UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Efecto bacteriostático y bactericida de extractos de ají panca (*Capsicum chinense*) y pimiento (*Capsicum annuum var. annuum*) sobre cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Eduardo Alexander Salazar Sánchez

ASESOR

Daphne Ramos Delgado

Lima - Perú

2016

A Adelinda, pues forjaste mi andar con amor,
sacrificio y exigencia. Hoy puedo decirte:
¡Gracias por todo, pequeña madre!

.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Daphne Ramos, gracias por la confianza depositada y por ayudarme en este primer paso hacia el mundo de la investigación.

A la M. V. Mónica Rebatta, recientemente colegiada, gracias por los consejos y el apoyo en las dificultades.

A la Dra. Bettit Salvá y Edith Navarro de la Universidad Nacional Agraria La Molina, así como a la Dra. María Elena Salazar de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, gracias por la ayuda desinteresada en la primera etapa de este trabajo.

Al Laboratorio de Virología y al Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental de la Facultad, gracias por las facilidades brindadas.

ÍNDICE

RESUMEN

En la actualidad, es creciente el interés por nuevas alternativas para reemplazar los antimicrobianos químicos debido a los efectos adversos para el consumidor. Existen especies botánicas con efecto antimicrobiano como los frutos de *Capsicum* que son de uso común en nuestro país. Los extractos obtenidos de los ajíes y pimientos poseen compuestos activos con efecto antimicrobiano sobre bacterias, hongos y virus; además, su uso es seguro debido a su naturaleza orgánica. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad bacteriostática y bactericida de extractos de Ají Panca (*Capsicum chinense*) y Pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se elaboró extracto de ambos frutos con rendimientos de 12.53 ± 0.30% y 12.17 ± 0.23% para Ají Panca y Pimiento, respectivamente. Asimismo, el extracto de ají panca contuvo 1.39 mg de capsaicina y 0.54 mg de dihidrocapsaicina, determinadas por HPLC. Estos compuestos no se analizaron para el pimiento ya que los niveles son no detectables en variedades dulces. Se evaluó el efecto de ambos extractos a concentraciones de 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10 y 0.04% usando el método de microdilución en caldo y posterior crecimiento en agares selectivos. Los resultados muestran que no existe efecto bacteriostático para ambas cepas. Asimismo, la viabilidad de *E. coli* ATCC 25922 no fue afectada por los dos extractos mientras que para *S. aureus* ATCC 25923 solo el ají panca no afecto su viabilidad. Finalmente, el efecto bactericida para *S. aureus* ATCC 25923, fue observado con el extracto de pimiento a concentraciones de 25, 12.5 y 6.25%.

Palabras clave: *Capsicum annuum* var. *annuum, Capsicum chinense, Escherichia coli* ATCC 25922*,* microdilución en caldo, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ABSTRACT

Nowadays, interest in new alternatives to replace chemical antimicrobials is growing due to the adverse effects they cause in the consumer. Among botanical species with antimicrobial effect demonstrated on many studies, *Capsicum* fruits are of common use in our country and belong to gastronomic culture of almost every region. Many studies prove that extracts obtained from chili peppers contain active compounds with antimicrobial effect against bacteria, fungi and virus. Furthermore, their use is safe due to their organic nature. Thus, the objective of the present study was to evaluate the bacteriostatic and bactericidal activity of extracts from Ají Panca (*Capsicum chinense*) and Pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*) on *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. An extract was elaborated from each fruit with yields of 12.53 ± 0.30% and 12.17 ± 0.23% for Ají Panca and Pimiento, respectively. Besides, Ají Panca extract contained 1.39 mg of capsaicin and 0.54 mg of dihidrocapsaicin, determined by HPLC. These compounds were not analysed for Pimiento since its levels are not detected in sweet varieties. The effect of both extracts at concentrations of 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10 and 0.04% was tested with broth microdilution method and subsequent growth on selected agars. Results show there is no bacteriostatic effect on the strains at any tested concentration. Also, neither of the extracts affected viability of *E. coli* ATCC 25922, and only Ají Panca extract was not bactericidal for *S. aureus* ATCC 25923 at tested concentrations. However, Pimiento extract at concentrations of 25, 12.5 y 6.25% proved to be bactericidal for *S. aureus* ATCC 25923.

Key Words: *Capsicum annuum* var. *annuum, Capsicum chinense, Escherichia coli* ATCC 25922*,* broth microdilution, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Grados centígrados
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Agar Baird Parker
EMB	Eosina Azul de Metileno
et al.	y colaboradores
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramo
INS	Instituto Nacional de Salud
Kcal	kilocalorías
kg	Kilogramo
LSPSA	Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental
mm	Milímetro
TSB	Caldo Tripticasa de Soya
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ANEXOS

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha crecido la preocupación por los efectos adversos de los antimicrobianos químicos convencionales. Esto debido a que pueden generar intoxicaciones y efectos residuales en el consumidor; así como resistencia microbiana debido a la exposición a pequeñas dosis. Frente a esta problemática, es creciente el interés por el desarrollo de nuevas alternativas que tengan un efecto equivalente a los antimicrobianos convencionales y que sean seguras para el consumidor. Es así que diversas investigaciones apuntan al aprovechamiento de moléculas de origen vegetal con capacidad de concentrar compuestos químicos que tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos y virus (Domingo y López-Brea, 2003; Piyawan *et al*., 2005; Zampini *et al*., 2007).

Nuestro país posee una gran biodiversidad de especies botánicas, muchas de las cuales son de uso tradicional y ya se han demostrado diversas propiedades benéficas para el hombre, como antimicrobianas, antioxidantes, antinflamatorias, anticancerígenas, etc. Existen estudios que han demostrado estas propiedades en especies comunes como manzanilla, eucalipto, menta, pimienta, ají, pimiento, entre otros (Domingo y López-Brea, 2003). Un género vegetal cuyo uso se ha extendido a casi todas las regiones del Perú es el *Capsicum*. Sus frutos; los ajíes y pimientos; han formado parte de la cultura peruana desde tiempos ancestrales y en la actualidad son aprovechados principalmente como condimentos debido a su sabor y característico picor al ser consumidos.

Los extractos de estos frutos, también conocidos como oleorresinas, son sustancias oleosas y viscosas, de coloración rojiza intensa y aroma característico de la especie. Debido a la ventaja técnica y económica que representan estos productos concentrados y de mayor tiempo de vida útil, son aprovechados en la industria alimentaria para la elaboración de confiterías, embutidos, postres y otros alimentos (Fernández, 2007). Además, diversos estudios han demostrado que las oleorresinas poseen actividad antimicrobiana contra una serie de microorganismos, muchos de ellos de interés en salud pública. Esto debido a la presencia de moléculas activas como capsaicinoides y compuestos fenólicos. Por ejemplo, se sabe que los extractos poseen actividad frente a bacterias como *Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* (Dorantes *et al*., 2000; Careaga *et al*., 2003; Colivet *et al*., 2006; Nascimento *et al*., 2014) y hongos como *Aspergillus sp*., *Penicillium sp*., y *Rhizopus sp*. (Moreno-Limón *et al*., 2012; Soumya y Nair, 2012; Cerón-Carrillo *et al*., 2014).

Es por ello que el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad bacteriostática y bactericida de oleorresinas de ají panca y de pimiento; dos especies botánicas de uso extendido en nuestro medio; frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PLANTAS

Actualmente, la aparición de bacterias multirresistentes debido al uso indiscriminado de antibióticos constituye una preocupación en salud pública. Por ello, crece el interés por combatir las infecciones bacterianas con nuevas alternativas obtenidas de diversas especies botánicas, que poseen una acción equivalente a los fármacos conocidos, sin presentar efectos indeseables en el paciente (Zampini *et al*., 2007). El aprovechamiento de sustancias antimicrobianas también se ha extendido a la inocuidad alimentaria. El principal objetivo del procesamiento de los alimentos es contribuir con el bienestar de la población, brindando un producto seguro, nutritivo y sensorialmente adecuado. Esto se debe a que los agentes químicos empleados para dicho fin producen efectos indeseables en el consumidor, como intoxicaciones, efectos residuales y resistencias bacterianas (Rodríguez, 2011).

La naturaleza ofrece una amplia variedad de sustancias biocidas, desde elementos simples como el oxígeno y el yodo, hasta péptidos producidos por algunos microorganismos. Sin embargo, es en el reino vegetal donde se concentra la mayor cantidad de compuestos químicos con actividad antimicrobiana (Domingo y López-Brea, 2013).

2.1. Sustancias antimicrobianas en plantas

Las plantas producen miles de compuestos de bajo peso molecular o metabolitos secundarios que no son esenciales para su desarrollo. Las sustancias antimicrobianas se encuentran dentro de esta categoría y se subdividen en dos grandes grupos: las fitoanticipinas, presentes en tejidos vegetales, y las fitoalexinas, cuya producción aumenta en respuesta a la invasión de microorganismos patógenos. Sin embargo, esta definición no es determinante puesto que los compuestos que actúan como fitoanticipinas en algunas plantas pueden ser fitoalexinas en otras (Dixon, 2001).

Según Domingo y López-Brea (2003), la capacidad de síntesis de metabolitos secundarios es ilimitada en plantas. Un bajo porcentaje de estos compuestos posee actividad antimicrobiana y se relaciona estructuralmente con el fenol. El cuadro 1 resume los principales grupos químicos con actividad antimicrobiana ampliamente demostrada por diversos estudios.

Cuadro 1. Grupos químicos con actividad antimicrobiana presentes en plantas

Grupo químico	Planta	Actividad
Fenoles simples	Tomillo (*Thymus officinalis*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Albahaca (*Ocimum basilicum*)	General *S. aureus*, *S. thyphimurium*, *Salmonella sp.*
Quinonas	Hipérico (*Hypericum perforatum*)	VIH
Taninos	Roble (*Quercus rubra*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Melisa (*Melissa officinalis*)	Bacterias y virus
Cumarinas	Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)	Virus
Flavonas	Té (*Camellia sinensis*), Roble (*Quercus rubra*)	*Shigella sp.*, *Vibrio sp.*
Alcaloides	Coca (*Erythroxylum coca*), Pimienta (*Piper nigrum*), Ají (*Capsicum sp.*)	Gram positivos Hongos, *Lactobacillus* Bacterias y hongos

Fuente: Domingo y López-Brea (2003).

2.1.1. Fenoles y heterósidos fenólicos

2.1.1.1. Compuestos fenólicos simples

Los compuestos fenólicos son moléculas simples de origen vegetal que tienen un anillo de fenol sustituido por grupos hidroxilo (OH). Existe una relación directa entre la actividad antimicrobiana y la cantidad y posición de los grupos hidroxilos en el anillo fenólico, lo que sugiere que un aumento en la hidroxilación produce mayor toxicidad en los microorganismos (Domingo y López-Brea, 2003).

Debido a su gran variedad, se cree que los compuestos fenólicos ejercen su acción antimicrobiana a diversos niveles. Los principios activos pueden degradar la pared celular y aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática a pequeños iones que alteran su estabilidad estructural. También afectan a las proteínas de membrana, filtran el contenido celular, coagulan el citoplasma e interactúan con el ADN eucariota, lo que explicaría su actividad antiviral. (Domingo y López-Brea, 2003; Ultee *et al.*, 2002; Maguna, 2006).

2.1.1.2. Quinonas

Estos compuestos se encuentran en la naturaleza y causan pardeamiento en las frutas dañadas. Las quinonas son compuestos que poseen alta reactividad hacia los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas. Cuando se unen a estos, interrumpen la función de la proteína; así, al unirse a las proteínas solubles y extracelulares de la pared celular, alteran su permeabilidad (Miskovsky, 2002; Domingo y López-Brea, 2003).

2.1.1.3. Taninos

Los taninos son sustancias vegetales de sabor astringente, solubles en agua, alcohol y acetona. Se ha usado para el curtido de pieles por su afinidad con las proteínas de la piel animal, ya que evita su putrefacción y vuelve el cuero impermeable. Se han descrito más de 30 taninos con actividad antibacteriana y antimicótica (Domingo y López-Brea, 2003; Lizcano y Vergara, 2008).

2.1.1.4. Cumarinas

Este grupo incluye a la cumarina, esculetina, umbeliferona y escopoletina. Ejercen su acción antimicrobiana por interacción con el ADN eucariota, lo que explicaría sus propiedades antivirales. También poseen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras (Domingo y López-Brea, 2003).

2.1.1.5. Flavonas y compuestos relacionados

Estos compuestos poseen en su estructura fenólica un grupo carbonilo (CO). Su mecanismo de acción es similar a las quinonas ya que poseen afinidad por las proteínas extracelulares y de membrana a las cuales se unen inactivando su función. Las flavonas poseen actividad antibacteriana y antiviral (Yiklirim *et al*., 2000; Fukai *et al*., 2002).

2.1.2. Alcaloides

Son sustancias principalmente de origen vegetal y constituyen gran parte de los principios activos en plantas medicinales, los mismos que se han usado para la producción de medicamentos. Los alcaloides ejercen su acción antimicrobiana mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo y López-Brea, 2003; Arango, 2008).

2.1.3. Otros compuestos

Existen otros compuestos químicos de menor frecuencia que pueden aislarse de plantas y que ejercen actividad antimicrobiana. Por ejemplo, los aldehídos poseen actividad genérica, las saponinas son eficaces contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus* y hongos; los sulfóxidos afectan el desarrollo de *Helicobacter pylori*, y algunos azúcares de la miel, como glucosa y fructosa, afectan a *Staphylococcus aureus*, entre otros (Domingo y López-Brea, 2003).

B.- GÉNERO *Capsicum*

2.2. Generalidades

El género *Capsicum* incluye entre 20 a 30 especies originarias de las regiones tropicales y subtropicales de América, de las cuales se han domesticado tan solo 5. Sus frutos, conocidos como ajíes y pimientos, son apreciados por su sabor, alto contenido de vitamina C, y su característico picor o pungencia, cualidades que los han convertido en los condimentos de mayor uso. Han sido aprovechados por las culturas antiguas y fueron las primeras especias encontradas por los españoles distribuyéndose a nivel mundial debido a que los primeros frutos secos que se exportaban contenían semillas fértiles (León, 2000).

Según Biodiversity International, nuestro país es quizá el que posee la mayor diversidad nativa de *Capsicum* en el mundo ya que no es raro encontrar abundantes variedades de las cinco especies domesticadas en los mercados locales, mientras que otros países solo comercializan dos a tres especies (ADEX, 2015).

2.2.1. Taxonomía

La taxonomía de los *Capsicum* resulta dificultosa debido a que son pocas las características distintivas entre algunas especies. Actualmente, se consideran cinco las especies domesticadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* (León, 2000). La clasificación taxonómica del *Capsicum* es:

Reino : Plantae
División: Spermatofita
Clase : Dicotiledoneae
Orden : Solanales
Familia : Solanáceas
Género : *Capsicum*

2.3. Ají panca

2.3.1. Descripción general

El ají panca (*Capsicum chinense*) (figura 1) es conocido en todas las regiones tropicales y es el segundo ají más popular en el Perú. Es originario del hemisferio occidental, aunque Kikolaus Von Jacquinomist, científico que bautizó a esta especie en 1776, sostuvo que provenía de China. La planta posee una altura de entre 30 cm hasta casi 1.4 m. Las hojas son de tono verde pálido a leve, largas y arrugadas, y las flores son blancas con estambres de color púrpura. El fruto mide entre 8 y 12 cm de largo, y entre 2.5 a 3 cm de ancho. Sus semillas miden entre 3 a 5 mm, son redondas, ligeramente reniformes y de color amarillo, y se insertan en una placenta cónica de disposición central. Cuando está maduro posee coloración marrón y pungencia leve (Bosland y Votava, 2000; DeWitt y Bosland, 2009; Mejía, 2013).

Figura 1. Ají panca (*Capsicum chinense*)
Fuente: LSPSA

2.3.2. Composición nutricional

Según las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos (INS, 2009), 100 gramos de porción comestible de ají panca seco posee 292 kcal de energía, con contenido de proteína y grasa de 7 y 7.8 g, respectivamente, valores que son ligeramente superiores a otros vegetales. El contenido de vitamina A es elevado, con 1324 µg y su contenido de vitamina C es de 23 mg (cuadro 2).

2.3.3. Situación comercial

En 2015 las exportaciones de ají panca llegaron a los 23 125 kg con un costo por kilogramo de aproximadamente US$ 6.43, mientras que los datos de 2014 muestran que la exportación de ají panca ascendió a 27 500 kg con un costo de US$ 3.78 por kilogramo. Asimismo, reporta que en 2015 se han exportado 913 166 kg a US$ 3.11 cada uno; mientras que en 2014 se exportaron 1 016 123 kg costando US$ 3.21 cada kilogramo (Agrodataperu, 2016).

Cuadro 2. Composición proximal del ají panca seco en 100 g de porción comestible

Compuesto	Contenido
Energía (kcal)	292
Agua (g)	20.2
Proteína (g)	7.0
Grasa (g)	7.8
Carbohidratos totales (g)	58.5
Carbohidratos disponibles (g)	29.8
Fibra cruda (g)	22.4
Fibra dietaría (g)	28.7
Ceniza (g)	6.5
Calcio (mg)	142
Fósforo (mg)	209
Zinc (mg)	1.02
Hierro (mg)	4.90
Retinol (µg)	4412
Vitamina A equivalentes totales (µg)	1324.0
Tiamina (mg)	0.13
Riboflavina (mg)	1.79
Niacina (mg)	3.55
Vitamina C (mg)	23.0

Fuente: INS (2009)

2.4. Pimiento

2.4.1. Descripción general

El pimiento es un pequeño arbusto anual originario de América Tropical que mide entre 0.75 y 1.0 m de alto, de tallo frágil, recto y verde del cual salen ramas que se subdividen en dos partes. Las hojas son grandes, oblongas, lanceoladas y globosas, de color verde brillante. Posee flores de color blanco a amarillento y su propagación se lleva a cabo por semillas. La mejor temperatura para el desarrollo del pimiento está entre los 21 a 26 °C, esta planta se adapta bien a los climas cálidos pero son afectadas por las heladas (FAO, 2014).

El fruto (figura 2) es de tamaño medio, con una longitud promedio de 70.98 mm y amplitud de 19.85 mm. Es una baya verde brillante, poligonal, carnosa y hueca en su interior, que cambia de color a medida que va madurando, volviéndose amarilla, anaranjada y finalmente roja. Posee un elevado valor nutritivo debido a su gran contenido de vitaminas A, C y E, además de antioxidantes (Andrawus *et al*., 2014; FAO, 2014).

Figura 2. Pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*)
Fuente: LSPSA

El fruto de pimiento se usa en la gastronomía de diversos países, pudiendo ser consumido fresco, cocido, como condimento de algunos platos caseros, en ensaladas, salsas y guisos. También puede ser procesado y usado en encurtidos, conservas y salsas (FAO, 2014).

2.4.2. Composición nutricional

La Tabla Peruana de Composición de Alimentos (INS, 2009), indica que 100 gramos de porción comestible de pimiento brindan un bajo nivel de energía (35 kcal), proteína (1.5 g) y grasa (0.5 g). Además, su contenido de agua es superior, alcanzando 89.6 gramos (cuadro 3).

2.4.3. Situación comercial

El pimiento rojo se comercializa principalmente como conserva. La presentación en conservas representa el 60% de las exportaciones de estos frutos. En el primer semestre de 2015, se registró un incremento del 16% en comparación con el año anterior, lo que representa casi US$ 65 millones. Las cifras de exportación de los frutos secos enteros también van en aumento, lo que no ocurre con los frutos secos molidos y en rodajas (ADEX, 2015).

Cuadro 3. Composición proximal del pimiento en 100 g de porción comestible

Compuesto	Contenido
Energía (kcal)	35
Agua (g)	89.6
Proteína (g)	1.5
Grasa (g)	0.5
Carbohidratos totales (g)	7.7
Carbohidratos disponibles (g)	5.7
Fibra cruda (g)	1.2
Fibra dietaria (g)	2.0
Ceniza (g)	0.7
Calcio (mg)	12
Fósforo (mg)	24
Zinc (mg)	0.25
Hierro (mg)	0.50
Retinol (µg)	125.0
Vitamina A equivalentes totales (µg)	157.0
Tiamina (mg)	0.05
Riboflavina (mg)	0.11
Niacina (mg)	1.58
Vitamina C (mg)	108.3

Fuente: INS (2009)

2.5. Oleorresina de *Capsicum*

Existen diversos productos de interés elaborados a partir de los frutos de *Capsicum*, entre ellos, la oleorresina; la cual es el aceite resultante de un proceso de extracción con diversos solventes orgánicos y su posterior concentración. Posee naturaleza oleosa y viscosa, color rojo intenso, aroma característico de la especie procedente, es fluido a temperatura ambiente y soluble en aceites (Fernández, 2007).

Su origen data de los años 30, cuando surgió la necesidad de contar con un producto de alta pureza que mantenga las características de los ajíes y pimientos por períodos prolongados, con uniformidad en aroma y color, y mayor resistencia a la acción microbiana, constituyendo una ventaja técnica y económica en comparación a las formas tradicionales de exportación. Tiene diversos usos dentro de la industria alimentaria, que incluyen la fabricación de jaleas, confituras y mermeladas, que son más apetecibles tras añadir oleorresina. También se usan en salsas, ensaladas, embutidos, conservas, comidas preparadas y congeladas, margarinas, mantequillas, quesos, papas fritas, cereales, galletas, tortas, gelatinas, pudines, bebidas, etc. Además, se ha adicionado en el alimento de aves de corral para obtener huevos y carne coloreada, así como para pigmentar el músculo de las truchas arco iris (Fernández, 2007; Salamanca y Sánchez, 2009).

La oleorresina está compuesta de una gran variedad de agentes lipofílicos, como mono-, di- y triglicéridos, ácidos grasos libres, pigmentos (carotenos y xantofilas), aceites esenciales, resinas ácidas, terpenos, ceras, esteroles vegetales y capsaicinoides (Fernández-Trujillo, 2007).

2.5.1. Métodos de extracción de oleorresina

Las plantas poseen diversos compuestos bioactivos como lípidos, pigmentos, fragancias y sabores que se aprovechan en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Para extraerlos se aplican métodos que aprovechan la diferencia de solubilidad de los diversos componentes o solutos presentes en la fase sólida, siendo necesario el uso de solventes de bajo punto de ebullición. Cuando ambas fases entran en contacto, algunos solutos se separan de la estructura natural original y migran hacia el solvente. A este proceso se le conoce como lixiviación (Velasco *et al*., 2007).

La proporción de la mezcla sólido-líquido dependerá de la técnica de extracción y la parte de la planta de usada (Salamanca y Sánchez, 2009). Existen dos métodos principales para la obtención de oleorresina: la extracción con solventes orgánicos y la extracción con fluidos supercríticos.

2.5.1.1. Extracción con solventes orgánicos

Es un método tradicional usado para separar componentes lipídicos de un producto natural con ayuda de un solvente orgánico. Requiere de poca inversión y es sencillo de ejecutar. Sin embargo, esta tecnología requiere del manejo de solventes que pueden ser volátiles e inflamables. Además, es posible que pequeñas cantidades del solvente se encuentren en el producto final, lo que constituye un riesgo para la salud del consumidor (Pacho-Carrillo *et al*., 2002; Salamanca y Sánchez, 2009). Dentro de esta categoría son comunes la extracción Soxhlet y por maceración pasiva.

Extracción Soxhlet: En el equipo Soxhlet la muestra en polvo se coloca en un cartucho de material poroso que se encuentra dentro de la cámara del extractor. El solvente empleado se coloca en un matraz de ebullición situado por debajo de la cámara. Cuando se evapora el solvente y alcanza el condensador en la parte superior del equipo, se condensa y cae sobre el cartucho con la muestra de polvo iniciando la extracción. En la parte superior de la cámara del extractor se encuentra un sifón lateral, de manera que cuando la cámara se llena, la mezcla cae hacia el matraz de ebullición. El proceso se repite permitiendo la concentración de la oleorresina en el matraz de ebullición y la recirculación del solvente. Posteriormente, la oleorresina se separa del solvente mediante destilación (Bautista *et al*., 2008; Caldas, 2012).

El rendimiento de extracción depende de la variedad de *Capsicum* y de los solventes utilizados. El equipo Soxhlet ha facilitado la obtención de oleorresina de páprika (*Capsicum annuum L.*) empleando etanol obteniendose entre 2.48 – 2.72% de rendimiento (Bautista *et al*., 2008). Un estudio realizado por Restrepo *et al*. (2007) utilizó el hexano para obtener oleorresina de Habanero (*Capsicum chinense*) y Tabasco (*Capsicum frutescens*) logrando rendimientos de 5.71 y 8.51%, respectivamente. En el mismo estudio, se empleó el acetato de etilo el cual permitió un porcentaje de rendimiento mayor, obteniéndose 10.16% para el habanero y 12.29% para el tabasco. Giraldo *et al*. (2009) elaboraron oleorresina de páprika empleando solventes como éter

de petróleo, hexano y acetato de etilo con rendimientos de 11.93, 12.2 y 16.08%, respectivamente. Las ventajas y desventajas de este método se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Ventajas y desventajas del método de extracción Soxhlet

Ventajas	Desventajas
• El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. Se mejora la extracción debido al uso de disolvente limpio. • El disolvente proviene de una condensación, luego es líquido y está caliente. Se favorece la solubilidad del analito. • No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora dejando al analito.	• No es aplicable a alimentos recubiertos de grasa como los lácteos. • Es un proceso lento e imposible de acelerar. • Requiere gran cantidad de solvente. • No es aplicable a analitos termolábiles. • Es necesaria una etapa de evaporación final.

Fuente: Salamanca y Sánchez (2009)

Extracción por maceración pasiva: Es un método de extracción sólido-líquido de uso común en el laboratorio. Ambas fases están en contacto directo y los componentes del sólido afines al solvente quedan disueltos en éste. Posteriormente, la oleorresina se obtiene evaporando y recuperando el solvente mediante el uso del rotavapor, equipo que emplea el baño maría como fuente de calor constante y bajas presiones para la recuperación rápida del solvente (Chua *et al*., 2008; Salamanca y Sánchez, 2009).

El porcentaje de rendimiento que se obtiene depende de la variedad y del solvente. En Colombia, Rodríguez *et al*. (2000) obtuvieron oleorresina con rendimientos variables comprendidos entre 8.95 – 10.85% para *C. annuum*, 4.20 – 7.70% para *C. chinense* y 6.40 – 12.42% para *C. frutescens*. En nuestro país, Gutiérrez (2014) elaboró oleorresina de ají panca y obtuvo un porcentaje de rendimiento de 4.13%. El cuadro 5 resume las ventajas y desventajas de este método de extracción.

Cuadro 5. Ventajas y desventajas de la maceración pasiva

Ventajas	Desventajas
• Permite la extracción directa de los alimentos en general. • El proceso se realiza a temperatura ambiente, no hay degradación de compuestos. • Se puede realizar con o sin agitación magnética. • Se logra extraer las propiedades de lo que se macera.	• Se requiere una gran cantidad de solvente. • Es necesaria una etapa de evaporación final.

Fuente: Salamanca y Sánchez (2009)

2.5.1.2. Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia sometida a presiónes y temperaturas superiores a su punto crítico termodinámico. Estas condiciones confieren a la sustancia la capacidad de difundir como un gas y de disolver como un líquido, convirtiéndola en un sustituto de los solventes orgánicos convencionales. Diversos compuestos pueden usarse como fluidos supercríticos, entre ellos tenemos: acetileno, acetona, agua, dióxido de carbono, etanol, metanol, propano y propileno (Velasco *et al*., 2007).

En este tipo de extracción se emplea comúnmente el CO_2 denso por su bajo costo y amplia disponibilidad. Este gas es inocuo, incoloro, inerte, fácilmente separable del soluto, no inflamable y no corrosivo. Diversos estudios han demostrado que esta tecnología permite la obtención de oleorresina en cantidad similar a la obtenida con métodos convencionales y con alta pureza (99.995%) e inocuidad (Pacho-Carrillo *et al*., 2002; Fernández-Trujillo, 2007).

El rendimiento varía según la materia prima y las condiciones de extracción. Fernández-Trujillo (2007) elaboró oleorresina de variedades dulces y picantes de *Capsicum annuum* con un rendimiento entre 5.2 – 17.4%. Por su parte, Gamarra *et al*.

(2011) elaboró oleorresina de rocoto (*Capsicum pubescens*) usando CO_2 supercrítico y obtuvo un rendimiento total de 0.511 – 1.728%.

2.6. Compuestos de *Capsicum* con actividad antimicrobiana

2.6.1. Capsaicinoides

Algunas variedades de ajíes son preferidas por ser picantes o pungentes. Esta cualidad se atribuye a los capsaicinoides, grupo de alcaloides derivados de la vainillilamina, sintetizados y almacenados en el tejido de la placenta del fruto, lugar donde se insertan las semillas. Debido a esta ubicación, se cree que los capsaicinoides juegan un rol importante en la protección química de las semillas frente a los animales herbívoros. Únicamente las aves son insensibles a la pungencia, característica que facilita la dispersión de semillas a áreas lejanas. El grado de pungencia en los frutos de *Capsicum* difiere según la especie y variedad, y en función de las condiciones de cultivo (García-Galindo *et al*., 1995; Cázares-Sánchez *et al*., 2005).

Del total de capsaicinoides, más del 70% es capsaicina [N-(4-hidroxi-3-metil-metoxibenzil-8-metilnon-6-tran-enamide)] seguida de la dihidrocapsaicina [N-(4-hidroxi-3-metil-metoxibenzil)-8-metilnonenamida] y otros derivados, como nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. Estas moléculas se presentan en estado puro como cristales blancos inodoros y de pungencia severa. La diferencia entre ellas es netamente estructural pues no se han podido aislar en forma estable (Ravishankar, 1997).

2.6.1.1. Propiedades

Como antimicrobianos: El efecto antimicrobiano de los extractos de *Capsicum* son atribuidos a la acción conjunta de los capsaicinoides y los compuestos fenólicos. Diversas investigaciones indican que los capsaicinoides poseen actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* (Dorantes *et al*., 2000; Careaga *et al*., 2003; Nascimento *et al*., 2014;), *Escherichia coli* y *Bacillus sp*. (Colivet *et al*., 2006). Asimismo, se ha demostrado que los extractos de *Capsicum* poseen propiedades antifúngicas sobre *Aspergillus sp*., *Penicillium sp*., y *Rhizopus sp*. (Moreno-Limón *et al*., 2012; Soumya y

Nair, 2012; Cerón-Carrillo *et al*., 2014), con resultados comparables a los obtenidos con la aplicación de fungicidas comerciales. Estudios realizados por Shayan y Saeidi (2013) prueban que los extractos de *Capsicum* también poseen la capacidad de impedir la formación de biofilms por bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Como analgésicos: El efecto medicinal de los capsaicinoides se ha aprovechado desde épocas precolombinas, en las que se usaban para calmar la tos y el dolor de garganta. Actualmente, la capsaicina se emplea en trastornos dolorosos como artritis, debido a su capacidad para reducir la sensibilidad en el área de aplicación. Este efecto se debe a que la capsaicina se une al receptor vainilloide subtipo 1 (VR-1) de las neuronas nociceptivas. Dicho receptor es un transductor de calor, lo que explicaría el dolor ardiente producido al consumir ajíes. El efecto de la capsaicina unida a su receptor consiste en la liberación y agotamiento de la sustancia P, neurotransmisor del dolor, bloqueando temporalmente la transmisión de la señal de dolor hacia el sistema nervioso central (Caterina *et al*., 2000). Las cremas que contienen capsaicina han reducido el dolor post-operatorio en pacientes de mastectomía, amputaciones, picazón en diálisis, dolores de cabeza, entre otros. El uso repetido de la crema aparentemente contrarresta la producción de sustancia P en la articulación, por lo tanto, hay menos dolor. La reducción de la sustancia P ayuda a reducir la inflamación prolongada, causada por el cartílago cuando se rompe (Bosland, 1996).

Como gastroprotector: Contrariamente a la creencia de que el consumo de ajíes produce úlceras pépticas, Delgado (2009) demostró que el fruto liofilizado de *Capsicum annuum* L tiene efecto gastroprotector frente a úlceras inducidas experimentalmente en ratas, pues incrementa la producción de moco gástrico.

2.6.1.2. Determinación

La determinación de capsaicinoides se puede realizar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Gutiérrez, 2014), cromatografía líquida de capa fina (TLC) (Soetarno *et al*., 1997) o mediante la espectrofotometría usando como estándar una solución de vainillina en acetato de etilo que es procesada de la misma forma que la muestra de oleorresina (Cerón-Carrillo *et al*., 2014).

El contenido de capsaicinoides depende de factores como la variedad del fruto y el estado de maduración de la planta (Cerón-Carrillo *et al*., 2014). Por lo general, el 70% de estos compuestos es capsaicina y el 20% dihidrocapsaicina (Ravishankar, 1997). El cuadro 6 resume las concentraciones de capsaicinoides reportadas por diversos autores.

Cuadro 6. Contenido de capsaicinoides en diversos frutos de *Capsicum*

Especie de *Capsicum*	Contenido de capsaicinoides	Solvente – método de detección	Fuente
Poblano (*C. annuum* var. *annuum*)	EM 1: 0.009 mg/g EM 2: 0.011 mg/g EM 3: 0.020 mg/g	Metanol – espectrofotometría UV-Vis	Cerón-Carrillo *et al*., 2014
Ají panca (*C. chinense*)	C: 10.074 mg/g DHC: 6.087 mg/g	Etanol – HPLC	Gutiérrez, 2014
Pimenta malagueta (*C. frutescens*)	C: 31.1 mg/g DHC: 15.0 mg/g	Hexano – HPLC	Nascimento *et al*., 2014
Habanero (*C. annuum*)	C: 5.88 mg/mL DHC: 0.86 mg/mL	Isopropanol – HPLC	Dorantes *et al*., 2000
Morrón (*C. annuum*)	C: no detectada DHC: no detectada	Isopropanol – HPLC	Dorantes *et al*., 2000

EM: Estado de maduración; C: Capsaicina, DHC: Dihidrocapsaicina

2.6.2. Compuestos fenólicos

Se ha demostrado que los capsaicinoides no son los únicos compuestos con actividad antimicrobiana en los extractos de *Capsicum*. (Cichewicz y Thorpe, 1996). Estos también poseen diversos compuestos fenólicos, como polifenoles, flavonoides y carotenoides, que poseen actividad antimicrobiana, actúan sinérgicamente con los antibióticos e inactivan la virulencia bacteriana (Cushnie y Lamb, 2011). Los compuestos fenólicos afectan la membrana citoplasmática y el metabolismo, retrasando o inhibiendo la proliferación microbiana (Domingo y López-Brea, 2003).

2.6.2.1. Propiedades

Los frutos de *Capsicum* poseen capacidad antioxidante. Esto se atribuye a la presencia de compuestos polifenólicos que reaccionan con los radicales libres (Deepa *et al*., 2005). También abundan flavonoides que sobrepasan el efecto antioxidante de muchos fitoquímicos (Hasler, 1998). El color rojo en los frutos se debe a la presencia de pigmentos, entre los cuales se encuentran carotenoides oxigenados como la capsantina, capsorubina y criptocapsina, exclusivos de este género y efectivos para inactivar radicales libres (Matsufuji *et al*., 1998).

2.6.2.2. Determinación

La determinación de los compuestos fenólicos totales se realiza mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. La muestra de oleorresina es tratada con concentraciones variables de agua destilada y carbonato de sodio. El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con la muestra formando un complejo azul cuya absorbancia se mide por espectrofotometría tras la incubación en oscuridad y a temperatura ambiente. El ácido gálico es usado como estándar y procesado de la misma manera que la muestra de oleorresina. Los resultados se expresan en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (Cerón-Carrillo *et al*., 2014; Nascimento *et al*., 2014). El cuadro 7 resume el contenido de compuestos fenólicos totales en frutos de *Capsicum* de diversos estudios.

Cuadro 7. Contenido de compuestos fenólicos totales en diversos frutos de *Capsicum*

Especie de *Capsicum*	Contenido de compuestos fenólicos totales	Solvente – método de detección	Fuente
Poblano (*C. annuum* var. *annuum*)	EM 1: 1.11 mg EAG/g EM 2: 1.08 mg EAG/g EM 3: 1.09 mg EAG/g	Metanol – Folin-Ciocalteu	Cerón-Carrillo *et al*., 2014
Serrano (*C. annuum* L. *Acuminatum*)	EM 1: 1.66 mg EAG/g EM 2: 1.97 mg EAG/g EM 3: 2.43 mg EAG/g	Metanol – Folin-Ciocalteu	Cerón-Carrillo *et al*., 2014
Habanero (*C. chinense*)	EM 1: 2.94 mg EAG/g EM 2: 2.77 mg EAG/g EM 3: 2.12 mg EAG/g	Metanol – Folin-Ciocalteu	Cerón-Carrillo *et al*., 2014
Pimenta malagueta (*C. frutescens*)	4.9 mg EAG/g	Hexano – Folin-Ciocalteu	Nascimento *et al*., 2014
Pimenta malagueta (*C. frutescens*)	110.6 mg EAG/g	Acetonitrilo – Folin-Ciocalteu	Nascimento *et al*., 2014

EM: Estado de maduración; EAG: Equivalentes de ácido gálico

Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos específicos se emplea la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las proporciones difieren ampliamente según la variedad. El cuadro 8 enumera algunos de los compuestos fenólicos comunes encontrados en diversos cultivares de *Capsicum annuum* L.

Cuadro 8. Compuestos fenólicos presentes en cultivares de *Capsicum annuum* L.

Compuesto fenólico	Cantidad (mg/g)
Ácido cafeico	0.064 – 0.545
Ácido cinámico	0.040
Ácido clorogénico	0.799
Ácido ferúlico	0.072
Ácido Protocatecuico	0.343 – 0.519
Ácido rosmarínico	0.060 – 4.019
Ácido sinápico	0.250
Ácido siríngico	0.045
Ácido vainillínico	0.146
Miricetina	3.315
Naringenina	0.022 – 0.044
Quercetina	0.041

Fuente: Pavlovic *et al*. (2012)

C.- BACTERIAS DE INTERÉS EN INOCUIDAD ALIMENTARIA

2.7. *Escherichia coli* (*E. coli*)

2.7.1. Generalidades

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa móvil y fermentadora de lactosa que fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich tras un brote de gastroenteritis infantil. En los últimos 50 años, se han encontrado diversas cepas patógenas de *E. coli* causantes de cuadros diarreicos graves, lo que ha convertido a esta bacteria en un problema de salud pública a nivel mundial (Nataro y Kaper, 1998).

El colon contiene un ecosistema microbiano de aproximadamente 10^{12} microorganismos por gramo de heces, con cerca de 400 especies distintas que conviven en equilibrio. De éstas, *E. coli* es la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Coloniza el intestino humano dentro de un lapso de 2 horas hasta varios días después del nacimiento. Es ubicua en el lumen intestinal y en condiciones normales no es patógena pero en individuos inmunosuprimidos, o cuando las barreras gastrointestinales son afectadas, cepas no patógenas pueden causar un proceso infeccioso limitado a la mucosa intestinal o diseminado a todo el organismo (Nataro y Kaper, 1998; Hooper y Gordon, 2001; Sousa, 2006).

Escherichia coli es el microorganismo más usado en la producción de proteínas para uso humano ya que es uno de los sistemas más estudiados (Lee, 1996). Usando *E. coli* recombinante, es posible la producción de interferones, interleucinas, factores estimuladores de colonias, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento tipo insulina y albúmina sérica humana (Hodgson, 1993).

Clínicamente, *E. coli* puede clasificarse en tres grupos: cepas comensales, cepas patógenas extraintestinales y cepas patógenas intestinales entéricas o diarreogénicas. Las cepas comensales forman parte de la flora intestinal del individuo sano y establecen con este una relación de mutualismo. En cambio, las cepas extraintestinales poseen factores de virulencia que provocan infecciones urinarias, intraabdominales, neumonías, osteomielitis, septicemias y meningitis del recién nacido. Las cepas patógenas intestinales son escasas en la flora fecal y producen gastroenteritis en individuos que las han ingerido en cantidad suficiente (Russo, 2002; Rodríguez, 2003).

2.7.2. Patotipos intestinales

Cuando ingresa una cepa patógena de *E. coli*, la infección sigue los mismos pasos que cualquier patógeno en la mucosa: colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y daño, siendo el primero de gran importancia pues implica que *E. coli* puede resistir las condiciones adversas como el peristaltismo y la competencia por nutrientes con la microflora presente (Nataro y Kaper, 1998).

Los seis patotipos intestinales de *E. coli* son enterotoxigénica (ECET), enteroagregativa (ECEA), enteropatógena (ECEP), enterohemorrágica (ECEH), enteroinvasiva (ECEI) y de adherencia difusa (ECAD).

2.7.2.1. *E. coli* enterotoxigénica (ECET)

ECET coloniza la superficie de la mucosa intestinal y libera la enterotoxina termolábil (LT), similar a la producida por *Vibrio cholerae*, la enteroxina termoestable (ST) o ambas. Tras ser absorbida por el enterocito, la LT incrementa la actividad de la adenilato ciclasa y el nivel de AMP cíclico intracelular (AMPc). La ST se une a la guanilil ciclasa ubicada en la membrana celular del enterocito, lo que promueve el aumento del GMP cíclico intracelular (GMPc). Esto permite una mayor fosforilación de los canales de cloro por acción de proteínas quinasas dependientes de AMPc y GMPc, así como secreción exacerbada del ión Cl^- con difusión pasiva de agua hacia el espacio intracelular, generando diarrea osmótica (Nataro y Kaper, 1998).

2.7.2.2. *E. coli* enteroagregativa (ECEA)

El mecanismo de infección por ECEA no está completamente descrito. Se caracteriza principalmente por el incremento en la actividad de las células caliciformes y mayor secreción de moco que en el lumen intestinal actúa como una biocapa que protege a una gran cantidad de bacterias (Nataro y Kaper, 1998). Además se ha descrito destrucción total o parcial de las vellosidades intestinales como consecuencia del efecto citotóxico que ejerce la biocapa con bacterias en la mucosa (Andrade *et al*., 2011).

2.7.2.3. *E. coli* enteropatógena (ECEP)

Las ECEP colonizan el intestino y se adhieren íntimamente entre sí y a los enterocitos mediante fimbrias y flagelos, induciendo el reacomodo del citoesqueleto con formación de pedestales de actina debajo de la bacteria y desaparición de las microvellosidades. Esta alteración de la morfología en el enterocito se conoce como lesión A/E (adherencia y eliminación) que genera pérdida de la función, mala absorción y diarrea acuosa en el paciente (Vidal *et al*., 2007).

2.7.2.4. *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)

ECEH se encuentra en el intestino de diversos animales, principalmente en el ganado vacuno y los alimentos que se producen con este constituyen una importante fuente de infección para el hombre, sobre todo cuando no se ha realizado el tratamiento térmico adecuado (Karmali, 1989).

2.7.2.5. *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)

Este patotipo se adhiere a las microvellosidades de las células del colon e ingresa por endocitosis. Una vez dentro se multiplica y se disemina a las células adyacentes causando muerte celular masiva y reacción inflamatoria rápida (Sears, 1996).

2.7.2.6. *E. coli* de adherencia difusa (ECAD)

Mediante una fimbria de superficie conocida como F1845, este patotipo se adhiere al epitelio y produce una reacción inflamatoria exacerbada, con secreción abundante de moco y liberación de toxinas que causan daño epitelial (Nataro y Kaper, 2001).

2.7.3. ETA asociada a *E. coli*

Desde 1892 se propuso que *E. coli* es indicador de contaminación fecal reciente en los alimentos debido a que la bacteria es abundante en el tracto intestinal y no en otros nichos. Se sabe que la capacidad de *E. coli* para sobrevivir en el medio ambiente es relativamente baja, por ello su presencia en los alimentos se atribuye a una posible contaminación fecal reciente (Feng *et al*., 2002).

En los últimos años, han aumentado los brotes asociados a esta bacteria, lo que implica un impacto en los sistemas de salud y la producción agrícola. Las fuentes más comunes de ETA incluyen los productos lácteos y jugos no pasteurizados, carne elaborada con insuficiente tratamiento térmico, frutas y hortalizas crudas. Las malas prácticas de higiene y el mal almacenamiento también influyen en la presentación de los casos (FAO, 2016).

Las cepas de *E. coli* producen diversos tipos de enfermedades según sus características patogénicas. Por ejemplo, *E. coli* shigatoxigénica produce diarrea con sangre. En cerca del 10% de los afectados por esta cepa; entre ellos niños y adultos

mayores; la enfermedad puede evolucionar hasta el síndrome urémico hemolítico. *E. coli* enterohemorrágica también se asocia a diarreas con sangre y síndrome urémico hemolítico por la producción de toxinas como verotoxinas y shigatoxinas. En salud pública, el serotipo más importante es *E. coli* O157:H7, el mismo que está ligado a una alta incidencia de infecciones y muertes cada año (FAO, 2016).

2.8. *Staphylococcus aureus (S. aureus)*

2.8.1. Generalidades

Es un coco Gram positivo de diámetro de 0.5 a 1.5 µm que puede visualizarse microscópicamente como células únicas o agrupadas en pares, tétradas, cadenas cortas o conjuntos que asemejan racimos de uvas. Esta última forma de presentación fue la que inspiró al médico Alexander Ogston en 1880 a introducir el término griego *staphyle*, que significa "racimo de uvas", para describir a los microorganismos que aislaba de cuadros supurativos. Este microorganismo es anaerobio facultativo, fermenta la glucosa y el manitol. Puede sobrevivir en condiciones ambientales diversas creciendo en un rango de temperatura que se encuentra entre 6 a 46 °C, siendo la óptima de 30 a 37 °C. Actualmente se le considera un microorganismo de gran potencial para causar diversas infecciones en el hombre y los animales (Fueyo, 2005; Cervantes-García *et al*., 2014).

S. aureus es un microorganismo que habitualmente forma parte de la microflora en la piel, boca, faringe, tracto gastrointestinal, vagina y principalmente a nivel nasal. Cerca del 20% de los individuos están permanentemente colonizados por *S. aureus* a nivel nasal, mientras que un 30% lo está de forma intermitente (Gordon y Lowy, 2008). Esta bacteria puede comportarse como un patógeno oportunista en pacientes inmunosuprimidos, según lo demuestra un estudio realizado por Von Eiff *et al*. (2001), donde los aislamientos de *S. aureus* en el torrente sanguíneo de pacientes con septicemia fueron idénticos a aislamientos nasales en el 82% de pacientes investigados.

S. aureus es un microorganismo anaerobio facultativo que fermenta la glucosa y el manitol. Sobrevive en condiciones ambientales diversas pudiendo crecer en un rango de temperatura de entre 6 a 46 °C, siendo la óptima de 30 a 37 °C. Puede tolerar concentraciones de NaCl de hasta el 20%, lo que permite su desarrollo en alimentos de

muy baja actividad acuosa (a_w). Además, resiste la desecación, la congelación y el calor (Fueyo, 2005).

S. aureus puede tolerar concentraciones de NaCl de hasta el 20%, lo que permite su desarrollo en alimentos de muy baja actividad acuosa (a_w), resistiendo además la desecación y congelación (Fueyo, 2005). Sin embargo, es sensible al tratamiento térmico y a los desinfectantes, por lo que la presencia de esta bacteria o de sus toxinas en los alimentos procesados sugiere malas prácticas de higiene por contacto humano o con superficies contaminadas. Además, si bien el microorganismo puede ser eliminado por el tratamiento térmico, sus toxinas son resistentes al calor (Bennett y Lancette, 2001).

2.8.2. ETA asociada a *S. aureus*

El hombre es el principal reservorio de *S. aureus* ya que ésta se encuentra en la piel y vías respiratorias superiores. Usualmente esta bacteria no causa enfermedad a menos que sea ingerida en el alimento. Frecuentemente, la contaminación ocurre por contacto directo del alimento con la piel del manipulador, microgotas de saliva o utensilios contaminados. La leche y productos lácteos también pueden contaminarse cuando los bovinos y ovinos padecen de mastitis. La refrigeración inadecuada, alimentos preparados y mantenidos por tiempo prolongado en bandejas calientes y la cocción insuficiente contribuyen con la ocurrencia de los brotes (González y Cecchini, 1999).

La ETA estafilocócica es una de las más frecuentes a nivel mundial. La enterotoxina termoestable es la responsable de la enfermedad y la dosis para provocarla oscila entre 1 a 5 µg/g de alimento. Una vez dentro del organismo, el periodo de incubación dura entre 2 a 6 horas y los síntomas se manifiestan bruscamente. Se produce sialorrea, náuseas, vómitos, mialgia, cólico abdominal, diarrea líquida, postración e hipotermia. La enfermedad es autolimitante y los síntomas desaparecen en un periodo de 1 a 2 días. El tratamiento no requiere antibióticos pero si una terapia de sostén (González y Cecchini, 1999).

D.- METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

2.9. Métodos de difusión en disco y en pozo

El método de disco difusión en placas o de Kirby-Bauer, también conocido como antibiograma, es actualmente recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para determinar la sensibilidad bacteriana a antimicrobianos conocidos. Consiste en enfrentar un microorganismo en estudio a una serie de antimicrobianos de concentración establecida y contenidos en discos de papel filtro que son colocados en la superficie de agar Müeller Hinton previamente sembrado con el microorganismo. El antimicrobiano difunde radialmente y genera una gradiente de concentración en el agar. Tras la incubación de 18 a 24 horas, la aparición de un halo de inhibición alrededor del disco indica que el microorganismo es sensible, mientras que la ausencia de dicho halo indica resistencia (García *et al*., 2000).

El método de difusión en pozos es una variación de la técnica de Kirby-Bauer y también está recomendado por la NCCLS. Se realizan pozos en el agar Müeller Hinton y se deposita en ellos una solución de antimicrobiano de concentración conocida. Tras la incubación de las placas, se forma un halo de inhibición que indica el nivel de actividad de la sustancia evaluada (Ramírez y Marín, 2009). Esta técnica presenta mayor sensibilidad en comparación con el uso de discos, pues estos son hidrófilos y retienen en su superficie algunos compuestos catiónicos de los extractos vegetales, lo que impide su difusión sobre el agar (Valgas *et al*., 2007).

2.10. Métodos de dilución

Los métodos de dilución permiten conocer la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). La CIM se define como la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un inóculo bacteriano *in vitro*. En cambio, la CBM es aquella que dentro del período de incubación induce la muerte del 99.9% de bacterias del inóculo *in vitro*. (Taroco *et al*., 2006).

Dentro de los métodos de dilución tenemos a la macrodilución y la microdilución.

2.10.1. Macrodilución en caldo

En la actualidad este método es poco usado debido a que su metodología es laboriosa ya que emplea demasiado tiempo y material. Consiste en la preparación de tubos con concentraciones conocidas de antimicrobiano, caldo nutritivo y un inóculo estandarizado. Las diluciones del antimicrobiano son seriadas y cada una es la mitad de la anterior; la serie de tubos se completa con un control sin antimicrobiano. Este método permite la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), que se define como aquella menor concentración frente a la cual el inóculo no se ha desarrollado, lo que se evidencia por ausencia de turbidez en el tubo (García *et al*., 2000).

Debido a que la ausencia de turbidez no necesariamente implica la muerte celular, este método se complementa con la determinación de la concentración bactericida mínima (CBM), que permite comprobar a qué concentración realmente hubo muerte del 99.9% de la población de microorganismos en el inóculo. Para esto, se toman alícuotas de aquellos tubos sin turbidez y se siembra en placas de agar específico. Tras 24 horas de incubación se evalúa si hay crecimiento de colonias típicas (Taroco *et al*., 2006).

2.10.2. Microdilución en caldo

La implementación de micropipetas y placas de microtitulación de 96 pocillos facilitó la miniaturización de la técnica de macrodilución (Taroco *et al*., 2006). La técnica de microdilución también enfrenta diferentes concentraciones de antimicrobiano con un inóculo bacteriano de concentración conocida en un caldo de cultivo. En una microplaca se pueden evaluar hasta 8 antimicrobianos y 11 diluciones, usando la última columna como control de crecimiento. Su ventaja radica en la menor cantidad de material necesario, aunque el costo se eleva si la lectura de turbidez es realizada con equipos como el lector de ELISA. Tal como en la macrodilución, la CIM se obtiene a partir de aquella menor concentración en donde no se presenta turbidez atribuible al crecimiento microbiano. Los valores obtenidos en este método son similares a los obtenidos por macrodilución. Para determinar la CBM se puede comprobar la viabilidad bacteriana tomando una alícuota de cada pocillo y sembrándola en agares selectivos (García *et al*., 2000; Ramírez y Marín, 2009).

2.11. Prueba Épsilon (E-test)

El E-test es una variante sencilla de la técnica de difusión en disco y permite la lectura directa de la CIM. Se emplean placas de agar previamente sembradas con la cepa de estudio. Sobre ellas se coloca una tira de plástico de 6 cm de largo y 5 mm de ancho que alberga un gradiente conocido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones, el cual difunde rápidamente sobre el agar. Tras el período de incubación, la zona de inhibición es elipsoidal y simétrica. La CIM se considera como aquella concentración donde la elipse formada se intersecta con la tira (García *et al*., 2000; Taroco *et al*., 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y tiempo

El presente estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima – Perú, durante el período de abril a diciembre del 2015. La obtención de oleorresina de ají panca y de pimiento, así como los ensayos de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental. La lectura de densidad óptica de las microplacas se realizó en la sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología.

3.2. Materiales y equipos

Materia prima

- Ají panca
- Pimiento

Materiales

- Microplacas de 96 pocillos
- Micropipetas
- Placas Petri

- Frascos de vidrio
- Viales de 2 mL
- Jeringas descartables de 1, 5 y 10 mL
- Microfiltros Millipore de 0.45 µm
- Hisopos estériles
- Bolsas ziplog
- Bolsas plásticas

Equipos

- Procesadora de alimentos
- Deshidratadora de alimentos (Blanik BDA020)
- Incubadora
- Estufa
- Autoclave
- Selladora

Medios y reactivos

- Caldo Tripticasa de soya (TSB)
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
- Agar Baird Parker (BP)
- Etanol rectificado de 96° (grado alimentario)

3.3. Metodología experimental

3.3.1. Elaboración de oleorresina

Los ajíes panca y pimientos fueron adquiridos de un distribuidor mayorista local, y transportados al Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental de la facultad. La preparación de los frutos se realizó según lo indicado por Gutiérrez (2014), con modificaciones propias. Los frutos enteros fueron lavados con agua corriente y escobillados suavemente para remover la tierra, restos vegetales, piedras, etc. Se desinfectaron por inmersión en una solución de agua e hipoclorito de sodio a recomendación del fabricante, se enjuagaron con agua destilada, se secaron con papel toalla y se colocaron en una deshidratadora de alimentos por 30 minutos a 60 °C para completar el secado superficial (figura 3).

Figura 3. Deshidratación superficial

Los dos grupos de frutos fueron deshidratados de manera independiente por medio de convección forzada en hornos industriales a 60 °C (realizado en las instalaciones de una empresa privada de Lima), luego fueron molidos y envasados en bolsas oscuras de plástico. El polvo obtenido fue molido adicionalmente en el laboratorio con una procesadora de alimentos y se usó un tamiz Tyler ASTM N° 60 (250 µm) para poder obtener un menor tamaño de partícula. Por triplicado, ambas fracciones fueron pesadas y se realizó la granulometría mediante el cálculo del porcentaje de partículas menores

de 250 µm. El insumo obtenido se empacó en bolsas gruesas de polietileno selladas herméticamente y almacenadas en refrigeración hasta su uso.

Con el fin de obtener la mayor cantidad de componentes bioactivos, la extracción de oleorresina se realizó mediante lixiviación con etanol (Colivet *et al*., 2006) empleando etanol rectificado de 96°, de grado alimentario. La mezcla consistió en una parte de polvo y 10 de solvente la cual se dejó macerar protegida de la luz solar y a temperatura ambiente por no menos de 12 horas (Rodríguez *et al*., 2000). La separación del solvente se realizó en dos etapas. La primera consistió en la concentración del macerado (figura 4). Para ello, pequeños volúmenes de la mezcla se colocaron en placas Petri destapadas y se sometieron a corrientes constantes de aire a 60 °C, provenientes de una deshidratadora de alimentos doméstica (Blanik BDA020). Paralelamente a la aparición de las primeras gotas de oleorresina, inmiscibles y de color rojizo oscuro, se añadieron nuevos volúmenes de macerado a las placas con el fin de evaporar la mayor cantidad posible de etanol. En la segunda etapa, la mezcla concentrada se colocó en recipientes de fondo curvo y dentro de una estufa a 40 °C por 2 días (figura 5) con el fin de concentrar la oleorresina y evaporar el etanol. La oleorresina obtenida (figura 6), fue un líquido viscoso de coloración intensa, homogénea y aroma característico; el cual fue almacenado a temperatura de refrigeración hasta su uso en frascos de boca ancha y color ámbar.

Figura 4. Evaporación del solvente

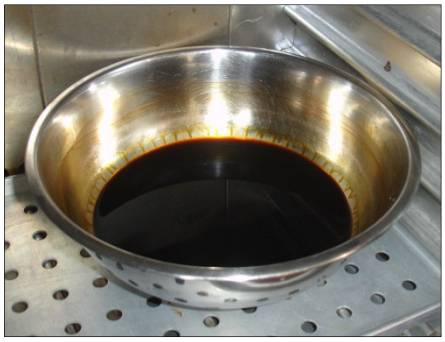


Figura 5. Macerado concentrado

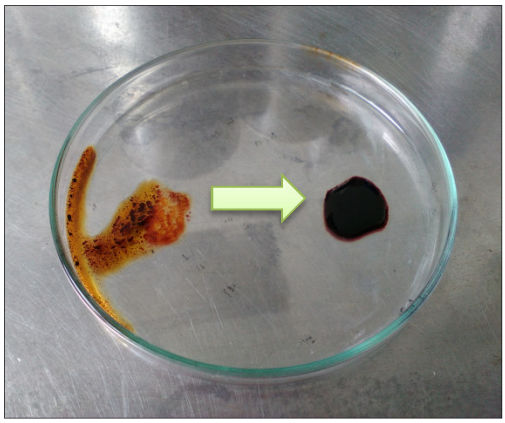


Figura 6. Oleorresina obtenida

El procedimiento descrito se realizó para obtener la oleorresina de ají panca y de pimiento por separado. Además, para determinar el rendimiento de la extracción, se midió por triplicado el volumen de oleorresina obtenido a partir 100 gramos de polvo del fruto correspondiente.

3.3.2. Análisis de compuestos antimicrobianos

Para analizar el contenido de capsaicinoides en el ají panca, se remitieron 5 mL de muestra de oleorresina a la Unidad de Investigación de Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Esta evaluación no se realizó para la oleorresina de pimiento ya que el fruto es dulce y los niveles de capsaicinoides no son detectables (Dorantes *et al.*, 2000).

3.3.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima

Mediante el método de la microdilución (figura 7), las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 (anexo 1) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (anexo 2) se enfrentaron a diferentes concentraciones de oleorresina de ají panca y de pimiento. Se usaron microplacas de 96 pocillos para evaluar los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1: Oleorresina de ají panca frente a *E. coli.*
- Tratamiento 2: Oleorresina de pimiento frente a *E. coli.*
- Tratamiento 3: Oleorresina de ají panca frente a *S. aureus.*
- Tratamiento 4: Oleorresina de pimiento frente a *S. aureus.*

Como caldo base, se preparó una solución de TSB con 10% de DMSO y 0.5% de Tween 80 (Gutiérrez *et al*., 2014, con modificaciones) que se usó en la preparación de los inóculos y para los pocillos. El inóculo bacteriano se preparó traspasando colonias de cultivos previos de *E. coli* y de *S. aureus* a tubos con TSB hasta alcanzar una turbidez visualmente equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, que corresponde a una población microbiana aproximada de 10^8 UFC/mL. Esta mezcla se diluyó decimalmente tres veces para obtener la concentración final de 10^5 bacterias/mL (García *et al*., 2000).

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos estériles, las mismas que fueron irradiadas con luz ultravioleta por 20 minutos antes del experimento. A 11 pocillos de una misma fila se añadieron 100 µL de la solución de TSB. Luego, al primero se agregó 100 µL de oleorresina previamente esterilizada por microfiltración (Millipore 0.45 µm) y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas a la mitad hasta el décimo pocillo, utilizando el undécimo como control positivo sin oleorresina. Finalmente, se añadieron 100 µL de inóculo bacteriano a los 11 pocillos. Las soluciones finales de oleorresina que se evaluaron fueron: 25; 12.5; 6.25; 3.13; 1.56; 0.78; 0.39; 0.20 y 0.10 y 0.04%, con una población microbiana final de aproximadamente 10^4 bacterias/mL (García *et al*., 2000). La operación descrita se realizó por cuadriplicado para cada tratamiento (anexo 3).

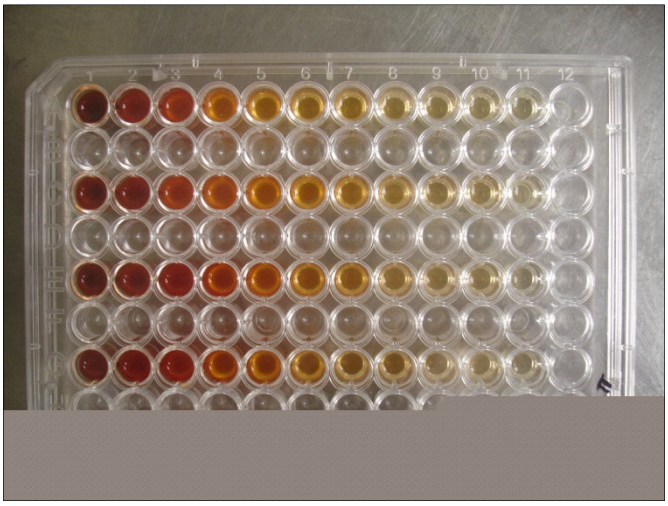


Figura 7. Microdilución en placas de 96 pocillos

En la Sección de Virología se determinó la densidad óptica de cada pocillo antes y después de un periodo de incubación de 22 horas a 35 °C, utilizando un lector de ELISA. La CIM se consideró como aquella en cuyos pocillos no hubo aumento de la densidad óptica tras el periodo de incubación. Esto correspondería a la inhibición del desarrollo microbiano en el pocillo respectivo.

3.3.4. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima

Se determinó la supervivencia de las bacterias expuestas a diferentes concentraciones de oleorresina por 22 horas. Para ello, se tomó una muestra de cada pocillo y se sembró en placas Petri con agares específicos, EMB para *E. coli* y BP para *S. aureus*. Las placas se incubaron a 35 °C y se observó la presencia o ausencia de colonias características de cada cepa en 48 horas. La CBM se consideró como aquella donde no hubo crecimiento bacteriano tras el procedimiento descrito.

3.5. Análisis de la información

Las densidades ópticas antes y después de la incubación se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y se evaluaron mediante la estadística descriptiva.

IV. RESULTADOS

Obtención de oleorresinas

Los frutos de ají panca y de pimiento se procesaron en el Laboratorio de Salud Pública según el protocolo modificado de Gutiérrez (2014). Tras la deshidratación a 65 °C de los frutos de *Capsicum*, se realizó la molienda, tamizado y pesaje del polvo obtenido. El porcentaje de partículas menores a 250 µm fue de 48.32 ± 1.36% para el polvo de ají panca y de 51.55 ± 1.66% para el pimiento. En cuanto al rendimiento del proceso de extracción etanólica, nuestro estudio permitió obtener 12.53 ± 0.30 y 12.17 ± 0.23 mL de oleorresina de ají panca y de pimiento, respectivamente, a partir de 100 gramos de polvo. Asimismo, el análisis de capsaicinoides mayoritarios de la oleorresina de ají panca mediante HPLC indica que este insumo posee 1.39 mg y 0.54 mg de capsaicina y dihidrocapsaicina por gramo de muestra, respectivamente.

Estudio de la actividad bacteriostática

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó el método de la microdilución en placas de 96 pocillos. Se registraron las densidades ópticas de los pozos antes y después de 22 horas de incubación. En cuanto al tratamiento de *E. coli* ATCC 25922 con concentraciones decrecientes de oleorresina de ají panca, no se determinó una CIM debido a que las densidades ópticas registradas tras el periodo de incubación fueron menores para los pocillos con soluciones de oleorresina de ají panca desde 12.50 hasta 0.04% (Cuadro 9 y anexo 4).

Cuadro 9. Densidades ópticas del tratamiento de *E. coli* ATCC 25922 con concentraciones decrecientes de oleorresina de ají panca

% OR-AP	DO ± DE (0 h)	DO ± DE (22 h)
25.00	0.41 ± 0.06	0.72 ± 0.09
12.50	1.25 ± 0.24	0.81 ± 0.10
6.25	1.37 ± 0.31	0.72 ± 0.08
3.13	1.09 ± 0.37	0.61 ± 0.07
1.56	0.78 ± 0.21	0.51 ± 0.05
0.78	0.66 ± 0.17	0.42 ± 0.04
0.39	0.49 ± 0.10	0.34 ± 0.03
0.20	0.54 ± 0.23	0.32 ±0.08
0.10	0.38 ± 0.06	0.21 ± 0.02
0.04	0.31 ± 0.08	0.18 ± 0.03
control	0.06 ± 0.00	0.10 ± 0.00

OR-AP: oleorresina de ají panca; DO: densidad óptica; DE: desviación estándar

La *E. coli* ATCC 25922 tuvo un comportamiento similar tras el tratamiento con oleorresina de pimiento, por lo que tampoco se determinó la CIM en este caso, donde las densidades ópticas tras la incubación fueron menores en los pocillos con concentraciones comprendidas entre 25 y 0.39%, aunque ligeramente mayores entre las soluciones al 0.2 a 0.04% de oleorresina de pimiento (Cuadro 10 y anexo 5).

Cuadro 10. Densidades ópticas del tratamiento de *E. coli* ATCC 25922 con concentraciones decrecientes de oleorresina de pimiento

% OR-P	DO ± DE (0 h)	DO ± DE (22 h)
25.00	1.33 ± 0.51	0.83 ± 0.33
12.50	2.05 ± 0.17	1.37 ± 0.16
6.25	1.56 ± 0.19	1.05 ± 0.17
3.13	0.84 ± 0.18	0.49 ± 0.11
1.56	0.55 ± 0.13	0.31 ± 0.07
0.78	0.32 ± 0.06	0.18 ± 0.03
0.39	0.22 ± 0.05	0.16 ± 0.03
0.20	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.05
0.10	0.10 ± 0.01	0.31 ± 0.38
0.04	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.05
control	0.06 ± 0.0	0.10 ± 0.0

OR-P: oleorresina de pimiento; DO: densidad óptica; DE: desviación estándar

En cuanto a la respuesta de *S. aureus* ATCC 25923 frente al tratamiento con concentraciones decrecientes de ají panca, todas las densidades ópticas fueron superiores tras la incubación (Cuadro 11 y anexo 6).

Cuadro 11. Densidades ópticas del tratamiento de *S. aureus* ATCC 25923 con concentraciones decrecientes de oleorresina de ají panca

% OR-AP	DO ± DE (0 h)	DO ± DE (22 h)
25.00	1.36 ± 1.53	1.53 ± 1.40
12.50	1.20 ± 1.32	1.37 ± 1.02
6.25	0.25 ± 0.05	0.74 ± 0.05
3.13	0.26 ± 0.05	0.73 ± 0.02
1.56	0.18 ± 0.02	0.75 ± 0.01
0.78	0.12 ± 0.01	0.75 ± 0.04
0.39	0.12 ± 0.01	0.82 ± 0.02
0.20	0.10 ± 0.01	0.64 ± 0.31
0.10	0.09 ± 0.01	0.85 ± 0.01
0.04	0.09 ± 0.01	0.85 ± 0.01
control	0.06 ± 0.00	0.82 ± 0.02

OR-AP: oleorresina de ají panca; DO: densidad óptica; DE: desviación estándar

En cuanto al comportamiento de esta bacteria frente a la oleorresina de pimiento, a concentraciones entre 25 y 1.56% se registraron densidades ópticas menores tras el período de incubación, mientras que desde 0.78 hasta 0.04% las densidades fueron mayores (cuadro 12 y anexo 7).

Cuadro 12. Densidades ópticas del tratamiento de *S. aureus* ATCC 25923 con concentraciones decrecientes de oleorresina de pimiento

% OR-P	DO ± DE (0 h)	DO ± DE (22 h)
25.00	1.89 ± 0.43	1.24 ± 0.16
12.50	2.18 ± 0.06	1.27 ± 0.02
6.25	1.45 ± 0.24	0.87 ± 0.22
3.13	1.12 ± 0.21	0.62 ± 0.07
1.56	0.77 ± 0.20	0.50 ± 0.05
0.78	0.47 ± 0.07	0.49 ±0.01
0.39	0.27 ± 0.05	0.61 ± 0.03
0.20	0.20 ± 0.04	0.67 ± 0.02
0.10	0.12 ± 0.02	0.75 ± 0.02
0.04	0.09 ± 0.01	0.76 ± 0.01
control	0.06 ± 0.00	0.82 ± 0.02

OR-P: oleorresina de pimiento; DO: densidad óptica; DE: desviación estándar

Estudio de la actividad bactericida

Se evaluó la concentración mínima bactericida (CBM) para todos los tratamientos y repeticiones. Para ello se sembró desde los pocillos de cada microplaca a agares específicos EMB para *E. coli* ATCC 25922 y Baird Parker para *S. aureus* ATCC 25923, registrando la presencia o ausencia de colonias típicas tras incubar 48 horas (cuadro 13). En el caso de *E. coli*, hubo desarrollo microbiano a todas las concentraciones de ají panca y pimiento (figura 8). La oleorresina de ají panca no fue letal para *S. aureus* ya que hubo crecimiento de colonias negras con halo transparente en el agar Baird Parker (figura 9). Sin embargo, la oleorresina de pimiento sí fue letal para *S. aureus* en las tres concentraciones mayores que se ensayaron, por lo que la CBM en este caso fue de 6.25% para todas las repeticiones.

Cuadro 13. Crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* en agares selectivos

Concentración (%)	EC-AP	EC-PM	SA-AP	SA-PM
25.00	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	**Ausencia-**
12.50	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	**Ausencia**
6.25	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	**Ausencia**
3.13	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
1.56	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
0.78	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
0.39	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
0.20	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
0.10	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
0.04	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
Control	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento

EC-AP: *E. coli* vs ají panca; EC-PM: *E. coli* vs pimiento; SA-AP: *S. aureus*; SA-PM: *S. aureus* vs pimiento; (+): Presencia de colonias; (-): Ausencia de colonias.

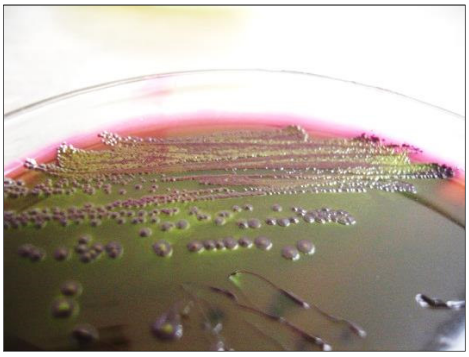


Figura 8. Colonias de *E. coli* ATCC 25922 en agar EMB

Figura 9. Colonias de *S. aureus* ATCC 25923 en Agar BP

V. DISCUSIÓN

El uso indiscriminado de agentes antimicrobianos como antibióticos comerciales y desinfectantes químicos ha conllevado a la aparición de bacterias multirresistentes, lo que actualmente es una preocupación constante en salud pública. En las últimas décadas se ha incrementado el interés por el uso de compuestos de origen vegetal con actividad equivalente a los antimicrobianos tradicionales y sin efectos adversos para el consumidor. Esto se debe a que en el reino vegetal se concentra la mayor cantidad de compuestos químicos con actividad antimicrobiana (Domingo y López-Brea, 2003; Piyawan *et al*., 2005; Zampini *et al*., 2007).

El interés por nuevas alternativas también se extiende al ámbito de la inocuidad alimentaria. El principal objetivo de la producción de alimentos es contribuir con el bienestar del hombre brindándole un producto seguro, nutritivo y sensorialmente adecuado (Rodríguez, 2011). Sin embargo, los alimentos son fácilmente alterables debido a su contenido de nutrientes que favorecen la proliferación de microorganismos, algunos de ellos patógenos para el hombre. Dentro de la diversidad de bacterias encontradas frecuentemente en los alimentos, tenemos a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Si bien la primera es comensal del tubo digestivo, también puede actuar como oportunista causando enfermedades gastrointestinales o multisistémicas (Feng *et al*., 2002). Esta bacteria es abundante en el colon del hombre y los animales; pero sobrevive poco tiempo en el medio ambiente, por lo que su presencia en alimentos puede atribuirse a una contaminación fecal reciente (Dos Santos, 2007). *S. aureus* también representa un peligro para el consumidor debido a que produce toxinas

termoestables que han sido identificadas en brotes de envenenamientos por alimentos (Bennett y Lancette, 2001). Más aún, ya que se encuentran en la piel, secreciones y vías respiratorias del hombre, su presencia en los alimentos puede indicar deficientes prácticas en el procesamiento de los alimentos, ya sea por higiene de los operarios, o mal manejo de la temperatura de cocción y almacenamiento (González y Cecchini, 1999).

Se ha demostrado que los extractos vegetales de especies comunes en nuestro medio como el tomillo, manzanilla, eucalipto, pimienta, ají, entre otros, poseen eficacia contra bacterias, hongos y algunos virus (Domingo y López-Brea, 2003). Uno de los géneros vegetales de uso común en nuestro país es el *Capsicum*. Éste incluye a la gran variedad de ajíes y pimientos que forman parte de la cultura gastronómica de casi todas las regiones del Perú debido a su sabor y característica pungencia. Hay estudios que demuestran que los extractos, también denominados oleorresinas, obtenidos de diversas especies de *Capsicum* poseen actividad antimicrobiana y antioxidante, atribuida a compuestos activos como capsaicinoides, fenoles, aceites esenciales, carotenos, etc.

La oleorresina de *Capsicum* es un producto de naturaleza oleosa, viscosa, coloración rojiza intensa y aroma característico que se obtiene mediante lixiviación del fruto deshidratado y molido con un solvente de bajo punto de ebullición. Esto permite concentrar compuestos activos y conservar el extracto por mayor tiempo, protegiéndolo de la acción microbiana (Fernández, 2007; Velasco *et al*., 2007). Dentro del proceso de elaboración de la oleorresina, son importantes la molienda del fruto deshidratado y la granulometría. Éstas se realizan para obtener un tamaño de partícula óptimo que permita la disolución, reactividad química y fluidez de una sustancia. Todo esto influirá en la veloz penetración del solvente en toda la partícula y la liberación del soluto hasta alcanzar rápidamente el equilibrio en la mezcla (Govindarajan y Salzer, 1986; Romero, 2012).

En nuestro estudio, el porcentaje de partículas de diámetro menor a 250 µm fue de 48.32 ± 1.36% para el polvo de ají panca y de 51.55 ± 1.66% para el pimiento. Estos valores son superiores a los reportados por González *et al*. (2008), quienes realizaron la granulometría del polvo de ají dulce (*C. chinense*) deshidratado a dos temperaturas y encontraron que el porcentaje de partículas menores a 250 µm era de 38.62 y 31.34%

para ajíes deshidratados a 60 y 70 °C, respectivamente. Más aún, los valores de nuestro estudio son superiores a lo reportado por Gutiérrez (2014), quien procesó ají panca y obtuvo 22.72% de partículas de tamaño menor a 300 µm. Sin embargo, Gil *et al*. (2012) elaboraron oleorresina de páprika (*Capsicum annuum* L.) con partículas del fruto en polvo de hasta 500 µm. Las diferencias pueden atribuirse a la metodología de molienda de los frutos deshidratados. En nuestro estudio, los ajíes panca y pimientos fueron molidos en una empresa privada y también en el laboratorio empleando una procesadora de alimentos, luego de lo cual fueron tamizados y pesados para la granulometría. Pese a que es importante considerar el tamaño de partícula de las muestras en polvo, las investigaciones reportan datos muy diversos y no existe un consenso acerca del tamaño ideal de las partículas.

El rendimiento de la extracción depende de diversos factores, como el tipo de solvente, tiempo de maceración, contenido inicial de componentes activos en el fruto, condiciones del cultivo, estado de maduración, etc. (Vásquez-Flota *et al*., 2007). En el presente trabajo, se obtuvo oleorresina con rendimientos de extracción de 12.53 ± 0.30% y 12.17 ± 0.23% a partir de 100 gramos de polvo de ají panca y de pimiento, respectivamente. Estos valores son superiores a lo encontrado por Rodríguez *et al*. (2000), quien reportó rendimientos de 4.20 hasta 7.70% para *C. chinense,* y de 8.95 hasta 10.85% para *C. annuum* tras la lixiviación con etanol. Gutiérrez (2014) extrajo oleorresina de ají panca obteniendo un rendimiento de 4.13%, diferencia que puede atribuirse al uso de un rotavapor que habría permitido concentrar aún más la oleorresina. En cuanto a la determinación de capsaicinoides en la oleorresina de ají panca mediante HPLC, por cada gramo de oleorresina se detectaron 1.39 mg de capsaicina y 0.54 mg de dihidrocapsaicina. Dichos valores son mucho menores a los reportados por Gutiérrez (2014), quien trabajó con ají panca encontrando 10.074 mg de capsaicina y 6.087 mg de dihidrocapsaicina por gramo de oleorresina mediante la misma prueba analítica. Sin embargo, cabe mencionar que su extracción tuvo un rendimiento de 4.13%, mientras que en nuestro estudio el rendimiento fue 12.53%. El menor contenido de capsaicinoides que se obtuvo podría deberse a la dilución de los compuestos activos cuando el porcentaje de extracción es mayor, tal como sugieren Dorantes *et al*. (2000). En cuanto a la oleorresina de pimiento, no se realizó la

cuantificación ya que se trata de un fruto dulce y Dorantes *et al*. reportan que los niveles de capsaicinoides en pimiento morrón (*Capsicum annuum*) no son detectables.

El estudio de la actividad bacteriostática y bactericida de las oleorresinas de ají panca y de pimiento frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 se realizó mediante la microdilución en placas de 96 pocillos con posterior siembra en agares específicos. Estos métodos permiten determinar la concentracion inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM). En el desarrollo de la primera, la turbidez o densidad óptica de cada pocillo después de la incubación debería ser superior o igual a la registrada al inicio; lo que indicaría desarrollo microbiano o ausencia de éste, respectivamente, y permitiría la detección de la CIM (García *et al*., 2000; Taroco *et al*., 2006).

Con respecto a la evaluación del efecto bacteriostático de la oleorresina de ají panca sobre *E. coli* ATCC 25922, no se determinó una CIM ya que las densidades ópticas en los pocillos de este tratamiento fueron inferiores tras el periodo de incubación de 22 horas. Dicha bacteria tuvo similar comportamiento frente a concentraciones decrecientes de oleorresina de pimiento. En este caso, la densidad óptica final fue menor en las concentraciones comprendidas entre 25 y 0.39%, y mayor en las concentraciones de 0.2 a 0.04%, por lo que tampoco se determinó una CIM para este tratamiento. Estos hallazgos sugieren que las oleorresinas obtenidas en el estudio, en las concentraciones evaluadas, no ejercen efecto bacteriostático alguno sobre *E. coli* ATCC 25922. Esto concuerda con la investigación de Escobar (2010), quien evaluó la susceptibilidad de dos cepas de *E. coli* O157:H7 frente al extracto etanólico de chile poblano (*Capsicum sp*.) y de pimiento rojo (*C. annuum*) usando la prueba de disco difusión en agar. Dicho autor reportó la ausencia de halos de inhibición en ambos casos. Empleando la misma prueba, Sia Su *et al*. (2013) demostró que el extracto etanólico de *C. frutescens* L. no tuvo efecto inhibitorio sobre *E. coli* y tampoco observaron halos de inhibición a concentraciones de 25, 50, 75 y 100%, siendo estas tres últimas superiores a las ensayadas en nuestro estudio. En cambio, nuestros resultados se contradicen con el estudio de Colivet *et al*. (2006) quienes reportan que una solución de extracto etanólico de ají dulce (*C. chinense*) al 25% es suficiente para formar halos de inhibición de 11.80 hasta 16.35 mm para *E. coli*. Por su parte, Gutiérrez (2014), quien trabajó con oleorresina del mismo fruto, encontró mediante la prueba de microdilución que una

concentración de 4.82 mg/mL era suficiente para inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. Asimismo, Nascimento *et al*. (2014) también emplearon la microdilución y reportaron que el extracto de pimenta malagueta (*C. frutescens*) puede inhibir el crecimiento de *E. coli* a una CIM de 10 mg/mL. Esta contradicción probablemente se atribuya a la diversidad de compuestos activos presentes en los frutos antes de la extracción. Isman (2000) y Espinosa-García (2001) sugieren que factores como la calidad del suelo, el clima, las enfermedades y situaciones estresantes en la planta, afectan la concentración final de fitoalexinas o metabolitos secundarios. Debido a esta diversidad química, es posible que cada extracto posea características antimicrobianas particulares.

En el caso de *S. aureus* ATCC 25923 enfrentado a concentraciones decrecientes de oleorresina de ají panca, todas las densidades ópticas fueron superiores tras la incubación. Asimismo, para el tratamiento con oleorresina de pimiento, los pocillos con soluciones comprendidas entre 25 y 1.56% mostraron densidades ópticas menores tras la incubación, mientras que aquellos con 0.78 a 0.04% de oleorresina mostraron densidades ópticas mayores. Para todos los casos, esto significaría que el crecimiento microbiano se produjo sin importar el porcentaje de oleorresina empleado en cada pocillo y que la CIM puede ser superior al 25%. Esto puede inferirse en base a lo reportado por Sia Su *et al*. (2013) donde la CIM de extracto etanólico de *Capsicum frutescens* L. a partir de la cual se formaban halos de inhibición fue de 50%. Sin embargo, Nascimento *et al*. (2014) y Gutiérrez (2014) han estudiado la CIM de extracto etanólico de pimenta malagueta y de ají panca, respectivamente. Ambos reportan que una concentración de 5 mg/mL es suficiente para inhibir el crecimiento de *S. aureus* en la prueba de microdilución.

Adicionalmente, con el propósito de evaluar la actividad bactericida de los tratamientos sobre las cepas en estudio, se tomaron muestras de todos los pocillos y se sembraron en agar EMB para *E. coli* y Baird Parker para *S. aureus*. Tras 24 de incubación, todas las placas de agar EMB albergaron colonias características de *E. coli* (tamaño pequeño con centro oscuro y rodeadas de brillo verde metálico). Este hallazgo permite afirmar que las concentraciones estudiadas de ambas oleorresinas no son bactericidas para *E. coli*. Situación similar ocurrió para el tratamiento de *S. aureus* con oleorresina de ají panca, donde tras la incubación se observaron colonias negras

rodeadas de un halo transparente sobre el agar Baird Parker. En cambio, para la oleorresina de pimiento la mínima concentración bactericida para *S. aureus* ATCC 25923 fue de 6.25%. Las investigaciones sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de *Capsicum* solo contemplan la medición de los halos de inhibición y la determinación de la CIM, mas no de la CBM. Así, Escobar (2010) menciona que al no identificar la CIM, no se prosiguió con la determinación de la CBM. En cambio, un estudio realizado por Careaga *et al*. (2003) encontraron que dosis de 1.5 y 0.3 mL/100 g de extracto de pimiento (*Capsicum annuum*) sobre *Salmonella typhimurium* y *Pseudomona aeruginosa* inoculadas en carne molida solo inhibieron el crecimiento de estas bacterias. En cambio, una concentración de 3 mL/100 g mostró un efecto bactericida sobre *P. aeruginosa* tras 5 días de exposición, mientras que dosis de 4 y 5 mL fueron bactericidas tras 3 días de exposición.

Cabe destacar que la respuesta antimicrobiana de las oleorresinas dependerá de su contenido de capsaicinoides y compuestos fenólicos. Los contenidos de capsaicina y dihidrocapsaicina en la oleorresina pura de ají panca en este estudio fueron de 1.39 y 0.54 mg/g, respectivamente, valores inferiores en comparación con lo encontrado por Gutiérrez (2014), quienes reportaron 10.074 y 6.807 mg/g de capsaicina y dihidrocapsaicina, respectivamente para el mismo fruto. Nascimento *et al.* (2014) obtuvieron valores de 9.20 y 4.0 mg/g de capsaicina y dihidrocapsaicina, respectivamente, valores que también son superiores a los de la oleorresina de este estudio. Por lo que, es posible atribuir el limitado poder antimicrobiano de las oleorresinas al bajo contenido inicial de compuestos activos como los capsaicinoides. Además, es necesario considerar que para todos los tratamientos, las oleorresinas de este estudio fueron diluidas obteniendo una serie de 10 soluciones decrecientes comprendidas entre el 25 y 0.04%, según lo recomendado por García *et al*. (2000). Esta operación diluyó aún más los componentes activos en cada pocillo, lo que explicaría por qué las dosis ensayadas fueron insuficientes para afectar el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*.

Más aún, la reducción de las densidades ópticas podría deberse a que las bacterias usadas en el estudio metabolizaron los componentes nutritivos en la oleorresina como los carotenos, la capsantina y la capsorrubina, ácidos grasos esenciales, vitaminas, etc. Además, Flagan y Leadbetter (2005) indican que algunas bacterias aprovechan la

capsaicina y sus precursores, como el ácido 8-metilnonaoico y la vainillilamina, como fuente de carbono y nitrógeno para su nutrición, lo que refuerza la teoría de que las cepas pudieron desarrollarse en los pocillos, gracias a las bajas dosis de capsaicina y además metabolizaron las moléculas del color.

Los resultados obtenidos sugieren que la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 es más susceptible que *E. coli* ATCC 25922, esto coincide con lo indicado por Nascimento *et al* (2014), quienes determinaron que para inhibir el crecimiento de *E. coli* era necesaria una concentración de capsaicina de 5 µg/mL, mientras que el mismo efecto inhibitorio para *S. aureus* se observó con solamente 1.2 µg/mL. La mayor resistencia de las bacterias Gram negativas a los aceites esenciales de las plantas puede atribuirse a la complejidad estructural de la doble membrana que envuelve a estos microorganismos, mientras que las Gram positivas solo poseen una capa externa de péptidoglucanos que no es una barrera efectiva (Bussatta *et al*., 2008; Nascimento *et al*., 2014).

La oleorresina del pimiento fue la que mejor efecto ejerció, en base a la acción bactericida observada sobre *S. aureus.* Diversos autores han atribuido la capacidad antimicrobiana de los frutos de *Capsicum* a la capsaicina y dihidrocapsaicina, compuestos presentes en las variedades pungentes, pero el pimiento es un fruto dulce y los capsaicinoides no son detectables en pruebas como la HPLC (Dorantes *et al*., 2000). Más aún, Soetarno *et al*. (1997) evaluaron la relación entre el nivel de pungencia y la actividad antimicrobiana de extractos de *C. frutescens* y dos variedades de *C. annuum* var. *longum*; encontrando que la actividad antimicrobiana no se relaciona con el nivel de capsaicinoides, lo que sugiere la presencia de otros compuestos activos, como los fenólicos. Esto se apoya en lo encontrado por Moreno-Limón *et al*. (2012) quienes reportan que el extracto de chile piquín (*C. annuum* L. var. *aviculare*) genera halos de inhibición para *Aspergillus flavus* de hasta 10.9 mm, mientras que la capsaicina solamente genera halos de 8.28 mm. Ellos concluyen que el efecto antimicrobiano no está ligado totalmente a la presencia de capsaicinoides sino a una mezcla de varios compuestos. Las plantas producen fitoalexinas o metabolitos secundarios en respuesta a diversos factores como ataque de patógenos, situaciones estresantes, infecciones, etc., siendo algunos compuestos eficaces contra microorganismos específicos, mientras que otros actúan en un amplio espectro. Sin embargo, todo esto significaría que el extracto

que se obtiene poseerá una alta diversidad química y, por ende, una acción antimicrobiana diferente en cada estudio (Isman, 2000; Espinosa-García, 2001).

Los resultados obtenidos indican que las oleorresinas de ají panca y de pimiento no presentan actividad bacteriostática a concentraciones menores al 25% para ninguna de las cepas estudiadas, pero es posible que la CIM se manifieste en soluciones de concentración superior. Sin embargo, debido a la naturaleza viscosa y oleosa de las oleorresinas, así como su color intenso, sería recomendable emplear otros métodos complementarios a la microdilución, como el de disco difusión o difusión en pozos. De igual forma, no se puede afirmar la ausencia de acción bactericida de las oleorresinas en los tres primeros tratamientos a menos que se ensayen concentraciones superiores. En cuanto al cuatro tratamiento, si bien la CBM es 6.25%, el valor real puede estar comprendido entre dicho porcentaje hasta la dilución siguiente de 3.13%.

VI. CONCLUSIONES

- Los extractos vegetales poseen una gran variabilidad en cuanto a contenido de compuestos activos y su efecto antimicrobiano.
- El método de microdilución debe complementarse con otros para evaluar la actividad bacteriostática.
- La determinación de la CBM da un resultado más confiable del poder antimicrobiano de una sustancia.

VII. RECOMENDACIONES

- Son necesarios más estudios para complementar la microdilución en caldo con técnicas como la de disco difusión o difusión en pozos.

- Se recomienda continuar las investigaciones a concentraciones superiores al 25% para determinar el comportamiento de ambas oleorresinas sobre el crecimiento y viabilidad de las cepas de estudio. También, estudiar concentraciones con rangos más reducidos.

- Es necesario conocer la acción antimicrobiana de las oleorresinas frente a otros agentes de interés en inocuidad alimentaria como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes, Aspergillus sp.,* etc.

- Es recomendable que se cuantifique el contenido de compuestos fenólicos totales de las oleorresinas mediante métodos como el de Folin-Ciocalteu, ya que también ejercen efecto antimicrobiano.

- Es recomendable identificar cada uno de los compuestos activos y cuantificar a los más abundantes mediante métodos como la HPLC. Esto permitiría estimar qué moléculas dentro de la gran diversidad química están más implicadas en un efecto antimicrobiano.

- De emplearse las oleorresinas del estudio para minimizar la carga microbiana inicial en un alimento, se recomienda el uso del producto a mayor concentración o en estado puro y evaluar la influencia de la matriz alimentaria sobre la respuesta antimicrobiana.

- Se sugiere evaluar la acción antimicrobiana de otros frutos del género *Capsicum* que posean mayor grado de pungencia, así como de otras especies botánicas comunes en nuestro medio.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ***[ADEX] Asociación de Exportadores. 2015.*** Exportaciones: Para que Piquen. Perú Exporta, 394, 62p. [Internet] [7 febrero 2016] Disponible en: http://www.adexperu.org.pe/images/Publicaciones/RevistaPeruExporta/RevistaPeruExporta_394.pdf

- ***Andrade JAB, Freymüller E, Fagundes-Neto U. 2011.*** *Escherichia coli* enteroagregativa como agente provocador de diarrea persistente: modelo experimental utilizando microscopia óptica de luz. Rev Paul Pediatr; 29(1): 60-66.

- ***Andrawus D, Alanamu A, Saheed O, Oladele F. 2014.*** Fruit Morphology as Taxonomic Features in Five Varieties of *Capsicum annuum* L. Solanaceae. Journal of Botany, ID 540868. 6 p.

- ***Arango GJ. 2008.*** Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquía. [Internet] [2 abril 2016] Disponible en: http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf

- ***Bautista M, Reyna L, Bravo M, Cornejo O, Huamán J, Guerrero M. 2008.*** Extracción de olorresinas de la páprika (*Capsicum annuum* L.) en unidad piloto. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 11(1): 54-57.

- ***Bennett RW, Lancette GA. 2001.*** Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. En: Bacteriological Analytical Manual. 8th edition. U. S. Food and Drug Administration. [Internet] [25 marzo 2015] Disponible en: http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071429.htm

- ***Bosland PW. 1996.*** *Capsicums*: Innovative uses of an ancient crop. J Janick (ed.). Progress in new crops. ASHS Press. Arlington. USA.

- ***Bosland P, Votava E. 2000.*** Peppers: Vegetable and Spice *Capsicums*. Crop Production Science in Horticulture 12. CABI Publishing. Reino Unido.

- ***Bussatta C, Mossi AJ, Alves MR, Cansian RL, De Olvideira J. 2007.*** Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38: 610-616.

- ***Caldas AP. 2012.*** Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido-líquido. Tesis de Ing. Química. Universidad de Cuenca. Ecuador.

- ***Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME, Hernández-Sánchez H. 2003.*** Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella*

typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. International Journal of Food Microbiology, 83(3): 331-335.

- ***Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. 2000.*** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science 288:306-313.

- ***Cázares-Sánchez E, Ramírez-Vallejo P, Castillo-González F, Soto-Hernández M, Rodríguez-González T, Chávez-Servia J. 2005.*** Capsaicinoides y Preferencia de Uso en Diferentes Morfotipos de Chile (*Capsicum annuum* L.) del Centro-Oriente de Yucatán. Agro-Ciencia, 39: 627-638.

- ***Cerón-Carrillo T, Munguía-Pérez R, García S, Santiesteban-López A. 2014.*** Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*). Rev Ib Ci, 1(2): 213-221.

- ***Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. 2014.*** Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab; 61(1): 28-40.

- ***Chua M, Tung Y, Chang S. 2008.*** Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. Bioresource Technology 99: 1918-1925.

- ***Cichewicz RH, Thorpe PA. 1996.*** The antimicrobial properties of chilli peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. J. Ethnopharmacol, 52: 61-70.

- ***Colivet J, Belloso G, Hurtado E. 2006.*** Comparación del efecto inhibidor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp*. Saber, 18(2): 168-173.

- ***Cushnie TPT, Lamb AJ. 2011.*** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents, 38, 99-107.

- ***Deepa N, Charanjit K, Binoy G, Singh B, Kapoor HC. 2008.*** Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. Food Sc and Tech, 40(1): 121-129.

- ***Delgado R. 2009.*** Evaluación del efecto gastroprotector del extracto liofilizado de *Capsicum annuum* L en ratas. Tesis de Magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. [Internet] [3 mayo 2015] Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/232/delgado_mr.pdf?sequence=1

- ***DeWitt D, Bosland P. 2009.*** The Complete Chile Pepper Book: A Gardener's Guide of Choosing, Growing, Preserving and Cooking. Londres: Timber Press.

- ***Dixon RA. 2001.*** Natural products and plant disease resistance. Nature 411: 843-847.

- ***Domingo D, López-Brea M. 2013.*** Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 16(4): 385-393.

- ***Dorantes L, Colmenero R, Hernández H, Mota L, Jaramillo ME, Fernández E, Solano C. 2000.*** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. Int J of Food Microbiology: 125-128.

- ***Dos santos LF, Goncalves EM, Vaz TMI, Irino K, Guth BEC. 2007.*** Distinct pathotypes of O113 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals in Brazil. Journal of clinical microbiology 45(6): 2028-2030.

- ***Escobar AD. 2010.*** Extractos de plantas como inhibidores de la formación de biopelícula de *Escherichia coli* O157:H7. Tesis de Magister. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 111 p.

- ***Espinosa-García FJ. 2000.*** La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: Anaya AL, Espinosa-García FJ, Cruz-Ortega R. Coord. Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas. Instituto de Ecología. Plaza y Valdes S.A. de C.V. México DF. 733 p.

- ***[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014.*** Productos Frescos de Verdura. Fichas Técnicas. [Internet][2 de febrero de 2016]. Disponible en: http://www.fao.org/3/a-au174s.pdf

- ***[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.*** Prevención de la *Escherichia coli* en los alimentos. Inocuidad y calidad de los alimentos. [Internet] [20 mayo 2016] Disponible en: http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/e-coli0/es/

- ***Feng P, Weagant SD, Grant MA. 2002.*** Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. En: U. S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual.

- ***Fernández G. 2007.*** Extracción, Análisis, Estabilidad y Síntesis de Capsaicinoides. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. España. 288 p.

- ***Fernández-Trujillo J. 2007.*** Extracción Convencional de Oleorresina de Pimentón Dulce y Picante I. Generalidades, Composición, Proceso e Innovaciones y Aplicaciones. Grasas y Aceites, 58(3): 252-263.

- ***Flagan SF, Leadbetter JR. 2005.*** Utilization of capsaicin and vanillylamine as growth substrates by *Capsicum* (hot pepper)-associated bacteria. Environmental Microbiology, 8(3): 560-565.

- ***Fueyo JM. 2005.*** Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

- ***Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. 2002.*** Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia 73: 536-539.

- ***Gamarra N, Bontemps I, Coronel E, Velásquez S, Granza S. 2011.*** Extracción por fluido supercrítico de CO2 y cuantificación de capsaicinoides de rocoto (*Capsicum pubescens*) del valle del Mantaro. Prospectiva Universitaria,. 8(1): 11-17.

- ***Garcia JA, Cantón R, Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez ML, Rodríguez-Vial C, Vila J. 2000.*** Procedimientos de microbiología clínica. Capítulo 11: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. España.

- ***García-Galindo H, Ortega-Martínez J, García-Rosales M, Martínez C, Beristáin C. 1995.*** La Capsaicina, el Principio Pungente del Chile: Su Naturaleza, Absorción, Metabolismo y Efectos Farmacológicos. Ciencia 46: 84-102.

- ***Gil MA, Londoño-Londoño J, González MI, Millán LJ, Sanabria CC. 2012.*** Aplicación de la páprika extraída por fluidos supercríticos y microencapsulada por spray-drying en un producto embutido. Una alternativa como colorante natural. Revista Lasallista de Investigación, 9(2):87-101. http://www.redalyc.org/pdf/695/69525875011.pdf

- ***Giraldo FJ, Gil MA, Alzate LM, Restrepo AM, Millan L, Ordoñez AF, Restrepo CE. 2009.*** Comparación de métodos de extracción de oleorresina de páprika (Capsicum annuum L.) convencionales con una tecnología amigable al medio ambiente. Producción + Limpia. 4(1): 17-26.

- ***González A, Espinoza A, Cañizares AE, Méndez JR. 2008.*** Obtención de un polvo de ají dulce (*Capsicum chinense*) producido mediante deshidratación por aire forzado. Revista Científica UDO Agrícola, 8(1): 118-126

- ***González SE, Cecchini DM. 1999.*** Módulo 2: Enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos. En: Diagnóstico e investigación epidemiológica de

las enfermedades transmitidas por alimentos. Organización Panamericana de la Salud. [Internet] [4 abril 2016] Disponible en: http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2n.html

- ***Gordon RJ, Lowy FD. 2008.*** Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis 46(5): 350-359.

- ***Govindarajan VS, Salzer UJ. 1986.*** *Capsicum* – Production, technology, chemistry, and quality – part II. Processed products, standards, world production and trade. Crit Rev Food Sci Nutr 23(3): 207-288.

- ***Gutiérrez AA. 2014.*** Efecto antimicrobiano del ají panca (*Capsicum chinense*) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* durante el almacenamiento de chorizo fresco. Tesis de Ingeniero Alimentario. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 173 p.

- ***Hasler CM. 1998*** Functional foods: Their role in disease prevention and health. Food Technology 52: 63-39.

- ***Hodgson J. 1993.*** Expression Systems: A User's Guide. Nature Biotechnology, 11: 887-893.

- ***Hooper LV, Gordon JI. 2001.*** Commensal host-bacterial relationship in the gut. Science 292: 1115-1118.

- ***[INS] Instituto Nacional de Salud. 2009.*** Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. 8° ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

- ***Isman MB. 2000.*** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19: 603-608.

- ***Karmali MA. 1989.*** Infection by Verocytotixin- Producing *Escherichia coli*. Clinical MIcrobiology Reviews. Vol 2(1): 15-38.

- ***Agrodataperu. 2016.*** [Internet] [10 abril 2016]. Disponible en: http://www.agrodataperu.com

- ***Lee SY. 1996.*** High cell-density culture of *Escherichia coli*. Review. TIBTECH 14: 98-105.

- ***León J. 2000.*** Botánica de los Cultivos Tropicales. 3 ed. Editorial Agroamérica. San José, Costa Rica. Pp 330-334.

- ***Lizcano AJ, Vergara JL. 2008.*** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeria pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 131 p.

- ***Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. 2006.*** Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Resumen 057 N° 355. Universidad

Nacinoal del Noreste. Argentina. [Internet] [20 noviembre 2015] Disponible en: http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf

- ***Matsufuji H, Nakamuro H, Chino M, Takeda M. 1998.*** Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). J of Agricultural and Food Chemistry, 46:3468-3472.

- ***Miskovsky P. 2002.*** Hyericin – A new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. Curr Drug Targets 3: 55-84.

- ***Moreno-Limón S, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila ML, Hernández-Piñero JL, Núñez-González MA. 2012.*** Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*. Polibotánica 34: 171-184.

- ***Nascimento PLA, Nascimento TCES, Ramos NSM, Silva GR, Amorin C, Silva TMS, Moreira KA, Porto ALF. 2013.*** Antimicrobial and antioxidant activities of Pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*). African Journal of Microbiology Research, 7(27): 3526-3533.

- ***Nascimento PLA, Nascimento TCES, Ramos NSM, Silva GR, Galindo JE, Falcao REA, Moreira KA, Porto ALF, Silva TMS. 2014.*** Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). Molecules, 19: 5434-5447.

- ***Nataro JP, Kaper JB. 1998.*** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11(1): 142-201.

- ***Pacho-Carrillo JD, Domínguez-Espinosa RM, Cantón CG, Ponsich A, Turner R, Manzanilla G, Poot C. 2002.*** Diseño conceptual de una planta de extracción de oleorresinas: *Capsicum* y capsaicina a partir de chile habanero (*Capsicum chinense*) usando CO2 supercrítico. Tecnol. Ciencia Ed. 17(2): 95-103.

- ***Pavlovic R, Mladenovic J, Radavanovic B, Acamovic-Dokovic G, Zdravkovic J, Zdravkovic M. 2012.*** Phenolic compounds and biological activity of *Capsicum* annuum L. African Journal of Biotechnology 11(45): 10446-10450.

- ***Piyawan S, Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Iida T, Honda T. 2005.*** Inhibitory action of *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Science, 51: 590-596.

- ***Ramírez LS, Marín D. 2009.*** Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica, 42: 263-268.

- ***Ravishankar BE. 1997.*** Supercritical fluid extraction of capsaicin from peppers. Tesis de Doctor en Filosofía. Texas Tech University. Texas. USA. 128 p.

- ***Restrepo M, Llanos N, Fonseca CE. 2007.*** Composición de las oleorresinas de dos variedades de ají picante (habanero y tabasco) obtenidas mediante lixiviación con solventes orgánicos. Revista Lasallista de Investigación, 4(1): 14-19.

- ***Rodríguez L, Arango J, Urrego F. 2000.*** Obtención de oleorresinas a partir de tres especies de *Capsicum sp*. cultivadas en Colombia (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*). Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. [Internet] [18 mayo 2015] Disponible en: http://avalon.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica3/oleorresinas.pdf

- ***Rodríguez JJ. 2003.*** *Escherichia coli*. Consuma seguridad, diario de la seguridad alimentaria. España. [Internet] [30 mayo 2015] Disponible en: www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/11/07/9262.php

- ***Romerio MD. 2012.*** Estudio de farmacotecnia y desarrollo de formas de dosificiación de vegetales deshidratados para su aplicación en pediatría y personas de la tercera edad. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. pp 279. [Internet] [4 abril 2016] Disponible en: http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/23781/1/21454449.pdf

- ***Russo T. 2002.***Enfermedades producidas por bacilos entéricos Gramnegativos. En: Harrison TR. Principio de Medicina Interna. McGraw-Hill. Interamericana de España. Vol I, cap 153. P. 1126-1130.

- ***Salamanca MA, Sánchez MY. 2009.*** Extracción y caracterización de la oleorresina de orégano (*Origanum vulgare*). Tesis de Grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 94 p.

- ***Sears C. 1996.*** Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and Linkage to intestinal secretion. Microbiology review. 60(1): 167-215.

- ***Shayan S, Saeidi S. 2013.*** Antibacterial and antibiofilm activities of extract *Capsicum annuum* L on the growth and biofilm formation of common pathogenic strains. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 5(4): 513-518.

- ***Sia su GL, David PDM, Tan LAU, Sia Su LL, Sison MAC, Ragragio EM, Arollado EC, Guzmán T. 2013.*** Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Capsicum frutescens* Linn crude fruit extract on selected microorganisms. J of Pharmaceutical and biomedical Sciences, 37(37): 1922-1926.

- ***Soetarno S, Sukrasno E, Sukrasno S. 1997.*** Antimicrobial activities of the etanol extracts of *Capsicum* fruits with different levels of pungency. JMS 2(2): 57-83.

- ***Soumya SL, Nair BR. 2012.*** Antifungal efficacy of *Capsicum frutescens* L. extracts against some prevalent fungal strains associated with groundnut storage. J of Agricultural Technology, 8(2): 739-750.

- ***Sousa CP. 2006.*** The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 12(3): 363-373.

- ***Taroco R, Seija V, Vignoli R. 2006.*** Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Libro: Temas Bacteriología y Virología. Ed Oficina del libro FEFMUR. Instituto de Higiene, Montevideo. Uruguay. Cap. 36: pp. 663-671.

- ***Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. 2002.*** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1561–1568.

- ***Valgas C, Souza SMD, Smânia EFA, Jr AS. 2007.*** Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology, 38: 369.

- ***Vásquez-Flota F, Miranda-Ham ML, Monforte-González M, Gutiérrez-Carbajal G, Velázquez-García C, Nieto-Pelayo Y. 2007.*** La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. Revista Fitotecnia Mexicana, 30(4): 353-360.

- ***Velasco RJ, Villada HS, Carrera JE. 2007.*** Aplicación de los fluidos supercríticos en la agroindustria. Información Tecnológica. 18(1): 53-65.

- ***Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. 2007.*** Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública de México 49 (5): 376-386.

- ***Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001.*** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J. Med; 344(1): 11-16.

- ***Zampini IC, Cudmani N, Isla MI. 2007.*** Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquím Clín Latinoam. 41(3): 385-393

IX. ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de *E. coli* ATCC 25922

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Escherichia coli **Catalog Number:** 0335 **Lot Number:** 335-163 **Reference Number:** ATCC® 25922™* **Purity:** < 0.1% Total Pellet CFU **Recovery:** > 1000 CFUs per Pellet **Passage from Reference:** 4	**Expiration Date:** 2017/6/30 **Release Information:** **Quality Control Technologist:** Tracy A Blenker **Release Date:** 2015/7/16

Performance

Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough	**Medium:** SBAP
Microscopic Features: Gram negative straight rod	**Method:** Gram Stain (1)
ID System: Vitek GN (1) See attached ID System results document.	**Other Features/ Challenges: Results** (1) Oxidase(Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

ACCREDITED

TESTING CERT #2655.01

 Page 1 of 1 DOC.286

MicroBioLogics

bioMerieux Customer: 05871
System #: C21105

Laboratory Report

Printed Jul 15, 2015 08:03 CDT
Printed by: tab
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 335 163-1

Bench: TB

Card Type: GN Testing Instrument: 00000A6D6328 (1116)

Bionumber: 0405611560566601
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	**Card:**	GN	**Lot Number:**	241334940	**Expires:**	Feb 14, 2016 12:00 CST
	Completed:	Jul 14, 2015 17:00 CDT	**Status:**	Final	**Analysis Time:**	5.00 hours
Selected Organism	98% Probability		**Escherichia coli**			
	Bionumber:	0405611560566601			**Confidence:**	Excellent identification
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s)						
Escherichia coli	dTAG(22),					

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

ANEXO 2: Certificado de *S. aureus* ATCC 25923

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus **Catalog Number:** 0360 **Lot Number:** 360-214 **Reference Number:** ATCC® 25923™* **Purity:** < 0.1% Total Pellet CFU **Recovery:** > 1000 CFUs per Pellet **Passage from Reference:** 4	**Expiration Date:** 2016/11/30 **Release Information:** **Quality Control Technologist:** Tracy A Blenker **Release Date:** 2014/12/16

Performance

Macroscopic Features:	Medium:
Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Gram Stain (1)

ID System: Vitek GP (1)

Phenotypic Features	Results
D-AMYGDALIN	-
PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	-
D-XYLOSE	-
ARGININE DIHYDROLASE 1	+
BETA-GALACTOSIDASE	-
ALPHA-GLUCOSIDASE	-
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-
CYCLODEXTRIN	-
L-Aspartate ARYLAMIDASE	-
BETA GALACTOPYRANOSIDASE	-
ALPHA-MANNOSIDASE	-
PHOSPHATASE	+
Leucine ARYLAMIDASE	-
L-Proline ARYLAMIDASE	-
BETA GLUCURONIDASE	-
ALPHA-GALACTOSIDASE	-
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	+
BETA-GLUCORONIDASE	-
Alanine ARYLAMIDASE	-
Tyrosine ARYLAMIDASE	-
D-SORBITOL	-
UREASE	-
POLYMIXIN B RESISTANCE	+
D-GALACTOSE	-
D-RIBOSE	+
L-LACTATE alkalinization	+
LACTOSE	-
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+
D-MALTOSE	+
BACITRACIN RESISTANCE	+
NOVOBIOCIN RESISTANCE	-
GROWTH IN 6.5% NaCl	+
D-MANNITOL	+
D-MANNOSE	+
METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	+
PULLULAN	-
D-RAFFINOSE	-
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+
SALICIN	-
SACCHAROSE/SUCROSE	+
D-TREHALOSE	+
ARGININE DIHYDROLASE 2	-
OPTOCHIN RESISTANCE	+

Other Features / Challenges: Results

(1) Catalase(3% Hydrogen Peroxide): positive
(1) Coagulase(rabbit plasma-tube): positive
(1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
(1) Ampicillin (10 mcg)(Disk Susceptibility): 27 - 35 mm
(1) Penicillin (10 units)(Disk Susceptibility): 26 - 37 mm
(1) Oxacillin (1 mcg)(Disk Susceptibility): 18 - 24

Brad Goskowicz, President
AUTHORIZED SIGNATURE

 Page 1 of 2 DOC.286

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus **Catalog Number:** 0360 **Lot Number:** 360-214 **Reference Number:** ATCC® 25923™* **Purity:** < 0.1% Total Pellet CFU **Recovery:** > 1000 CFUs per Pellet **Passage from Reference:** 4	**Expiration Date:** 2016/11/30 **Release Information:** **Quality Control Technologist:** Tracy A Blenker **Release Date:** 2014/12/16

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

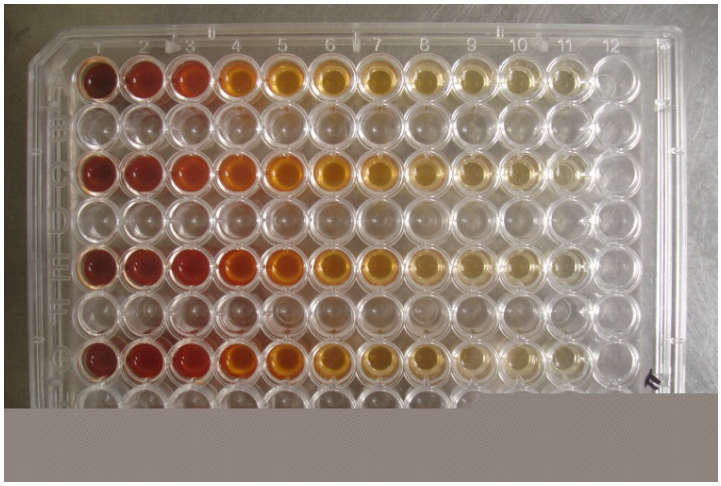
ACCREDITED

TESTING CERT #2655.01

ANEXO 3: Esquema de pocillos utilizados en microdilución en caldo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**25.00**	**12.50**	**6.25**	**3.13**	**1.56**	**0.78**	**0.39**	**0.20**	**0.10**	**0.04**	**C**	
B												
C	**25.00**	**12.50**	**6.25**	**3.13**	**1.56**	**0.78**	**0.39**	**0.20**	**0.10**	**0.04**	**C**	
D												
E	**25.00**	**12.50**	**6.25**	**3.13**	**1.56**	**0.78**	**0.39**	**0.20**	**0.10**	**0.04**	**C**	
F												
G	**25.00**	**12.50**	**6.25**	**3.13**	**1.56**	**0.78**	**0.39**	**0.20**	**0.10**	**0.04**	**C**	
H												

C = control



Cada fila representa la serie de 10 diluciones seriadas desde 25% hasta 0.04%, con el onceavo pocillo como control sin oleorresina. Cada columna representa las 4 repeticiones para una concentración determinada. Cada microplaca se usó para uno de los 4 tratamientos.

ANEXO 4: Densidades ópticas del tratamiento 1

Densidades ópticas del tratamiento: *E. coli* – Ají Panca (Hora 0)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
23/10/2015

IDEXX LABORATORIES

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 23/10/2015
Template: 23/10/2015-004
Tech: E

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.323	1.331	1.529	1.123	1.034	0.641	0.466	0.354	0.282	0.285	0.057	0.092
S/P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.165	0.153	1.073	0.931
Result		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.075	0.069	0.071	0.070	0.061	0.071	0.075	0.081	0.089	0.082	0.072	0.078
S/P		1.024	1.016	1.020	1.056	1.016	1.000	0.976	0.944	0.972	1.012	0.988
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.477	1.422	1.656	1.592	0.918	0.934	0.664	0.927	0.439	0.441	0.061	0.077
S/P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.056	0.992
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.071	0.079	0.082	0.081	0.074	0.073	0.081	0.079	0.090	0.086	0.092	0.089
S/P	1.016	0.984	0.972	0.976	1.004	1.008	0.976	0.984	0.940	0.956	0.931	0.944
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.450	1.412	1.442	1.113	0.656	0.576	0.398	0.372	0.402	0.241	0.057	0.076
S/P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.331	1.073	0.996
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.093	0.080	0.077	0.077	0.094	0.101	0.100	0.103	0.081	0.075	0.095	0.083
S/P	0.927	0.980	0.992	0.992	0.923	0.895	0.899	0.887	0.976	1.000	0.919	0.968
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.379	0.842	0.846	0.545	0.500	0.494	0.424	0.506	0.390	0.281	0.058	0.084
S/P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.169	1.069	0.964
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.072	0.068	0.067	0.075	0.064	0.079	0.072	0.108	0.095	0.084	0.083	0.076
S/P	1.012	1.028	1.032	1.000	1.044	0.984	1.012	0.867	0.919	0.964	0.968	0.996
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	ECAP	

Densidades ópticas del tratamiento: *E. coli* – Ají Panca (Hora 22)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
24/10/2015

IDEXX LABORATORIES

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 24/10/2015
Template: 24/10/2015-004
Tech: AS

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.712	0.802	0.730	0.609	0.527	0.420	0.357	0.280	0.208	0.191	0.062	0.094
S/P		0.000	0.000	0.164	0.295	0.466	0.566	0.689	0.804	0.831	1.037	0.986
Result		Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.085	0.203	0.220	0.208	0.215	0.220	0.216	0.229	0.217	0.234	0.216	0.107
S/P		0.812	0.785	0.804	0.793	0.785	0.791	0.770	0.789	0.762	0.791	0.965
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.747	0.746	0.593	0.717	0.567	0.488	0.380	0.461	0.223	0.225	0.066	0.145
S/P	0.000	0.000	0.190	0.000	0.231	0.357	0.530	0.400	0.780	0.777	1.030	0.904
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.105	0.204	0.212	0.212	0.215	0.207	0.211	0.202	0.218	0.218	0.209	0.131
S/P	0.968	0.810	0.797	0.797	0.793	0.805	0.799	0.813	0.788	0.788	0.802	0.927
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.572	0.705	0.805	0.576	0.516	0.413	0.312	0.248	0.233	0.149	0.065	0.129
S/P	0.223	0.011	0.000	0.217	0.313	0.477	0.638	0.740	0.764	0.898	1.032	0.930
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.117	0.200	0.202	0.208	0.222	0.218	0.226	0.239	0.210	0.210	0.210	0.111
S/P	0.949	0.817	0.813	0.804	0.781	0.788	0.775	0.754	0.801	0.801	0.801	0.959
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.831	0.972	0.751	0.522	0.433	0.377	0.314	0.300	0.188	0.147	0.060	0.086
S/P	0.000	0.000	0.000	0.303	0.445	0.534	0.635	0.657	0.836	0.901	1.040	0.998
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.061	0.074	0.086	0.111	0.107	0.118	0.107	0.133	0.119	0.088	0.084	0.078
S/P	1.038	1.018	0.998	0.959	0.965	0.947	0.965	0.923	0.946	0.995	1.002	1.011
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	ECAP	

ANEXO 5: Densidades ópticas del tratamiento 2

Densidades ópticas del tratamiento: *E. coli* – Pimiento (Hora 0)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virologia
23/10/2015

IDEXX LABORATORIES

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 23/10/2015
Template: 23/10/2015-005
Tech: E

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	2.072	1.774	1.376	0.592	0.336	0.211	0.164	0.104	0.090	0.081	0.063	0.073
S/P		0.149	0.349	0.741	0.869	0.932	0.955	0.985	0.992	0.997	1.006	1.001
Result		Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.075	0.072	0.088	0.103	0.095	0.119	0.112	0.107	0.098	0.083	0.070	0.074
S/P		1.002	0.993	0.986	0.990	0.978	0.981	0.984	0.988	0.996	1.003	1.001
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.528	2.192	1.412	1.007	0.594	0.371	0.278	0.173	0.114	0.102	0.060	0.071
S/P	0.272	0.000	0.330	0.533	0.740	0.852	0.898	0.951	0.980	0.986	1.008	1.002
Result	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.069	0.073	0.079	0.079	0.103	0.110	0.088	0.095	0.118	0.082	0.078	0.061
S/P	1.003	1.001	0.998	0.998	0.986	0.982	0.993	0.990	0.978	0.996	0.998	1.007
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.821	2.189	1.842	1.005	0.652	0.328	0.265	0.153	0.116	0.102	0.052	0.068
S/P	0.626	0.000	0.115	0.534	0.711	0.873	0.905	0.961	0.979	0.986	1.012	1.004
Result	Pos!	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.075	0.071	0.068	0.069	0.083	0.090	0.093	0.092	0.094	0.079	0.086	0.091
S/P	1.000	1.002	1.004	1.003	0.996	0.992	0.991	0.991	0.990	0.998	0.994	0.992
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.909	2.053	1.628	0.758	0.635	0.354	0.170	0.154	0.095	0.090	0.052	0.065
S/P	0.582	0.010	0.222	0.658	0.720	0.860	0.952	0.960	0.990	0.992	1.012	1.005
Result	Pos!	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.074	0.073	0.068	0.061	0.063	0.079	0.065	0.101	0.070	0.073	0.101	0.079
S/P	1.001	1.001	1.004	1.007	1.006	0.998	1.005	0.987	1.003	1.001	0.987	0.998
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	ECPM	

Densidades ópticas del tratamiento: *E. coli* – Pimiento (Hora 22)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
24/10/2015

LABORATORIES

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 24/10/2015
Template: 24/10/2015-001
Tech: AS

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.332	1.114	0.883	0.349	0.197	0.141	0.192	0.089	0.084	0.077	0.064	0.072
S/P		0.173	0.356	0.779	0.899	0.944	0.903	0.985	0.989	0.994	1.005	0.998
Result		Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.070	0.072	0.086	0.085	0.076	0.090	0.080	0.072	0.066	0.075	0.070	0.077
S/P		0.998	0.987	0.988	0.995	0.984	0.992	0.998	1.003	0.996	1.000	0.994
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.920	1.538	0.891	0.591	0.320	0.218	0.172	0.219	0.100	0.090	0.060	0.071
S/P	0.326	0.000	0.349	0.587	0.802	0.883	0.919	0.882	0.976	0.984	1.008	0.999
Result	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.068	0.074	0.079	0.070	0.082	0.084	0.067	0.092	0.092	0.071	0.078	0.063
S/P	1.002	0.997	0.993	1.000	0.990	0.989	1.002	0.983	0.983	0.999	0.994	1.006
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.585	1.396	1.252	0.595	0.366	0.181	0.178	0.203	0.096	0.197	0.052	0.068
S/P	0.592	0.000	0.063	0.584	0.765	0.912	0.914	0.895	0.979	0.899	1.014	1.002
Result	Pos!	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.074	0.070	0.068	0.065	0.074	0.078	0.074	0.087	0.095	0.078	0.085	0.091
S/P	0.997	1.000	1.002	1.004	0.997	0.994	0.997	0.987	0.980	0.994	0.988	0.983
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.485	1.419	1.173	0.411	0.350	0.194	0.116	0.163	0.084	0.081	0.053	0.071
S/P	0.671	0.000	0.126	0.730	0.778	0.902	0.964	0.926	0.989	0.991	1.013	0.999
Result	Pos!	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.073	0.074	0.068	0.061	0.063	0.079	0.065	0.101	0.072	0.072	0.102	0.080
S/P	0.998	0.997	1.002	1.007	1.006	0.993	1.004	0.975	0.998	0.998	0.975	0.992
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	ECPM	

ANEXO 6: Densidades ópticas del tratamiento 3

Densidades ópticas del tratamiento: *S. aureus* – Ají Panca (Hora 0)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
23/10/2015

IDEXX LABORATORIES

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 23/10/2015
Template: 23/10/2015-002
Tech: E

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	*4.000	0.575	0.203	0.318	0.206	0.135	0.129	0.095	0.101	0.092	0.068	0.113
S/P		0.874	0.969	0.939	0.968	0.986	0.988	0.996	0.995	0.997	1.003	0.992
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.080	0.071	0.072	0.067	0.061	0.080	0.088	0.071	0.084	0.078	0.076	0.083
S/P		1.002	1.002	1.003	1.005	1.000	0.998	1.002	0.999	1.001	1.001	0.999
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.712	3.476	0.200	0.201	0.159	0.108	0.099	0.097	0.089	0.082	0.061	0.080
S/P	0.839	0.134	0.969	0.969	0.980	0.993	0.995	0.996	0.998	0.999	1.005	1.000
Result	Pos!	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.072	0.079	0.079	0.093	0.085	0.084	0.088	0.083	0.091	0.077	0.076	0.089
S/P	1.002	1.000	1.000	0.997	0.999	0.999	0.998	0.999	0.997	1.001	1.001	0.998
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.475	0.384	0.275	0.295	0.196	0.131	0.124	0.089	0.076	0.076	0.059	0.078
S/P	0.899	0.922	0.950	0.945	0.970	0.987	0.989	0.998	1.001	1.001	1.005	1.001
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.088	0.081	0.078	0.072	0.085	0.087	0.089	0.095	0.072	0.066	0.097	0.087
S/P	0.998	1.000	1.001	1.002	0.999	0.998	0.998	0.996	1.002	1.004	0.996	0.998
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.260	0.366	0.319	0.219	0.147	0.115	0.130	0.106	0.087	0.091	0.053	0.086
S/P	0.954	0.927	0.939	0.965	0.983	0.991	0.987	0.993	0.998	0.997	1.007	0.998
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.079	0.083	0.069	0.083	0.064	0.078	0.071	0.102	0.093	0.083	0.084	0.076
S/P	1.000	0.999	1.003	0.999	1.004	1.001	1.002	0.994	0.997	0.999	0.999	1.001
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	SAAP	

Densidades ópticas del tratamiento: *S. aureus* – Ají Panca (Hora 22)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
24/10/2015

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 24/10/2015
Template: 24/10/2015-003
Tech: AS

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	3.948	0.900	0.683	0.765	0.769	0.732	0.812	0.777	0.854	0.841	0.814	0.113
S/P		0.784	0.840	0.818	0.817	0.827	0.806	0.815	0.796	0.799	0.806	0.986
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.059	0.071	0.071	0.066	0.060	0.067	0.077	0.071	0.084	0.077	0.075	0.082
S/P		0.997	0.997	0.998	1.000	0.998	0.995	0.997	0.994	0.995	0.996	0.994
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.640	3.124	0.752	0.700	0.739	0.755	0.848	0.848	0.872	0.847	0.825	0.079
S/P	0.851	0.212	0.822	0.835	0.825	0.821	0.797	0.797	0.791	0.797	0.803	0.995
Result	Pos!	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.075	0.079	0.077	0.078	0.072	0.066	0.069	0.065	0.077	0.077	0.076	0.091
S/P	0.996	0.995	0.995	0.995	0.997	0.998	0.997	0.998	0.995	0.995	0.996	0.992
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.800	0.716	0.723	0.725	0.760	0.815	0.791	0.823	0.839	0.856	0.809	0.079
S/P	0.809	0.831	0.829	0.829	0.820	0.806	0.812	0.804	0.799	0.795	0.807	0.995
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.083	0.080	0.079	0.071	0.084	0.095	0.091	0.094	0.074	0.067	0.096	0.085
S/P	0.994	0.995	0.995	0.997	0.994	0.991	0.992	0.991	0.996	0.998	0.990	0.993
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.720	0.731	0.816	0.731	0.735	0.711	0.813	0.841	0.843	0.862	0.814	0.085
S/P	0.830	0.827	0.805	0.827	0.826	0.832	0.806	0.799	0.798	0.794	0.806	0.993
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.078	0.075	0.069	0.084	0.066	0.087	0.073	0.103	0.092	0.082	0.083	0.078
S/P	0.995	0.996	0.997	0.994	0.998	0.993	0.996	0.989	0.992	0.994	0.994	0.995
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	SAAP	

ANEXO 7: Densidades ópticas del tratamiento 4

Densidades ópticas del tratamiento: *S. aureus* – Pimiento (Hora 0)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
23/10/2015

IDEXX LABORATORIES

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 23/10/2015
Template: 23/10/2015-003
Tech: E

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	2.199	2.208	1.446	1.084	0.685	0.404	0.246	0.172	0.109	0.079	0.054	0.093
S/P		0.000	0.355	0.526	0.714	0.846	0.921	0.956	0.985	1.000	1.011	0.993
Result		Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.078	0.069	0.070	0.068	0.060	0.063	0.065	0.073	0.084	0.077	0.072	0.076
S/P		1.004	1.004	1.005	1.008	1.007	1.006	1.002	0.997	1.000	1.003	1.001
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	2.034	2.079	1.086	1.457	1.110	0.522	0.355	0.243	0.139	0.113	0.061	0.083
S/P	0.078	0.057	0.525	0.350	0.513	0.791	0.869	0.922	0.971	0.983	1.008	0.998
Result	Neg	Neg	Pos!	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.070	0.078	0.081	0.081	0.074	0.081	0.077	0.067	0.081	0.078	0.074	0.091
S/P	1.004	1.000	0.999	0.999	1.002	0.999	1.000	1.005	0.999	1.000	1.002	0.994
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	2.177	2.210	1.743	0.885	0.681	0.399	0.217	0.146	0.096	0.079	0.057	0.078
S/P	0.010	0.000	0.215	0.620	0.716	0.849	0.934	0.968	0.992	1.000	1.010	1.000
Result	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.089	0.083	0.079	0.072	0.084	0.090	0.090	0.102	0.075	0.067	0.098	0.083
S/P	0.995	0.998	1.000	1.003	0.997	0.994	0.994	0.989	1.001	1.005	0.991	0.998
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.143	2.219	1.515	1.060	0.601	0.551	0.252	0.222	0.140	0.099	0.062	0.081
S/P	0.498	0.000	0.322	0.537	0.753	0.777	0.918	0.932	0.971	0.990	1.008	0.999
Result	Pos!	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.071	0.067	0.066	0.074	0.062	0.083	0.071	0.103	0.094	0.083	0.084	0.072
S/P	1.003	1.005	1.006	1.002	1.008	0.998	1.003	0.988	0.992	0.998	0.997	1.003
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	SAPM	

Densidades ópticas del tratamiento: *S. aureus* – Pimiento (Hora 22)

Laboratorio de virología
FMV-UNMSM
Virología
24/10/2015

Plate Listing

Assay: PRRSX3 (User)
Date: 24/10/2015
Template: 24/10/2015-002
Tech: AS

Plate - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Row A	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.312	1.247	0.825	0.635	0.505	0.480	0.611	0.696	0.768	0.765	0.820	0.095
S/P		0.053	0.394	0.548	0.653	0.674	0.568	0.499	0.440	0.443	0.398	0.985
Result		Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Neg	Pos!
Row B	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.077	0.069	0.070	0.067	0.058	0.063	0.066	0.072	0.082	0.077	0.072	0.077
S/P		1.006	1.006	1.008	1.015	1.011	1.009	1.004	0.996	1.000	1.004	1.000
Result		Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.434	1.264	0.529	0.722	0.592	0.504	0.616	0.656	0.728	0.744	0.855	0.083
S/P	0.000	0.039	0.634	0.478	0.583	0.654	0.564	0.531	0.473	0.460	0.370	0.995
Result	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Neg	Pos!
Row D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.069	0.077	0.085	0.081	0.068	0.080	0.073	0.065	0.079	0.076	0.076	0.091
S/P	1.006	1.000	0.994	0.997	1.007	0.998	1.003	1.010	0.998	1.001	1.001	0.989
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row E	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.191	1.286	1.116	0.516	0.449	0.498	0.641	0.683	0.738	0.748	0.784	0.078
S/P	0.098	0.021	0.159	0.645	0.699	0.659	0.543	0.509	0.465	0.457	0.428	0.999
Result	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row F	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.089	0.077	0.081	0.072	0.084	0.090	0.089	0.099	0.073	0.068	0.097	0.084
S/P	0.990	1.000	0.997	1.004	0.994	0.989	0.990	0.982	1.003	1.007	0.984	0.994
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!
Row G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1.007	1.287	1.009	0.605	0.471	0.483	0.566	0.652	0.770	0.776	0.851	0.081
S/P	0.247	0.020	0.245	0.572	0.681	0.671	0.604	0.534	0.439	0.434	0.373	0.997
Result	Neg	Neg	Neg	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Neg	Pos!
Row H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0.070	0.067	0.067	0.077	0.063	0.085	0.071	0.102	0.096	0.083	0.084	0.072
S/P	1.006	1.008	1.008	1.000	1.011	0.994	1.005	0.980	0.985	0.995	0.994	1.004
Result	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!	Pos!

Code	Assay	Count	Case	Comment
A	PRRSX3	94	SAPM	