paulista., V. 21, N. 1/2, p 47-54.
24. RENGIFO, E. & CERRUTTI, T. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Estudio de su Uso y Cultivo. SE. 304 pp.
25. SILVA & CERRUTTI. 1995. Plantas Medicinales del Jardín Botánico. IMET-IPSS. Iquitos- Perú. 101 pp.
26. SILVA, H. & GARCIA J. 1997. La Medicina Tradicional en Loreto. IPSS-IMET. Iquitos – Perú. 108 pp.
27. <http://www.interhiper.com/medicina/fitoterapia/achiote.htm>
28. [www.FITOTERAPIA.NET](http://www.FITOTERAPIA.NET)



## Anexo 1

### FLUJOGRAMA DE LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN EN PLACAS



## Anexo 2

FOTO 1: COCIMIENTO DE FRUTOS DE HUITO



FOTO 2: REALIZACION DE LOS EXCAVADOS EN EL AGAR



FOTO 3: COLOCACION DE EXTRACTOS EN LOS EXCAVADOS



FOTO 4: INHIBICION DE *Escherichia coli* POR EL EXTRACTO DE HUITO

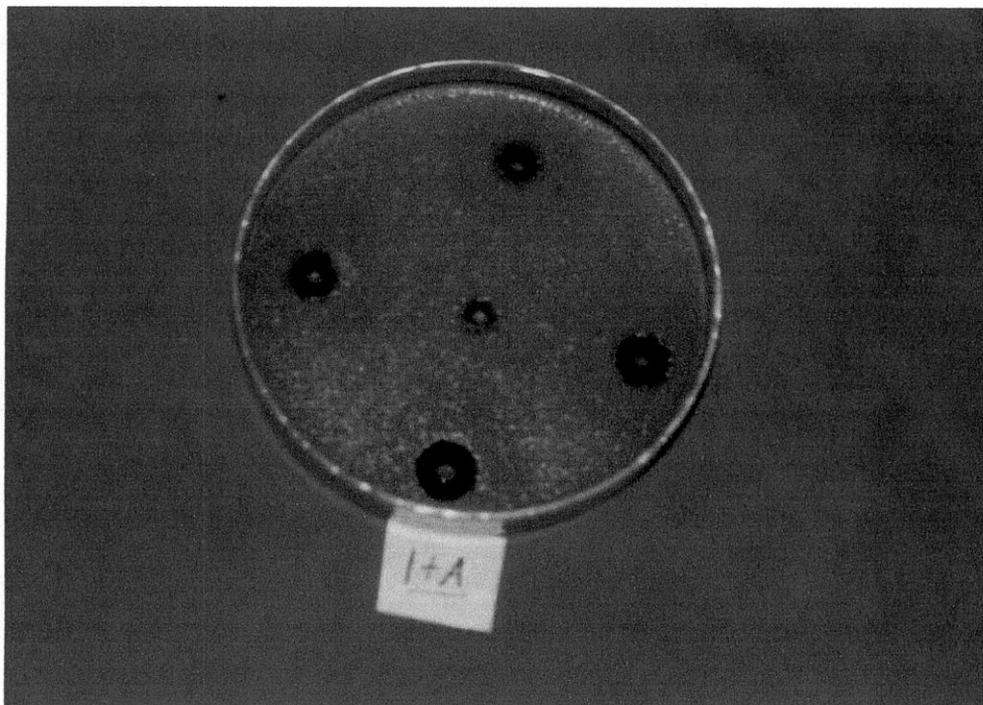


FOTO 5: INHIBICION DE *Staphylococcus aureus* POR EL EXTRACTO DE HUITO

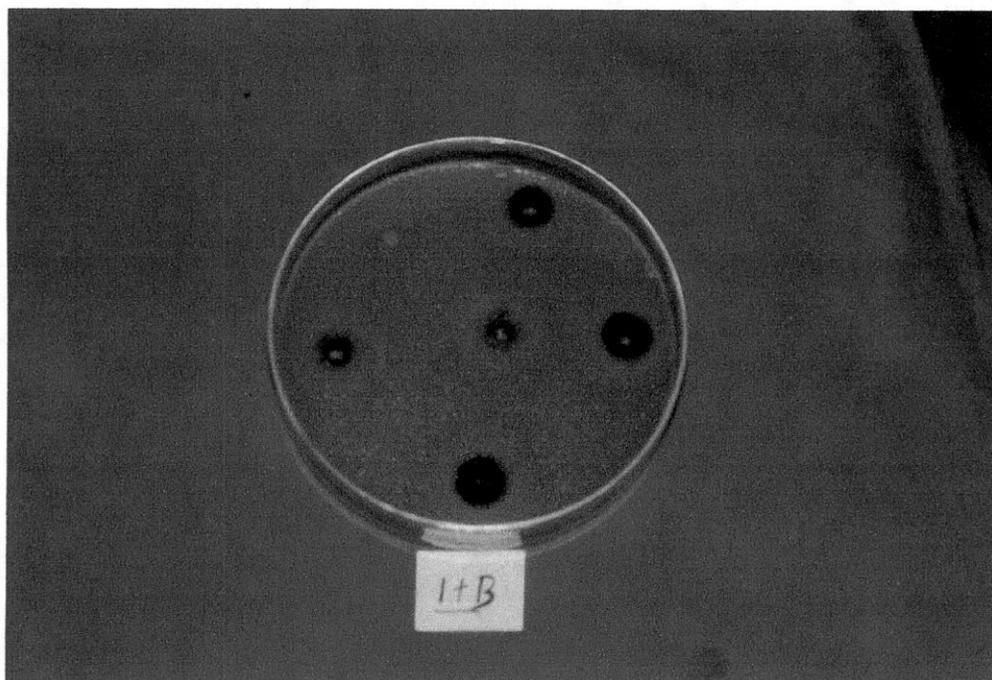


FOTO 6: INHIBICION DE *Pseudomonas aeruginosa* POR EL EXTRACTO DE HUITO

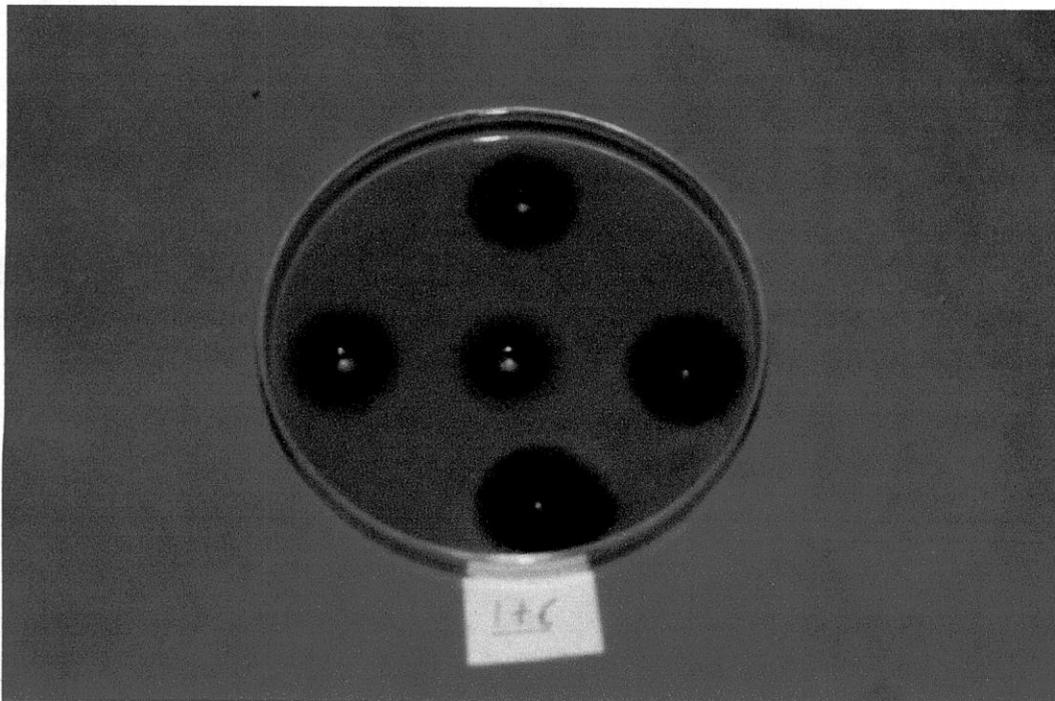


FOTO 7: INHIBICION DE *Candida albicans* POR EL EXTRACTO DE HUITO

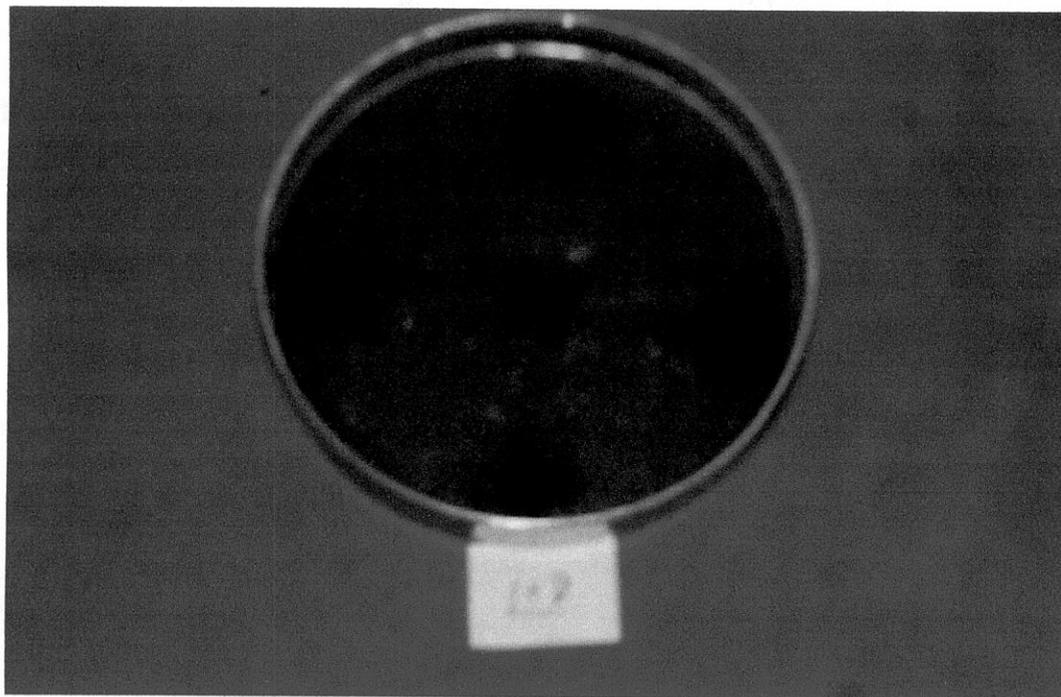


FOTO 8: INHIBICION DE *Escherichia coli* POR EL EXTRACTO DE ACHIOTE

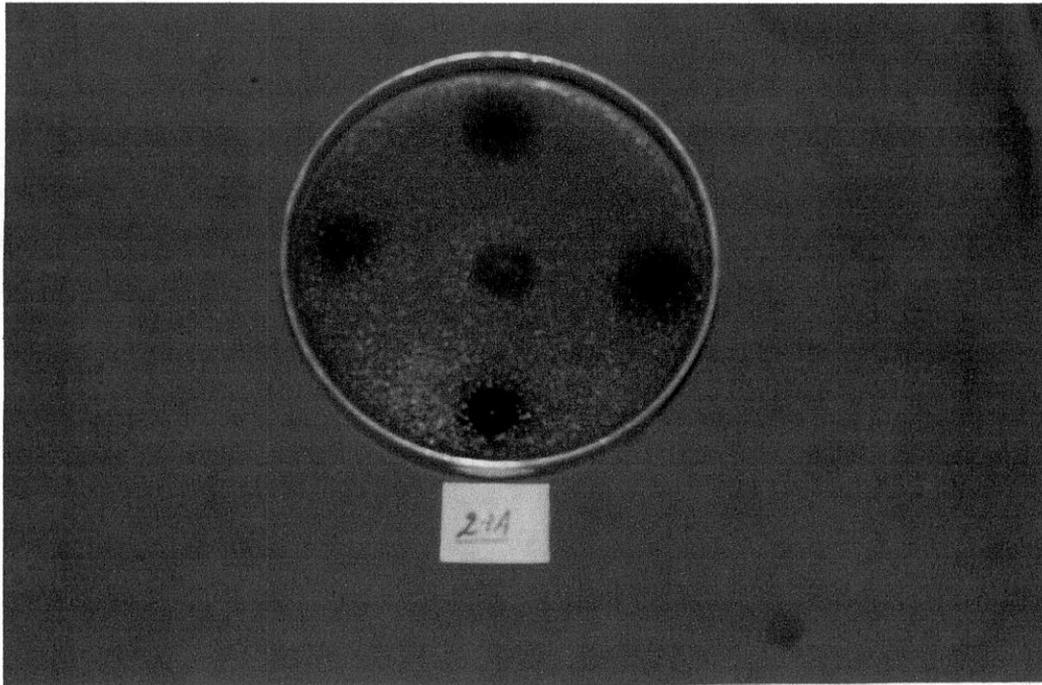


FOTO 9: INHIBICION DE *Staphylococcus aureus* POR EL EXTRACTO DE ACHIOTE

