



Universidad Norbert Wiener

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Efecto antibacteriano a diferentes concentraciones del
extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens*
“rocoto” en cepas estándares**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

Presentado por:

Br. Carhuacho Gonzáles, Pedro Edgar

Br. Huarcaya Estrada, Jhon Wilfredo

Asesor:

Dra. Chávez Flores, Juana Elvira

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar con mis objetivos.

A mi esposa Carol y mi hija Alondra quienes me alentaron a seguir adelante sobre todo en los momentos más difíciles.

A mi madre María Victoria por su apoyo incondicional, durante los años de estudio, ha sido la persona quien ha velado por mis bienes económicos. A mi suegra Ana Aguilera por su dedicación y atención para con mi familia durante estos años.

Br. Pedro Edgar Carhuancho Gonzales

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme en cada paso de mi vida, dándome salud y la fuerza para seguir adelante en los momentos más difíciles.

A mis padres Alfredo y Fany, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera, por sus consejos que me orientaron a tomar las mejores decisiones y por creer en mí.

A mi novia Melissa por su paciencia y sus palabras de aliento a lo largo de mi carrera, las cuales han motivado lograr este objetivo.

A mis hermanos porque siempre están presente apoyando de manera constante para poder superarme cada día más y así poder luchar para un futuro mejor.

Br. Jhon Wilfredo Huarcaya Estrada

AGRADECIMIENTO

A nuestra alma mater la Universidad Norbert Wiener por brindarnos todas las facilidades para el desarrollo de la tesis.

Nuestro agradecimiento a nuestra asesora Dra. Juana Elvira Chávez Flores ya que sin su tutela y guía la presente tesis no se hubiera desarrollado. Gracias por sus sabios consejos, su amistad, su entrega, su dedicación, comprensión, tiempo y por compartir sus sabias experiencias académicas.

Agradecemos a los docentes de la Universidad en especial a la Dra. Marilú Jaramillo por dedicar su tiempo y siempre dispuesta a apoyarnos.

A nuestro jurado por dedicarnos su espacio de tiempo para corregir nuestra investigación.

Al laboratorio de material didáctico por el apoyo brindado en facilitarnos los materiales y equipos ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de tesis nuestro más profundo agradecimiento.

Br. Carhuancho Gonzáles, Pedro Edgar

Br. Huarcaya Estrada, Jhon Wilfredo

A los miembros del jurado examinador y calificador por sus consejos y sugerencias durante la evaluación del presente trabajo:

Presidente : Dr. Enrique León Soria
Secretaria : Mg. Jaramillo Briceño Marilú Ricardina
Vocal 1 : Mg. Justil Guerrero Hugo Jesús
Suplente : Q.F. Ramos Jaco Antonio Guillermo

Muy agradecidos.

Br. Pedro Edgar Carhuancho Gonzales

Br. Jhon Wilfredo Huarcaya Estrada

GLOSARIO

Término	Sigla/abreviatura
Tricloruro de aluminio	AlCl₃
American Type Culture Collection	ATCC
Benceno	Bz
Cloroformo	CHCl₃
Etanol	EtOH
Acetato de etilo	EtOAc
Éter etílico	Et₂O
Éter petróleo	EP
Tricloruro férrico	FeCl₃
Grados Celsius	°C
Agua	H₂O
Milímetro	mm
Metanol	MeOH
Organización Mundial De La Salud	OMS
Microlitro	μL
Unidad formadora de colonia	UFC

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Justificación	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1. Objetivo general	4
1.4.2. Objetivos específicos	4
1.5. Variables	4
1.5.1. Variable independiente	4
1.5.2. Variable dependiente	4
1.6. Hipótesis	4
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes de la investigación	5
2.1.1 Antecedentes a nivel Internacional	5
2.1.2 Antecedentes a nivel Nacional	6
2.2. Generalidades	8
2.2.1. Actividad antimicrobiana de las plantas medicinales	8
2.2.2. Género <i>Capsicum</i>	8
2.2.3. Características principales del <i>Capsicum pubescens</i>	9
2.2.4. <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	10
2.2.5. Clasificación sistemática de la especie <i>Capsicum pubescens</i>	11
2.2.6. Descripción botánica del <i>Capsicum pubescens</i>	11
2.2.7. Composición química del “rocoto”	12

2.2.8. Beneficios y propiedades del “rocoto”	14
2.3. Microorganismos empleados en el estudio	15
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.3.2. <i>Escherichia coli</i>	18
2.4. Método de extracción	21
2.4.1. Lixiviación (percolación)	21
2.5. Métodos antibacterianos	21
2.5.1. Difusión en agar	22
2.5.2. Modificado de pozos en agar	22
III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	23
3.1. Tipo de estudio	23
3.2. Población	23
3.2.1. Población vegetal	23
3.2.2. Muestra vegetal	23
3.2.3. Criterios de inclusión	23
3.2.4. Criterios de exclusión	23
3.2.5. Población bacteriana	23
3.2.6. Materiales de laboratorio para la obtención del extracto etanólico por lixiviación	24
3.2.7. Materiales para el análisis cualitativo del extracto del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	24
3.2.8. Solventes y reactivos para el análisis de solubilidad y análisis cualitativo	25
3.2.9. Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo	26

3.3. Métodos	27
3.3.1. Recolección y procesamiento del espécimen vegetal	27
3.3.2. Preparación del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” por el método de percolación	28
3.3.3. Prueba de solubilidad del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	32
3.3.4. Análisis cualitativo fitoquímico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	32
3.3.5. Preparación del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” a diferentes concentraciones.	33
3.3.6. Obtención de los microorganismos	33
3.3.7. Preparación de los inóculos bacterianos	34
3.3.8. Inoculación de las placas	35
3.3.9. Métodos de difusión en disco Kirby – Bauer	36
3.3.10. Método modificado de pozos en agar	36
3.3.11. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición	38
3.3.12. Clasificación de la actividad microbianas según el porcentaje de inhibición	38
IV. RESULTADOS	39
4.1. Prueba de solubilidad del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	39
4.2. Análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	40

4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	42
4.4. Técnicas para el procesamiento de datos y análisis de resultados	44
4.5. Análisis e interpretación de resultados	44
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
IX. ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Prueba de solubilidad del extracto etanólico del fruto del <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” (10mg de extracto / 1 mL de solvente).	39
Tabla 2. Análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> (20 mg del extracto del fruto / 1 mL de solvente)	40
Tabla 3. Medidas de los halos de inhibición del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> al 25, 50 y 100% en cepas estándares por el método de kirby – Bauer.	42
Tabla 4. Medidas de los halos de inhibición del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> al 25, 50 y 100% en cepas estándares por el método de modificado en pozos de agar.	43
Tabla 5. Medidas de los halos de inhibición del control positivo Oxacilina 1 µg y Ciprofloxacino 5 µg y control negativo agua destilada.	43
Tabla 6. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”, frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , según diámetro de la zona de inhibición por el método de Kirby - Bauer.	45
Tabla 7. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”, frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , según diámetro de la zona de inhibición por el método modificado de pozos en agar.	46

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Metabolitos con actividad antimicrobiana presentes en plantas medicinales	8
Cuadro 2. Taxonomía de <i>Staphylococcus aureus</i> .	15
Cuadro 3. Taxonomía de <i>Escherichia coli</i> .	18
Cuadro 4. Reactivos utilizados en el análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto del <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	32
Cuadro 5. Clasificación de la actividad antimicrobiana.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diversidad de frutos del género <i>Capsicum</i> .	9
Figura 2. Características de flor y fruto para diferentes especies del género <i>Capsicum</i> .	12
Figura 3. Molécula de capsaicina.	13
Figura 4. Molécula de dihidrocapsaicina.	14
Figura 5. <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”.	27
Figura 6. Lavado, trozado y secado de <i>Capsicum pubescens</i> .	28
Figura 7. Pulverizado, tamizado de <i>Capsicum pubescens</i> .	29
Figura 8. Percolado con solvente etanólico al 96 %, preparación del extracto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” a partir del percolador.	29
Figura 9. Extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”.	30
Figura 10. Prueba de solubilidad y análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”.	31
Figura 11. Extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” al 25, 50 y 100 %.	33
Figura 12. Cepas estándares ATCC.	34

Figura 13.	Cepas estándares ATCC comparada a la escala de Mac Farland N° 0,5.	35
Figura 14.	Inoculación de cepas estándares de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus subtilis</i> , en agar Muller Hinton	36
Figura 15.	Discos de sensibilidad en blanco.	37
Figura 16.	Discos de sensibilidad control positivo (ciprofloxacino y oxacilina).	37
Figura 17.	Prueba de solubilidad del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”.	39
Figura 18.	Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”.	41

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Ubicación sistemática del <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	56
Anexo 2. Muestra recolectada del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” en proceso de lavado.	57
Anexo 3. Secado del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto” previamente trozado.	57
Anexo 4. Pulverizado y tamizado del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	58
Anexo 5. Armado del equipo casero de lixiviación para la obtención del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	58
Anexo 6. Obtención de extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	59
Anexo 7. Reactivos para realizar la prueba de solubilidad	59
Anexo 8. Reactivos para realizar el análisis cualitativo fitoquímico	60
Anexo 9. Siembra de cepas estándares en agar Müller Hinton	60
Anexo 10. Reconocimiento de alcaloides del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	61
Anexo 11. Reconocimiento de flavonoides del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	61

Anexo 12.	Reconocimiento de compuestos fenólicos del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	62
Anexo 13.	Reconocimiento de taninos del extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	62
Anexo 14.	Medidas de halos de inhibición por el método de Kirby Bauer	63
Anexo 15.	Medición de halos de inhibición por el método modificado de pozos de agar	63
Anexo 16.	Lámpara UV visible marca CAMAG	65
Anexo 17.	Identificación de flavonoides con el reactivo de AlCl ₃ . (Observación del halo amarillo)	65

RESUMEN

El fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” posee valiosas propiedades como protector gástrico, antiinflamatorio, antimicrobiano. La presente investigación, tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” sobre cepas estándares. El extracto etanólico se preparó por el método de lixiviación (percolación) a concentraciones de 25, 50 y 100%, se realizó la prueba de solubilidad y el análisis cualitativo fitoquímico. La actividad antimicrobiana se evaluó por triplicado en cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 por el método de difusión en disco (Kirby- Bauer) y el método modificado en pozos de agar, se midió los halos con vernier. Los controles positivos fueron discos de Oxacilina 1 µg y Ciprofloxacino 5 µg. El extracto fue soluble en agua destilada, etanol y metanol. En el análisis cualitativo fitoquímico se determinaron flavonoides, alcaloides, taninos y compuestos fenólicos. Los halos de inhibición obtenidos por el método de Kirby Bauer fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 7,5, 11, y 12 mm, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 10,3, 12,8 y 15,9 mm y *Escherichia coli* ATCC 25922 no presentó halo de inhibición a las concentraciones de 25, 50, y 100% respectivamente. Los halos de inhibición obtenidos por el método modificado de pozos en agar fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 16,8, 18,4 y 19,2 mm, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 12,8, 15,9 y 17,5 mm y *Escherichia coli* ATCC 25922 no presentó halos de inhibición a las concentraciones de 25, 50, y 100% respectivamente. Se concluyó que el efecto antibacteriano solo se presentó para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633, observándose mayor efecto inhibitorio con el método modificado de pozos de agar.

Palabras Clave: *Capsicum pubescens*, rocoto, extracto etanólico, lixiviación, actividad antibacteriana, Kirby Bauer, modificado de pozos en agar.

ABSTRACT

The fruit of *Capsicum pubescens* "rocoto" has valuable properties as a gastric protector, anti-inflammatory, antimicrobial. The objective of the present investigation was to evaluate the antibacterial effect of the ethanolic extract of the fruit of *Capsicum pubescens* "rocoto" on standard strains. The ethanolic extract was prepared by the leaching method (percolation) at concentrations of 25, 50 and 100%, the solubility test and the qualitative phytochemical analysis were carried out. The antimicrobial activity was evaluated in triplicate in strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 by the disk diffusion method (Kirby-Bauer) and the modified method in agar wells, halos were measured with vernier. The positive controls were 1 µg Oxacillin and 5 µg Ciprofloxacin discs. The extract was soluble in distilled water, ethanol and methanol. In the qualitative phytochemical analysis, flavonoids, alkaloids, tannin and phenolic compounds were determined. The inhibition halos obtained by the Kirby Bauer method were: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 7.5, 11, and 12 mm, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 10.3, 12.8 and 15.9 mm and *Escherichia coli* ATCC 25922 did not present Halo inhibition at concentrations of 25, 50, and 100% respectively. The inhibition halos obtained by the modified method of agar wells were: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 16.8, 18.4 and 19.2 mm, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 12.8, 15.9 and 17.5 mm and *Escherichia coli* ATCC 25922 did not present inhibition halos at concentrations of 25, 50, and 100% respectively. It was concluded that the antibacterial effect only occurred for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, observing a greater inhibitory effect with the modified method of agar wells.

Keywords: *Capsicum pubescens*, rocoto, ethanolic extract, leaching, antibacterial activity, Kirby Bauer, modified from agar wells.

I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Estas bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones en el ser humano, la resistencia a los antibióticos hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad. Se pueden adoptar medidas en todos los niveles de la sociedad para reducir el impacto de este fenómeno y limitar su propagación, una de esas medidas en el sector de la salud es invertir en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, vacunas, productos para diagnósticos y otros instrumentos.¹

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 como diversas investigaciones se orientan al aprovechamiento de moléculas de origen vegetal con capacidad de contener compuestos químicos que presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos y virus.²

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, muchas de sus especies vegetales pueden ser aprovechadas de forma sostenible por la industria, uno de los géneros cuyo uso se ha extendido a casi todas las regiones del Perú es *Capsicum* que comprende las siguientes especies: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, y *Capsicum pubescens* “rocoto”, siendo esta última una de las especies más cultivadas. Generalmente las zonas de producción son los valles andinos y la época de siembra es todo el año requiriendo un clima templado. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios.^{3,4}

Por ello el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

1.1 Planteamiento del problema

En el ámbito de la medicina moderna es alarmante la generación de resistencia de los microorganismos a distintos antibióticos en las terapias de las enfermedades respiratorias y de las vías urinarias, esto genera la necesidad de encontrar nuevos compuestos que inhiban los mecanismos de resistencia de los microorganismos, principalmente aquellos de importancia clínica. Las plantas medicinales representan una alternativa muy importante para aislar nuevos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas.

La población usa en forma tradicional las plantas medicinales como alternativa para aliviar sus problemas de salud, cumpliendo un rol fundamental en la medicina tradicional.

El género *Capsicum* pertenece a la gran familia de las *Solanáceas*, que tiene una importancia sobresaliente desde el punto de vista cultural y económico. Los géneros más importantes de la familia *Solanáceas* son: *Solanum*, *Lycopersicum*, *Nicotiana*, *Muricatum*, *Datura*, *Physalis*, *Cyphomandra* y *Capsicum*. El género *Capsicum* tiene cerca de 30 especies en las regiones tropicales y subtropicales, sobre todo de América, de los cuales 9 especies son nativas del Perú, 8 especies son cultivadas y una es endémica. Una de las especies cultivadas es el Rocoto cuyo nombre científico es *Capsicum pubescens*, generalmente las zonas de producción son los valles andinos y la época de siembra es todo el año requiriendo un clima templado.^{3,4}

Capsicum pubescens “rocoto” es utilizado para el tratamiento de las úlceras, la gastritis, además tiene propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas y antimicrobiana, esto debido a los compuestos fenólicos que contienen y que muestran actividad antibacteriana. Los extractos de esta especie presentan una gran cantidad de componentes activos, entre los que se encuentran los capsaicinoides.^{5,6}

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” en cepas estándares.

1.2 Formulación del problema

¿Presentara efecto antibacteriano el extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” a diferentes concentraciones frente a cepas estándares?

1.3 Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que en los países de América debido a un alto porcentaje de automedicación los principales problemas vinculados a la resistencia microbiana pasan por las infecciones adquiridas en la comunidad, especialmente cierto tipo de infecciones urinarias o respiratorias que ya no responden a los antibióticos de rutina, por esta causa en la actualidad se requieren medicamentos más complejos y caros.⁷

Se conoce el efecto antibacteriano del extracto etanólico de distintas especies del género *Capsicum*, sin embargo, no se conoce el estudio antibacteriano del extracto etanólico de la especie *Capsicum pubescens* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* porque estas cepas son causantes de las infecciones más frecuentes. Según la OMS *Escherichia coli* es causante del 75 - 80 % de infecciones urinarias⁸ y *Staphylococcus aureus* es causante del 70 % de infecciones de vías respiratorias⁹. Debido a esto es necesario abordar el tratamiento de dichas infecciones con productos naturales ya que *Capsicum pubescens* “rocoto” es utilizada de manera cotidiana en la gastronomía peruana.

Este estudio pretende revalorar el uso tradicional del rocoto proponiéndolo como una alternativa de tratamiento de uso medicinal.

1.4 Objetivos:

1.4.1 Objetivo general:

Determinar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” frente a cepas estándares.

1.4.2 Objetivos específicos:

1. Identificar cualitativamente los metabolitos presentes en el extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”.
2. Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” al 25, 50 y 100 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.
3. Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” al 25, 50 y 100 % frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
4. Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” al 25, 50 y 100 % frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

1.5 Variables

1.5.1 Variable Independiente

- Extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

1.5.2 Variable Dependiente

- Efecto antibacteriano

1.6 Hipótesis

La concentración del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” influye sobre su efecto antibacteriano frente a cepas estándares.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

2.1.1 Antecedentes a nivel Internacional

Colivet J, Belloso G, (2006)¹⁰, realizaron la investigación titulada “Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus* sp” cuyo **objetivo** fue comprobar el posible efecto antimicrobiano del ají dulce. La investigación fue de tipo experimental, utilizando el **método** de difusión en agar, **los resultados fueron**: Los extractos con ají dulce verde secados a 100°C tuvieron un efecto inhibitor mayor para *Escherichia coli* que los obtenidos con ají secado a 70°C, en los extractos del ají secado entero fueron los que presentaron mayor poder inhibitorio del crecimiento de *Bacillus* sp, además, también se mostró que el extracto obtenido con ají secado entero a 100°C fue más inhibitorio (16,82 mm) que el obtenido con el ají secado entero a 70°C (12,25 mm), lo que permitió inferir que a 70°C los compuestos que podrían inhibir la actividad de los microorganismos se ven disminuido en su acción. **Se concluyó**, que los extractos etanólicos del ají verde fueron los únicos que presentaron actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Bacillus* sp., además la temperatura de secado y el corte tuvieron efecto significativo sobre la actividad antimicrobiana. El extracto de ají secado a 100 °C produjo mayor halo de inhibición sobre *Escherichia coli* que los obtenidos con ají secado a 70 °C.

López E, Lobato C, (2011)¹¹, realizaron la investigación titulada “Extracción y cuantificación espectrofotométrica de capsaicina a partir de chile habanero” cuyo **objetivo** fue comparar dos métodos de extracción de oleorresina a partir de chile habanero y evaluar la concentración de capsaicinoides presente en los extractos obtenidos. Para la obtención de la oleorresina se desarrolló con el **método** de lixiviación con etanol a 60 ° y extracción Soxhlet con acetato de etilo, se cuantificaron la cantidad de capsaicinoides presentes en cada uno de los extractos obtenidos. Los **resultados** obtenidos muestran que el método Soxhlet permite una mayor extracción de oleorresina, el proceso de lixiviación fue más selectivo para obtener capsaicinoides, puesto que éstos se encuentran en una mayor concentración en la oleorresina que se obtiene por lixiviación con etanol que en aquella extraída con acetato de etilo

empleando la técnica Soxhlet. **En conclusión**, la lixiviación con etanol fue el método más adecuado para obtener capsaicinoides a partir de chile habanero.

Cerón T, Munguía R. (2014)¹², realizaron la investigación titulada “Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*)” cuyo **objetivo** fue determinar el efecto antibacteriano de los extractos de tres especies de chile: Poblano, Habanero y Serrano (*Capsicum annuum* var *annuum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum annuum* L. *Acuminatum*) frente a *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* y *Penicillium* sp. La investigación fue de tipo experimental, se desarrolló por el **método** de Kirby–Bauer para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos. Los **resultados fueron**: El extracto de chile Habanero presentó el mayor efecto inhibitorio para los microorganismos estudiados, debido seguramente a componentes específicos en esta especie de chile, como es el caso de un péptido presente en las semillas que presenta efecto antimicrobiano. Se ha probado que los extractos etanólicos de *Capsicum chinense* verde tienen efecto inhibitorio debido a compuestos activos solubles en etanol. **En conclusión**, los extractos de chile habanero (*Capsicum chinense*) en el tercer estado de maduración presentó mayor efecto antimicrobiano para diversos tipos de microorganismos frente a *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* y *Penicillium* sp debido a los compuestos capsaicinoides.

2.1.2 Antecedentes a nivel Nacional

Salazar E, (2016)¹³, realizó la tesis titulada “Efecto bacteriostático y bactericida de extractos de ají panca (*Capsicum chinense*) y pimienta (*Capsicum annuum* var. *annuum*) sobre cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923” de la UNMSM para obtener el título profesional de médico veterinario, cuyo **objetivo** fue evaluar la actividad bacteriostática y bactericida de las oleorresinas de ají panca y pimienta. La investigación fue de tipo experimental, para la obtención de la oleorresina se desarrolló con el **método** de extracción Soxhlet y maceración pasiva. Los resultados obtenidos mostraron que no existe efecto bacteriostático del extracto de ají panca (*Capsicum chinense*) y pimienta (*Capsicum annuum* var. *annuum*) sobre cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923” finalmente el efecto bactericida para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fue observado con el extracto de pimienta a concentraciones de 6,25, 12,5 y 25%, en

conclusión, las oleorresinas de ají panca y de pimienta no presentaron actividad bacteriostática a concentraciones menores al 25% para ninguna de las cepas estudiadas, pero es posible que la concentración inhibitoria mínima se manifieste en soluciones de concentración superior, 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.

Villavicencio B, (2016)¹⁴, realizó la tesis titulada “Caracterización químico nutricional y actividad antioxidante de dos muestras de *Capsicum pubescens* (Rocoto rojo y amarillo) provenientes de Villa Rica (Pasco)” de la Universidad Cayetano Heredia para obtener el título de Químico Farmacéutico, cuyo **objetivo** fue realizar la caracterización químico-nutricional y de actividad antioxidante de dos variedades de rocoto, rojo y amarillo que se cultivan en Villa Rica, Pasco. Para ambas muestras de rocoto, el porcentaje de humedad fue alto (92%). No hubo diferencias en el contenido en base seca de proteínas (15,5%) y grasa (1,8%), pero respecto al contenido de carbohidratos, el rocoto rojo tuvo mayor porcentaje que el amarillo (55,3% versus 51,3%). En cuanto al contenido de fibra y ceniza el rocoto amarillo presentó mayor porcentaje (21 y 10,3%, respectivamente) en comparación con el rojo (18 y 9,3%, respectivamente). El contenido de capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) fue determinado tanto en pulpa como en placenta + semillas por medio de HPLC. Para ambas muestras, el contenido de capsaicinoides fue menor en la pulpa, siendo la dihidrocapsaicina el capsaicinoide de mayor concentración. El contenido total de capsaicinoides del rocoto amarillo fue mayor al del rojo tanto en pulpa (101,6 vs. 35,25 µg/g muestra fresca) como en placenta + semillas (893,5 vs. 340,3 µg/g muestra fresca). La actividad antioxidante *in vitro*, determinada a través del ensayo ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), muestra que el rocoto amarillo tiene mayor actividad que el rocoto rojo.

2.2 GENERALIDADES

2.2.1 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. ¹⁵

En el cuadro Nro. 1 se resume los principales grupos químicos con actividad antimicrobiana ampliamente demostrada por diversos estudios.

Cuadro 1. Metabolitos con actividad antimicrobiana presentes en plantas medicinales ¹⁶.

Metabolito	Planta	Actividad
Fenoles simples	Tomillo (<i>Thymus officinalis</i>) Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	General <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella sp</i>
Quinonas	Hipérico (<i>Hypericum perforatum</i>)	VIH
Taninos	Roble (<i>Quercus rubra</i>) Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>) Melisa (<i>Melissa officinalis</i>)	Bacteriales civiles
Cumarinas	Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)	Virus
Flavonas	Té (<i>Camellia sinensis</i>) Roble (<i>Quercus rubra</i>)	<i>Shiguella sp.</i> <i>Vibrio sp.</i>
Alcaloides	Coca (<i>Erythroxylum coca</i>) Pimienta (<i>Piper nigrum</i>) Ají (<i>Capsicum sp.</i>)	Gram positivos Hongos, <i>Lactobacillus</i> Bacterias y hongos

2.2.2 Género *Capsicum*

El género *Capsicum* es originario de América, teniendo su centro de origen en la parte sur central de Bolivia, de donde se expandió a las zonas tropicales, subtropicales y templadas, para luego migrar a los Andes y tierras bajas de la Amazonía. Diversos procesos de especiación y radiación permitieron la formación de nuevas especies y la sobrevivencia de estas en estos nuevos ecosistemas.

El género *Capsicum* presenta más de 25 especies, de las cuales cinco son cultivadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens*. *Capsicum pubescens* se originó en las tierras altas andinas, *Capsicum baccatum* se originó en las zonas relativamente secas del sur centro de Bolivia y regiones adyacentes y *Capsicum annuum* se originó en hábitats más húmedos de las tierras bajas tropicales de América del Sur y Central. El complejo *annuum* fue domesticado al menos dos veces, un tipo *Capsicum annuum* en México y *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens* en la Amazonía. ¹⁷ En la figura 1 se observan las diferentes especies de *Capsicum*.



Figura 1. Diversidad de frutos del género *Capsicum* ¹⁸.

2.2.3 Características principales del género *Capsicum*

La capsaicina, cuya fórmula empírica es $C_{18}H_{27}NO_3$, es la sustancia alcaloide responsable de la pungencia de los ajíes. Se sabe que la capsaicina no es un compuesto simple, sino que se trata de una mezcla de varias amidas a las que se les conoce con el nombre de capsaicinoides. En cuanto a su distribución en el fruto, la capsaicina se encuentra principalmente en la placenta y su herencia está gobernada por un gen dominante. ¹⁹

Pero también existen condiciones ambientales que determinan la pungencia de los frutos; si durante su ciclo de producción las plantas de ajíes pasan por etapas de sequía o de calores fuertes tienden a producir frutos más picantes, que otras cultivadas bajo condiciones más controladas, así como también las altas temperaturas nocturnas afectan el grado de picor de los ajíes, haciendo que los frutos sean más ácidos y amargos de sabor. Se consideran también factores morfológicos que determinan la pungencia, como el tamaño del fruto, en donde por lo general, los ajíes de frutos pequeños pican más que los ajíes de frutos grandes; y la ubicación de los frutos en la planta, en donde aquellos frutos que se forman en la parte inferior de la planta (los que maduran primero) tienden ser más picantes que los que brotan en la parte superior.¹⁹

La pungencia de los ajíes es medida en grados o unidad Scoville. En 1912, Wilbur Scoville asignó un valor de cero a los ajíes dulces (que no pican) y en el otro extremo de la escala ubicó a la capsaicina a la que le dio un valor de dieciséis millones, como la sustancia más picante.²⁰

Una de las primeras reacciones al momento de ingerir un ají es la sensación de un calor placentero el cual luego se extiende por todo el cuerpo. Cuando resulta ser demasiado picante, nos puede provocar un fuerte ardor en la boca y en la garganta, lágrimas en los ojos, flujo nasal y sudoración en la frente y el cuello. Estas sensaciones se registran en los receptores del dolor, localizados en la boca, la nariz y el estómago. El consumo repetido de ají llega a desensibilizar los receptores de dolor y crea una tolerancia hacia lo picante.²¹

2.2.4 *Capsicum pubescens* “rocoto”

La especie *Capsicum pubescens* es llamado comúnmente “rocoto” en países como son Perú y Chile. Locoto es el nombre utilizado en Bolivia derivado del quechua rukutu o luqutu, pimienta también es un nombre utilizado para diferentes clases de *Capsicum pubescens* y *Capsicum annuum* en Argentina, chile de cera, chile manzano es el nombre utilizado en México.²²

Las zonas de producción son los valles andinos, la época de siembra es todo el año teniendo como ámbito un clima templado, favoreciendo una temperatura óptima que fluctúa entre los 18 a 20° C con una humedad relativa baja.²³ En base a la primera

clasificación hecha para el *Capsicum pubescens* por Ruiz y Pavón en 1794, en un estudio que demoró un promedio de 7 años, se pudo clasificar el rocoto de la forma mostrada en la tabla taxonómica.²³

2.2.5 Clasificación sistemática de la especie *Capsicum pubescens* (anexo 1)

La clasificación sistemática de la planta se realizó en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), según el sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

Reino	: Vegetal
Phyllum	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Solanales
Familia	: Solanáceae
Género	: <i>Capsicum</i>
Especie	: <i>Capsicum pubescens</i> Ruiz & Pavon
Nombre vulgar	: rocoto

2.2.6 Descripción botánica del *Capsicum pubescens*

El género *Capsicum* comprende un conjunto de plantas semi arbustivas perennes, pero de cultivo anual. Alcanza entre 0,3 y 1,5 metros de altura, dependiendo principalmente de la variedad, de las condiciones climáticas y de la fertilización. La inflorescencia está constituida por flores hermafroditas, pentabuladas con cinco anteras soldadas y un estigma. La longitud del estilo puede variar de acuerdo con la variedad o especie. En los tipos silvestres el estilo es más largo que los estambres, longistilas; mientras que, en las domesticadas, es usualmente más corto, brevistilas. Las especies cultivadas se consideran autógamas. Sin embargo, existen altos porcentajes de polinización cruzada.²⁴ El género *Capsicum* presenta diferentes colores de flor. En especies de este género, se definen dos grupos de flores: blancas y púrpuras. En el grupo de flores blancas hay dos subgrupos: El constituido por *Capsicum baccatum* y el que agrupa a *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*. El grupo de flores

púrpuras se encuentran la especie *Capsicum pubescens*.²⁵ En la figura 2 se pueden apreciar algunas características del género *Capsicum*.



Figura 2. Características de flor y fruto para diferentes especies del género *Capsicum*. Línea superior (izquierda a derecha): Flores de *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccatum*, y *Capsicum pubescens*. Línea inferior (izquierda a derecha): frutos de *Capsicum annuum* (cv Jalapeno), *Capsicum frutescens* (cv Tabasco) *Capsicum baccatum*, y *Capsicum pubescens* ²⁶.

2.2.7 Composición Química del “rocoto”

Los rocotos presentan una enorme variedad de compuestos, muchos de ellos con unas marcadas propiedades antioxidantes e importantes efectos biológicos. ²⁷ Los niveles de estos compuestos pueden variar dependiendo de la variedad de rocoto de que se trate, del estado de maduración que presente o de las condiciones de crecimiento que haya tenido. El componente mayoritario de los rocotos está representado por los hidratos de carbono. También contiene proteínas en pequeña cantidad y muy pocos lípidos. ²⁸

Los rocotos rojos constituyen una fuente buena de vitamina C, vitamina A y licopeno, constituyéndose en uno de los alimentos desintoxicantes más importantes. ²⁷ De hecho, si comparamos con los cítricos (naranjas, limones, pomelos, etc.), los rocotos nos

proporcionan más del doble de vitamina C, por peso de fruto. También son una fuente vegetal rica en vitamina A y, en menor medida, en otras como E, B1 y ácido fólico.²⁹

Los capsaicinoides son los compuestos que le dan el sabor picante a los frutos del género *Capsicum*, los cuales son un grupo de amidas ácidas formados a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono, entre los cuales destacan dos capsaicinoides.

La capsaicina es un alcaloide de fórmula $C_{18}H_{27}O_3 N$ que es sólido a temperatura ambiente (punto de fusión $64^{\circ}C$). Su nombre IUPAC es (E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnon-6-enamida. Juntamente con la dihidrocapsaicina (capsaicina que ha perdido el doble enlace por hidrogenación), forman el 90% de todos los compuestos responsables del picor del ají y los pimientos.³⁰

La Capsaicina, con formula (6E)-N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-8-metil-6-enamida tal como se presenta en la figura 3, representa aproximadamente el 80 % de los capsaicinoides totales presentes en las variedades picantes del género *Capsicum*.³¹

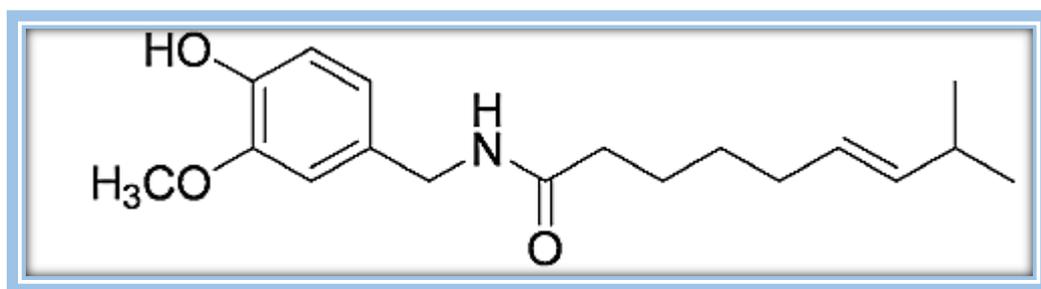


Figura 3. Molécula de capsaicina³¹.

La dihidrocapsaicina, con formula N-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl]-8-methylnonanamide tal como se presenta en la figura 3, es un dihidro derivado de la Capsaicina, esta representa por lo general el 20% de los capsaicinoides totales presentes en las variedades picantes del género *Capsicum*.

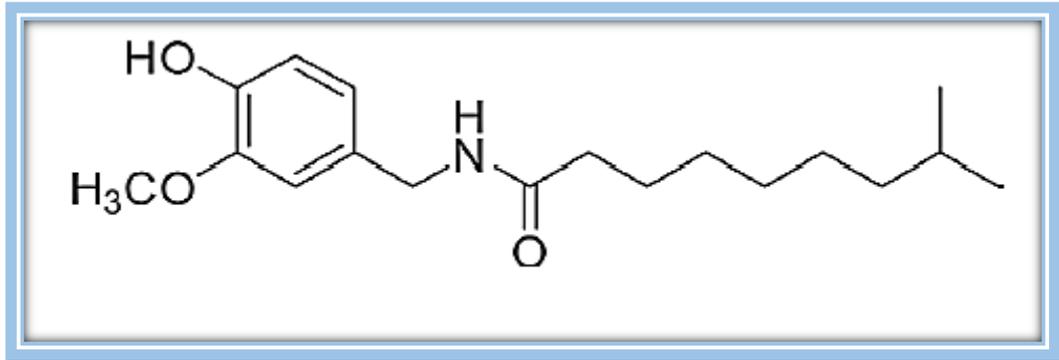


Figura 4. Molécula de dihidrocapsaicina ³¹.

2.2.8 Beneficios y propiedades del rocoto. ²³

Protector estomacal: El consumo habitual de rocoto se recomienda para el tratamiento de las úlceras, gastritis, colitis y en general beneficia al sistema digestivo. Porque los jugos gástricos humanos al igual que la saliva de algunos mamíferos tienen la acidez suficiente para neutralizar su picor. La Capsaicina estimula la segregación de jugos gástricos y propicia la acumulación de lípidos y bicarbonatos en la mucosa del estómago, fortaleciéndola y facilitando el proceso digestivo. Además, la salivación extra que produce en la boca contribuye a una mejor digestión en general.

Desinflamante y antibiótico: Por ello las pepitas del ají se empleaban antiguamente para combatir el dolor de muelas. Sus propiedades desinflamantes combinadas con las digestivas lo convierten en un poderoso remedio para las hemorroides y dolores producidos por artrosis.

Productor de endorfinas: La sensación de dolor controlado que el picor del rocoto produce en la lengua es una respuesta que nuestro organismo produce endorfinas que inhiben ciertas partes del cerebro produciendo una sensación de placer que genera cierta adicción difícil de describir.

Tratamiento de Hipertensión: Actúa como dilatador de los vasos sanguíneos, se aconseja para aliviar el malestar y bajar la presión de las personas que sufren este mal.

Fuente de vitamina C: Un rocoto posee una cantidad de vitamina C cuatro veces superior al de la naranja y al igual que otros frutos sus propiedades antioxidantes son parte esencial de una dieta sana, aconsejada para prevenir el cáncer.

2.3 MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

TAXONOMIA.³²

Cuadro 2: Taxonomía de *Staphylococcus aureus*.

REINO	Bacteria
FILO	<i>Firmicutes</i>
CLASE	<i>Bacilli</i>
ORDEN	<i>Bacillales</i>
FAMILIA	<i>Staphylococcaceae</i>
GENERO	<i>Staphylococcus</i>
ESPECIE	<i>Staphylococcus aureus</i>

GENERALIDADES

Staphylococcus deriva del griego staphylé que significa “en racimo de uvas”, se trata de cocos gram positivos, que se disponen en agregados (estafilo = cúmulo), aunque también en parejas o cadenas cortas. Su tamaño varía de 0,5 – 1 μm de diámetro. Son inmóviles y no esporulados. Crecen en un medio que contiene cloruro sódico al 10% a una temperatura óptima 35-37 °C. Fundamentalmente son aerobios, aunque también anaerobios facultativos. Son catalasa-positivos, gracias a esta reacción se les puede identificar fácilmente respecto a los estreptococos, oxidasa-negativos y fermentan los azúcares. El género *Staphylococcus* se compone actualmente de 33 especies, 17 de las cuales pueden ser encontradas en clínicas humanas.³³

PATOGENICIDAD

La capacidad de los *Staphylococcus* para producir enfermedades depende de su posibilidad de intercambiar con libertad información genética. Muchas

características son transferidas por bacteriófagos, ya sea mediante transducción generalizada por conversión del fago, pero también se ha descrito un proceso similar a la conjugación entre los *Staphylococcus* del grupo de fagos II con gran frecuencia ocasionan infecciones cutáneas, mientras que los de grupo de fagos III causan más a menudo infecciones gastrointestinales. Los *Staphylococcus* llevan muchos plásmidos que codifican la resistencia a los antibióticos y se demostró que dichos plásmidos se transmiten de manera eficiente entre los estafilococos tanto por transducción como por conjugación. Los *Staphylococcus* se encuentran generalmente en la piel y mucosas del hombre y otros animales. Algunos de los *Staphylococcus* patógenos tanto para el hombre como para los animales producen una enzima denominada coagulasa y la detección de esta enzima se utiliza en el laboratorio para identificar estos microorganismos. Entre los *Staphylococcus* la especie coagulasa-positiva *Staphylococcus aureus* y dos especies coagulasa negativas *Staphylococcus epidermidis*, y *Staphylococcus saprophyticus*, se encuentran con frecuencia en infecciones humanas; ciertamente *Staphylococcus aureus* es patógeno y recibe esta denominación, así como la sinónima de *Staphylococcus* dorado, porque en placas de agar forma colonias de color amarillo dorado; sin embargo, las colonias pueden ser también de color amarillo limón o blancas, por lo que esta característica no es fundamental. Alrededor de las colonias puede comprobarse beta-hemólisis. El dato bioquímico capital, que parece muy relacionado con su patogenicidad, es el ser coagulasa-positivo. Por eso, en la práctica, los términos *Staphylococcus aureus* y coagulasa positiva son intercambiables. *Staphylococcus aureus*, tiene una alta incidencia como agente de infección, tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Es la primera como agente de infecciones, desde superficiales como el forúnculo, a profunda como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. En el medio hospitalario, es el agente de infección de heridas operatorias y de prótesis más frecuente. *Staphylococcus aureus*, es capaz de causar cuadros tóxicos por producción de potentes exotoxinas tales como intoxicación alimentaria, síndrome de piel escaldada y shock tóxico, también presenta una gran capacidad de adaptación y supervivencia de esta bacteria, su aumento progresivo de resistencia a los antimicrobianos, en especial en el medio hospitalario, que plantea serios problemas epidemiológicos y terapéuticos.^{34, 35}

EPIDEMIOLOGIA

Staphylococcus aureus es una de las bacterias patógenas más importantes a nivel global. Cerca de un cuarto de la población porta alguna de sus cepas en cierta etapa de su vida o todo el tiempo. Desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de *Staphylococcus aureus* por todo el mundo. Estos se han detectado en una gran variedad de lugares, tales como hospitales, centros de atención y clínicas, y en años recientes, en la comunidad. Actualmente, estos brotes se dividen en infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad.³⁵

TRATAMIENTO

La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina, meticilina y otros antibióticos de amplio espectro hace cada día más difícil la escogencia de un antibiótico en forma empírica. Si la cepa aislada es sensible a la penicilina (<10% de las cepas), el tratamiento de elección es penicilina G. Si la cepa es resistente a la penicilina, pero sensible a meticilina, la elección es oxacilina. Si el paciente es alérgico a penicilinas y la cepa es *S. aureus* sensible a la meticilina, una opción válida es el uso de cefalosporinas, a menos que la alergia sea de tipo anafiláctico, en cuyo caso está indicado el uso de vancomicina. Si el germen aislado es SARM, la elección es la vancomicina con dosis empírica de 30 mg/kg al día, dividida en 2-4 dosis diarias. Debido a la aparición de cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina o SARV, se han introducido nuevos antibióticos, entre los que se encuentran linezolid (familia oxazolidinona).³⁵

2.3.2 *Escherichia coli*

TAXONOMIA.³²

Cuadro 3: Taxonomía de *Escherichia coli*.

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

GENERALIDADES

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, considerada parte de la flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea.³³

Puede ser inmóvil o móvil por flagelos peritricos, constituye el habitante facultativo del intestino grueso más importante. Las cepas de *Escherichia coli* poseen antígenos flagelares (H), capsulares (K), y somáticos (O), se conocen más de 50 antígenos flagelares, alrededor de 100 capsulares y 170 somáticos, apareciendo en diversas combinaciones. *Escherichia coli* es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano.³⁶⁻³⁸

PATOGENECIDAD

Escherichia coli causa multitud de infecciones en el ser humano. Las más frecuentes son las urinarias, pero origina también infecciones de las vías biliares, peritonitis,

neumonía, meningitis neonatal y gastroenteritis, en pacientes debilitados o inmunodeprimidos puede colonizar la piel y las diferentes mucosas y ocasionar una variedad de síndromes clínicos. *Escherichia coli*, puede producir abscesos en cualquier localización a nivel del tejido celular subcutáneo secundarios a la infección de las heridas operatorias. *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, capaz de crecer a 44°C, catalasa-positivo y oxidasa-negativo, que fermenta la glucosa y la lactosa. Estudios de homología del DNA han revelado la existencia de varias especies nuevas del género *Escherichia*: *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris* y *Escherichia harmanii*. Se desconoce si desempeñan algún papel en la patología humana. *Escherichia coli* es versátil y se adapta bien a sus hábitats característicos, puede crecer en un medio que tan sólo tenga glucosa, en presencia o ausencia de oxígeno. Bajo condiciones anaeróbicas crece por medio de la fermentación, produciendo ácidos mezclados y gas característico como productos finales. También puede crecer mediante respiración anaeróbica, ya que es capaz de utilizar NO₃, NO₂ o fumarato como aceptores finales de electrones para los procesos respiratorios de transporte de electrones.³³

EPIDEMIOLOGIA

Es difícil conocer con exactitud la epidemiología global de las infecciones oportunistas y la participación de las enterobacterias en ellas, de las infecciones con diagnóstico microbiológico, en el 40 por 100 se hallan involucradas las enterobacterias, siendo *Escherichia coli* la aislada con mayor frecuencia, otros agentes etiológicos son *Pseudomona aeruginosa*, enterococos, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* con menor frecuencia y por este orden. Es pues, indiscutible que *Escherichia coli*, no solo es la enterobacteria más frecuente en estos procesos, sino en términos absolutos, el primer microorganismo causante de infección oportunista.

39

Escherichia coli, puede responder a señales del medio ambiente como sustancias químicas, pH, temperatura, osmolaridad, etc. de maneras distintas. Puede captar, por ejemplo, la presencia o ausencia de sustancias químicas o gases y aproximarse o alejarse de ellos; o puede desarrollar fimbrias que se adhieren específicamente a una célula o receptor celular. En respuesta al cambio de temperatura y osmolaridad puede

variar el diámetro de los poros de las porinas de la membrana externa y acomodar moléculas mayores (nutrientes) o excluir sustancias inhibitorias. Aunque *Escherichia coli* es un comensal normal del tubo digestivo, puede, sin embargo, causar manifestaciones patológicas en diversas circunstancias. La emigración desde el ano a la región periuretral, con ulterior ascenso de los gérmenes por la uretra hasta la vejiga urinaria, es la patogenia más habitual de las infecciones urinarias colibacilares. Desde las vías urinarias, *Escherichia coli* puede originar bacteriemias con posible aparición de metástasis sépticas. Aunque la puerta de entrada más frecuente es la urinaria, ello no significa que sea la única que permite el acceso de este germen a la circulación. Según parece, también puede penetrar desde el tubo digestivo, aunque normalmente, las células de Kupffer del hígado fagocitan los bacilos de esta procedencia y los eliminan de la circulación. Sin embargo, en las hepatopatías crónicas, la hipertensión portal con anastomosis portosistémicas permite el acceso de *Escherichia coli* a la circulación general sin pasar por el filtro hepático, con posible bacteriemia y aparición de focos sépticos, como la denominada peritonitis espontánea de los cirróticos. El germen puede llegar al pulmón desde la faringe. En efecto, en pacientes hospitalizados con enfermedades graves, *Echerichia coli* forma parte de la flora faríngea y, desde ésta, sea por instrumentación o espontáneamente, puede alcanzar los alvéolos originando una neumonía específica.

TRATAMIENTO

Los antibióticos a utilizar deben ser activos in vitro frente a la cepa, y alcanzar concentraciones suficientes en el foco. La capacidad de estas bacterias para adquirir genes de resistencia hace imprescindible la realización antimicrobiana. En infecciones urinarias junto con otros posibles condicionantes son fundamentales para la orientación terapéutica. El cotrimoxazol, las quinolonas y los aminoglucósidos, cuando son activos in vitro, son clínicamente eficaces. En la enteritis por *Escherichia coli* no se ha demostrado la eficacia del tratamiento antibiótico e incluso parece contraindicado en la enteritis hemorrágica. Solamente las formas graves de *Escherichia coli* enteroinvasiva se benefician del tratamiento.³⁹

2.4. MÉTODO DE EXTRACCION

Se define como la separación de un componente de una mezcla en medio de un disolvente. Los métodos de extracción pueden ser: Maceración simple y fraccionada, digestión, infusión, decocción, destilación, soxhlet, lixiviación entre otros. Sin embargo en esta investigación utilizamos el método de lixiviación.

2.4.1 Lixiviación (percolación)

Los métodos de extracción permiten la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, usado uno o varios disolventes. Dentro de las técnicas extractivas esta la maceración, reflujo, lixiviación o percolación, extracción por arrastre con vapor de agua, extracción continua.⁴⁰

La percolación es un método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana. Es un método que consiste en que el solvente (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de solvente acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva. Este tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); Se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el solvente y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. Es importante que previo a la extracción es necesario humectar la droga con el solvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del solvente en las membranas celulares durante la lixiviación.⁴¹

2.5 MÉTODOS PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIBACTERIANO

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *In vitro* la susceptibilidad de bacterias frente a agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, de tal modo que los resultados son influenciados por el método seleccionado. Para el presente estudio se

realizaron dos métodos: Difusión en agar (Kirby-Bauer) y Modificado de pozos de agar.

2.5.1 Difusión en agar (Kirby-Bauer)

Este método es el más frecuentemente usado, es también llamado difusión por disco o Kirby-Bauer, en este caso, el microorganismo es inoculado en la superficie de agar, donde se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35 °C, durante la incubación el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo con las tablas publicadas por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Si las recomendaciones para realizar este método son fielmente seguidas, las categorías se correlacionan muy bien con los resultados de los otros métodos.⁴²

2.5.2 Modificado de pozos de agar

A través de este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias a estudiar sobre cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes o bien ser de referencia (ATCC). El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar, en el cual se excava en la superficie un pozo de un diámetro de 6 mm con el apoyo de un sacabocado estéril y dentro se coloca un papel de filtro con una cantidad determinada de la sustancia a estudiar. El papel filtro Whatman tiene una desventaja, cuando la sustancia a probar es un extracto natural, debido al contenido de celulosa, esta posee grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica actuando directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco impidiendo la difusión de estos en el agar; lo que explica por qué el método de pozo es más sensible.⁴²

III. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1 Tipo de estudio:

- **Experimental:** Se manipularon las variables en dos grupos, experimental y de control.
- **Analítico:** Se establecieron relaciones entre las variables dependientes e independientes con la finalidad de obtener diversas conclusiones.
- **Prospectivo:** En el registro de información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.

3.2 Población

3.2.1 Población vegetal

Plantas de *Capsicum pubescens* “rocoto” de la ciudad de Huancayo - Junín ubicado a 3,259 msnm.

3.2.2 Muestra vegetal

Aproximadamente 5 kg del fruto, todos los frutos en estado de maduración de buen aspecto y entero.

3.2.3 Criterios de inclusión

Plantas sanas, en buen estado de conservación y libre de contaminantes

3.2.4 Criterios de exclusión

Plantas infestadas por microorganismos, secas o en mal estado de conservación, con restos de excremento o cualquier agente que pueda alterar su naturaleza orgánica.

3.2.5 Población bacteriana

Cepas bacterianas American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

3.2.6 Materiales de laboratorio para la obtención del extracto etanólico por lixiviación:

- Balanza mecánica “Mettler”
- Alcohol 96° “alkofarma”
- Soporte Universal “Belart”
- Gancho con argolla
- Papel filtro 20 cm x 20 cm “Whatman”
- Algodón x 500 g “Quirmex”
- Fuente de vidrio “Pyrex”
- Frasco ámbar “Pyrex”
- Canicas de vidrio
- Botellas de vidrio boca ancha cortada por la mitad
- Tapones de caucho
- Frasco de vidrio boca ancha
- Molino “corona”
- Tamiz #100 “Advantech”
- Equipo de venoclisis “IQ medic”
- Estufa esterilizadora a calor seco circulación natural de aire, modelo 5NE40, marca Memmert - Alemania

3.2.7 Materiales para el análisis cualitativo del extracto del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”:

- Balanza analítica, modelo BT-260k, serie 0012314
- Tubo de ensayo 13 x 100 “Pyrex”
- Beacker 50 y 100 mL “Pyrex”

- Bagueta o varilla de vidrio “Metrix”
- Espatula de metal “Nalgene”
- Goteros “Nalgene”
- Gradilla para tubos de ensayo “ Eppendorf ”
- Pinza de madera “Belart”
- Pipetas 1, 2 y 5 mL “Pyrex”
- Propipeta de goma “Vicking”
- Lámpara de Luz UV 366 nm “Ultraviolet”

3.2.8 Solventes y reactivos para el análisis de solubilidad y análisis cualitativo

- Etanol Q.P “Merck Peruana”
- Metanol Q.P “Merck Peruana”
- N-butanol Q.P “Merck Peruana”
- Acetato de etilo Q.P “Merck Peruana”
- Éter dietílico Q.P “Merck Peruana”
- Acetona Q.P “Merck Peruana”
- Benceno Q.P “Merck Peruana”
- N-hexano Q.P “Merck Peruana”
- Éter de petróleo Q.P “Merck Peruana”
- Tricloruro de aluminio
- Reactivo de Shinoda
- Tricloruro férrico
- Reactivo de gelatina
- Reactivo de Bertrand

- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Popoff
- Reactivo de Sonneschein
- Reactivo de Wagner

3.2.9 Material y equipos para la preparación de medios de cultivo

- 5 pipetas 0,5 mL “Pyrex”
- 5 pipetas 1,0 mL “Pyrex”
- 5 tubos 10 mm x 100 mm “Pyrex”
- Gradilla para tubos de ensayo
- Mechero de Bunsen “Neolab”
- Placas Petri estériles descartables
- Agar Sangre “Merck”
- Sangre de ovino desfibrinada
- Asas de siembra de metal
- Pinzas estériles
- Inoculo de Cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 marca KWIK STIK
- Inoculo de Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 KWIK STIK
- Inoculo de Cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 23857 KWIK STIK
- Discos de sensibilidad en blanco marca OXOID
- Refrigerador, marca LG/ER, serie 27177 BQ
- Autoclave, serie 01-00002591

Otros:

- Disco de sensibilidad con antibiótico para control (Oxacilina 1 μg y ciprofloxacino 5 μg químicamente puro) marca OXOID
- Agua destilada
- Cloruro de sodio

3.3 Métodos

3.3.1 Recolección y procesamiento del espécimen vegetal

Los frutos de *Capsicum pubescens* “rocoto”, fueron recolectados en el mes de diciembre, en la parte alta de la ciudad de Huancayo perteneciente al departamento de Junín aproximadamente a 3259 msnm. Se recolectaron los frutos maduros de color rojo seleccionando las que se encontraban en óptimas condiciones presentando buena apariencia física, se limpiaron todas las impurezas y después se lavaron con agua potable a chorro, aproximadamente se recolectó 5 kg de materia prima las cuales fueron conservadas en condiciones adecuadas hasta su utilización para la elaboración del extracto etanólico.



Figura 5. *Capsicum pubescens* “rocoto”

3.3.2 Preparación del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

Se usó 5 kg del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”, se procedió a trozar eliminando las semillas, posterior a ello se procedió con la deshidratación con estufa a calor seco modelo 5NE40 “Memmert” por 72 horas a una temperatura de 40°C y finalmente la pulverización con ayuda de un molino “Corona” y tamiz # 100 hasta la obtención de partículas uniformes y homogéneas.

Cabe recalcar que previo a la extracción es necesario humectar la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del solvente en las membranas celulares durante la percolación, finalmente, el extracto liquido obtenido se depositó en varias fuentes de Pyrex y se concentró en la campana extractora para eliminar la sustancia volátil (etanol 96°), posterior a ello se recolecta el extracto en un frasco ámbar de boca ancha.



Figura 6. Lavado (1), trozado y secado (2) de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Figura 7. Pulverizado (1) y tamizado (2) de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Figura 8. Percolado con solvente etanólico al 96 % (1), preparación del extracto de *Capsicum pubescens* “rocoto” a partir del percolador (2)



Figura 9. Extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

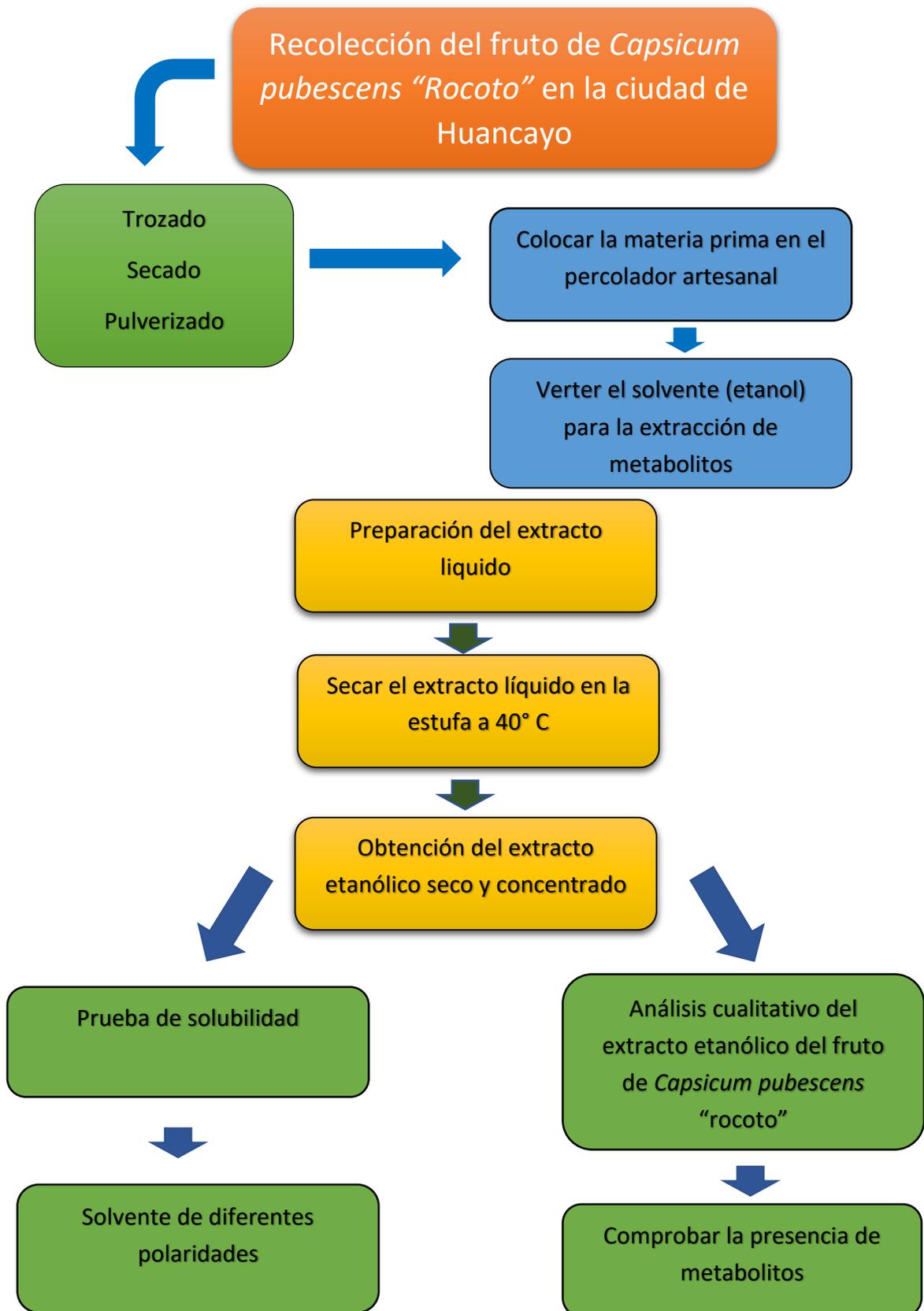


Figura 10. Prueba de solubilidad y análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* "rocoto"

3.3.3 Prueba de solubilidad del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”.

La prueba de solubilidad permite conocer el comportamiento del extracto en soluciones de diferente polaridad. En 10 tubos de ensayo se colocó 20 mg del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “Rocoto”, se le agregó a cada uno de los tubos 1 mL del solvente, así como: Agua destilada, etanol, metanol, n-butanol, acetato de etilo, hexano, acetona, benceno, éter dietílico, éter de petróleo. Se agitó y se observó los resultados como se muestra en la Tabla 1 y figura 17.

3.3.4 Análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico de *Capsicum pubescens* “rocoto”

Se realizó para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos del extracto etanólico, basado en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación. Se solubilizó 20 mg del extracto seco del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” en etanol observándose los resultados en la tabla 2 y figura 18. En el cuadro 4 se puede apreciar los reactivos utilizados para el análisis cualitativo fitoquímico.

Cuadro 4. Reactivos utilizados en el análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto del *Capsicum pubescens* “rocoto”

REACTIVOS	METABOLITOS
AlCl ₃	Flavonoides
FeCl ₃	Compuestos fenólicos
Shinoda	Flavonoides
Gelatina + NaOH	Taninos
Bertrand	Alcaloides
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Popoff	Alcaloides
Sonneschein	Alcaloides
Wagner	Alcaloides

3.3.5. Preparación del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” a diferentes concentraciones.

Se utilizó el extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” al 25, 50 y 100%, se pesó 1,25g, 2,5g y 5g del extracto en un vial color ámbar y se añadió 1ml de agua destilada a cada vial obteniendo así las concentraciones mencionadas. Así mismo se utilizó Oxacilina 1 μ g y Ciprofloxacino 5 μ g como control positivo.



Figura 11. Extracto etanólico de *Capsicum pubescens* al 25, 50 y 100 %
(Conc:)

3.3.6 Obtención de los microorganismos

Se trabajó con cepas de bacterias estándar American Type Culture Collection: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 23857 de la marca KWIK STIK. Cada unidad de KWIK STIK incluye un gránulo liofilizado de un microorganismo, una ampolla de líquido hidratante y un hisopo de inoculación. Cada dispositivo está sellado dentro de una bolsa laminada que contiene material desecante para evitar la acumulación perjudicial de humedad. Para la obtención de las cepas se dejó a temperatura ambiente las bolsas de KWIK STIK, luego se procedió

a abrir rasgando a la altura de la marca señalada, quitando la unidad de KWIK STIK. Se aprieta (solo una vez) la ampolla en la parte superior de KWIK STIK que se encuentra en la tapa para liberar el líquido hidratante. Se mantiene en forma vertical y golpeamos sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo. Se deja que el líquido hidratante fluya por el mango del hisopo hasta llegar al fondo de la unidad. Apretamos la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea, de inmediato se satura el hisopo con el material hidratado y se transfiere al medio de cultivo (agar nutritivo), por medio de un asa esterilizada se realizan estrías para facilitar el aislamiento de la colonia. En la figura 12 se observan las bolsas de KWIK STIK.



Figura 12. Cepas estándares ATCC

3.3.7 Preparación de los inóculos bacterianos

Una vez obtenidas las colonias ATCC en el agar nutritivo incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, utilizamos un tubo de ensayo estéril con solución salina al 0,9% al cual le agregamos las colonias necesarias para llegar a la escala Mc Farland de 0,5, este patrón de turbidez nos garantiza la cantidad de bacterias ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) necesarias para el estudio en la prueba de sensibilidad antibacteriana, también se verificó su absorbancia a 580 nm ⁴⁴. En la figura 13 se puede apreciar las cepas estándares ATCC comparada a la escala de Mac Farland N° 0,5



Figura 13. Cepas estándares ATCC comparada a la escala de Mac Farland N° 0,5

3.3.8 Inoculación de las placas

Pasado los 15 minutos del ajuste de la turbidez del inóculo se procedió a inocular las placas, sumergiendo un hisopo estéril presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo, posteriormente se procedió al estriado de todas las placas Petri de Agar Müller-Hinton con la bacteria, la técnica se realizó en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme. En la figura 14 se muestra la inoculación de las cepas estándares en Agar Müller-Hinton.



Figura 14. Inoculación de cepas estándares de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. en agar Muller Hinton

3.3.9 Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer)

Se impregnaron 20 μ L del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* previamente preparados al 25, 50 y 100%, en cada uno de los discos en blanco por triplicado, además de discos de control positivo y control negativo y se colocan sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Estas se incuban invertidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h, posteriormente se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos.

3.3.10 Método modificado de pozos en agar

Se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 20 μ L del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* previamente preparados al 25, 50 y 100%

por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la placa invertida a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h, posteriormente se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro del discos.

En la figura 15 y 16 se muestran los discos de sensibilidad en blanco y los discos de control positivo (ciprofloxacino y oxacilina).



Figura 15. Discos de sensibilidad en blanco.



Figura 16. Discos de sensibilidad control positivo (ciprofloxacino y oxacilina).

3.3.11 Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.⁴⁵

Para calcular los porcentajes de inhibición se empleó la fórmula utilizada por Ramírez y Díaz (2007):

$$\% \text{ INHIBICION: } \frac{\text{Diámetro de la muestra}}{\text{Diámetro del control}} \times 100$$

3.3.12 Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

Para clasificar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico se utilizó el siguiente cuadro utilizada por Quispe y Tenorio⁴⁶

Cuadro 5. Clasificación de la actividad antimicrobiana.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inactivo	< 40 %
Poco activo	40 – 50 %
Moderadamente activo	51 – 75 %
Buena actividad	> 76 %

IV. RESULTADOS

4.1 Prueba de Solubilidad

El extracto etanólico del fruto del *Capsicum pubescens* “rocoto” fue soluble en agua destilada, etanol y metanol e insoluble en solventes apolares como se observan en la tabla 1 y figura 17.

Tabla 1. Prueba de solubilidad del extracto etanólico del fruto del *Capsicum pubescens* “rocoto” (10 mg de extracto / 1mL de solvente)

SOLVENTES	SOLUBILIDAD
Agua destilada	+
Etanol	+
Metanol	+
n-butanol	-
Acetato de etilo	-
Hexano	-
Acetona	-
Benceno	-
Éter dietílico	-
Éter de petróleo	-

Leyenda: Soluble (+), Insoluble (-)

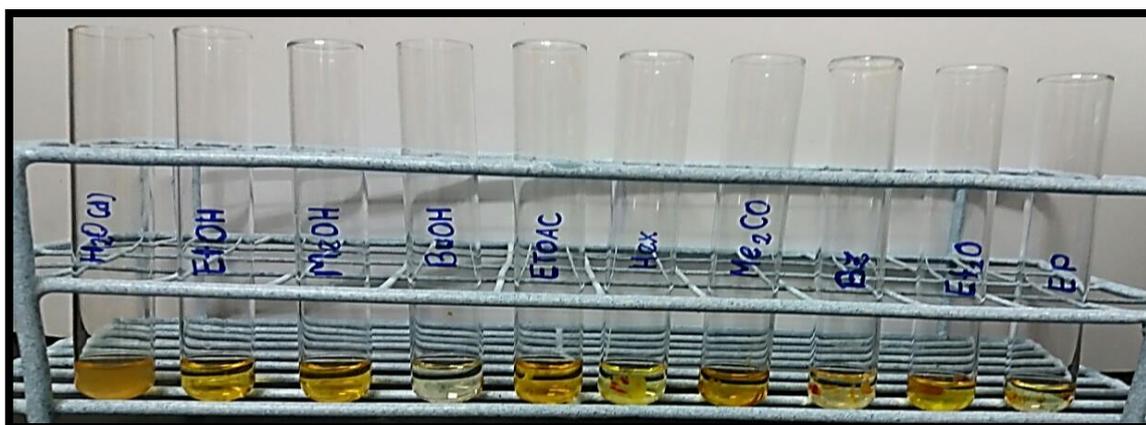


Figura 17. Prueba de solubilidad del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

Fuente: Elaboración propia.

4.2 Análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

Se realizó el perfil cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” el cual presenta metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y alcaloides. Tabla 2 y figura 18.

Tabla 2. Análisis cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* (20 mg del extracto del fruto / 1 mL de solvente)

REACTIVOS	METABOLITOS	RESULTADO
AlCl₃	Flavonoides	+
FeCl₃	Compuestos fenólicos	+
Shinoda	Flavonoides	+
Gelatina/NaOH	Taninos	+
Bertrand	Alcaloides	+
Dragendorff	Alcaloides	+
Mayer	Alcaloides	+
Popoff	Alcaloides	+
Sonneschein	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	+

Leyenda: Presencia (+), Ausencia (-)

Fuente: Elaboración propia.

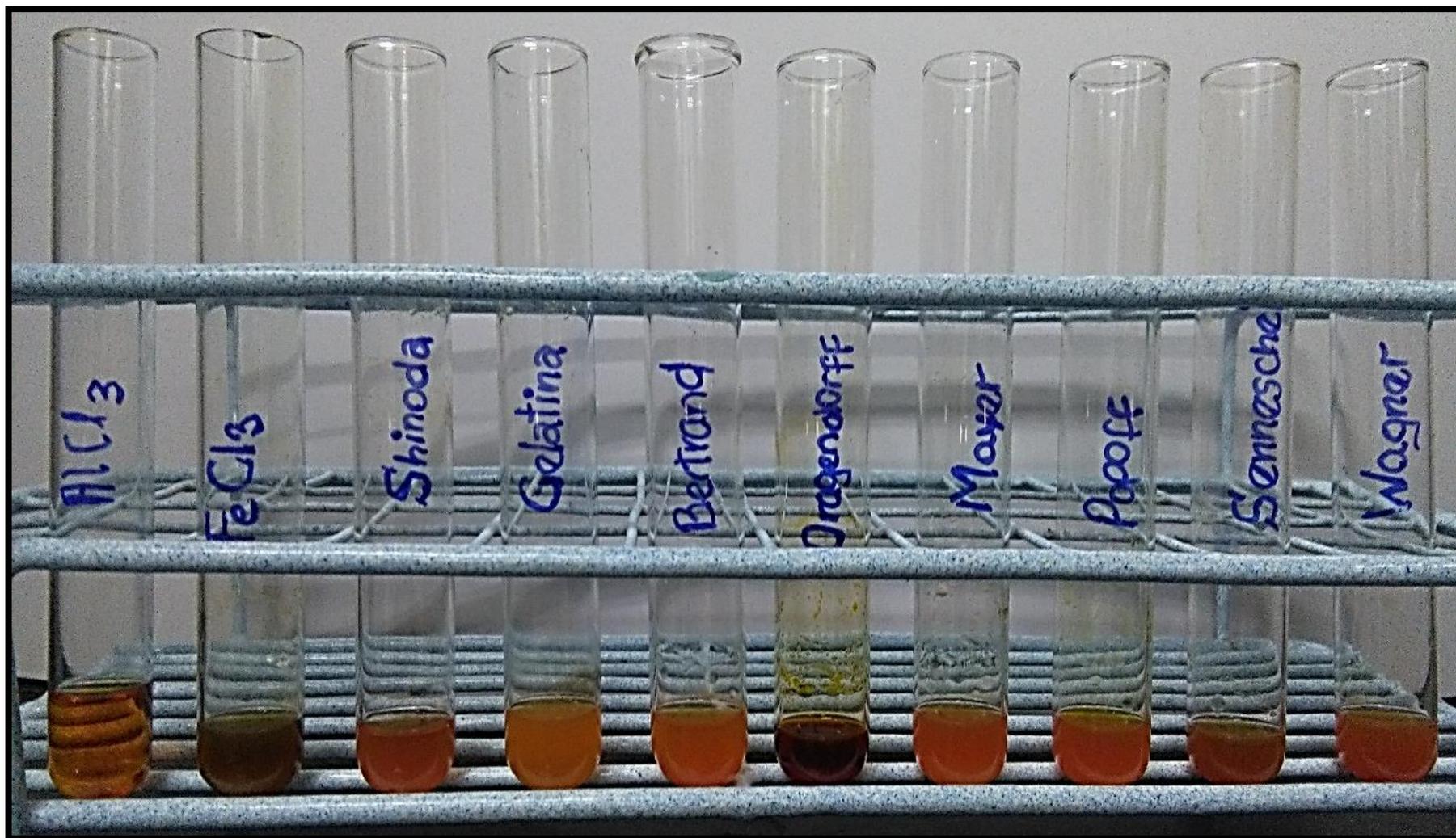


Figura 18. Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”

En la tabla 3, 4 y 5 se presentan los halos de inhibición obtenidos por el método de Kirby – Bauer, método modificado en pozos de agar y los halos de inhibición de los controles respectivamente.

Tabla 3. Medidas de los halos de inhibición del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* al 25, 50 y 100% en cepas estándares por el método de Kirby – Bauer.

Extracto al 25 %	1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10 mm	11 mm	10 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8 mm	7 mm	7,5 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0
Extracto al 50 %	1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,52 mm	13,24 mm	12,59 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12 mm	10 mm	11 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0
Extracto al 100 %	1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15,64 mm	16,01 mm	16,12 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12 mm	13 mm	11 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0

Tabla 4. Medidas de los halos de inhibición del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* al 25, 50 y 100% en cepas estándares por el método de modificado en pozos de agar.

Extracto al 25 %	1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,52 mm	13,24 mm	12,59 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16,81 mm	16,76 mm	16,93 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0
Extracto al 50 %	1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15,64 mm	16,01 mm	16,12 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18,36 mm	18,41 mm	18,39 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0
Extracto al 100 %	1	2	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17,56 mm	17,49 mm	17,52 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19,28 mm	19,09 mm	19,17 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0

Tabla 5. Medidas de los halos de inhibición del control positivo Oxacilina 1 µg y Ciprofloxacino 5 µg y control negativo agua destilada.

Control positivo	1	2	3	Promedio
Penicilina: Oxacilina 1 µg	26 mm	25 mm	26 mm	25.6 mm
Fluoroquinolona: Ciprofloxacino 5 µg	44 mm	46 mm	45 mm	45 mm
Control negativo	1	2	3	Promedio
Cl Na 9% (solución salina)	0	0	0	0

4.4 Técnicas para el procesamiento de datos y análisis de resultados

Se confeccionó una ficha de datos donde se anotaron los resultados de ambos métodos: difusión en placas con discos de papel filtro y excavación en pozos. La recolección de los datos se realizó de forma manual y visión directa.

Para la interpretación de los resultados se tomó como referencia la clasificación del efecto antimicrobiano según el porcentaje de inhibición: inactivo (< 40 %), poco activo (40 – 50 %), moderadamente activo (51 – 75 %) y buena actividad (>76 %).

4.5 Análisis e interpretación de resultados

Se realizó el estudio in vitro en las especies bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 23857, de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”, oxacilina, ciprofloxacina y solución salina trabajándose por triplicado y con dos metodologías comprobándose sensibilidad bacteriana en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Los resultados obtenidos en los dos métodos realizados al *Capsicum pubescens* “rocoto” en estudio han sido agrupados en tablas y gráficos, para la mejor interpretación de los resultados que se detallan a continuación.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, según diámetro de la zona de inhibición por el método de Kirby - Bauer.

MICROORGANISMOS DE ESTUDIO	Extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN		ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
	Concentración (%)	Media de los halos (mm)	% Inhibición	Resultado Método (Kirby – Bauer)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	0	0	-
	50	0	0	-
	100	0	0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	7,5	29	Inactivo
	50	11,0	43	Poco activo
	100	12,0	47	Poco activo
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25	10,3	40	Poco activo
	50	12,8	50	Poco activo
	100	15,9	62	Moderado activo

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, según diámetro de la zona de inhibición por el método modificado de pozos en agar.

MICROORGANISMOS DE ESTUDIO	Extracto etanólico del fruto de <i>Capsicum pubescens</i> “rocoto”	DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN		Actividad antimicrobiana
	Concentración (%)	Media de los halos (mm)	% Inhibición	Resultado método (modificado de pozos en agar)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	0	0	-
	50	0	0	-
	100	0	0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	16,8	66	Moderadamente activo
	50	18,4	72	Moderadamente activo
	100	19.2	75	Moderadamente activo
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25	12,8	50	Poco activo
	50	15,9	62	Moderadamente activo
	100	17,5	68	Moderadamente activo

Fuente: Elaboración propia.

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 5 se muestra los resultados del perfil cualitativo fitoquímico del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”, donde se encontró la presencia de metabolitos secundarios como: Flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y taninos, resultados similares fueron encontrados por Yañez P. *et al.* (2015)⁴⁷ quien trabajó con extractos de diferentes frutos del género *Capsicum* entre ellos el *Capsicum pubescens*, encontrando metabolitos secundarios como: Alcaloides, compuestos fenólicos y taninos, pero no se encontró presencia de flavonoides. En la investigación realizada los flavonoides fueron identificados con el reactivo de Shinoda y AlCl₃. Según Lock O (2016)⁴⁸ menciona que los flavonoides son los metabolitos que poseen actividad antimicrobiana.

En la figura 25 se aprecia la presencia de halos de inhibición del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* pero ausencia de halo en *Escherichia coli* utilizando el método de difusión en agar, resultados que discrepa con la investigación de Colivet J, *et al.* (2006)¹⁰ donde determinaron que los extractos etanólicos de ají dulce *Capsicum annuum* otra especie del género capsicum, fueron los únicos que presentaron actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Bacillus* sp, realizado con el mismo método de difusión en agar.

Asimismo, Lobato G, Gómez A, Romero N, *et al.* (2011)¹¹. Investigaron la extracción y cuantificación espectrofotométrica de capsaicina a partir de chile habanero donde concluyen que la metodología de extracción por lixiviación con etanol al 60 % y extracción soxhlet con acetato de etilo, esta última es la que proporciona mayor cantidad de oleorresina, sin embargo, la cantidad de capsaicinoides es mayor empleando la lixiviación, por lo que se considera que éste método es más selectivo para la obtención de capsaicina y sus derivados a partir de chile habanero; en la presente investigación se usó el método de lixiviación puesto que el *Capsicum pubescens* posee alta concentración de capsaicinoides tales como la capsaicina y dihidrocapsaicina.

En la figura 25 y 26 se puede apreciar la diferencia significativa de los halos de inhibición en ambos métodos logrando concluir que el método modificados en pozos de agar es más sensible que el método de discos de difusión (Kirby - Bauer) este análisis coincide con la

investigación de Rojas J, García A, López A. (2005)⁴⁹ donde investigaron dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales concluyendo que los diámetros de inhibición al aplicar el método Kirby-Bauer fueron ligeramente menores a los del método modificado de pozos en agar para los subgrupos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus betahemolítico*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (extractos acetónicos y etanólicos) y *Staphylococcus betahemolítico* (extracto acuoso). Esto quiere decir que el método de Pozos en Agar fue más sensible que el método Kirby- Bauer.

En la figura 25 se aprecia el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* frente a *Staphylococcus aureus* por el método de disco de difusión (Kirby Bauer) en las concentraciones de 25, 50 y 100% donde se concluye que el que posee mayor halo de inhibición es al 100%, resultados similares fueron encontrados por Cabrera W. (2015)⁵⁰ quién determinó por el método de disco de difusión que el extracto hidroalcohólico de *Capsicum pubescens* a concentraciones de 75% presenta mayor halo de inhibición frente a cepa clínica de *Staphylococcus aureus*.

VI. CONCLUSIONES

En el análisis cualitativo del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” se comprobó la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenólicos (derivados del catecol), taninos y alcaloides.

Se evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; categorizado como moderadamente activo según el método modificado de pozos en agar.

Se evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 categorizado como moderadamente activo según el método modificado de pozos en agar.

Se evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922; donde no se evidencio inhibición del crecimiento microbiano, categorizado como inactivo en ambos métodos.

VII. RECOMENDACIONES

1. Profundizar los estudios experimentales en animales de laboratorio para valorar la efectividad y toxicidad que pueda presentar el extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” en el caso del uso terapéutico en la población.
2. Realizar estudios para evaluar la actividad antibacteriana por vía tópica en animales de experimentación del extracto etanólico de *Capsicum pubescen* “rocoto” sobre *Staphylococcus aureus*, así como su formulación para la preparación de formas farmacéuticas.
3. Continuar otros estudios complementarios con la finalidad de evaluar otros efectos terapéuticos atribuibles en la medicina tradicional a *Capsicum pubescens* “rocoto”

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. (2018) Resistencia a los antibióticos. [en línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/> [Consultado el 2 de marzo de 2018].
2. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia. 2013; 16(4): 385-393.
3. Mendoza R. Sistemática e historia del ají *Capsicum Tourn.* Universidad Nacional de Piura. 2006 (11p)
4. Mostacero J, Ferreyra R, Brack F, Gamarra O. Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Editora Normas Legales SAC. Volumen I y II. Trujillo, Perú 2002; 1323 pp.
5. Perfil comercial: Rocoto. Organismo público sierra exportadora. diciembre 2016.
6. Cerón T, Munguía R, García S, Santiesteban A. Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*). Revista Iberoamericana de Ciencias. 2014;1(2):213–21.
7. Mitchell, C. (2018). Expertos de la Salud advierten sobre. [en línea] Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5241%3A2011-expertos-salud-advierten-sobre-infecciones_incurables_&catid=1443%3AAbbs-boletines_&Itemid=135_&lang=es [Consultado el 12 de diciembre de 2017].
8. Aguilar E, Osoreo F. Simposio Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Med Per. 2011; 23(22): 26–31.
9. Tibavizco D, Rodríguez J, Silva E, Cuervo S, Cortés J. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. 2011;27(9):294–307.
10. Colivet, Belloso G, Hurtado E. Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus* sp. 2006; 18:168–73. Disponible en : <http://www.ojs.udo.edu.ve/index.php/saber/article/view/335>
11. López E, Lobato C. Extracción y cuantificación espectrofotométrica de capsaicina a partir de chile habanero. Universidad Juárez autónoma de tabasco. 2011 ;68–109.

12. Cerón T, Munguía R. Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*)”. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2014;1(2):213–21.
13. Salazar E. 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]. Lima: UNMSM; 2016.
14. Villavicencio B. Caracterización químico nutricional y actividad antioxidante de dos muestras de *Capsicum pubescens* (Rocoto rojo y amarillo) provenientes de Villa Rica (Pasco) [tesis]. Lima: UPCH; 2016.
15. 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
16. Brea M, Domingo D. Plantas con acción antimicrobiana. [en línea] Dialnet.unirioja.es. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=786844> [Consultado el 15 de febrero de 2018].
17. Nuez F, Gil R, Costa J. El cultivo de los pimientos, chiles y ajés. Ediciones Mundiprensa, 1996; 20: 84-140.
18. El pimiento [Internet]. Apoloybaco.com. 2018 [citado el 6 de mayo de 2018]. Disponible en: http://www.apoloybaco.com/gastronomia/index.php?option=com_content&view=article&id=536
19. Espinoza D. Caracterización morfológica de ajés de la costa del Perú. [tesis] lima – Perú. UNALM, 2017.
20. Cedrón J. La capsaicina. *Revista de Química PUCP*, 2013; 27(1-2), 7-8.
21. Long J. 2011. El *Capsicum* a través de la historia mexicana. En K. Richterich (Ed.), *El Chile: Protagonista de la Independencia y la Revolución*. (pp. 7-19). México: Fundación Herdez.
22. Long J. 1986. *Capsicum* y Cultura: La Historia del Chilli. Fondo de Cultura Económica. México. 183p.
23. PCM. Perfil Comercial: Rocoto. Lima, Peru, 2013-2014.
24. Nuez F, Gil R, Costa J. El cultivo de los pimientos, chiles y ajés. Ediciones Mundiprensa, 1996; 20: 84-140

25. Pickergsill B. Some aspects of interespecific hibritación in Capsicum. IV Euocarpia Capsicum meeting, Wageningen 3:2-6, 1980
26. Mendoza R. Sistemática e historia del ají *Capsicum* tourn. UNP, Universalia 11(2) 2006
27. Howard L, Talcott S, Brenes C, *et al.* Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected peeper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. Journal of agricultural and food chemistry, 48 (5): 1713- 1720, 2000.
28. Iwai I, Suzuki T, Fujiwake H. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum*. Agricultural and biological chemistry, Tokyo, 43: 2493-2498, 1979.
29. Schweid R. Hot peppers: The story of Cajuns and Capsicums. Chapel Hill, University of North Carolina Press, 1999.
30. Osuna J, Wall M, Waddell C. “Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type chile (*Capsicum annuum* l.) Cultivars”. Journal of agricultural and food chemistry, 46 (12): 5093-5096, 1998.
31. Cedrón J, Whitaker F. La Capsaicina. Revista de química PUCP 2013;27:7–8.
32. Ríos M, flores J. “Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; por el método de macrodilución y difusión en agar” 2016, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2016.
33. Koneman E, *et al.* Diagnóstico Microbiológico. 6ta edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2008.
34. Stuart T. Microbiología. Editorial McGraw-Hill. primera edición. México. 2000. 136p.
35. Tibavizco D, *et al.* Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Rev. Biomédica Vol 27 N°2 Bogotá. 20017.
36. Lopardo H, *et al.* Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. Volumen I. 12p.
37. Romero C, Herrera B. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial Medica Panamericana. México. 2002. 95p.
38. Puerta G, Mateos F. Enterobacterias. Rev Médica. España. 2010.
39. García J, Picazo J. Microbiología médica general. tema 19. Harcourt Brace. España. 1998. 233p.

40. Lamarque A, *et al.* Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Técnicas extractivas. 1ra edición. Argentina. Editorial Encuentro. 2008. 90p.
41. Carrión A, García C. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. Tesis. Universidad de Cuenca. Ecuador 2010.
42. Ramirez L, Marin D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira, 2009
43. Gerson S, Green LH (2000). Preliminary Evaluation of the Antifungal Activity of Extracts of *Morinda citrifolia* Linn. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 379 - 380
44. Martínez M, Badell J, Gonzáles N. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera (sabila). *Rev. Cubana Plant. Med.* 1: 18 - 20
45. Ramirez L, Diaz H. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica.* 2007; 33: 0122-1701.
46. Quispe M, Tenorio E. Determinación fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de los órganos aéreos de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling “pacha salvia”. Tesis de grado: Universidad Norbert Wiener; 2018. 59p.
47. Yáñez P, Balseca D, Rivadeneira L, Larenas C. Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador. La granja. *Revista de Ciencias de la Vida [Internet].* 2015;22(2):12-32. Recuperado de:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047267002>
48. Lock O. “Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales, 3^{ra} Ed. Lima – Perú: Editorial de la Pontificia Universidad católica del Perú; 2016.
49. Rojas J, García A, López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Colombia, *Blacpma* 2005; vol. 4, pág. 28.
50. Cabrera W. Actividad antibacterial in vitro del extracto hidroalcohólico del rocoto (*Capsicum pubescens*, Ruiz & Pavon) [tesis]. Lima – Perú: UAP; 2015.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación sistemática del *Capsicum pubescens* "rocoto"



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 219-USM-2016

EL JEFE (E) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de, **Jhon Wilfredo HUARCAYA ESTRADA**, estudiante de la Universidad Privada NORBERT WIENER, ha sido estudiada y clasificada como: ***Capsicum pubescens*** Ruiz & Pavon, tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Capsicum*

ESPECIE: *Capsicum pubescens* Ruiz & Pavon

Nombre vulgar: rocoto
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán S.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 05 de octubre de 2016



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE (E) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

DDB

Anexo 2. Muestra recolectada del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” en proceso de lavado.



Anexo 3. Secado del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto” previamente trozado.



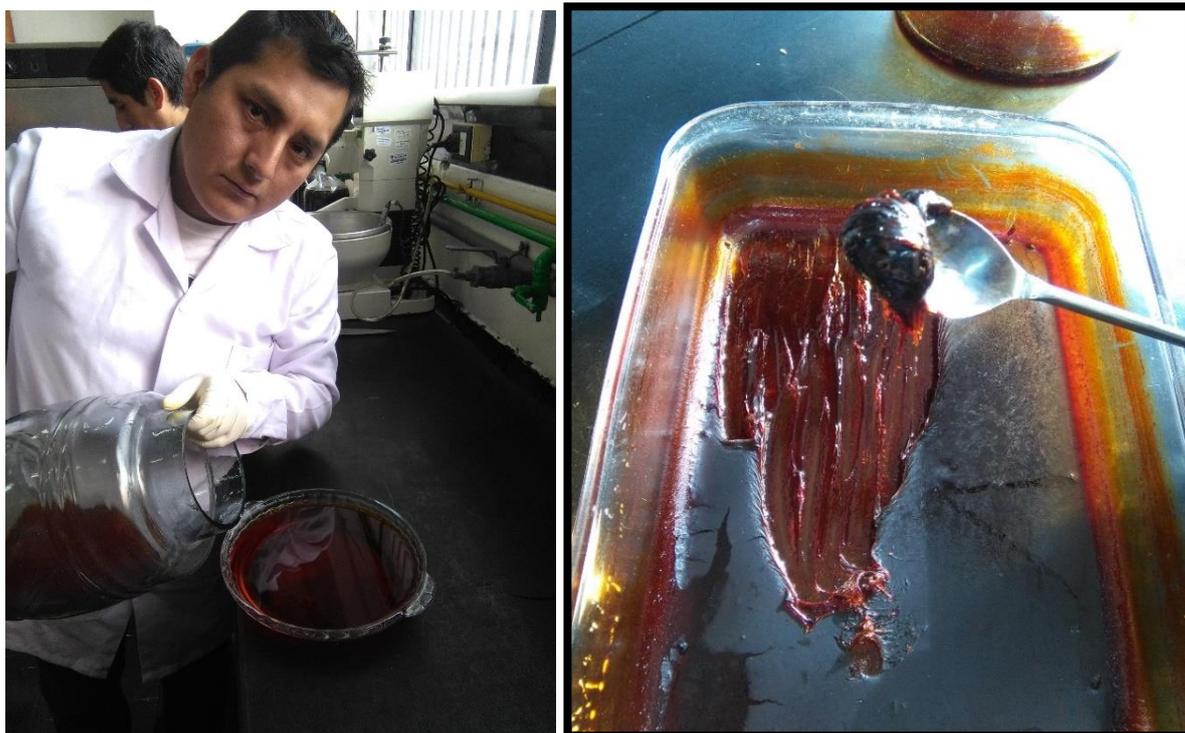
Anexo 4. Pulverizado y tamizado del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Anexo 5. Armado del equipo casero de lixiviación para la obtención del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Anexo 6. Obtención de extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Anexo 7. Reactivos para realizar la prueba de solubilidad

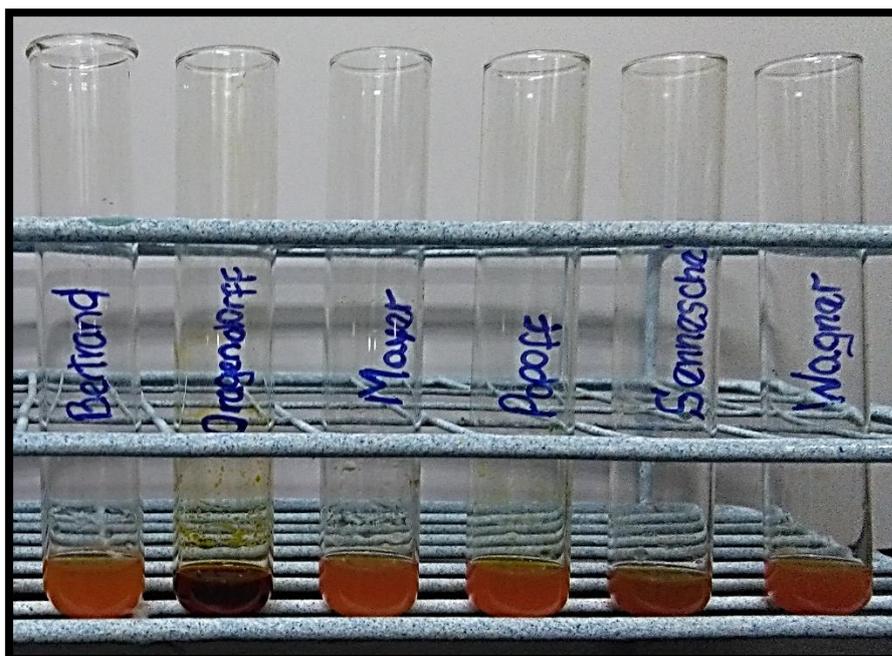


Anexo 8. Reactivos para realizar el análisis cualitativo fitoquímico



Anexo 9. Siembra de cepas estándares en agar Müller Hinton





Anexo 10. Reconocimiento de alcaloides del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



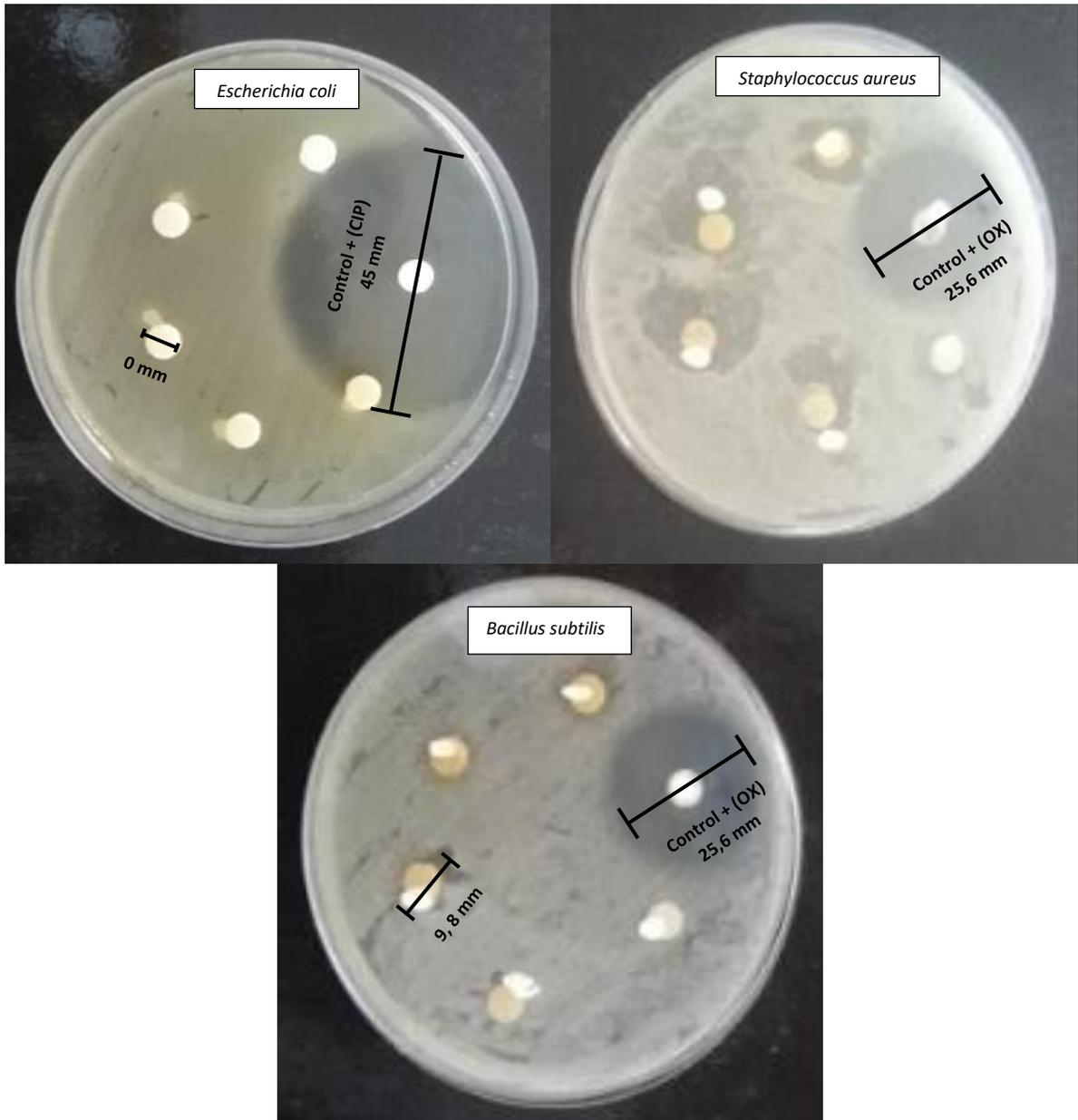
Anexo 11. Reconocimiento de flavonoides del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



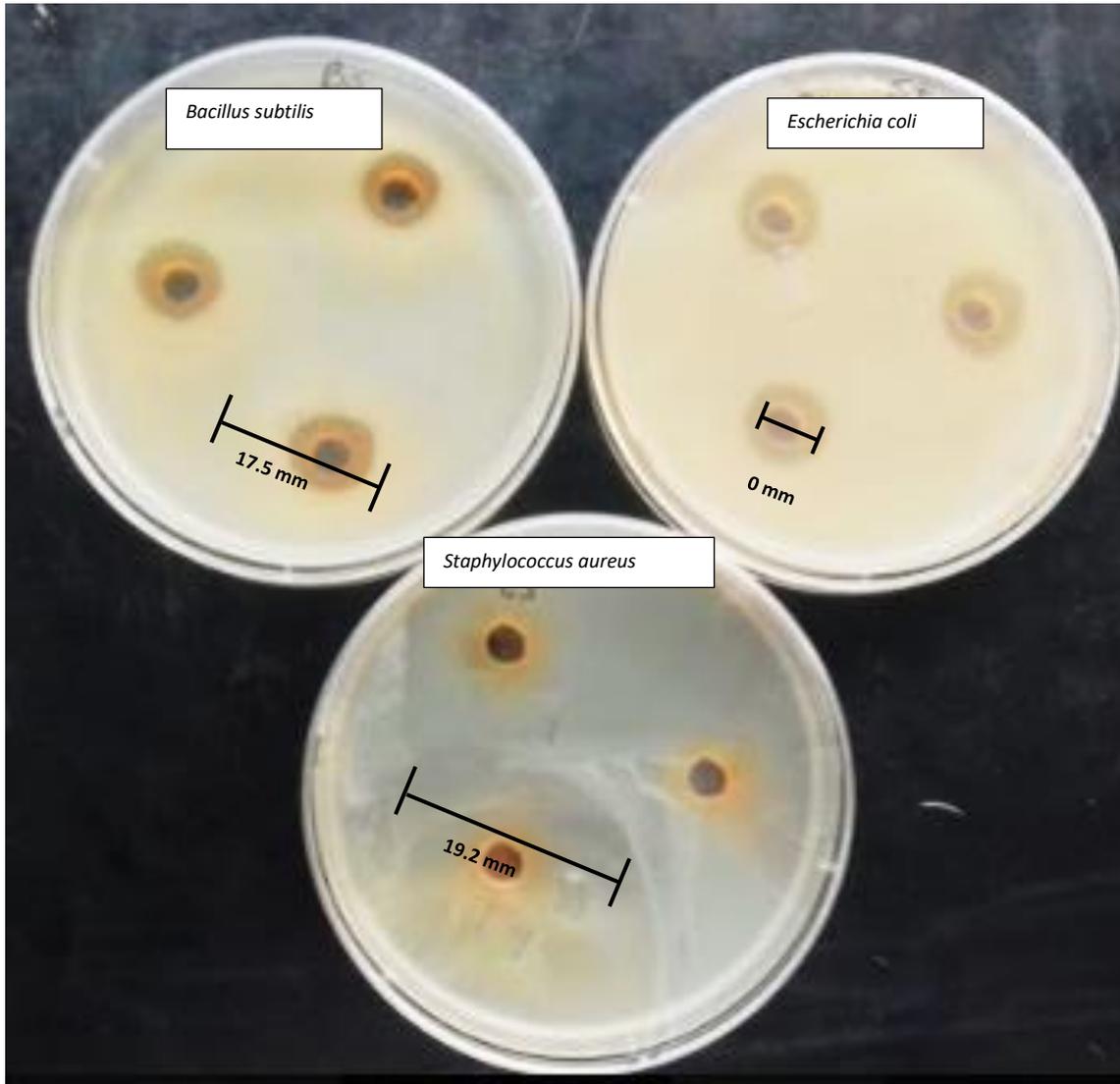
Anexo 12. Reconocimiento de compuestos fenólicos del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Anexo 13. Reconocimiento de taninos del extracto etanólico del fruto de *Capsicum pubescens* “rocoto”



Anexo 14. Medidas de halos de inhibición por el método de Kirby Bauer



Anexo 15. Medición de halos de inhibición por el método modificado de pozos de agar



Anexo 16. Lámpara UV visible marca CAMAG

Fuente: Elaboración propia.



Anexo 17. Identificación de flavonoides con el reactivo de AlCl_3 .

(Observación del halo amarillo)

Fuente: Elaboración propia.