

“Año del Centenario de Machu Picchu para el Mundo”

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS,
FARMACIA E INFORMÁTICA**

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA *IN VITRO* SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* (vector de la Fiebre Amarilla y dengue) Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO FRENTE A CEPAS DE *Salmonella typhi* spp. DE LAS ACETOGENINAS OBTENIDAS A PARTIR DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE SEMILLAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

Presentado por:

Br. JUDITH CALLO CONDORI

**Br. KAROL EDUARDO FARFÁN
BARRIENTOS.**

Asesora:

M.cs. Carla del Carpio Jimenez

Co- Asesores:

M.cs. Erick Yabar Landa

M.cs. Yanet Mendoza Muñoz

Mgt. Carlos Serrano Flores.

CUSCO -2011

Tesis auspiciada por el Centro de Investigación de la UNSAAC.

DEDICATORIA

Primero quiero dedicar este logro a Dios, por estar siempre conmigo brindándome fortaleza frente a todas las adversidades que nos presenta la vida, por iluminar mi camino todos los días de mi vida, por ser mi guía en todos los pasos que doy y haberme dado la bendición de haber concretado uno de los objetivos más importantes de mi vida.

A mi mamita Simona por ser mi ejemplo de vida, por sus consejos sabios, por su comprensión, por todo el esfuerzo y sacrificio que realizó en su vida para darme lo mejor y llevarme hasta a donde ahora me encuentro. Gracias mamita.

A la persona muy especial de mi vida: Jeason, por regalarme su amor incondicional, por escucharme, por sus palabras estimulándome a no caer y alcanzar mis metas, por ser mi apoyo y estar a mi lado en los momentos más difíciles siendo una bendición en mi vida. Gracias amorcito.

A mi querido y extrañado papito Emilio que descansa en paz a lado de nuestro padre Dios, por ser el ángel que me cuida y ser la motivación para salir adelante y afrontar con perseverancia nuevos retos.

A mis hermanos Vicente, Edwin y Emilio por ser mis consejeros, mis otros motivos de lucha, mis ejemplos y por haberme brindado todo su cariño, su amor, su paciencia, su comprensión y apoyo durante todo este tiempo. A ellos gracias por ser los mejores hermanos del mundo.

Judith callo c.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, guiarme, cuidarme, iluminarme y permitirme dar este gran paso en mi vida, gracias Dios mío por todo tu amor y tu perdón, esto no hubiese sido posible sin tu presencia en todo momento.

A mi querido padre Luis Eduardo Farfán León por su apoyo, comprensión, por animarme siempre a lograr mis metas, por sus acertados consejos y por ser mi padre; para ti viejito lindo.

A mi amada madre Rosario Barrientos Bravo por su amor, por su preocupación de que nunca me falte nada, por su esperanza puesta en mí y por haberme traído al mundo y ser una bendición en mi vida; con mucho amor para ti querida mamá.

A todos mis hermanos: Luis E, Ruben D, Julio C, Ana K, Miguel A y David A. por apoyarme en todas mis decisiones y por siempre darme sus consejos y experiencias vividas; va para Uds. queridos hermanos

Al amor de mi vida que siempre está a mi lado animándome y dándome momentos lindos en mi vida gracias por compartir tu vida con la mía, por soportarme y comprenderme y sobre todo por amarme; para ti Yessica Z. Ch. te quiero mucho.

K. Eduardo Farfán B.

AGRADECIMIENTOS

A dios por su amparo, protección y fortaleza en todo lugar y momento.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por habernos acogido en sus aulas e inculcado conocimientos durante nuestro desarrollo profesional.

Al instituto de investigación de la UNSAAC por el apoyo para la realización del trabajo de tesis.

A nuestra asesora M.C.s. Carla del Carpio Jimenez, por su apoyo incondicional, por su atención, sus consejos, orientaciones y confianza puesta en nosotros durante todo el proceso de ejecución de la tesis.

Al Mgt. Carlos Serrano Flores por su tiempo, paciencia, conocimientos, alegrías y vivencias compartidas en la realización de nuestra tesis, a usted un especial reconocimiento porque la realización de este trabajo se lo debemos a usted.

A la M.C.s. Yanet Mendoza Muñoz por sus conocimientos y facilitarnos el laboratorio a su cargo necesario para la ejecución del trabajo de tesis.

A los biólogos Henry Yañez Trujillano y Luis León Olayunca por su apoyo incondicional, sus conocimientos, sus consejos, su tiempo, su amistad y los hermosos momentos vividos durante el viaje a la localidad de Camanti para la ejecución de la segunda parte de la tesis.

A todo el personal del centro de salud Quincemil- Camanti quienes nos acogieron, ayudaron y brindaron su amistad durante nuestra estadía en la localidad de Quincemil y ejecución del trabajo de tesis.

A Jorge y Nancy encargados del laboratorio de control de calidad (HPLC), darles las gracias por el apoyo, los conocimientos y su tiempo en la identificación de nuestros compuestos.

A nuestras queridas familias por todo su apoyo incondicional y por el esfuerzo realizado para que nosotros lleguemos a concluir nuestra carrera profesional.

A nuestras queridas amigas Betty, Carmen, Deris y amigos por su compañía, amistad sincera, enseñanzas y vivencias que nos recordaban lo bello que es la vida.

Finalmente, pero no con menor reconocimiento, queremos agradecer a cada una de las personas que intervinieron, aportaron y acompañaron durante la formulación, ejecución y sustentación del trabajo, quienes amablemente e incondicionalmente nos ayudaron, gracias por sus sugerencias y experiencias compartidas.

Judi y Edu.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I

1. GENERALIDADES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVOS GENERALES.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	4
1.4. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA.....	5
1.5. HIPOTESIS.....	6
1.6. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACION.....	6

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO.....	7
2.1. VISION HISTORICA.....	7
2.2. ANTECEDENTES.....	8
2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	8
2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES.....	11
2.2.3. ANTECEDENTES LOCALES.....	11
2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	11
2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	12
2.4.1. ASPECTOS DESCRIPTIVOS DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Annona muricata</i> L.....	12

2.4.1.1. Nombre científico de la especie vegetal	12
2.4.1.2. Nombres Populares.....	12
2.4.1.3. Origen de la especie vegetal	13
2.4.1.4. Clasificación taxonómica de la especie vegetal.	13
2.4.1.5. Descripción Botánica.....	14
2.4.1.6. Composición química y valor nutricional del fruto.....	14
2.4.1.7. Componentes químicos de la semilla.....	15
2.4.1.8. Usos en la medicina tradicional.....	16
2.4.1.9. Acetogeninas.	17
2.4.2. DEL EFECTO INSECTICIDA.....	21
2.4.2.1. Fiebre Amarilla	21
2.4.2.2. Dengue.....	23
2.4.2.3. Vector de la fiebre amarilla y dengue mosquito <i>Aedes aegypti</i>	24
2.4.2.4. Biopesticida.....	26
2.4.2.5. Insecticida utilizado como patrón (TEMEFÓS).....	28
2.4.3. DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.....	29
2.4.3.1. Fiebre tifoidea	29
2.4.3.2. Salmonella typhi.....	30
2.4.3.3. Crecimiento de las poblaciones bacterianas.	33
2.4.3.4. Curva de crecimiento bacteriano.....	34
2.4.3.5. Actividad antimicrobiana in vitro.....	36
2.4.3.6. Actividad Antimicrobiana.....	37
2.4.3.7. Medición de la actividad antimicrobiana.....	40
2.4.3.8. Interpretación del antibiograma.	43
2.4.3.9. Control microbiológico.....	43
2.4.3.10. Fármaco patrón (CIPROFLOXACINO).	44
2.5. GLOSARIO DE TÉRMINOS.	49

CAPITULO III

3. MATERIALES Y METODOS.....	53
3.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.....	53
3.1.1. MUESTRA VEGETAL.....	54
3.1.2. MUESTRAS BIOLÓGICA.....	54
3.1.3. MUESTRA MICROBIANA.....	54
3.2. MATERIALES, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS.....	54
3.2.1. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	54
3.2.2. SOLVENTES Y REACTIVOS.....	56
3.2.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	56
3.2.4. OTROS MATERIALES.....	56
3.3. DE INFRAESTRUCTURA.....	57
3.4. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	58
3.4.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	58
3.4.1.1. Tipo de investigación.....	58
3.4.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	58
3.4.2.1. Ensayo de la actividad insecticida.....	58
3.4.2.2. Ensayo de la actividad antibacteriana.....	61
3.5. IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	62
3.5.1. VARIABLES IMPLICADAS.....	62
3.5.1.1. De la actividad insecticida.....	63
3.5.1.2. De la actividad antibacteriana.....	64
3.5.2. VARIABLES NO IMPLICADAS.....	65
3.5.2.1. Variables intervinientes.....	65
3.5.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	66
3.5.3.1. Del material vegetal.....	66
3.5.3.2. De las larvas.....	66
3.5.3.3. Del material microbiológico.....	67

3.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS:.....	67
3.7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	67
3.7.1. EXTRACCIÓN Y ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS ACETOGENINAS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	67
3.7.1.1. Recolección de la especie vegetal <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	67
3.7.1.2. Selección y Dsecación de la muestra.....	70
3.7.1.3. Determinación del Porcentaje de Humedad.....	71
3.7.1.4. Molienda.....	73
3.7.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	73
3.7.3. OBTENCIÓN DE ACETOGENINAS A PARTIR DEL EXTRACTO ETANOLICO DE SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> L.	74
3.7.3.1 Procedimiento.....	77
3.7.4. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN.....	80
3.7.5. ANÁLISIS FISICO-QUIMICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS	80
3.7.5.1. Características Organolépticas	80
3.7.5.2. Ensayos Físicos:.....	81
3.8. DE LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA	87
3.8.1. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA.	87
3.8.1.1. Recolección de la especie insectil <i>Aedes aegypti</i>	87
3.8.1.2. Identificación de la muestra insectil.....	93
3.8.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA EN LARVAS DE LOS MOSQUITOS DE <i>Aedes aegypti</i>	98
3.8.2.1. Bioensayo del efecto insecticida:.....	98
3.8.2.2 Análisis Estadístico:.....	104
3.9. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	105
3.9.1. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	105
3.9.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.	109
3.9.2.1. Activación e identificación de <i>Salmonella typhi</i> spp.	109

3.9.2.2. Estandarización de la curva de crecimiento de <i>salmonella typhi</i> spp.....	112
---	-----

3.9.2.3. Estandarización de la concentración antibacteriana del concentrado de Acetogeninas de <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba) por el método de difusión disco en placa.....	114
--	-----

CAPITULO IV

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	121
4.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	122
4.1.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	122
4.1.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	123
4.1.3. ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS.....	124
4.1.3.1. Características organolépticas:.....	124
4.1.3.2. Pruebas de solubilidad de las Acetogeninas de las semillas de <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	124
4.1.3.3. Análisis cromatográfico:.....	126
4.2. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA DE LAS ACETOGENINAS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba) FRENTE A LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	136
4.2.1. OBSERVACIONES EN EL ANÁLISIS.....	136
4.2.2. RESULTADOS GENERALES DEL EFECTO INSECTICIDA.....	139
4.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO INSECTICIDA.....	142
4.3. RESULTADOS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.....	160
4.3.1. DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LAS ACETOGENINAS AISLADAS A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SEMILLAS DE <i>Annona muricata</i> L. (Masasamba).....	160
4.3.2. RESULTADOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Salmonella typhi</i> spp.....	161
4.3.3. DEL ENSAYO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.....	164
4.4.3.1. De la prueba piloto.....	164
4.4.3.2. De la estandarización de las concentraciones antibacterianas.....	165

4.3.3.3. Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas.....	167
4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	168
CONCLUSIONES.....	176
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....	178
BIBLIOGRAFÍA.....	179
ANEXOS.....	187

ABREVIATURAS:

DH:Dengue Hemorrágico

DC:Dengue Clásico

OPS: Organización Panamericana de la Salud

HPLC:Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

CMI:Concentración Mínima Inhibitoria

OMS:Organización Mundial de la Salud

INS:Instituto Nacional de Salud

THF:Tetrahidrofurano

MINSA:Ministerio de Salud

C: Carbono.

OH: Hidroxilo (grupo funcional)

NADH:Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido.

ATP: AdenosinTri Fosfato

DEN1: Dengue serotipo 1

DEN2: Dengue serotipo 2

DEN3: Dengue serotipo 3

DEN4: Dengue serotipo 4

ACB: Agentes de Control Biológico

KOH: Hidroxido de Potasio (fórmula química)

PH: Potencial de Hidrogeniones.

SH₂: Sulfuro de Hidrogeno (fórmula química)

ARN: Acido Ribonucleico.

ARNr:ARN ribosómico

ADN: Acido Desoxirribonucleico.

UFC:Unidades Formadoras de Colonia

SNC: Sistema Nervioso Central

QP: Químicamente Puro.

DIGESA:Dirección General de Salud Ambiental

DIRESA: Dirección Regional de Salud.

RELCOV: Red Latinoamericana de Control de Vectores.

PPM: Partes Por Millon.

Mg: Miligramos.

MI: Mililitros.

µl: Microlitros

BHI: Infusión Cerebro Corazón.

nm: Nanómetros.

mm: Milímetros.

RESUMEN

El presente trabajo evaluó el efecto insecticida y efecto antibacteriano de las Acetogeninas extraídas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba), el desarrollo de la investigación fue llevado a cabo en diferentes escenarios de la región Cusco (provincias de la Convención, Cusco, Quispicanchis).

La obtención del concentrado de Acetogeninas se realizó por extracción por maceración etanólica al 70% hasta la obtención del extracto etanólico crudo, posteriormente se realizó un proceso de extracción por decantación con solventes de diferente polaridad. El concentrado de Acetogeninas fue sometido a análisis fisicoquímico y determinación de la composición química mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinándose con mucha probabilidad de que la Acetogenina denominada squamostatin D sea el componente mayoritario del concentrado de Acetogeninas obtenida a partir de las semillas de *Annona muricata* L. (43.1206%), al comparar los resultados con los de otros estudios de la especie vegetal se determinó que nuestra muestra de Acetogeninas posee mayor cantidad de squamostatin D,

Posteriormente se determinó el efecto insecticida de las Acetogeninas frente a larvas de *Aedes aegypti* con soluciones preparadas a diferentes concentraciones (10 000, 5000, 500 y 50 ppm), obteniendo resultados de gran interés, siendo la concentración de 10.000ppm la que demostró mayor efecto insecticida frente a las demás concentraciones de experimentación, y en relación con el insecticida patrón (Temefós) presentó un efecto insecticida similar al matar el mismo número de larvas en un periodo de tiempo aproximado.

Se determinó la actividad antibacteriana de las Acetogeninas frente a cepas bacterianas de *Salmonella typhi* spp mediante la técnica de Kirby Bawer para lo cual se utilizaron concentraciones estandarizadas (100, 123.97, 153.69, 190.52, 236.19, 292.81, 362.99 y 450mg) obtenidas a partir de una prueba piloto. Encontrándose que a partir de 100mg se produce inhibición del crecimiento bacteriano, valor que es considerado como la concentración mínima inhibitoria (CIM), y el mayor efecto antibacteriano se produjo a la concentración de 450mg con un halo de inhibición en promedio de 31.67mm la cual superó al halo de inhibición del medicamento patrón (Ciprofloxacino) utilizado la cual fue de 27.67mm en promedio.

Palabras claves: *Annona muricata* L., Acetogeninas, actividad insecticida, *Aedes aegypti*, efecto antibacteriano, *Salmonella typhi*.

SUMMARY

The present work evaluated the insecticide effect and anti-bacterial effect of the Acetogeninas extracted as from abstracts *Annona's muricata* L. (Masasamba), etanólicos of seeds the development of investigation was accomplished at different scenes of the region Cusco (the Convention's provinces, Cusco, Quispicanchis).

The obtaining of Acetogeninas's concentrate the raw etanólico sold off to the 70 % to the obtaining of the abstract for extraction for maceration etanólica, at a later time a process of extraction for decanting with solvents of different polarity came true. Acetogeninas's concentrate went submitted to physicochemical analysis and determination of the chemical intervening composition cromatografía sells out of high resolution (HPLC), to found with a lot of probability of than the named Acetogenina squamostatin, the D be the majority component of Acetogeninas's concentrate obtained as from *Annona's seeds muricata* L. (43,1206 %), when the results compared to give them another studies of the vegetable sort were determined that our Acetogeninas's sign possesses bigger squamostatin's quantity D,

At a later time determined insecticide effect of the Acetogeninas *Aedes's aegypti* with solutions arranged for to different concentrations in front of larvae itself (10 000, 5000. 500 and 50 ppm), getting results from great interest, being the concentration of 10.000ppm her that bigger insecticide effect in front of them demonstrated concentrations of experimentation besides, and (Temefós) you presented an insecticide similar effect when the same larvae's number in an approximate period of time killed relating to the insecticide employer.

determined *Salmonella's Typhi* anti-bacterial activity of the Acetogeninas in front of bacterial ancestries itself intervening spp Kirby Bawer's technique for which they utilized standardized concentrations (100, 123,97, 153,69, 190,52, 236,19, 292,81, 362,99 and 450mg) obtained as from a pilot proof. Meeting than inhibition of the bacterial growth that is considered like the minimal inhibitory concentration, value are produced as from 100mg (CIM), and the bigger anti-bacterial effect produced to the concentration of 450mg with a halo of inhibition in average of 31.67mm which (Ciprofloxacino) the utilized employer proved better than the medication's halo of inhibition which went from 27.67mm on the average.

Key words: *Annona muricata* L, Acetogeninas, insecticide activity, *Aedes aegypti*, anti-bacterial effect, *Salmonella typhi*.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, existe una gran variedad botánica con posibles usos medicinales; en base a conocimientos empíricos sobre su uso terapéutico. Estos conocimientos para ser validados deben ser probados experimentalmente y ello conlleva un proceso científico.

La importancia de las plantas medicinales, ha sido apoyada frecuentemente por diversas organizaciones internacionales como la asamblea Mundial de la Salud y la organización Mundial de la salud quienes con el proyecto "Salud y Medicina Tradicional" han dado mucho valor a los remedios fitoquímicos el 80% de la población mundial usa plantas como fuente primaria de agentes medicinales, en muchos países del mundo existen sistemas bien establecidos de medicina tradicional, en donde los remedios naturales están recopilados por lo que las plantas continúan siendo una fuente mayoritaria de productos naturales biológicamente activos, que puedan servir como entidades comercialmente significativas o suministrar estructuras que sirven de blanco para el desarrollo de derivados modificados que poseen toxicidad reducida y mejorada actividad (1).

Las plantas, en conjunto, producen más de 100.000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Estos son, normalmente, no-esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. Semejante diversidad química es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano, o la predación de insectos y animales. Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas. Por lo tanto en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como una alternativa fuente de antiespasmódicos, analgésicos, antibacterianos, pesticidas, etc. más seguros para la salud humana y el medio ambiente(2).

La *Annona muricata* L. es un árbol que ha sido utilizado por culturas antiquísimas entre ellas la Chimú (pre Inca) con fines medicinales y alimento. Todas las partes de la planta se utilizan con fines terapéuticos ampliamente

comprobados desde la década de 1940. Su uso en la medicina tradicional se debe por sus propiedades beneficiosas las que se mencionan como protector, eleva el sistema inmunológico hasta en un 50%, presenta Propiedades rejuvenecedoras y antioxidantes, Antitumorales, antirreumático, antiartrítico, antidiabético, anti inflamatorio, endocrinológico, sedativo, anti diarreico, fungicidas y antimicóticas, antipsoriacicas, antiparasitarias, antibacterianas, antihistamínicas e insecticidas (3).

Históricamente, las campañas de control de los mosquitos han tenido éxito en la eliminación de *Aedes aegypti*, el vector urbano de la fiebre amarilla en la mayoría de los países continentales de Centroamérica y Sudamérica (4). Sin embargo, los mosquitos de esta especie han recolonizado las zonas urbanas de la región y vuelven a suponer un riesgo de fiebre amarilla urbana. Por este motivo surge la opción de utilizar agentes del entorno las cuales son de fácil acceso por los pobladores para poder controlar la proliferación de los mosquitos (5).

El dengue y la fiebre amarilla en la actualidad son Arbovirosis humanas de mayor importancia en salud pública, enfermedades víricas que mayormente están distribuidas en países en vías de desarrollo, donde la peligrosa combinación del abandono de condiciones ambientales, los factores climatológicos y el alto índice de pobreza dificultan la erradicación del mosquito *Aedes aegypti* que actúa como vector. Así como también las enfermedades entéricas causadas por infecciones bacterianas que ocasionan una gran parte de carga de morbilidad y mortalidad en niños, en países en vías de desarrollo nos llevan a buscar nuevas alternativas para evitarlas.

En tanto una amplia variedad de antimicrobianos naturales, han sido desarrollados a partir de microorganismos, plantas y animales, muchos de los cuales, ya han sido empleados para la conservación de la salud y otros vienen siendo investigados.

CAPITULO I

1. GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fiebre amarilla también llamada *Plaga Americana*, es una enfermedad vírica aguda e infecciosa causada por el virus de la fiebre amarilla transmitida por mosquitos infectados del género *Aedes*. Es una causa importante de enfermedad hemorrágica en muchos países de África y Sudamérica, a pesar de la existencia de una vacuna efectiva como medida de profilaxis.

Se calcula que cada año se producen en el mundo 200 000 casos de fiebre amarilla que causan unas 30 000 muertes. El virus es endémico en las zonas tropicales de África y América Latina, con una población de más de 900 millones de habitantes, de ahí surge la importancia en el manejo adecuado de medidas de control de los mosquitos infectados en zonas latentes a estas infestaciones (1)(6).

En todo el continente americano, se han notificado 2395 casos entre 1985 y 1999, con un total de 1764 muertes por fiebre amarilla. Más del 80% de estos casos provinieron de Bolivia y de Perú (6).

La mayoría de los brotes en Sudamérica ocurren entre personas que trabajan en las selvas tropicales lluviosas, convirtiéndose por ello, en esas localidades, en una enfermedad ocupacional (6).

El Dengue en la actualidad es una de las enfermedades víricas humana de mayor importancia en salud pública, resultando endémico en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo. Anualmente, en el mundo, se reportan aproximadamente 50-100 millones de casos de dengue clásico (DC) y 250 000 a 500 000 casos de dengue hemorrágico (DH), constituyéndose esta enfermedad en la principal causa de hospitalización y muerte entre los niños (6).

Dos quintas partes de la población mundial viven en áreas de riesgo para dengue, mayormente distribuidas en países en vías de desarrollo como el Perú, donde la peligrosa combinación del abandono de condiciones ambientales, los

factores climatológicos y los índices crecientes de pobreza dificultan la erradicación del *Aedes aegypti* que actúa como vector. (7)

En el Perú, los primeros casos de dengue en forma epidémica fueron reportados en la Amazonía (Iquitos, Pucallpa y Tarapoto) en 1990 (7 858 casos en total) desde entonces, el dengue se ha extendido en el país desde el oriente hacia el occidente y de norte a sur. En 1991, se notificaron epidemias en Tingo María y chanchamayo; en 1992, en Tumbes; y en 1993; en Piura. (7)

En la región de Cusco los casos reportados de dengue al sistema de vigilancia epidemiológica de la DIRESA durante los tres últimos años (2009, 2010 y 2011) fueron en total 57 siendo el 2011 el año donde se reportó todos los casos. Por otra parte los casos reportados de fiebre amarilla al sistema de vigilancia epidemiológica de la DIRESA durante los años 2000 al 2011 en la región de Cusco fueron de 38 casos en total teniendo una incidencia mayor en los 5 últimos años con 18 casos (ANEXO N° 13). (8)

Muchas personas que habitan áreas endémicas, utilizan como medio de tratamiento la medicina tradicional como complemento a los tratamientos médicos, dentro de estas enfermedades encontramos en nuestro país enfermedades como la fiebre amarilla, producida por un virus cuyo vector es el mosquito *Aedes Aegypti* que ha sido fuente de epidemias devastadoras en el pasado (7).

Para lograr disminuir la diseminación de esta enfermedad se observo que la única forma de controlarlas es mediante la erradicación o reducción a niveles extremadamente bajos del vector, utilizando insecticidas químicos Por esta razón, la OPS (2001), propuso el llamado control selectivo de vectores, que involucra el uso de recursos disponibles en un determinado territorio y al alcance de la comunidad, con el propósito de adaptarlos y adecuarlos como medidas para el control de vectores (7).

A su vez los desórdenes gastrointestinales son causa importante de enfermedad de la población en general; los más frecuentes son las diarreas infecciosas y el dolor abdominal en niños, el estreñimiento y gastritis en

adultos. La epidemiología de estas enfermedades se agrava por la transmisión feco-oral muchas veces como consecuencia de la falta de agua potable y deficientes sistemas de eliminación de excretas. Estas enfermedades se dan por diferentes patógenos entre ellas las que destaca en nuestro medio es *Salmonella* la cual es un microorganismo procariota unicelular considerado patógeno para el ser humano (9).

En la región Cusco la fiebre tifoidea tiene una incidencia elevada reportándose según la información recogida del MINSA en el año 2009 se registraron 9,037 casos, en el año 2010 se registraron 7,427 casos (anexo N°14) (10).

Por lo que se decidió realizar este estudio sobre la actividad insecticida y antibacteriana In Vitro de esta especie, los cuales proporcionarán una validez científica que será necesaria para garantizar su eficacia en el tratamiento y control de manera informada de los vectores de la fiebre amarilla y su uso como un antibacteriano frente a una determinada especie bacteriana (8).

1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Presentaran las Acetogeninas presentes en las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) obtenidas de extractos etanólicos efecto insecticida sobre larvas de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla y dengue)?

¿Presentarán las Acetogeninas obtenidas del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba), actividad antibacteriana sobre bacterias de *Salmonella typhi* spp, responsable de infecciones diarreicas agudas en nuestra comunidad?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la actividad insecticida de las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. frente a larvas de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla y dengue).

2. Determinar la actividad antibacteriana in vitro de las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" frente a cepas de *Salmonella Typhi* spp.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener los extractos etanólicos al 70% de las semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba".
- Obtener las Acetogeninas presentes en los extractos etanólicos al 70% de las semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" mediante técnicas de extracción por solventes.
- Realizar los ensayos fitoquímicos preliminares de los extractos etanólicos al 70% de las semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. (Masasamba) tales como: porcentaje de humedad, porcentaje de extracción y pruebas de solubilidad.
- Realizar el análisis fisicoquímico del concentrado de acetogeninas mediante cromatografía en capa delgada y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Recolectar e identificar larvas de *Aedes aegypti* mediante técnicas estandarizadas.
- Comparar la actividad insecticida in vitro de las Acetogeninas obtenidas del extractos etanólicos al 70% a partir de semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L (Masasamba) con un insecticida estándar (Temefós).
- Obtener cepas de cultivos de *Salmonella typhi* spp. para la determinación del efecto antibacteriano de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos al 70% de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).
- Realizar el control microbiológico de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos al 70% de *Annona muricata* L.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), de las Acetogeninas obtenidas de los extractos etanólicos al 70% de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) frente a cepas de *salmonella typhi* spp.
- Comparar la actividad antibacteriana in vitro de las Acetogeninas obtenidas del extractos etanólicos al 70% a partir de semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L (Masasamba) con un antibacteriano estándar (Ciprofloxacino).
- Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada ensayo de la presente investigación.

1.4. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA

En el conocimiento:

El empleo de las plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan a la población, es cada vez más frecuente y la Masasamba, una planta que crece en la zona tropical de la sierra peruana (Quillabamba - Cusco) posee numerosas cualidades entre las que destacamos su efecto insecticida y antibacteriana.

La fiebre amarilla y el dengue son enfermedades transmitidas por un vector, de gran importancia en salud pública. La prevalencia de estas enfermedades víricas está asociada a su principal vector *Aedes aegypti* (Linnaeus), es endémica en más de 100 países y unos 2.500 millones de personas están ahora en riesgo de contraer la enfermedad. Según la Organización mundial de la salud (O.M.S) pueden presentarse unos 50 millones de infecciones cada año. En el año 2002 se presentó la cifra más alta de casos de fiebre hemorrágica en América latina, 1'019.196 casos fueron registrados, de los cuales 17.363 fueron fiebre amarilla hemorrágica, presentándose 225 muertes (1). Durante el año 2001, el Instituto Nacional de Salud (INS) recibió un total de 6,072 muestras procedentes de 16 departamentos del Perú, determinándose 1593 casos positivos a dengue por serología, que representa 6,8% de los casos reportados como probables en el mismo año. (7)

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa intestinal, grave y aguda que constituye un problema severo de salud pública en casi todo el mundo, aunque

su incidencia ha disminuido en países con mejores niveles de higiene y saneamiento ambiental, en nuestro país aun se presentan casos en los establecimientos de salud debido a las condiciones higiénicas en la que la mayoría de población está sometida. (8)

En prioridad:

Muchas especies vegetales, especialmente de las *Annonaceae*, han mostrado tener bioactividades, en especial la insecticida así como también la antibacteriana (Alali et al., 1999). Sin embargo, poco se ha investigado dentro de los programas de salud pública local y nacional, la manera de controlar los altos niveles de resistencia fisiológica alcanzados a causa de los insecticidas sintéticos actualmente en uso (OMS, 1992). Por este motivo y con la perspectiva de incorporar un recurso alternativo para el control de los mosquitos *A. aegypti*, en beneficio de la salud humana y controlar epidemias de fiebre amarilla y dengue en zonas latentes se desea realizar esta investigación dentro de un manejo racional de nuestro medio ambiente (1).

La *salmonellosis* es una enfermedad que afecta esencialmente a los seres humanos, es transmitida al ingerir alimentos contaminados por lo que la población es muy susceptible a contraerla, por este motivo se busca incorporar a la especie vegetal como una alternativa de tratamiento.

Por lo que el presente trabajo de investigación pretende dar una nueva alternativa de tratamiento de origen natural, con menor toxicidad y de bajo costo, en vista que la especie vegetal crece de forma silvestre, lo que facilita a la población su fácil acceso a las plantas para un tratamiento adecuado. (9)

1.5. HIPOTESIS

1.- Las Acetogeninas obtenidas de extractos etanólicos a partir de semillas de *Annona muricata* L (Masasamba) poseen actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti*. Mosquito catalogado como vector responsable de enfermedades endémicas en nuestro país como son la Fiebre Amarilla y Dengue.

2.- Las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L "Masasamba" posee actividad antibacteriana frente a bacterias del genero Salmonella, en particular *Salmonella Typhi* spp. Agente causal de diarreas agudas en nuestra comunidad.

1.6. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACION

La temporada de recolección del fruto de *Annona muricata* L (Masasamba) que contiene las semillas sólo se da entre los meses de febrero a mayo por lo que la accesibilidad a las zonas donde se encuentra se ve dificultada por las lluvias de temporada que causan problemas en las vías de transporte para acceder a las zonas donde se desarrolla la planta, debido a esto su recolección es limitada.

Las condiciones medio ambientales de las zonas de recolección de larvas de *Aedes aegypti*.

La obtención de cepas puras de bacterias de *salmonella typhi* ATCC por la falta de proveedores.

La obtención del medio de cultivo Bismuto Sulfito según Wilson Blair la cual se utiliza para la diferenciación de *Salmonella typhi* frente a otras salmonellas.

Estos puntos se convierten en limitaciones de la investigación debido además a diversos factores como de viaje, pedido de la cepa de bacterias a una entidad reconocida, factores económicos, desconocimiento de las zonas de recolección, etc.

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1. VISION HISTORICA

El bagaje de conocimiento sobre el uso de las plantas de las culturas andinas es enorme. La información etnobotánica andina existente está catalogada de acuerdo al momento histórico en que fue obtenida, los tipos de usos atribuidos a las plantas y los grupos humanos involucrados.

La Masasamba es comúnmente conocida como guanábana su origen no se conoce con certeza sin embargo, actualmente se cultiva en América tropical, el sudeste Asiático y en las islas Filipinas. Ha sido introducida en muchos países y es considerada la más tropical de las anonas.

Fue cultivado en el Perú prehispánico. Su fruto se encuentra representado con frecuencia en la cerámica precolombina de la costa peruana, conforme lo testimonia la existencia de varias piezas de cerámica de la Cultura Chimú en la que está representada con exactitud. (12)

Los indígenas cultivaron cuidadosamente muchas especies de la familia Annonaceae en Mesoamerica, los valles interandinos, Amazonia y otros lugares. (12)

Dentro de la medicina tradicional los indígenas usaban las hojas en infusión como antidiarreicas y como digestivas. Aplicadas localmente como cataplasma, lo empleaban en el caso de las paperas. Las flores eran usadas en casos de gripe y catarro bronquial. (13)

En los últimos años, el extracto de guanábana ha llegado a ser ampliamente aclamado por tener supuestas propiedades altamente potentes para combatir diversas enfermedades. Los usos más comunes de esta planta van desde el cultivo de sus frutos, la obtención de aceites para perfumería y el interés de las propiedades de dureza y elasticidad que presenta su madera. (13)

Históricamente, las campañas de control de los mosquitos han tenido éxito en la eliminación de *Aedes aegypti*, el vector urbano de la fiebre amarilla y dengue en la mayoría de los países continentales de Centroamérica y Sudamérica. Sin embargo, los mosquitos de esta especie han recolonizado las zonas urbanas de la región y vuelven a suponer un riesgo de estas enfermedades.

Desde el comienzo de los años en el que se ha tratado de erradicar a los mosquitos causantes de la fiebre amarilla se observó que se estaba dando a lugar la resistencia de los mosquitos, vectores de enfermedades metaxénicas a los insecticidas químicos la cual se ha incrementado en los últimos años. Frente a esta realidad, se está realizando la búsqueda de métodos alternativos.

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO:

Figueroa, et al., 1995 “propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas” revista BIOFARBO; Instituto De Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas Universidad Mayor de San Andrés-Bolivia (14).

Menciona que las semillas, las raíces y las hojas de *Annona muricata* L. (Masasamba), presentan una composición compleja, presenta más de 30 componentes principales, los componentes mayormente presentes son Lactonas como Annohexocina, Annomuricina A, B, C y E, Annomutacina, Annopentocinas A, B y C, Muricoreacina, Gigantetronemina, Murihexocina A y C, Javoricina; lípidos como Acido gentísico, Acido lignocérico, Acido linoleico, Acido esteárico e Isoquinolinas como Anonaine, Anonine, Atherospermine, Coreximine.

Por todo ello tiene actividad antibacteriana de amplio espectro, actividad antimicótica contra saprofitos y un efecto repelente contra vectores de la fiebre amarilla (14).

Robinan, et al., 1986 “SEMINARIO TRAMIL No. 2. Investigación Científica y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe”. Menciona que las diferentes partes del vegetal presenta diversas propiedades medicinales las cuales son utilizadas por los lugareños donde habita la planta de diferentes maneras y de acuerdo a sus conocimientos como: Antibacteriana (Corteza), Antiparasitario (Semillas y corteza), Antiulceroso (Corteza), Galactogogo (Fruto), Antiespasmódico (Hojas), Sedativo (Hojas), Antimalárico (Hojas),

Antidiabético (Hojas), Vasodilatador (Hojas), Pectoral (Flores), Amebicida (Corteza), Vermífugo (Corteza y hojas), Insecticida (Hojas y raíz) (15).

Murillo et, al., 2001 "las *Annonaceae* de Colombia" pag 49-58: Menciona el estudio sobre la medicina tradicional como fuente que conduce al descubrimiento de nuevos agentes antiparasitarios, ha encontrado que plantas de la familia *Annonaceae* son utilizadas por comunidades colombianas como antiparasitarias. Algunas especies de esta familia presentan interesantes metabolitos con actividad biológica: polifenoles, aceites esenciales, terpenos compuestos aromáticos, Acetogeninas particularmente activas, moléculas con un amplio espectro de acción antibacteriana, antiparasitaria e insecticida y los alcaloides de tipo bencilisoquinolinicos. (16).

Escobar, T. Zarate, R. Bastidas, A., 1994 "Biología floral y polinización artificial del guanábano *Annona muricata* L. en condiciones del valle del Cauca Colombia" .pp. 7-20.

Menciona que *Annona muricata* por sus componentes activos posee propiedades insecticidas debido a la presencia de compuestos como los alcaloides muricina y muricinina, Acetogeninas, flavonoides entre otros. Las semillas pulverizadas son utilizadas para matar piojos, chinches, polillas y cucarachas. (17)

DEL ESTUDIO FARMACOLOGICO:

Montoya, et, al., Acetogeninas de *Annonaceae* como pesticidas naturales sobre larvas del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (lep: noctuidae). Boletín del museo de Entomología de la Universidad del Valle, 32-40.2005.

Realizaron un estudio que demuestra la eficiencia de las Acetogeninas *Annonaceae* encontradas en extractos es una alternativa ecológica en el manejo integrado de plagas, debido a la abundancia de *Annona muricata*. (18)

Marmara et. al., veinte plantas medicinales, instituto de ciencia y tecnología agrícola, publicaciones recursos naturales, 28-35.2004.

Realizaron una evaluación de dos acetogeninas de *Annonaceae* y sus efectos insecticidas y mutagénico sobre diferentes especies con distintos hábitos alimenticios. (19)

Mc. Lughlin, I.; zeng, N.H. Oberlies, G-X; Zhao, Z-M. Recent avances in phytochemistry. Mata, R and Romeo, J.T Plenum Pres, 249-310.1995.

Mencionan que las plantas de la familia *Annonaceae* como la *A. muricata*, *A. cherimolia* y otras presentan Acetogeninas en las raíces como en las semillas de los frutos las cuales son compuestos naturales que presentan una extensa gama de actividad biológica, antitumoral, citotóxica, antimicrobiana, plaguicida, anti protozario y antihelmíntico (20).

Romain, A.D.; Poupon, E.; Romero, V.; E.; Peris, E.; Lewin, G.; Cortes, D.; Brandt, V.; Hocquemiller, R. 62,;6248-6257.

Menciona que las Acetogeninas son compuestos de estructura característica como la Escuamocina; Acetogenina bis-THF, Annonacina; acetogenina mono-THF dihidroxilada presentes en semillas de plantas de la familia *Annonaceae* como *A. muricata* *A. cherimolia*, *A. esquamosa* y de otras *Anonáceas*. El interés surge por algunos estudios que sugieren que ciertas Acetogeninas de la *Annona muricata* (Masasamba) y de otras *Annonaceae*s presentan un excelente potencial como Biopesticidas. (21)

Cave, A., Figadere, B., Laurens. A. and Cortes, D. 1997. "Acetogenin from Annonaceae progress in the chemistry of organic natural Springer". 81-287; 1997.

Realizaron un estudio con Acetogeninas evaluando su actividad antibacteriana e insecticida. La actividad antibacteriana fue evaluada frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*) y bacterias Gram negativas (*E. coli*, entre otras enterobacterias). Los resultados mostraron sensibilidad bacteriana a dichos compuestos.

Mientras que en el estudio insecticida mostraron efectos positivos contra insectos como el mosquito transmisor de la fiebre amarilla, las cucarachas, *Drosophila melanogaster* y algunas especies de arañas. (22)

Pereira, A.M.;Ferro D. monografía de diez plantas medicinales. p7- 2008.

Mencionan que los extractos metanolicos, hexánicos producidos a partir de semillas, hojas y corteza presentan actividad antibacteriana frente a *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexeri*, *Staphylococcus aureus*, *S. albus*. (23)

2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES

Tapia, Mario: "Semillas Andinas". Concytec. 1993. Estudio que demuestra la presencia de compuestos con potente actividad anticancerígena las cuales a su vez presentan actividad potente contra los vectores de la fiebre amarilla siendo las siguientes: Bullatacin, Bullatacinone, Muricoreacin, Murihexocin C, Annomuricin A, Annomuricin B, Muricatocin A, Muricatocin C, Muricapento c. (24).

2.2.3. ANTECEDENTES LOCALES

Actualmente no existe ningún estudio de *Annona muricata* L. sobre el efecto insecticida sobre algún vector en nuestra localidad.

2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Según la OMS el número de casos de fiebre amarilla ha aumentado en los dos últimos decenios debido a diversos factores como a la disminución de la inmunidad de la población. Hay varias especies diferentes de mosquitos *Aedes* y *Haemogogus* que transmiten el virus (1).

Según el MINSa los mosquitos se crían cerca de las casas (domésticos), en el bosque (salvajes) o en ambos hábitats (semidomésticos) en nuestra zona tropical del Perú. El control de los mosquitos es fundamental hasta que la vacunación haga efecto. El riesgo de transmisión de la fiebre amarilla en zonas urbanas puede reducirse eliminando los potenciales criaderos de mosquitos y aplicando insecticidas al agua donde se desarrollan en sus estadios más tempranos (6).

Estudios realizados en Colombia sobre *Annona muricata* L. (Masasamba), mencionan que los componentes presentes en las semillas, hojas, raíz, tallo, fruto hacen posible la determinación de diversos efectos farmacológicos como citotóxico, antimicrobiano (antibacteriano), antiparasitario e insecticida (larvicida) frente al vector de fiebre amarilla. Las Acetogeninas presentes en la semilla de *Annona muricata* L. son responsables de la actividad plaguicida (9).

Según la unidad de estadística e informática del Hospital de Apoyo Departamental Cusco en el año 2010 se han reportado 74 casos de fiebre tifoidea de los cuales 18 han sido hospitalizados por el cuadro agresivo que presentaron los pacientes, en el año 2011 desde Enero hasta la fecha se han

reportado 31 casos de fiebre tifoidea de los cuales 01 caso fue derivada a hospitalización. (25)

2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.

2.4.1. ASPECTOS DESCRIPTIVOS DE LA ESPECIE VEGETAL *Annona muricata* L.

2.4.1.1. Nombre científico de la especie vegetal.

Annona muricata L. pertenece a la familia *Annonaceae* es conocida en América con el nombre graviola y *sursop* en idioma inglés. Sus sinónimos son: *Annona bonplandiana* (Kunth), *Annona cearensis* (Barb. Rodr), *Annona macrocarpa* (Wercklé), *Annona muricata* (var. *Borinquensis* Morales) y *Guanabanus muricatus* (M. Gómez). (26)

2.4.1.2. Nombres Populares

La *Annona muricata* L. es conocida popularmente con los nombres como guanábana, graviola, masasamba, corosol, chachiman, huana-huana. Su origen no se conoce con certeza, sin embargo, actualmente se cultiva en América tropical, el sudeste asiático y las islas filipinas (26).

2.4.1.3. Origen de la especie vegetal

El guanábano (*Annona muricata* L.) es una planta cuyo centro de origen es la parte tropical de Sudamérica pero ha sido introducida en muchos países. Crece óptimamente entre los 0- 1,000 m.s.n.m. Es considerada la más tropical de las annonas, pues no resiste el frío (26).

2.4.1.4. Clasificación taxonómica de la especie vegetal.

Reino	:	Plantae
Phyllum	:	Spermatophyta
Subphyllum	:	Magnoliophytina
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Magnolidas
Orden	:	Magnoliales
Familia	:	Annonaceae
Género	:	Annona
Especie:		<i>Annona muricata</i> .

Fuente: Comisión Nacional Forestal (26)

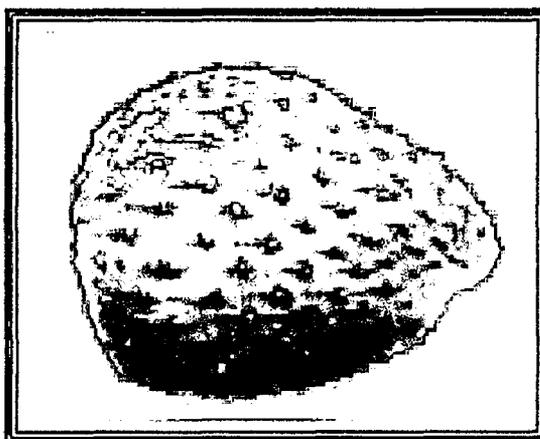


FIGURA N° 1: Fruto de *Annona muricata* L.

Fuente: *Annona muricata* L. (1753). (26).

2.4.1.5. Descripción Botánica

Árbol pequeño que llega a alcanzar hasta 10 metros de altura, de follaje compacto, hojas simples, coriáceas verde oscuro, grandes y brillantes; flores bisexuales solitarias o en pares en tallos cortos que brotan de las ramas viejas; cáliz con 3 sépalos diminutos e inconspicuos de color verde; corola con 6 pétalos de color amarillo; fruto baya colectiva o sincarpo, de forma acorazonada u ovoide, con pericarpio (cáscara) verdoso con tubérculos

espiniformes carnosos, la pulpa es blanca y jugosa de sabor agridulce; las semillas de color negro lustroso o castaño (27).



FIGURA N° 2: Características botánicas de la especie vegetal (*Annona muricata* L).

Fuente: *Annona muricata* L. (1753). (26)

2.4.1.6. Composición química y valor nutricional del fruto.

(100 gramos de fruta fresca)

- Humedad 80,6 %
- Fibra 1,63 %
- Cenizas 0,73 %
- Grasa 0,31 %
- Proteína 1,22 %
- Almidón 1,62 %
- Vitamina C 0,021 %
- Azúcares (Glucosa, Fructosa) 15,63 %
- Potasio 45,8 mg
- Sodio 23 mg
- Magnesio 23,9 mg
- Fósforo 26,0 mg
- Hierro 0,47 mg
- Citrulina (proteína).
- Arginina (aminoácido).
- Acido caproico (lípido).

- Anonaine (isoquinolina).
- Anoniine (isoquinolina).
- Asimilobine (isoquinolina).(27)

2.4.1.7. Componentes químicos de la semilla

- Lactonas.
- Annonicina.
- Annomontacina.
- Annonacina.
- Annomuricatina.
- Annonacinona.
- Javoricina.

Contiene además:

- Annomuricatina (proteína).
- Acido linoleico (lípidos).

Fuente: Monografía Sobre Pruebas de Actividad Biológica (27).

2.4.1.8. Usos en la medicina tradicional.

Dentro de la medicina tradicional las hojas se usan en infusiones como antidiarreicas y digestivas. Aplicadas localmente como cataplasma son antiinflamatorias, y se han usado en el caso de las paperas. Las flores son pectorales y febrífugas, se usa en casos de gripe y catarro bronquial, poseen propiedades astringentes, colagogas digestivas y también vermífugas.(27)

TABLA 1: Propiedades medicinales de cada parte de la especie vegetal (*Annona muricata* L).

Anticancerígeno	Hojas y brotes tiernos
Antibacteriana	Corteza y semillas
Antiparasitario	Semillas y corteza
Antiulceroso	Corteza
Galactogogo	Fruto
Antiespasmódico	Hojas
Sedativo	Hojas
Antimalárico	Hojas
Antidiabético	Hojas
Pectoral	flores
Amebicida	corteza
Vermífugo	Corteza y hojas
Insecticida	Hojas, semillas y raíz

Fuente: biopesticidas de origen vegetal (28).

2.4.1.9. Acetogeninas.

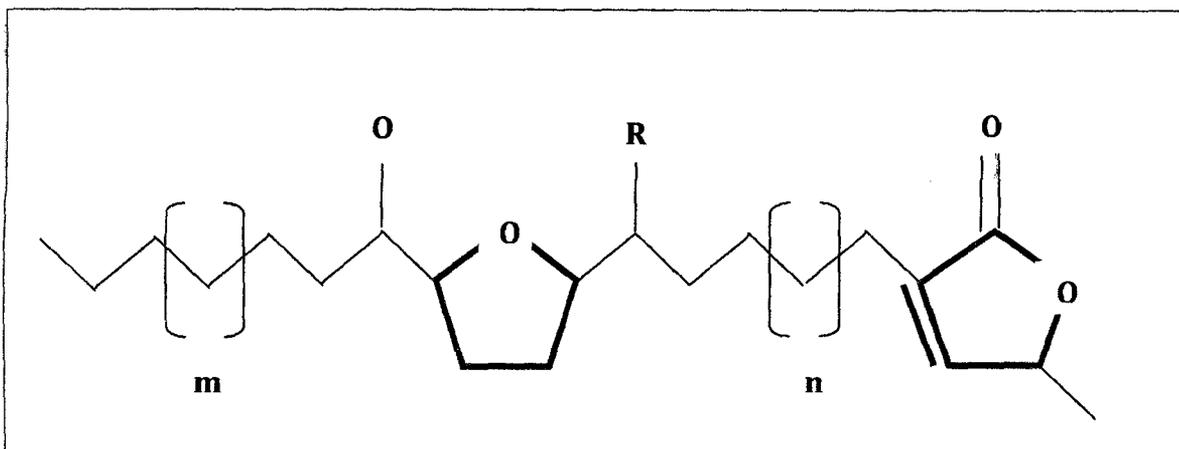
Las Acetogeninas presentes en las *Annonaceae* son un grupo de sustancias conformadas por una cadena larga de C-32 o C-34 de ácidos grasos que pueden estar combinadas con una unidad 2-propanol en el C-2 para tomar una γ -Lactona, las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral, inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoaria y antimicrobiana. (29)

Clasificación de las Acetogeninas de Annonaceae.

Las Acetogeninas de *Annonaceae* se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura, así se tiene:

- ❖ Mono-Tetrahidrofurano (THF).
- ❖ Adyacentes bis-THF.
- ❖ No adyacentes bis-THF.
- ❖ sin anillo mono-THF.

Estas estructuras también poseen hidroxilos laterales las cuales pueden estar a uno u otro lado de la estructura, seguida por una subclasificación de las γ -Lactonas o sustituidas por cetolactonas. (29)



Donde:

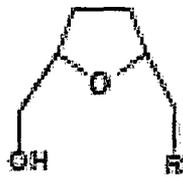
R= OH ó H

GRAFICO N° 1: Estructura general de las Acetogeninas.

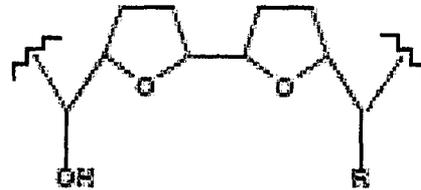
Fuente: Aislamiento y caracterización estructural de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona muricata* y *Annona cherimolia*. (29)

CON ANILLOS:

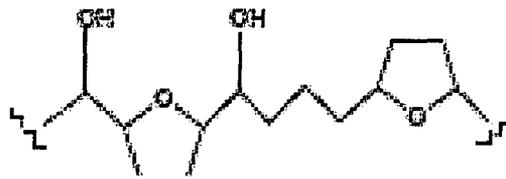
Acetogenina mono-THF



Acetogeninas adyacentes bis-THF



Acetogeninas no adyacentes bis-THF

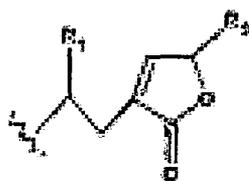


SIN ANILLOS:

Acetogeninas sin anillos-THF

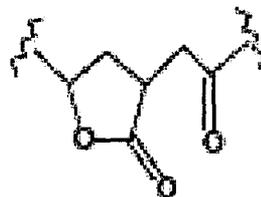


SUBCLASIFICACION DE ACETOGENINAS CON ANILLOS LACTONA TERMINALES



R1=H1OH
R2=H1OH

Cetolactonas cis o trans



Anillo hidroxilado y reducido

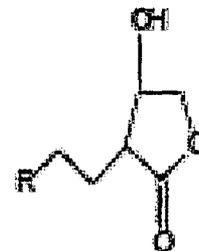


GRAFICO N°2: Clasificación de Acetogeninas según su estructura.

Fuente: Flórez L - Extractos Bioactivos (30)

Relación estructura actividad.

Diversos estudios han sugerido una relación entre la estructura de las Acetogeninas y la actividad biológica al considerar las siguientes características.

- Las Acetogeninas que contienen en su estructura dos anillos de Tetrahidrofurano (THF) adyacentes en su estructura son las que han presentado mayor actividad biológica. Los estudios realizados han sugerido que la función del anillo de THF sea anclar la Acetogenina a la región que contiene el glicerol en la membrana liposomal.
- La γ -Lactona terminal es esencial para la actividad, ya que una reducción del doble enlace de la γ -Lactona α,β -insaturado reduce la actividad. Las cetolactonas son menos potentes que las γ -Lactonas α,β -insaturada.
- El número de grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena también está relacionado con la actividad, presentando mayor actividad aquellas Acetogeninas que poseen un mayor número de grupos OH.
- Un grupo hidroxilo en C-4 es esencial para la actividad.
- Acetogeninas con grupo Ceto a lo largo de la cadena alifática son menos activas que aquellas que presentan grupos hidroxilo.
- La presencia de dobles enlaces o de dioles vecinales a lo largo de la cadena hidrocarbonada aumenta la actividad.
- La longitud de la cadena C-35 o c-37 es la ideal para que se presente la actividad.
- Otro factor que afecta la actividad biológica es la distancia entre los grupos funcionales presentes en las Acetogeninas.
- Se presenta una mayor actividad cuando la distancia entre la γ -Lactona y el THF es de trece carbonos. Las Acetogeninas que presentan un hidroxilo en C-9 presentan actividad considerable, así como aquellas que presentan anillos de THF flanqueados por OH. (30)

Mecanismo de acción de las Acetogeninas.

Una serie de experimentos están demostrando que las Acetogeninas de las *Annonaceae* son inhibidoras de la enzima NADH en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Se encontró que inicialmente la toxicidad presentada

por la exposición de insectos a las Acetogeninas de las *Annonaceae*, incluye una disminución lenta en la movilidad y crecimiento antes de la muerte. Tales síntomas son normalmente atribuidos a los bajos niveles de ATP causados por los inhibidores respiratorios, sin embargo se requiere estudios futuros para conocer el tipo de organismo susceptible a estos componentes, incluyendo mamíferos. (30)

2.4.2. DEL EFECTO INSECTICIDA.

La actividad insecticida asociada con esta familia radica en su importancia en el tratamiento tradicional para enfermedades como la malaria (31)

Los vectores que transmiten la fiebre amarilla son ciertas especies de *Aedes*, el *aegypti* el más común, con un ciclo de vida único: hombre – *A. aegypti* – hombre. El ciclo de vida comprende varios estadios: huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto. Este último se asocia a las actividades del hombre por sus características de reproducción y alimentación. La importancia de la especie vegetal *Annona muricata* (Mazasamba) radica en que las Acetogeninas presentes en esta especie vegetal presentan actividad insecticida frente al vector de la fiebre amarilla y dengue denominado *Aedes aegypti*.

2.4.2.1. Fiebre Amarilla

La fiebre amarilla, conocida también como mal de Siam o fiebre de Barbados, es una enfermedad infecciosa aguda, de rápida evolución, que se transmite por la picadura de mosquitos. Su gravedad puede ser muy variable. Independientemente de su intensidad, una vez padecida se adquiere la inmunidad de por vida. Se manifiesta generalmente en brotes epidémicos de alta mortalidad en las regiones de África, América Central y del Sur. (32)

Causas

Es una enfermedad vírica transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*.

Síntomas de Fiebre amarilla

Sólo en los casos más graves aparece la clásica triada de síntomas: ictericia, hemorragia, fiebre y albuminuria intensa. Durante la incubación, que dura entre

tres y seis días, el virus permanece inactivo. La primera fase, que dura entre tres y cuatro días, se caracteriza por fiebre, escalofríos, dolores musculares, cefaleas, pérdida de apetito, náuseas, vómitos y el signo de Faget, frecuencia cardíaca normal en presencia de fiebre elevada. Pasado este periodo el paciente mejora y los síntomas desaparecen. (32)(33)

Aproximadamente el 15 por ciento de los enfermos desarrolla la fase tóxica, en la que la mayoría de los órganos fallan. Esta fase se caracteriza por la reaparición de los síntomas: fiebre, ictericia (tinte amarillo de piel y mucosas), dolor abdominal, vómitos, hemorragias nasales, conjuntivales y gástricas. La presencia de la albúmina en la sangre (albuminuria) indica que los riñones comienzan a fallar, hasta que se produce un fracaso renal completo con la no emisión de orina (anuria). Esto provoca la muerte en unos diez o catorce días en la mitad de los pacientes que entran en esta fase. El resto se recupera sin secuelas. (33)

Prevención

La vacunación es la medida más eficaz contra el contagio, por lo que la OMS la recomienda para cualquier viaje fuera de áreas urbanas en países situados en zonas de América Central y del Sur y parte del África Subsahariana. Debe ser administrada en los centros oficiales de vacunación acreditados por la OMS. Una dosis proporciona inmunidad durante diez años a partir del décimo día de administración. Provoca efectos adversos, como dolor local, dolores musculares o dolores de cabeza y también puede aparecer fiebre. Está contraindicada durante el embarazo, en las personas alérgicas al huevo, en inmunodeprimidos y en niños menores de nueve meses. Otras medidas de prevención son evitar la picadura de los mosquitos y controlar su reproducción (33).

Tratamiento

No existe un tratamiento específico. Se deben de controlar los síntomas y mantener las funciones de los órganos vitales cuando comiencen a fallar, así como los volúmenes de líquidos y la concentración de electrolitos corporales.

Está contraindicado el uso de ácido acetil salicílico. La fiebre debe ser tratada con paracetamol y la deshidratación leve con sales de rehidratación oral, bajo la supervisión de un médico. (33)

2.4.2.2. Dengue.

El dengue es una enfermedad causada por un virus que es transmitido a través de la picadura de mosquitos infectados. Los viajeros pueden infectarse durante visitas a países tropicales y subtropicales. La enfermedad ocurre en la mayor parte de los países tropicales en Asia, las Islas del Pacífico, las islas del Caribe, México, Sur y Centro América y África.

El virus del dengue es un flavivirus que incluye 4 serotipos (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4). Cualquiera de estos serotipos puede producir la enfermedad. El más frecuente en el dengue clásico es el serotipo 1, que es también el menos frecuente en el dengue hemorrágico. (34)

Causas

Es una enfermedad vírica transmitida por mosquitos hembra de *Aedes aegypti*, es un flavivirus que incluye 4 serotipos (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4). (34)

Síntomas del Dengue

En el Dengue clásico, los síntomas son semejantes a los de una gripe fuerte: fiebre alta de aparición brusca, dolor intenso de cabeza y detrás de los ojos, dolores musculares y de las articulaciones, náuseas, vómitos y erupción de la piel.

El Dengue hemorrágico, es menos frecuente, pero puede aparecer como una enfermedad severa y a veces mortal. A los síntomas anteriores se le agrega sangrado en distintas partes del cuerpo (tendencia a tener fácilmente moretones, distintos tipos de hemorragias en la piel, nariz, encías e internas). (35)

Prevención.

La única manera de prevenir el contagio del dengue es eliminar al mosquito transmisor, básicamente a través de la eliminación de los criaderos de sus larvas, que se reproducen en recipientes con agua tanto en domicilios como en espacios públicos. Sin el mosquito que la transmite, no hay dengue.

A nivel individual, se debe evitar la picadura de los insectos. Para ello se recomienda usar ropa de algodón de colores claros que cubra brazos y piernas, y usar repelentes en forma prudente y sin excesos. (35)

Tratamiento

No existe un tratamiento específico. Se deben de controlar los síntomas y mantener las funciones de los órganos vitales cuando comiencen a fallar, así como los volúmenes de líquidos y la concentración de electrolitos corporales. Está contraindicado el uso de ácido acetil salicílico. La fiebre debe ser tratada con paracetamol y la deshidratación leve con sales de rehidratación oral, bajo la supervisión de un médico. (35)

2.4.2.3. Vector de la fiebre amarilla y dengue mosquito *Aedes aegypti*.

Los mosquitos *Aedes aegypti* son vectores del dengue, fiebre hemorrágica del dengue y de la fiebre amarilla.

El género *Aedes* comprende muchas especies de distribución cosmopolita, viven en agujeros en los árboles, o en estanques transitorios de agua dulce o corrientes. Muchas especies de Norte América producen picaduras molestas. Ciertas especies pueden actuar como transmisoras de fiebre amarilla, dengue, wucheriasis y encefalitis viral.

Se caracteriza por sus hábitos intradomiciliarios, asociado directamente al hombre. (36)

Clasificación científica.

Reino	:	Animalia
Filo	:	Arthropoda
Clase	:	Insecta
Orden	:	Diptera
Familia	:	Culicidae
Género	:	<i>Aedes</i>
Subgénero	:	<i>Stegomyia</i>
Especie	:	<i>Aedes aegypti</i>

Fuente: parasitología clínica. (36)

Características descriptivas de *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti pertenece al orden dípteros y de la familia *culicidae*, que se caracteriza por su pequeño tamaño, con abdomen delgado, a las estrechas, antenas largas y extremadamente plumosas en los machos; presentan un aparato bucal adaptado para picar, con una trompa o pico largo y no articulado, constituido por el labio inferior, por lo que son chupadores labiales. El pico les sirve a los machos para chupar el jugo o néctar de los vegetales y a las hembras que son hematófagas, para chupar la sangre de los vertebrados. (36)

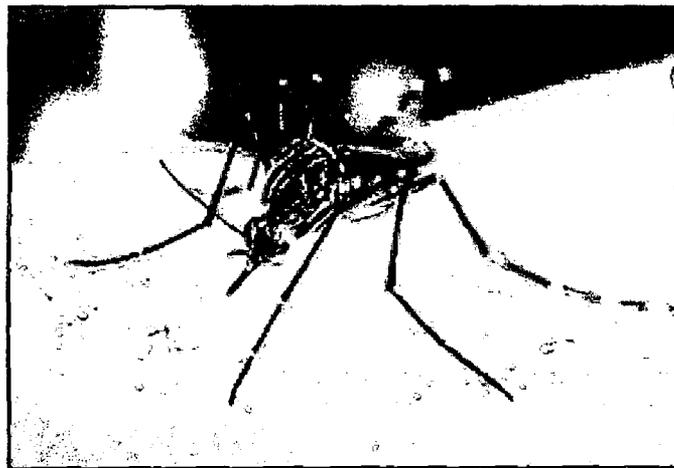


FIGURA Nº 3: Mosquito hembra *Aedes aegypti*.

Fuente: Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello (36).

Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

El ciclo de vida de los mosquitos se desarrolla en cuatro etapas que son:

✓ Huevo:

Está encerrado en una cubierta de tres capas con un pasaje en forma de embudo que facilita la entrada de espermatozoides. Los huevos son depositados en el agua. (37)

✓ Larva:

Alargada, sin patas con pelos enrollados y ramificaciones transversales o simples, distribuidos en todo su cuerpo, pasa a través de cuatro etapas hasta alcanzar la longitud de un adulto. Nadan desordenadamente alcanzando la superficie para respirar. (37)

✓ **Pupa:** Megalocéfala, curva, que asemeja un signo de puntuación coma, la pupa se sumerge rápidamente con una sucesión de saltos como respuesta a estímulos. (37)

✓ **Adulto:**

Al madurar la pupa la membrana es rota por la vesícula aérea y la actividad del insecto adulto para escapar. (37)

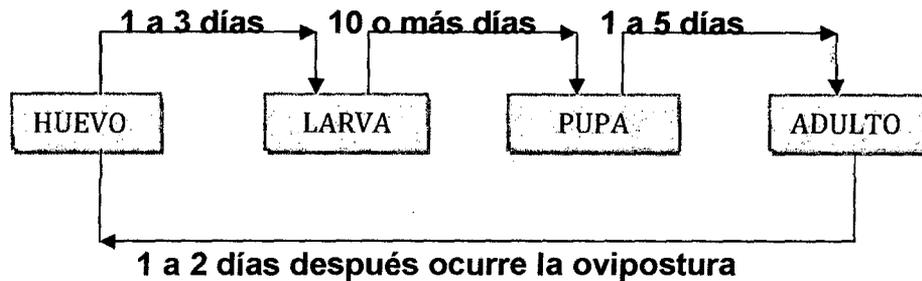


GRÁFICO N° 03: Esquema general del ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

Fuente: Evaluación de la actividad larvica de extractos polares y no polares de Acetogeninas (36).

2.4.2.4. Biopesticida.

Los biopesticidas o agentes de control biológico (ACB) son productos que contienen un ingrediente activo o bien se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden estar constituidos por toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no a sustancias coadyuvantes. (38)

Una gran variedad de biopesticidas naturales se han desarrollado y aprobado para el control de plagas de insectos, pestes y enfermedades bacterianas, estos nuevos derivados botánicos resultan menos dañinos para el medio ambiente, y además se pueden convertir en una herramienta útil para los cultivos de alimentos donde no se puedan fumigar (38).

Características de los biopesticidas

Los biopesticidas son un grupo de pesticidas que pueden reducir el riesgo del uso de pesticidas.

Los biopesticidas en general:

- Tienen un espectro de acción muy limitado y un modo de acción específico.
- Actúan lentamente.
- Tienen tiempos críticos de aplicación.
- Suprime, no elimina la población de la plaga.
- Tienen una persistencia limitada en el campo y tienen una vida de almacén limitada.
- Son más seguros a los humanos y al medio ambiente que los pesticidas convencionales.
- No presentan problemas residuales.

Ventajas:

1. La especificidad en su actuación.
2. Respeto al medio ambiente.
3. Los patógenos tienden a desarrollar menor resistencia a productos microbianos que a productos químicos. (38)

Desventajas:

1. Una efectividad de control en general menor que los productos químicos.
2. Generalmente su acción no es inmediata.
3. Dificultades de producción a nivel comercial.
4. Necesidad de resolver problemas técnicos como la sensibilidad a factores ambientales (temperatura, radiación UV, humedad) que presentan la mayoría de estos productos. (38)

Clasificación de Biopesticidas.

Los Biopesticidas se clasifican de acuerdo al agente contra el que es usado entre estas se encuentran (ver tabla N°2)

TABLA N°2: Clases de biopesticidas

Clases	Acción
Bioinsecticidas	Sobre insectos
Biofungicidas	Sobre hongos
Bioherbicidas	Sobre hierbas
Biobactericidas	Sobre bacterias
Bionematicidas	Sobre nematodos

Fuente: Aislamiento y caracterización estructural de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona muricata* y *Annona cherimolia*. (38)

2.4.2.5. Insecticida utilizado como patrón (TEMEFÓS)

Comúnmente conocido por una de sus fórmulas comerciales de nombre Abate (grado técnico 98%), es el plaguicida que ha tenido mayor uso en las Américas, particularmente en programas de salud pública para el control de las larvas del mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue y fiebre amarilla.

Temefós es un plaguicida organofosforado no sistémico que actúa por contacto e ingestión. Interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa. Se utiliza principalmente como larvicida e insecticida.(39)

Nombre químico

Su nombre químico es 0,0,0,0'-tetrametil-0,0'-tio-di-p-fenileno.

Fórmula global C₁₆H₂₀O₆P₂S₃. Peso molecular: 466.48.

Estructura química.

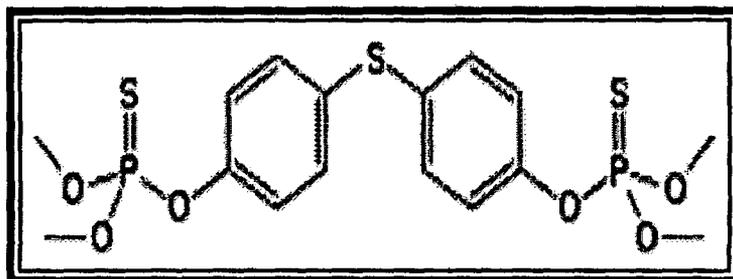


GRAFICO N° 4: Estructura química de Temefós

Fuente: Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina. (39)

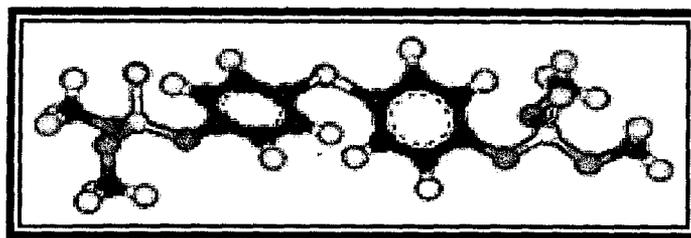


FIGURA N° 5: Estructura tridimensional de Temefós

Fuente: Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina. (39)

Clasificación

En función de sus efectos agudos, la EPA clasifica al Temefós en el Grupo III, "ligeramente peligroso". Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasifica en la categoría U, según la cual "es improbable que presente riesgo agudo si se usa en forma normal".

En México está clasificado en el tipo toxicológico IV. (39)

2.4.3 DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.

2.4.3.1. Fiebre tifoidea.

La fiebre tifoidea se adquiere por la ingestión de alimentos contaminados con *Salmonella typhi*. Con inóculos de 1×10^9 tiene una incubación de 10 a 14 días (40).

Síntomas

En la primera semana presenta fiebre, malestar general, mialgias, cefalea, anorexia y dolor abdominal, puede haber también dolor a la palpación abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, inyección conjuntival, piel reseca y letargia; en la segunda semana constipación o diarrea, tos y síntomas respiratorios, roséola tifoídica. Las complicaciones más comunes son la hemorragia intestinal o perforación intestinal, colecistitis, hepatitis, artritis, osteomielitis, miocarditis, neumonía, parotiditis, pielonefritis, orquitis, amigdalitis, meningitis, linfadenitis supurativa y pancreatitis (40).

Agente causal.

La fiebre tifoidea es causada por *Salmonella typhi*, *Salmonella* penetra al humano por vía oral, llega al intestino, se adhiere a la mucosa y producen patrón secretor y un patrón invasor. Los serotipos de *Salmonella* no tifoidica

causan gastroenteritis aguda sin invasión. *Salmonella* pasa a través de la capa de células epiteliales hacia la lámina propia, donde provocan edema de la mucosa e inflamación, producen pequeñas cantidades de endotoxinas que actúan como pirógenos. Posteriormente se diseminan por vía hematógica y llegan a varios órganos, aparatos o sistemas del cuerpo (40).

Distribución geográfica.

La fiebre tifoidea se encuentra en todas las latitudes y en todos los países del mundo, con mayor incidencia en la edad escolar. La infección por *Salmonella typhi* es más común en individuos entre 5 y 25 años de edad; la transmisión es por la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces humanas.

2.4.3.2. Salmonella typhi.

Responsable de fiebres intestinales, intoxicaciones alimentarias y septicemias, tras la introducción de gérmenes por vía oral. (41)

Clasificación científica.

Reino	:	Procarionte.
División	:	Bacterias.
Sección	:	Anaerobias facultativas.
Familia	:	Enterobacteriaceae.
Género	:	Salmonella.
Especie:		Salmonella typhi.

Fuente: Microbiología médica (41)

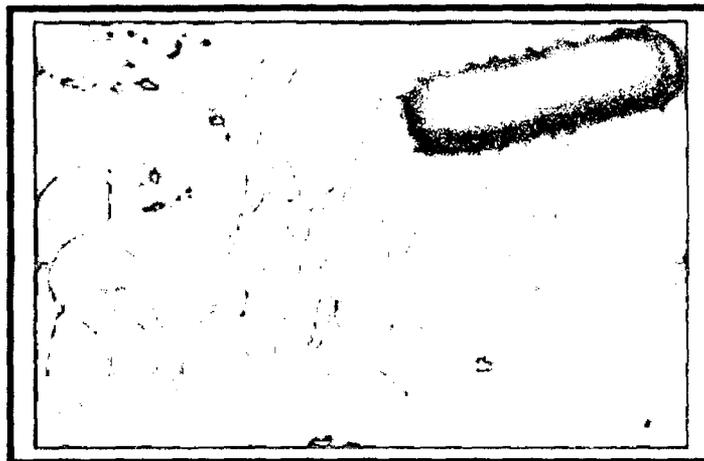


FIGURA N° 4: Bacteria Salmonella typhi.

Fuente: Presentación de un caso atípico de fiebre tifoidea (42).

Nombres científicos de Salmonella typhi.

Bacillus typhosus, Bacillus typhi abdominalis, Bacterium typhi, Eberthella typhi, Salmonella typhosus, Bacterium typhosum, Eberthella typhosa. (42).

Distribución y transmisión.

La *Salmonella Typhi*, está muy difundida por todo el mundo, pero abunda más en los países en que se previene escasamente la contaminación de los suministros de agua y alimentos (42).

El germen se transmite de todas las personas infectadas a las sanas por cualquier medio que pueda ser contaminado por materiales fecales. En cierta época, el principal origen de la infección era el enfermo, pero en la actualidad tiene la máxima importancia el portador resistente. Petruschky dio a conocer, en 1898 que los gérmenes tíficos persisten en la orina de los enfermos de tífus durante meses posteriormente se demostró también que se encuentra en las heces y que el 2.3% de las personas infectadas son portadores durante toda su vida (42).

El germen se transmite a los alimentos por medio del agua contaminada que se pone directamente en contacto con ellos o con los utensilios empleados para el manejo de los mismos. Los dedos del portador pueden transmitir el germen a utensilios y alimentos. Otro tanto pueden realizar las moscas. Aunque el agua es el vehículo de transmisión más frecuente, la leche es un alimento importante que puede contaminarse (42).

Morfología y tinción.

Salmonella typhi es un bacilo grueso y corto de 0'5-0'8 μ de diámetro 1-3 μ de longitud. Algunas bacterias aisladas y ciertos cultivos pueden ser alargados y filiformes. Es muy móvil gracias a sus flagelos peritricos. No tiene cápsulas ni forma de esporos (42).

Se tiñe fácilmente por métodos de coloración habituales y es Gram negativa.

Las bacterias Gram negativas no contiene ribonucleato de magnesio, son menos sensibles a los colorantes de trifenil metano, sensibles a la estreptomycin, son disueltos por KOH al 1%, su isoelectrico entre pH 4 a 5 la mayor parte son bacilos espirilos y cocos que no forman esporos, producen endotoxinas (42).

Características y necesidades de cultivo.

En agente de tifus es aerobio y anaerobio facultativo, creciendo bien en medios a base de infusión de carne a pH 7.2 y temperatura óptima de 36.5°C.

En superficie de Agar forma colonias pequeñas, grises y transparentes, que se vuelven opacas cuando el cultivo envejece, crecen en medio diferencial de SS en caldo produce turbidez uniforme y raramente película en superficie, el crecimiento en papa es fino y brillante, limitándose a una estrecha faja (42).

Resistencia.

Mueren rápidamente por la acción de los desinfectantes superficiales ordinarios tales como el cloro a 200 p.p.m. El calentamiento a 60.5°C durante 30min, o a 71.1°C durante quince segundos, mata el germen. En consecuencia, las temperaturas de pasteurización de la leche son una importante salvaguardia de la salud pública (42).

Propiedades químicas.

Salmonella Typhi produce ácido, galactosa, xilosa, maltosa, rafinosa, dextrina, glicerina, manitol y sorbitol. No fermenta la lactosa, sacarosa, inulina, rhamnosa, inositol, salicina ni, generalmente, la arabinosa y el dulcitol, producen SH₂. Reduce los nitratos a nitritos. No forma indol, ni licúa la gelatina. Produce ligera acidificación inicial de la leche tornasolada aumentando la alcalinidad a medida que el cultivo envejece (41).

TABLA N° 3: Enfermedades clínicas producidas por *Salmonellas*

	Fiebres intestinales.	Septicemias	Gastroenteritis
Período de incubación	7 a 20 días	Variable	8-48 horas
Iniciación	Insidiosa	Súbita	Súbita
Fiebre	Gradual, después una "meseta" alta con estado "tifoideo"	Ascenso rápido, después temperatura en agujas "séptica"	Generalmente baja
Duración de la enfermedad	Varias semanas	Variable	2 a 5 días
Síntomas gastrointestinales	A menudo constipación temprana, más tarde, diarrea sanguinolenta	A menudo no hay	Náuseas, vómitos, diarrea al comienzo
Hemocultivo	Positivo durante la primera y la segunda semana de la enfermedad	Positivo durante la fiebre alta	Negativo
Coprocultivo	Positivo de la segunda semana en adelante, negativo al principio de la enfermedad	Pocas veces es positivo	Después del comienzo, rápidamente positivo

Fuente: Romero Cabello Raúl – Microbiología y Parasitología Humana (40).

2.4.3.3. Crecimiento de las poblaciones bacterianas.

Se entiende como crecimiento o desarrollo al aumento ordenado de todos los componentes químicos de una célula. Por tanto, el aumento del tamaño que resulta cuando de una célula capta agua o deposita lípidos o polisacáridos no es un crecimiento verdadero. La multiplicación celular es una secuencia del crecimiento; en microorganismos unicelulares, es la multiplicación, aumenta la cantidad de individuos y da lugar a una población o cultivo. (43)

Nutrición microbiana

Las células están fundamentalmente compuestas de macromoléculas y de agua. Las macromoléculas se componen de unidades más pequeñas denominadas monómeros, en esencia, la nutrición microbiana consiste en suministrar a las células ingredientes químicos que constituirán monómeros. Estos compuestos químicos son denominados nutrientes.

De acuerdo a la naturaleza y característica de los microorganismos estos requieren diferentes tipos de nutrientes y a menudo suelen ser específicas. (43)

Medios de cultivo

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio para el cultivo de microorganismos. En microbiología se usan dos tipos generales de medios de cultivos; los químicamente definidos y los complejos o no definidos. Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos purificados en un volumen de agua destilada. Por lo tanto se sabe la composición química exacta de un medio definido. Sin embargo en muchos casos la composición exacta de un medio no es importante. (43)

Cultivo de microorganismos en el laboratorio

Una vez que ha sido preparado un medio de cultivo puede ser inoculado es decir se le añaden microorganismos y a continuación es incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. En general se tratara de un cultivo anéxico o puro, esto es, de un cultivo que contiene solo un único tipo de microorganismo. Para mantener un cultivo puro es esencial evitar la entrada de otros organismos. Un método importante para obtener cultivos puros y para

asegurar la pureza de un cultivo es el uso de medios sólidos en placas petri.
(43)

2.4.3.4. Curva de crecimiento bacteriano.

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres.

El crecimiento en un sistema cerrado de este tipo está sometido a leyes que son válidas para los organismos unicelulares y pluricelulares. En la práctica la curva presenta cuatro fases: (44)

Si se introduce en un medio de cultivo líquido una población bacteriana (inoculo), procedente toda ella de la misma célula madre (cultivo puro), y el sistema es cerrado, es decir, ni se añaden ni se eliminan sustancias de desecho, se genera una curva de crecimiento con las etapas que se indican a continuación. (44)

Latencia.

Está determinada por el tiempo que las bacterias requieren para reorganizar sus sistemas enzimáticos. La duración depende de la cantidad del inoculo y de lo parecido que sea el medio del que proviene al nuevo, al que durante este periodo tendrán que adaptarse. (41)

Aunque no hay multiplicación como tal, si existe una intensa actividad enzimática preparatoria de lo que ocurrirá en la siguiente fase. (41)

Crecimiento exponencial o logarítmico.

Al disponer de los nutrientes necesarios, el número de bacterias comienza a aumentar sensiblemente. Las bacterias alcanzan su ritmo máximo de duplicación (el tiempo de generación se acorta), la actividad metabólica es intensa y la síntesis de elementos estructurales se acelera. De acuerdo con lo expuesto, se trata de una fase que en representación logarítmica es una recta. (41).

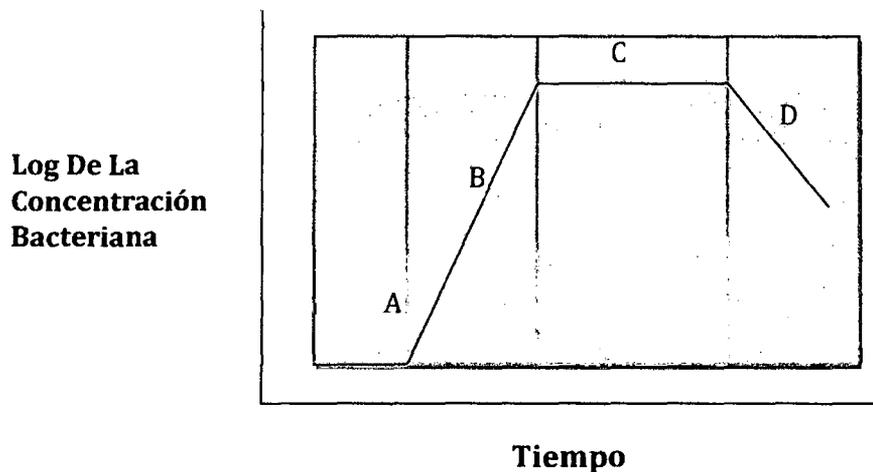
Equilibrio o estacionaria.

Se van agotando los nutrientes, se acumulan sustancias tóxicas y la actividad metabólica y el ritmo de división disminuyen (el tiempo de generación se alargan); en definitiva, existe un equilibrio entre las células viables y las que no lo son. (41)

Muerte o declive logarítmico

El incremento de las circunstancias adversa determina que el equilibrio anterior se rompa a favor de la perdida de la viabilidad de las células. Esto trae consigo la caída de la curva de crecimiento. (41)

Esta curva ideal puede modificarse según el tipo de bacterias y dependiendo de que para crecer exista una dependencia de varios nutrientes o estos se agoten en tiempos distintos. (41)



Fase Log (A), Fase Exponencial (B), Fase Estacionaria (C) y Fase de Muerte (D)

GRÁFICO N° 05: Curva de crecimiento bacteriano.

Fuente: Jawetz, Melnick, Adelberg "Microbiología Médica" 2005. (41)

2.4.3.5. Actividad antimicrobiana in vitro

Medición del crecimiento microbiano.

Para seguir el curso del crecimiento es necesario efectuar mediciones cuantitativas que pueden ser su actividad metabólica, por conteo directo o indirecto, de modo que para determinar la velocidad de crecimiento puede utilizarse la medición de cualquier propiedad de la biomasa, que son habitualmente la masa celular o el número de células. (44)

No es necesario para el conteo de células microbiales estimar su número. En la ciencia y en la industria, los números microbiales y la actividad son determinados por métodos indirectos, uno de estos métodos son la turbidez, la

rapidez de medida de la misma en instrumentos sensibles como un espectrofotómetro o un colorímetro pueden servir una turbidimetría que permite que siga la densidad del cultivo a medida que este crece. La turbidez se expresa en unidades de absorbancia. Para los organismos unicelulares, la absorbancia es proporcional a la cantidad de células, así como su peso, por lo que las lecturas de turbidez se pueden utilizar como un sustituto de la cuenta. (44)

El cálculo de número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopía, número de colonias), la masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular, turbidimetría) o actividad celular (grado de actividad bioquímica con relación al tamaño de la población). Todos estos métodos se clasifican en:

- Métodos directos.
- Métodos indirectos.

TABLA N° 4: Medición del crecimiento bacteriano

MÉTODOS DIRECTOS	MÉTODOS INDIRECTOS
Recuento del número de células en una cámara toma.	Recuento de colonias en placa.
Peso seco celular.	Recuento sobre filtro de membrana.
Determinación de nitrógeno o de proteínas totales.	Consumo de oxígeno.
Determinación de DNA.	Liberación de dióxido de carbono.
	Concentración de una enzima.
	Incorporación de precursores radioactivos.
	Medida de turbidez.

Fuente: Lastra Jorge; Arias Edison. (45).

2.4.3.6. Actividad Antimicrobiana.

Un agente con capacidad antimicrobiana es una sustancia química que mata o inhibe el desarrollo de los microorganismos, esa sustancia puede ser sintética o natural. Los agentes que matan organismos se llaman agentes "cidas", con un prefijo que indica la clase del organismo al que matan. Así, tenemos agente bactericida, fungicida y algicida. (46)

Los agentes que no matan, sino que solamente inhiben el crecimiento se llaman agentes "estáticos" y podemos hablar de agentes bacteriostáticos, fungistáticos y algistáticos.

La distinción entre un agente "estático" y un "cida", es a menudo arbitraria, pues un agente es "cida", a altas concentraciones y puede ser "estático" a concentraciones menores. Para ser efectivo, un agente "estático" debe estar presente continuamente ya que si se elimina o se neutraliza su actividad, el organismo presente puede iniciar su desarrollo, si las condiciones son favorables. (46)

Efecto de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento

Los agentes antimicrobianos afectan el crecimiento en varias formas y el estudio de la acción de estos agentes, en relación con la curva de crecimiento, es una ayuda considerable para comprender sus modos de acción y se clasifican en:

✓ **Agentes antibióticos.**

Los antibióticos son compuestos químicos derivadas o producidos por microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) capaces de inhibir el crecimiento e incluso destruir especies microbianas de forma específica a bajas concentraciones y sin toxicidad (o muy baja) para el organismo humano. (46)

✓ **Quimioterápicos.**

Son agentes químicos antibacterianos, producidos en forma sintética, en el laboratorio bioquímico farmacológico. (46)

✓ **Bacteriostático.**

Sustancia que a concentraciones alcanzadas en el plasma y tejidos solo son capaces de inhibir el desarrollo y la multiplicación bacteriana, las cuales se reanudan una vez que se suspende el tratamiento. Los antibióticos

bacteriostáticos resultan ser eficaces por que las bacterias cuyo crecimiento se inhibe morirán con el tiempo o bien serán atacadas por los mecanismos de defensa del huésped. (46)

✓ **Bactericida.**

Se denomina así aquella sustancia que tiene la capacidad para destruir la bacteria, su acción terapéutica es, por tanto, irreversible. El prototipo de este grupo lo constituyen los fármacos que actúan sobre la pared o la membrana citoplasmática. (46)

Modo y mecanismo de acción de los antimicrobianos.

Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La especificidad de acción depende de que el fármaco bloquee una enzima o sustrato no presente en las células eucariotas humanas o suficientemente distintas.

✓ **Inhibición de la síntesis de la pared celular.**

El componente esencial de la pared es un mucopeptido (peptidoglucano) cuya síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes, la droga se fija en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria aparecen efectos en dicha pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensible, penetra líquido en el interior, estalla y se lisa. Las penicilinas, cefalosporinas y vancomicina actúan de esta manera. (47)

✓ **Lesión de la membrana celular**

Las bacterias Gram positivas tienen una cubierta de peptidoglucano gruesa situada por fuera de la membrana citoplasmática.

Las bacterias Gram negativas poseen también una capa de peptidoglucano, más fina que de las Gram positivas, pero disponen además de una membrana exterior de composición asimétrica. La lámina interna de esta membrana está constituida por fosfolípidos, mientras que la externa contiene un lípido glucosilado especial denominado lipopolisacárido o endotoxina.

Varios derivados de naturaleza lipopeptídica tienen la capacidad de insertarse en las membranas lipídicas.

Este mecanismo de acción es completamente distinto al de otros antibióticos y, por tanto, no hay resistencia cruzada. (47)

✓ **Inhibidores de la síntesis proteica.**

Varios antibióticos inhiben la síntesis proteica y la mayoría lo hacen uniéndose a distintas bases nitrogenadas del ARN ribosómico (ARNr) que forman parte del centro de decodificación, del centro de formación de enlaces peptídicos (peptidiltransferasa) o de la región próxima de la entrada al túnel de salida del péptido recién sintetizado.

En el ribosoma bacteriano, el centro de decodificación se halla en una pequeña región del ARNr 16S de la subunidad 30S, mientras que el lugar de formación de péptidos y la entrada al túnel de salida de la proteína recién formada están constituidos por nucleótidos contenidos en un bucle del dominio V del ARNr 23S de la subunidad 50S. (47)

✓ **Inhibición de la síntesis o función de los ácidos nucleicos.**

Los antibióticos pueden ejercer esta acción mediante tres mecanismos:

- Inhibiendo la replicación del ADN.
- Impidiendo la transcripción.
- Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales (bloqueo de la formación de bases purinas y pirimidinas). (47)

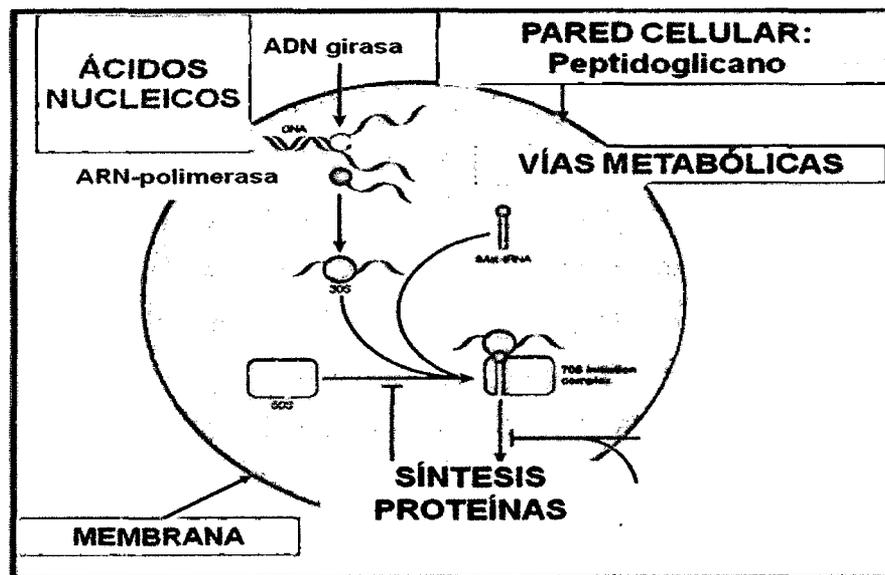


FIGURA N° 5: Blancos de algunos agentes antimicrobianos.

Fuente: J.A. Martínez y F. Sánchez. (48).

2.4.3.7. Medición de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se mide por la determinación de la cantidad menor del agente necesario para inhibir el desarrollo de un organismo de prueba, un valor llamado concentración inhibitoria mínima (CIM).

Método de difusión en Agar.

Un procedimiento utilizado para estudiar la acción antimicrobiana es el método de difusión en Agar. Se prepara una placa petri con un medio de Agar inoculado de modo uniforme con el organismo de prueba. La placa de prueba se puede inocular vertiendo una capa sobrenadante de Agar que contenga el organismo de prueba, o cubriendo la superficie del medio con un cultivo del organismo de prueba en caldo. Se adicionan cantidades conocidas del agente antimicrobiano a discos de papel filtro colocados sobre la superficie del Agar. Durante la incubación, el agente se difunde desde el papel filtro hacia el Agar, cuanto más lejos llegue el papel filtro, menor será la concentración del agente. A cierta distancia del disco se alcanzara la CIM. Pasado este punto se presenta el crecimiento, pero más cerca del disco no hay crecimiento. Así se crea una zona de inhibición y su tamaño se mide con una regla; el diámetro será proporcional a la cantidad del agente antimicrobiano adicionada al disco y a la efectividad general del agente. (37) (38)

Tan pronto como el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del Agar, el agua es absorbida por el papel filtro y el antibiótico difunde en el medio que lo rodea. A medida que aumenta la distancia de difusión del antibiótico, se produce una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico.

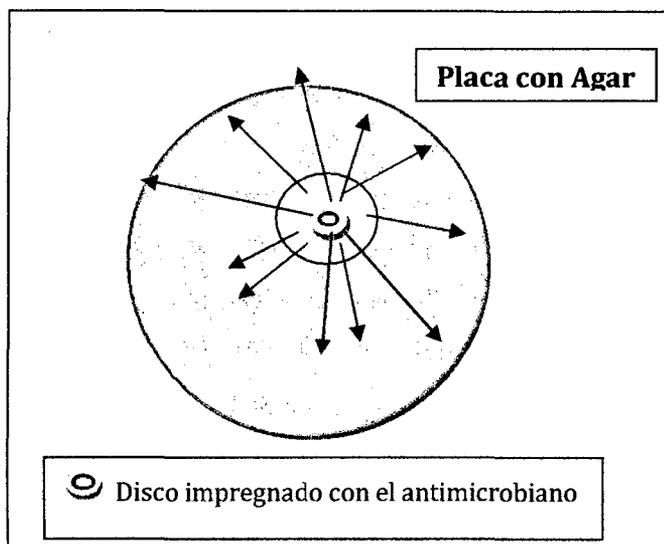


GRÁFICO N° 6: Difusión del principio activo en el agar.

Fuente: Diagnostico Microbiológico de Koneman Elmer W., Stephen D. Aller. (38)

Dilución en Agar.

Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego son incubadas. Después de la incubación, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la concentración mínima inhibitoria (CIM) para el antibiótico. (49)

Dilución en caldo.

En este caso, tubos (macro dilución) o micro placas (micro dilución), contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la micro placa y la CIM es determinada después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la dilución en Agar. (49)

E – test.

Este método ha sido descrito más recientemente y representa una sofisticada combinación de métodos descritos anteriormente. El E – test es más simple que otros métodos para obtener una CIM. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van

desde 0.016ug/ml esta tira se pone sobre una placa, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en el cual la CIM puede ser leída directamente. (49)

Métodos automatizados.

En este método existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de la susceptibilidad. Utilizan una medición de turbidimetría o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos emplea el método de micro dilución y periodos de incubación menores que las habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de Enterobacterias y otros gérmenes de crecimiento rápido, pero generalmente no son los adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales. (50)

2.4.3.8. Interpretación del antibiograma.

Susceptible: significa que la infección causada por un organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado. (48)

Sensibilidad intermedia: esta categoría incluye organismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder probablemente a la terapia. Esta categoría, además, implica que el antibiótico utilizado puede ser usado si la infección está localizada en sitios donde el fármaco es fisiológicamente concentrado (quinolonas en vías urinarias), o cuando pueden ser usadas altas dosis (ej. Penicilinas). (50)

Resistente: significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra el antibiótico utilizado. (50)

2.4.3.9. Control microbiológico.

Los criterios para el control microbiológico recomendados por la organización mundial de la salud (OMS) y la organización panamericana de la salud (OPS), son los siguientes:

- ❖ Criterio imperativo.
- ❖ Criterio indicativo de higiene.
- ❖ Criterio de alerta o límites críticos. (51)

TABLA N° 5: Criterios de control microbiológico.

CRITERIOS	PESO EXACTO	BACTERIAS	CANTIDAD PERMISIBLE
Criterio imperativo: este microorganismo no debe presentarse. La presencia de este indica un riesgo elevado.	10g	salmonella	Ausente.
Criterio indicativo de higiene: la presencia excesiva de este indica que la higiene en el proceso ha sido deficiente. Por lo que el producto no debe exceder los limites especificados en este rubro.	10g	Coliformes fecales (E. coli)	Ausente rango aceptado 10 - 10² UFC.
Criterios alerta o limites críticos: significa que el producto no debe exceder los limites especificados en este rubro.	10g	Aerobios mesofilos. Hongos y levaduras.	5X10⁵ – 5X10⁶ ufc/g. 10² - 10³ ufc/g.

Fuente: DIGESA. Dirección General de Salud "Criterio de Calidad Sanitaria e inocuidad de alimentos (51)

Donde:

UFC: unidades formadoras de colonia.

2.4.3.10. Fármaco patrón (CIPROFLOXACINO).

El ciprofloxacino es un principio activo del grupo de las quinolonas. Estos compuestos se conocen también con el nombre de la girasa. Es un agente antibacteriano de acción bactericida y de efecto rápido, que no presenta resistencia cruzada con las penicilinas, tetraciclinas, aminoglucósidos. Generalmente los organismos resistentes a estos antibióticos son sensibles al ciprofloxacino. Se ha demostrado que cuando se combina con otros agentes antibacterianos se presentan efectos aditivos. (47)

Mecanismo de acción:

El Ciprofloxacino inhibe la lectura a partir del cromosoma de la información necesaria para el metabolismo normal de la bacteria. De esta manera se reduce rápidamente la capacidad reproductora de las bacterias. Actúa intracelularmente por inhibición de la DNA girasa, un tipo II de topoisomerasa que es esencial para el enrollamiento del ATP dependiente del ADN bacteriano; posibilitando que se replique y que forme parte de ambas células hijas; el Ciprofloxacino inhibe la relajación del DNA enrollado y promueve el rompimiento del DNA de doble cadena. (47)

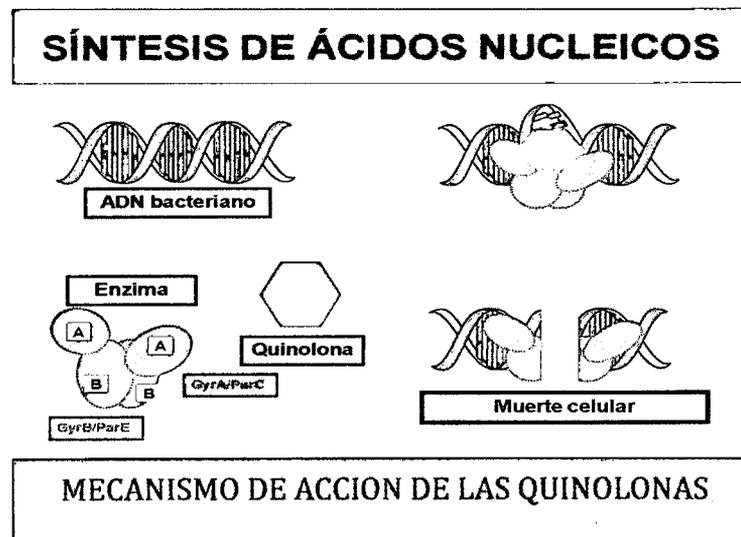


FIGURA N° 6: Mecanismo de acción de las Quinolonas

Fuente: Red de Salud de Cuba INFOMED (52).

Farmacocinética:

En los lugares de infección, es decir, en líquidos y tejidos corporales, la concentración de Ciprofloxacino es más elevada que en el suero.

- Absorción: Rápida y bien absorbida del tracto gastrointestinal, después de la administración oral. La absorción demora en presencia de alimentos.
- Distribución: Ampliamente distribuida a través del cuerpo; las concentraciones tisulares generalmente exceden a las concentraciones del suero, especialmente en los riñones, vesícula biliar, hígado, pulmones, tejidos ginecológicos y tejido prostático; se distribuye a la saliva, secreciones nasales, humor acuoso, esputo, linfa, fluido peritoneal, bilis, secreciones prostáticas, fluidos de ampollas de piel; también se distribuye a la piel, grasa, músculo, hueso y cartílago; fluido cerebroespinal que alcanza un pico sérico máximo (10 %) en las meninges no inflamadas, y un 14-37 % en las meninges inflamadas.
- Unión a proteínas: Baja (20-40 %).
- Metabolismo: Hepático.
- Eliminación: Renal: Aproximadamente del 50-70 % de la dosis parenteral se excreta inalterada en la orina. Biliar/Fecal: Pequeñas cantidades se excretan en la bilis; aproximadamente un 15 % de la dosis parenteral se excreta en las heces en 5 días. Tras una infusión intravenosa un 75 % de la dosis administrada se elimina con la orina y un 14 % con las heces. Más del 90 % de la eliminación se efectúa en las primeras 24 horas. (52)

Espectro antibacteriano:

TABLA N°6: Espectro antibacteriano del ciprofloxacino

Microorganismos aeróbicos Gram positivos	Microorganismos aeróbicos Gram negativos
<ul style="list-style-type: none">• Enterococcus faecalis• Staphylococcus aureus (susceptible a la meticilina)• Staphylococcus epidermidis• Staphylococcus saprophyticus• Streptococcus pneumoniae• Streptococcus pyogenes	<ul style="list-style-type: none">• Campylobacter jejuni• Citrobacter diversus• Citrobacter freundii• Enterobacter cloacae• Escherichia coli• Haemophilus influenzae• Haemophilus parainfluenzae• Klebsiella pneumoniae• Moraxella catarrhalis• Morganella morganii• Neisseria gonorrhoeae• Proteus mirabilis• Proteus vulgaris• Providencia rettgeri• Providencia stuartii• Pseudomonas aeruginosa• Salmonella typhi• Serratia marcescens• Shigella boydii• Shigella dysenteriae• Shigella flexneri• Shigella sonnei• Vibrio cholerae• Vibrio parahaemolyticus• Yersenia enterocolitica

Fuente: Red de Salud de Cuba (52)

Indicaciones:

El Ciprofloxacino es un anti infeccioso de amplio espectro, activo frente a un gran número de organismos Gram-positivos y Gram-negativos. Se emplea en el tratamiento de las siguientes infecciones causadas por gérmenes sensibles:

- Infecciones de la piel y tejidos blandos: úlceras infectadas, quemaduras infectadas. Infecciones osteoarticulares: osteomielitis, artritis séptica.
- Infecciones de vías respiratorias: bronquitis aguda, reagudización de bronquitis crónica y fibrosis quística, bronquiectasias, empiema, neumonía por bacterias gram-negativas.
- Infecciones del tracto genito-urinario: uretritis complicadas y no complicadas, cistitis, pielonefritis, prostatitis, epididimitis, gonorrea.
- Infecciones gastrointestinales: fiebre entérica, diarrea infecciosa.
- Infecciones del oído medio y de los senos paranasales.
- Infecciones de boca, dientes y mandíbulas. Infecciones de las vías biliares. Sepsis (septicemia).
- Infecciones del peritoneo (peritonitis).
- Infecciones de los ojos, Infecciones o posibilidad de infección inminente (profilaxis) en pacientes con sistema inmunitario debilitado.

Reacciones Adversas:

Se han observado ocasionalmente los siguientes efectos secundarios: náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, vértigo, cefaleas, insomnio, agitación, temblor, reacciones de hipersensibilidad (erupciones cutáneas y muy raramente dolores musculares y articulares). Efecto sobre los parámetros de laboratorio y sangre. Muy raras veces: colitis pseudomembranosa; convulsiones, reacciones psicóticas y otras del SNC; reacciones anafilácticas incluido shock, síndrome de Stevens-Johnson, nefritis intersticial, trastornos hepáticos graves, incluyendo necrosis hepática, fotosensibilidad; disturbios de la función renal incluyendo fallo renal pasajero, trastornos de la vista, pérdida pasajera del sentido del oído. (52)

Efectos secundarios

- Reacciones de hipersensibilidad: se han reportado reacciones sistémicas serias y ocasionalmente fatales.
- Efectos neurológicos: cefalea, inquietud; en < 1% de pacientes se ha observado convulsiones, incremento de la presión intracraneal, psicosis tóxica, vértigo, confusión, temblor, alucinaciones, depresión, pensamientos o actos suicidas. Si estas reacciones ocurren la droga debe ser discontinuada.
- Efectos respiratorios: en < 1% de pacientes disnea, epistaxis, edema pulmonar, embolismo pulmonar.
- Efectos cardiovasculares: en < 1% de pacientes ocurre palpitaciones, fibrilación auricular, latidos ectópicos ventriculares, síncope, hipertensión, angina de pecho, paro cardíaco, trombosis cerebral.
- Efectos gastrointestinales: náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, colitis pseudomembranosa; en < 1% de pacientes ocurre candidiasis oral, disfagia, perforación intestinal, sangrado digestivo, ictericia colestásica.
- Efectos renales: en < 1% de pacientes, nefritis intersticial.
- Otros efectos: ruptura del tendón de Aquiles u otros tendones, fototoxicidad, rash, artralgias.
- Órganos de los sentidos: visión doble, visión borrosa, trastorno en la percepción del color (más brillante) disminución de la agudeza visual y auditiva, diplopía, dolor en el globo ocular, tinnitus. (52)

2.5. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

EXTRACTO: Es una sustancia, normalmente es un ingrediente activo de una planta o tejido animal, que se prepara utilizando disolventes o evaporación, para separar la sustancia del material original.

ACETOGENINAS: Compuestos activos que afectan la producción de trifosfato de Adenosina (ATP) en la mitocondria. El ATP es la fuente principal de energía de la célula. Las Acetogeninas modulan selectivamente la producción de ATP afecta la viabilidad de células específicas y el crecimiento de vasos sanguíneos que los nutren.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Expresión que describe los efectos beneficiosos o nocivos de una droga en la materia viva. Cuando la droga es una mezcla química compleja, esta actividad es ejercida por el ingrediente activo o el farmacóforo de la sustancia pero se puede modular por los otros componentes de la sustancia. La clase principal de actividad biológica es toxicidad de una sustancia.

INGREDIENTE ACTIVO: Es la parte biológicamente activa del producto fitosanitario presente en una formulación.

ANNONACEAE: Familia de plantas dicotiledóneas, arbóreas o arbustivas, a menudo trepadoras, propia de las zonas tropicales e intertropicales, con las hojas alternas, simples y enteras, flores casi axilares, solitarias o en manojos y fruto simple o compuesto, seco o camoso con pepitas duras y frágiles.

CULICIDOS: (*latín Culicidae*) son mosquitos, insectos pertenecientes al orden de los dípteros; sus géneros incluyen Anopheles, Culex, Psorfora, Oclerotatus, Aedes, Stegomyia, Sabetes, Culiseta y Haemagoggus. Existen 35 géneros en total con más de 2700 especies reconocidas. Son insectos voladores, que poseen un cuerpo delgado y patas alargadas; el tamaño de los adultos varía de especie a especie, pero rara vez superan los 15mm. Las larvas se desarrollan en el agua.

LARVA: Animal en estado de desarrollo, cuando ha abandonado las cubiertas del huevo y es capaz de nutrirse por sí mismo, pero aun no ha adquirido la forma y la organización propia de los adultos de su especie.

OVIPARO: Un animal ovíparo es un animal cuya modalidad de reproducción incluye el depósito de huevos en el medio externo, donde completar su

desarrollo antes de la eclosión. Son ovíparos la mayoría de los insectos, los peces, los anfibios y los reptiles, así como la totalidad de las aves.

OVOVIVIPARIDAD: Un animal es ovovivíparo (*del latín ovum, "huevo", vivus, "vivo", y pariré, "parir"*) cuando los huevos permanecen dentro del cuerpo de la hembra hasta su eclosión. Esta puede producirse inmediatamente antes de lo que vendrá a ser un parto, o inmediatamente después de la puesta.

DENGUE: Enfermedad producida por un virus transmitido por mosquitos de América central y zonas calurosas de Asia y Australia, también llamada la fiebre de los siete días.

FARMACOLÓGICO: Ciencia que trata de los medicamentos, sus propiedades y su composición.

FISIOLÓGICO: Que posee una función normal dentro del organismo.

ANTIHELMÍNTICO: Drogas que expulsan a los helmintos y gusanos parásitos del cuerpo, matándolos o expulsándolos vivos. Los remedios tradicionales de este tipo se llaman vermífugos.

ANTIMICROBIANO: Que impide el desarrollo de los microbios.

MICROORGANISMO: organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos.

APOPTOSIS: Muerte celular programada, un proceso que juega un importante papel desde el desarrollo temprano hasta el envejecimiento. Tiene especial importancia en el cáncer y es objeto de un estudio intenso dado que es una solución tentadora, por otro lado, puede interferir en los tratamientos terapéuticos.

BIOPESTICIDA: Pesticida hecho a base de recursos biológicos, es decir, de toxinas que se producen naturalmente.

PLAGUICIDA: Sustancia u organismo capaz de exterminar toda vida animal o vegetal que pueda afectar la salud, la alimentación o a la economía del hombre.

Entre los plaguicidas se encuentran los insecticidas, acaricidas, herbicidas y fungicidas. Se trata de sustancias mayormente destinadas a la protección vegetal o productos fitosanitarios principalmente de origen químico para combatir y controlar plagas y/o transmisores de enfermedades bacterianas o virales de los cultivos y productos que controlan a algunas especies vegetales

que compiten con los cultivos. Estos productos también pueden ser utilizados para el control de vectores de enfermedades humanas y animales en áreas abiertas o dentro del domicilio. A estas sustancias también se las llama ocasionalmente biocidas.

BACTERIAS: Microorganismo celular, sin núcleo definido por una membrana. Interviene en procesos como la fermentación, y puede ser la causa de enfermedades tales como el tifus, el cólera, afecciones venéreas, etc.

PROTOZOARIOS: Organismos unicelulares microscópicos flagelados.

BIOTOPO: Región de caracteres climáticos y geográficos definidos que es ocupada por una biocenosis o comunidad de especies animales y vegetales.

BIOTERIO: Conjunto de instalaciones, muebles e inmuebles destinados al alojamiento y manutención de animales de laboratorio durante una o varias fases de su ciclo vital; esto es, nacimiento, crecimiento, reproducción y muerte.

CEPA: En microbiología, conjunto de bacterias, virus u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

ANTIBACTERIANO.- Relativo a una sustancia que destruye las bacterias o que inhiben su crecimiento o replicación.

ANTIBIOGRAMA.- Consiste en el estudio de la sensibilidad o resistencia de determinados microorganismos (o grupos de ellos), a varios antibióticos. Se puede utilizar para tratar u patógeno, añadir a alimentos, en definitiva para saber cómo se comporta un germen frente a un determinado antibiótico.

ATÓXICO: Que no es venenosos.

CEPAS.- Es un subgrupo taxonómico de una determinada especie

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.- Es la concentración mínima inhibitoria de un fármaco presente en la sangre capaz de frenar una infección.

CULTIVO.- En microbiología, es una prueba de laboratorio que implica el cultivo de células o de microorganismos en un medio específico de crecimiento.

DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀).- Es la dosis única que, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL₅₀ se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilo, mg/kg).

DOSIS EFECTIVA D₅₀: En farmacología, se entiende por dosis efectiva de un medicamento a la dosis mínima capaz de producir el efecto deseado de la droga.

La droga que produce el efecto deseado en el 50% de la población se conoce como dosis efectiva 50%, o por sus siglas en inglés DE-50

INHIBICIÓN.- Restricción o detención de la función de una célula por estímulo de una sustancia la cual evita el desarrollo de la célula.

RESISTENCIA.- Oposición a la acción de una fuerza, es la oposición que presenta la bacteria de ser eliminada frente a los antimicrobianos.

SOLUBILIDAD.- Calidad de soluble. Extensión en la que una sustancia que vendría a ser el soluto, se disuelve en un líquido que vendría a ser el solvente que no necesariamente es el agua.

TÓXICO: Veneno y/o cualquier sustancia que incorporada al organismo es capaz de producir graves alteraciones orgánicas o funcionales.

CAPITULO III

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.

3.1.1 MUESTRA VEGETAL.

- Frutos de la especie *Annona muricata* L. (Masasamba), que fueron recolectados durante el mes de Abril del 2011, la cantidad de 50 kilogramos de muestra fresca en la localidad de Collpani, provincia de "La Convención", en el departamento de Cusco, a 1050 m.s.n.m.

3.1.2 MUESTRAS BIOLÓGICA.

- Larvas de *Aedes aegypti*

3.1.3 MUESTRA MICROBIANA.

- Cepas de *Salmonella typhi* spp tipificadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

3.2. MATERIALES, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS.

3.2.1. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.

A.- MATERIALES DE CAMPO.

- Bolsas de papel y de polietileno.
- Tijeras podadoras.
- Cámara fotográfica.
- Cuaderno de campo.
- Papel Kraff.
- Sacos.
- Lapiceros.

B.- MATERIALES DE LABORATORIO.

- Tubos de ensayo.
- Vasos de precipitado de 100 y 200ml.
- Placas petri.
- Baguetas.

- Pipetas.
- Micropipeta calibrada.
- Embudos.
- Fiolas de 100 y 200ml.
- Matraz de 200 y 500ml.
- Probetas de 100 y 250ml.
- Balones de 100 y 500ml.
- Pera de decantación 1000ml.
- Goteros.
- Trompo Econofiltro 0.45 μm .
- Piezas de metal: Soporte universal, espátula, etc.
- Papel filtro.
- Papel secante.
- Papel aluminio.
- Algodón.
- Botellas de vidrio de color oscuro de 4 a 5 litros de capacidad.
- Frascos de vidrio 100ml.
- Micro-pipetas.
- Asas de siembra.
- Mecheros Bunsen.
- Pinzas.
- Gradillas.
- Jeringas descartables de 1ml, 5ml, 10ml, 20ml.

C.- EQUIPOS DE LABORATORIO.

- Balanza analítica electrónica de sensibilidad 0.001g.
- Balanza analítica electrónica Howk AND GR-200
- Estufa de cultivo Fanem modelo 002CB.
- Autoclave. Modelo LS-B05I-1. Pres. màx. 0.22Mpa; T° màx 134°C
- Espectrofotómetro clinicon Mannheim-6MBH (340-620nm).
- Refrigeradora marca coldex.
- Cocinilla eléctrica.

- Rotavapor R-215 BUCHI.
- Cromatoplasmas de silicagel C18 soportadas en aluminio de 3.5 x 4.6cm.
- cocinilla eléctrica.
- Horno Pasteur Memmert. T° max. 220°C.
- Baño maria.
- Lámpara de luz UV.
- Campana de extracción.
- Baño de ultrasonido 117VAC 3510 Branson.
- Bomba de vacío MEDI PUMP 1633-6116

3.2.2. SOLVENTES Y REACTIVOS.

- Etanol de 70°
- Metanol de 70°.
- Agua destilada Q.P.
- Éter.
- Cloroformo Q.P.
- Acetona.
- Acetato de etilo.
- Bencina.
- Hexano.
- Sulfato de sodio.
- Ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2%.
- Hidróxido de potasio (KOH) al 5,7%.
- Dimetilsulfoxido.

3.2.3. MEDIOS DE CULTIVO.

- Agar Mueller Hilton.
- Agar Bismuto sulfito según Wilson Blair.
- Caldo infusión cerebro corazón (BHI).
- Agar saboudaud.
- Agar Plate Count.
- Agar Mc Conkey.
- Agar Hectoen.

3.2.4. OTROS MATERIALES.

- Discos de Ciprofloxacino 5ug.
- Mandil o guardapolvo.
- Gorros.
- Barbijos o mascarillas.
- Guantes.
- Gafas de protección.
- Cajas de tecnopor.
- Cubetas de plástico.
- Materiales de escritorio.
- Tijera estéril.
- Cúter estéril.
- Ligas
- Plumón marcador.
- Papel kraff.
- Papel aluminio.
- Papel filtro.
- Papel secante.
- Detergente.
- Lejía.
- Molino manual.
- Regla milimetrada
- Agujas descartables.
- Cámara fotográfica.
- Jeringas descartables de 1ml, 3ml, 5ml, 20ml.

3.3 DE INFRAESTRUCTURA.

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Laboratorio de Farmacología de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

- Laboratorio de Farmacognosia de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Laboratorio de Entomología de la carrera profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Laboratorio de Fitoquímica de la facultad de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Laboratorio de cromatografía de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

3.4. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.4.1. DISEÑO METODOLÓGICO.

3.4.1.1. Tipo de investigación.

La investigación en el cuál se realizaron los estudios de Actividad antibacteriana y actividad insecticida de las Acetogeninas son estudios de tipo cuasi-experimental porque se manipula deliberadamente, al menos una variable independiente (se analizan si una o más variables independientes afectan a una o más variables dependientes y porqué lo hacen), prospectivo (por el tiempo de ocurrencia de los hechos), transversal (por el periodo y secuencia del estudio). (53)

En los diseños cuasi-experimentales los sujetos no se asignan al azar a los grupos ni se emparejan, sino que dichos grupos ya están formados antes del experimento, son grupos intactos (la razón por la que surgen y la manera como se forman fueron independientes o aparte del experimento) (53)

La variable independiente (concentración de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata L.*) resulta ser la razón de estudio ya que es la variable que se hipotetiza, que será una de las causas que produce el efecto supuesto, para obtener evidencia de esta relación causal supuesta, el investigador manipula la variable independiente y observa si la dependiente varía o no. (53).

3.4.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.4.2.1. Ensayo de la actividad insecticida

Para determinar la actividad insecticida de las Acetogeninas obtenidas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* L (Masasamba), se siguió el diseño de Post Prueba y Grupo control.

❖ **Ensayo de la actividad insecticida para las Acetogeninas obtenidas a partir de los extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).**

Para determinar la actividad insecticida del concentrado de Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos al 70% de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) se realizó un estudio cuasi experimental con diseño post-prueba y grupo control siguiendo el procedimiento del laboratorio UNAL-Departamento de Química (59), grupo de productos naturales con modificaciones de acuerdo al protocolo propuesto por la Red Latinoamericana de Control de Vectores (35) (ciudad Iguazú, 23 de octubre de 2005), como sigue:

TABLA N°7: Diseño experimental del efecto insecticida.

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G1	X1	O1, O7, O13, O19...
G2	X2	O2, O8, O14, O20...
G3	X3	O3, O9, O15, O21...
G4	X4	O4, O10, O16, O22...
G5	X5	O5, O11, O17, O23...
G6	X6	O6, O12, O18, O24...

Donde:

- **G₁, G₂, G₃, G₄:** Grupos de larvas de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla) que serán sometidas al concentrado de Acetogeninas a diferentes concentraciones, por triplicado.
- **G₅:** Grupo de larvas de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla) que será sometida a un insecticida comercial usado contra este vector propuesto por la Red Latinoamericana de Control de Vectores (grupo patrón).
- **G₆:** Grupo de larvas de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla) que no será sometida a ninguna sustancia (grupo control negativo).
- **X₁, X₂, X₃, X₄:** Son las diferentes concentraciones de Acetogeninas diluidas en un solvente, las que serán aplicadas a los grupos de experimentación.

Donde: X₁: 10000ppm/50ul X₂: 5000ppm/50ul X₃: 500ppm/50ul
X₄: 50ppm/50ul

- **X₅:** Concentración de Temefós (1g/10L) (Grupo patrón)
- **X₆:** Agua (Grupo blanco)
- **O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆:** Observación del efecto insecticida (muerte) a 1 hora.
- **O₇, O₈, O₉, O₁₀, O₁₁, O₁₂:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 2 horas.
- **O₁₃, O₁₄, O₁₅, O₁₆, O₁₇, O₁₈:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 3 horas.
- **O₁₉, O₂₀, O₂₁, O₂₂, O₂₃, O₂₄:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 4 horas.
- **O₂₅, O₂₆, O₂₇, O₂₈, O₂₉, O₃₀:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 5 horas.
- **O₃₁, O₃₂, O₃₃, O₃₄, O₃₅, O₃₆:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 6 horas.
- **O₃₇, O₃₈, O₃₉, O₄₀, O₄₁, O₄₂:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 7 horas.
- **O₄₃, O₄₄, O₄₅, O₄₆, O₄₇, O₄₈:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 8 horas.
- **O₄₉, O₅₀, O₅₁, O₅₂, O₅₃, O₅₄:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 9 horas.
- **O₅₅, O₅₆, O₅₇, O₅₈, O₅₉, O₆₀:** Observación del efecto insecticida (muerte) a las 10 horas.

- O₆₁, O₆₂, O₆₃, O₆₄, O₆₅, O₆₆: Observación del efecto insecticida (muerte) a las 11 horas.
 - O₆₇, O₆₈, O₆₉, O₇₀, O₇₁, O₇₂: Observación del efecto insecticida (muerte) a las 12 horas.
 - O₇₃, O₇₄, O₇₅, O₇₆, O₇₇, O₇₈: Observación del efecto insecticida (muerte) a las 13 horas.
 - O₇₉, O₈₀, O₈₁, O₈₂, O₈₃, O₈₄: Observación del efecto insecticida (muerte) a las 14 horas.
 - O₈₅, O₈₆, O₈₇, O₈₈, O₈₉, O₉₀: Observación del efecto insecticida (muerte) a las 15 horas.
- :
- :
- :
- O_u, O_v, O_w, O_x, O_y, O_z: Observación del Efecto insecticida, al tiempo en el que todos los individuos de experimentación murieron.

3.4.2.2. Ensayo de la actividad antibacteriana.

Para determinar la CMI de la actividad antibacteriana de las Acetogeninas obtenidas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* L, se siguió el diseño de Post Prueba y Grupo control.

❖ Ensayo de la actividad antibacteriana para las Acetogeninas obtenidas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* L

Para el estudio de la actividad antibacteriana de las Acetogeninas obtenidas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba). Se siguió el siguiente diseño experimental aplicado a cepas de *Salmonella typhi* spp. tipificadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, como sigue:

TABLA N°8: Diseño experimental del efecto antibacteriano

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
G ₃	X ₃	O ₃
:	:	:
G ₁₉	X ₁₉	O ₁₉
G ₂₀	X ₂₀	O ₂₀
G ₂₁	X ₂₁	O ₂₁
G ₂₂	X ₂₂	O ₂₂

Donde:

- G₁, G₂, G₃,... G₂₀, G₂₁, G₂₂: Cepas de bacterias spp. *Salmonella typhi*, que serán sembradas en las placas petri por triplicado.
- X₁, X₂, X₃,... X₂₀: Son las diferentes concentraciones de las acetogeninas obtenidas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* en discos que fueron usados.

Donde: X₁: 5mg/disco X₂: 10mg/disco X₃: 15mg/disco X₄: 20mg/disco
X₅: 30mg/disco X₆: 40mg/disco X₇: 50mg/disco X₈: 60mg/disco
X₉: 70mg/disco X₁₀: 80mg/disco X₁₁: 90mg/disco X₁₂: 100mg/disco
X₁₃: 150mg/disco X₁₄: 200mg/disco X₁₅: 250mg/disco X₁₆: 300mg/disco
X₁₇: 350mg/disco X₁₈: 400mg/disco X₁₉: 450mg/disco X₂₀: 500mg/disco

- X₂₁: Concentración de discos de Ciprofloxacino 5ug (Grupo patrón)
- X₂₂: Dimetilsufoxico (Grupo blanco y/o control negativo)
- O₁, O₂, O₃,... O₂₀: Observación y medición de los halos de inhibición producidas por las Acetogeninas obtenidas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).
- O₂₁: Observación de los halos de inhibición representada por el grupo del Fármaco patrón (Ciprofloxacino)

- O₂₂: Observación de los halos de inhibición representada por el Dimetilsufoxido (Grupo blanco).

3.5. IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

3.5.1. VARIABLES IMPLICADAS.

3.5.1.1. De la actividad insecticida.

Variable independiente.

Concentración de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

- **Definición conceptual:** se define como cantidad de sustancia obtenida por procesos de extracción y purificación con actividad biológica disueltas en una cantidad de solvente.

- **Definición operacional:**

- ✓ **Naturaleza** : Cuantitativa
- ✓ **Medición** : Directa
- ✓ **Escala** : De razón o proporción.
- ✓ **Instrumento de medición** : Balanza analítica de precisión 0.001g.
- ✓ **Indicadores:** Peso del concentrado de Acetogeninas expresado en miligramos
- ✓ **Procedimiento de medición:** Se procedió a pesar el concentrado de Acetogeninas (mg) en una balanza analítica de alta sensibilidad y posteriormente se prepararon las diferentes soluciones por diluciones consecutivas en agua en ml.
- ✓ **Expresión final** : mg/ml

Variables Dependientes

Actividad insecticida.

- **Definición conceptual:** Se define como una sustancia con capacidad inherente de origen natural o sintético destinada a controlar plagas y enfermedades.

- **Definición operacional:**

- ✓ **Naturaleza** : Cuantitativa
- ✓ **Medición** : Directa
- ✓ **Escala** : Razón.
- ✓ **Instrumentos de medición:** Fichas de recolección de datos del número de muertes de los individuos de experimentación.
- ✓ **Indicador** : Número de larvas de experimentación muertas en relación a las vivas con la administración de las Acetogeninas a diferentes concentraciones.
- ✓ **Procedimiento de medición:** Se adicionan diferentes concentraciones de Acetogeninas obtenidas por dilución a partir de una solución madre sobre cada grupo de larvas de experimentación para posteriormente observar cuantos individuos de experimentación murieron en cada grupo experimental.
- ✓ **Expresión final** : Número de larvas de experimentación muertas en relación a las vivas con la administración de las diferentes concentraciones de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

3.5.1.2. De la actividad antibacteriana.

Variable Independiente.

Concentración de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

- **Definición conceptual:** se define como cantidad de sustancia obtenida por procesos de extracción y purificación con actividad biológica disueltas en una cantidad de solvente.

- **Definición operacional:**

- ✓ **Naturaleza** : Cuantitativa
- ✓ **Medición** : Directa
- ✓ **Escala** : De razón o proporción.
- ✓ **Instrumento de medición** : Balanza analítica de precisión 0.001g.

- ✓ **Indicadores:** Peso del concentrado de Acetogeninas expresado en miligramos
- ✓ **Procedimiento de medición:** Se procedió a pesar el concentrado de Acetogeninas (mg) luego se realizaron las diluciones en Dimetilsufoxico en ml y se tomaron una cantidad adecuada con una micropipeta respectivamente.
- ✓ **Expresión final** : mg/ml

Variable Dependiente

Actividad antibacteriana.

- **Definición conceptual:** Acción de una sustancia o agente de origen natural o sintético el cual destruye o suprime el crecimiento o reproducción de las bacterias, las cuales pueden ser "cidas", y/o agente "estático".
- **Definición operacional:**
 - ✓ **Naturaleza** : Cuantitativa
 - ✓ **Medición** : Directa
 - ✓ **Escala** : De razón o proporción.
 - ✓ **Instrumentos de medición** : Regla milimetrada
 - ✓ **Procedimiento de medición:** Una vez inoculado las bacterias y puestas las diferentes concentraciones de los extractos de las especies en estudio se midió el halo de inhibición resultante.
 - ✓ **Indicador:** Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.
 - ✓ **Expresión final** : mm.

3.5.2 VARIABLES NO IMPLICADAS

3.5.2.1. Variables intervinientes

De la planta:

- **Estadio de crecimiento** (La especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" se recolectaron durante la etapa final de maduración del fruto.
- **Lugar de recolección.** (Se eligió para la recolección de la especie en estudio la localidad de Collpani, de la Provincia de la Convención ubicada en el departamento del Cusco.)

- **Altitud de recolección.** (La especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" se recolectaron a 1050m.s.n.m)
- **Temporada de recolección.** (La especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" fue recolectada durante el mes de Abril)
- **Parte de la planta a estudiar.** (En estudio las semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba")

De las bacterias:

- **Estado de crecimiento.** (Fase logarítmica de la curva de crecimiento analizado por lectura de la densidad óptica en espectrofotómetro a 670nm)
- **bacterias aisladas.** (Cepas bacterianas, identificadas y viables que se observaron en placas petri después de la activación)
- **Medio de cultivo.** (Se usaron medios de cultivo: Caldo Cerebro Corazón, Agar Bismuto sulfito según Wilson Blair, Agar Mueller Hinton, Agar saboudaud y Agar Plate Count preparadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante en condiciones asépticas).

De las larvas:

- **Especie.** (Larvas de la especie *Aedes aegypti*)
- **Edad** (Larvas de la especie *Aedes aegypti* en estadio larval III tardío y IV temprano).
- **Estado de nutrición.** (Las larvas de la especie *Aedes aegypti* serán alimentados bajo las condiciones de su medio natural para no alterar su desarrollo).

3.5.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.5.3.1. Del material vegetal

Se incluyen:

- frutos sanos y homogéneos de la especie vegetal *Annona muricata* L. (Masasamba).

Se excluyen:

- frutos dañados o parasitados o contaminados por insecticidas de la especie vegetal *Annona muricata* L. (Masasamba).

3.5.3.2. De las larvas.

Se Incluyen:

- Larvas de la especie *Aedes aegypti* con una edad comprendida entre la fase larval III y IV, que mantengan su morfología completa.

Se Excluyen:

- Larvas de la especie *Aedes aegypti* que no se encuentren sanos, o no cumplan con las especificaciones del experimento.

3.5.3.3. Del material microbiológico

Se incluyen:

- Cepas bacterianas de: *Salmonella typhi* spp. en buen estado de conservación y viabilidad.

Se excluyen:

- Las cepas bacterianas que no estén en buenas condiciones (contaminación) o que no cumplan con las características básicas de las cepas.

3.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS:

- Para la determinación del efecto insecticida: los datos se recolectaron mediante la técnica de observación en el laboratorio; y los instrumentos utilizados fueron las fichas estructuradas para la recolección de datos de la evaluación del efecto insecticida (ANEXO N°6).
- Para la determinación del efecto antimicrobiano: los datos se recolectaron mediante la técnica de observación en el laboratorio; y los instrumentos utilizados fueron la regla, fichas estructuradas para la recolección de datos de la evaluación del efecto antibacteriano (ANEXO N°9 y 10).

3.7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

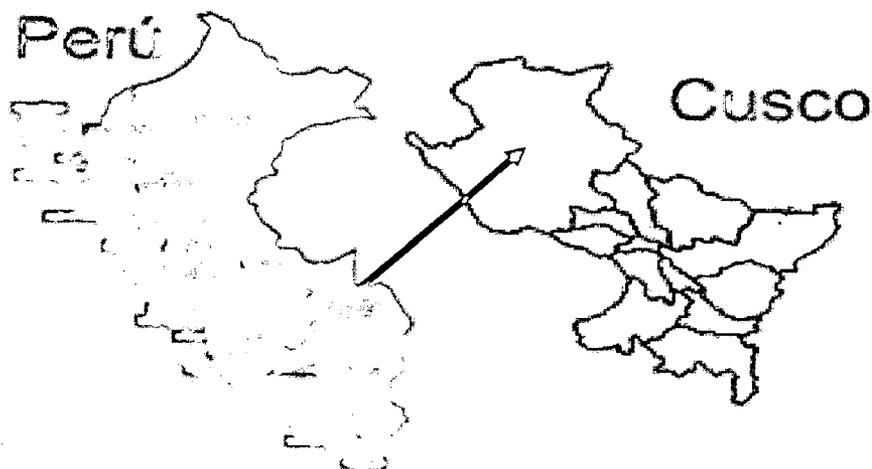
PRIMERA PARTE

3.7.1. EXTRACCIÓN Y ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS ACETOGENINAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

3.7.1.1. Recolección de la especie vegetal *Annona muricata* L. (Masasamba).

Todo el material vegetal de *Annona muricata* L. fue recolectada en la zona tropical de la región Cusco, ciudad de Quillabamba, localidad de Collpani, en el departamento de Cusco, a 1050 m.s.n.m. en el mes de Abril (24/04/11) a horas 3:00pm; la recolección del material vegetal fue realizada con la ayuda de los pobladores de la zona. El material vegetal fue cosechado del árbol con un dispositivo casero que consistía en un palo largo de 10m aproximadamente con una bolsa en el extremo superior, el cual fue facilitado por los pobladores de la zona.

Se recolectaron los frutos maduros, sanos y libres de contaminación, luego de ser recolectados los frutos, fueron almacenados adecuadamente en bolsas de papel con la finalidad de evitar algún deterioro por el cambio de temperatura y para su adecuado transporte hasta la ciudad del Cusco, y proceder a la siguiente fase de la investigación.



La flecha señala la ubicación geográfica de Quillabamba, lugar de recolección de la especie vegetal en estudio.

FIGURA N°7: Ubicación geográfica del lugar de recolección

Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI-2006. (56).



FIGURA N°8: fotografía de la especie vegetal a 1050msnm

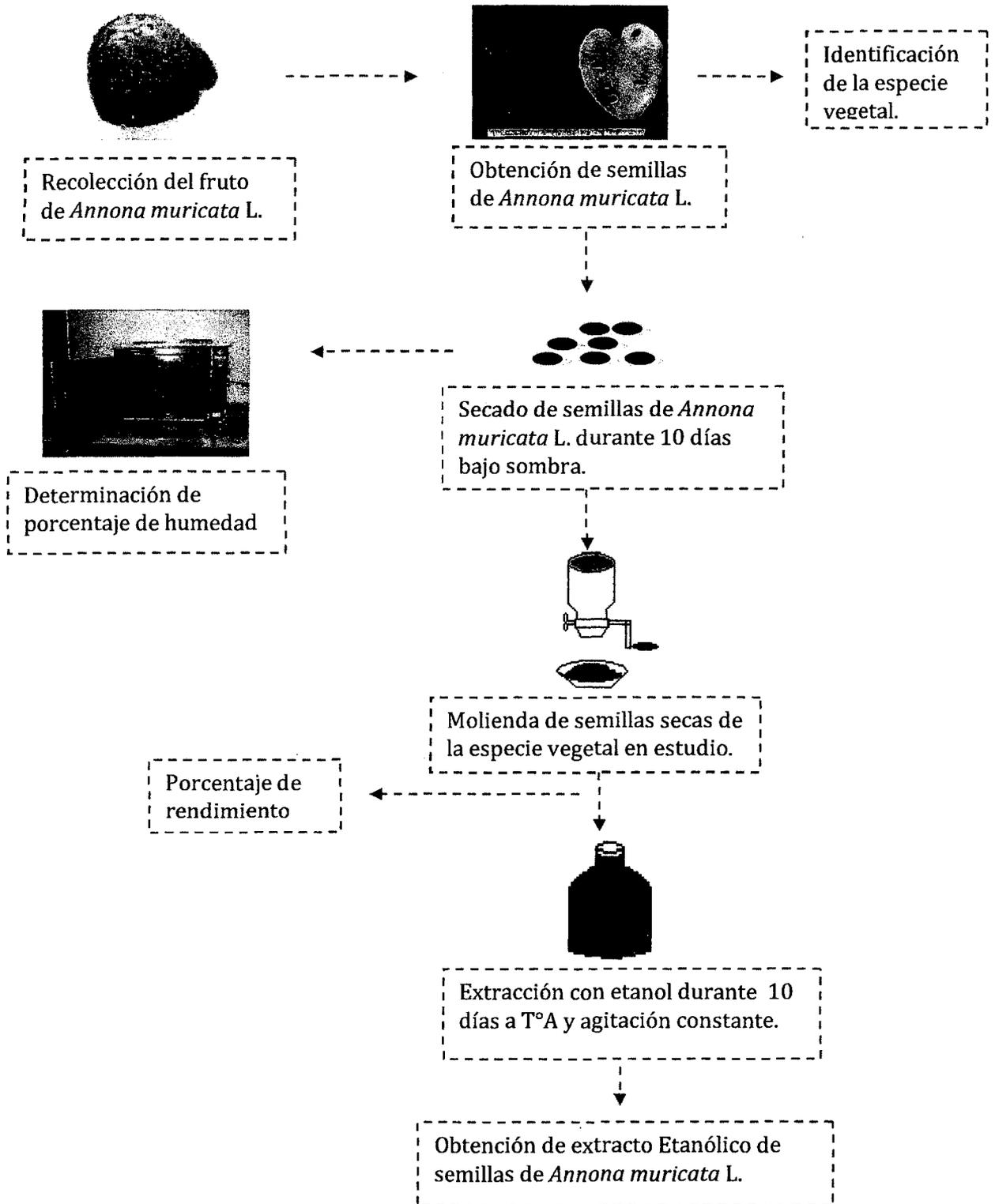
Fuente: Callo J y Farfán K.E.



FIGURA N°9: fotografía del proceso de recolección de la especie vegetal *Annona muricata* L. (Masasamba).

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

FLUJOGRAMA N° 01: Preparación de la muestra para la obtención del extracto etanólico a partir de semillas de *Annona muricata* L.



Fuente: elaboración propia.

3.7.1.2. Selección y Dsecación de la muestra.

Los frutos una vez que han sido recolectados fueron almacenados en condiciones óptimas hasta el momento de su empleo, es necesario eliminar la tierra o sustancias extrañas que puedan ir acompañando a la especie vegetal. Así mismo la desecación consiste en eliminar el agua de la vegetación sin alterar los principios activos de la droga.

Procedimiento experimental: Una vez obtenido el fruto en estudio se procedió a la selección y limpieza de los frutos de la especie vegetal *Annona muricata* L. (Masasamba), de las cuales cuidadosamente se retiraron las semillas que se encuentran dentro del fruto con la ayuda de un cuchillo limpio, posteriormente estas semillas se extendieron en papel Kraff para su secado la cual se realizó en un lugar fresco, limpio, ventilado, en sombra y a temperatura ambiente durante 7 días.

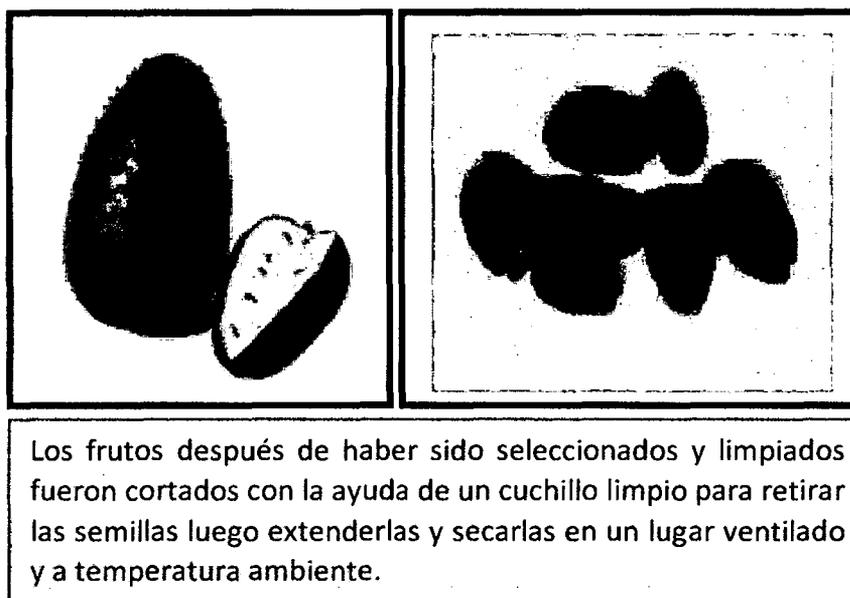


FIGURA N°10: fotografías: Izquierda: Corte del fruto de *Annona muricata* L.
Derecha: Semillas extendidas de *Annona muricata*

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

3.7.1.3. Determinación del Porcentaje de Humedad.

Método Gravimétrico: Determinación de la pérdida de agua por desecación en una estufa.

Este método consiste en calentar una muestra vegetal homogénea, previamente triturada y pesada a una temperatura de 50°C durante un tiempo de secado en una estufa y se deja secar hasta peso constante, es decir que entre dos pesadas consecutivas realizadas tras un tiempo de desecación determinado no exista una diferencia mayor de 0.5mg/g. de sustancia analizada. (57)

Procedimiento experimental: A una parte de las semillas frescas seleccionadas se les determinó el porcentaje de humedad, de la siguiente manera: Se colocó aproximadamente 10g de las semillas frescas en tres placas Petri cada una, previamente pesadas, estas se llevaron a una estufa a una temperatura de 50°C hasta obtener un peso constante respectivamente. Esta operación se realizó por triplicado.

Para la determinación del porcentaje de humedad se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

Donde:

%H: Porcentaje de humedad.

M_f: Peso de la muestra fresca.

M_s: Peso de la muestra seca.

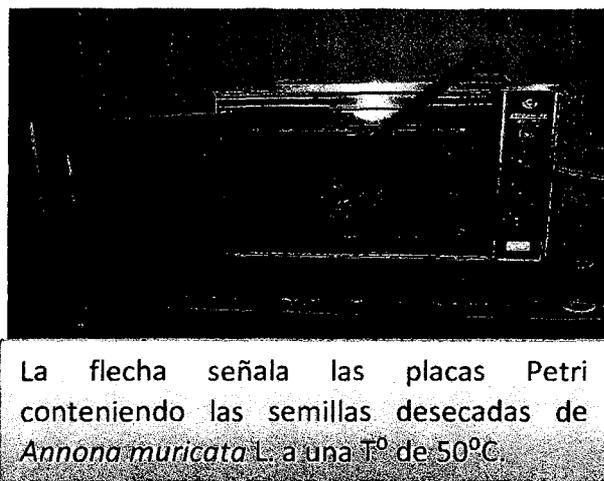


FIGURA N°11: fotografía del procedimiento para determinar porcentaje de humedad de las semillas de *Annona muricata* L.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

3.7.1.4. Molienda.

Los principios activos a extraer se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran incrustados en las células con el fin de facilitar la extracción de los mismos por ello la muestra es sometida a un proceso de molturación o troceado que destruye las estructuras que contienen mejorando así el rendimiento de la extracción. (57)

Procedimiento experimental: Una vez secas las semillas se procedieron a molerlas en un molino manual de granos previamente desinfectado, luego se tamizó la muestra obtenida para obtener un producto relativamente homogéneo. Al finalizar esta operación las semillas molidas se envasaron en recipientes de vidrio oscuro (color ámbar) y/o recipientes forrados con papel oscuro, los recipientes previamente limpios con tapa hermética.

3.7.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

La extracción es un proceso de interacción de la droga con el solvente (57), para ello las semillas secas, molidas y envasadas se sometieron a extracción por maceración con Etanol 70° según el objetivo de la presente investigación.

El proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacobotánica de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica así como en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, para realizar la extracción con etanol las semillas secas molidas de *Annona muricata* L. "Masasamba" se llevaron a macerar con 4 litros de etanol al 70°, durante 10 días. Pasado este tiempo se procedió a filtrar los macerados para separar restos vegetales. Los productos filtrados se llevaron inmediatamente a evaporar utilizando el Rotaevaporador R-215 BUCHI. El extracto crudo etanólico se obtuvo después de evaporar el disolvente en el Rotaevaporador a presión reducida al vacío, presión que es establecida para el solvente según las especificaciones del instrumento y a una temperatura de 60°C.

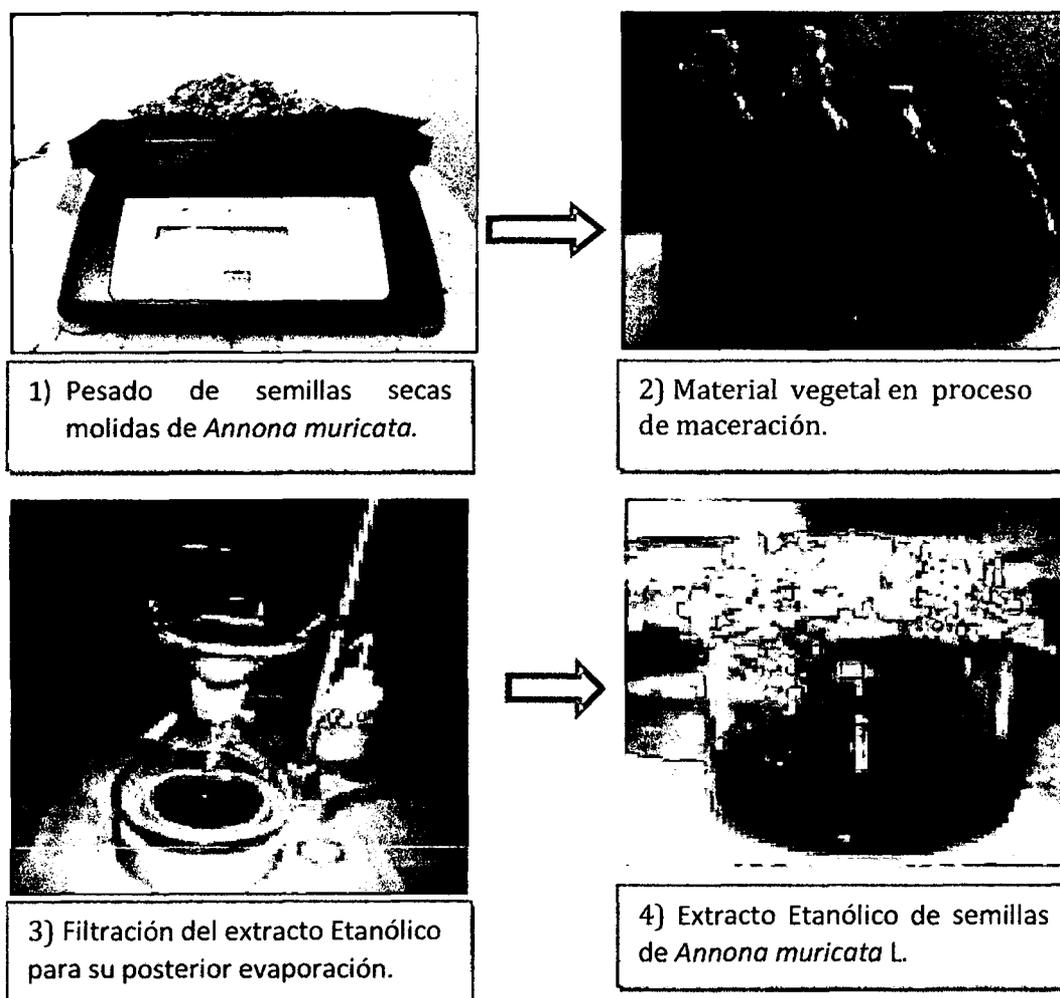


FIGURA N°12: fotografías del procedimiento de obtención del extracto etanólico de *Annona muricata* L.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

3.7.3. OBTENCIÓN DE ACETOGENINAS A PARTIR DEL EXTRACTO ETANOLICO DE SEMILLAS DE *Annona muricata* L.

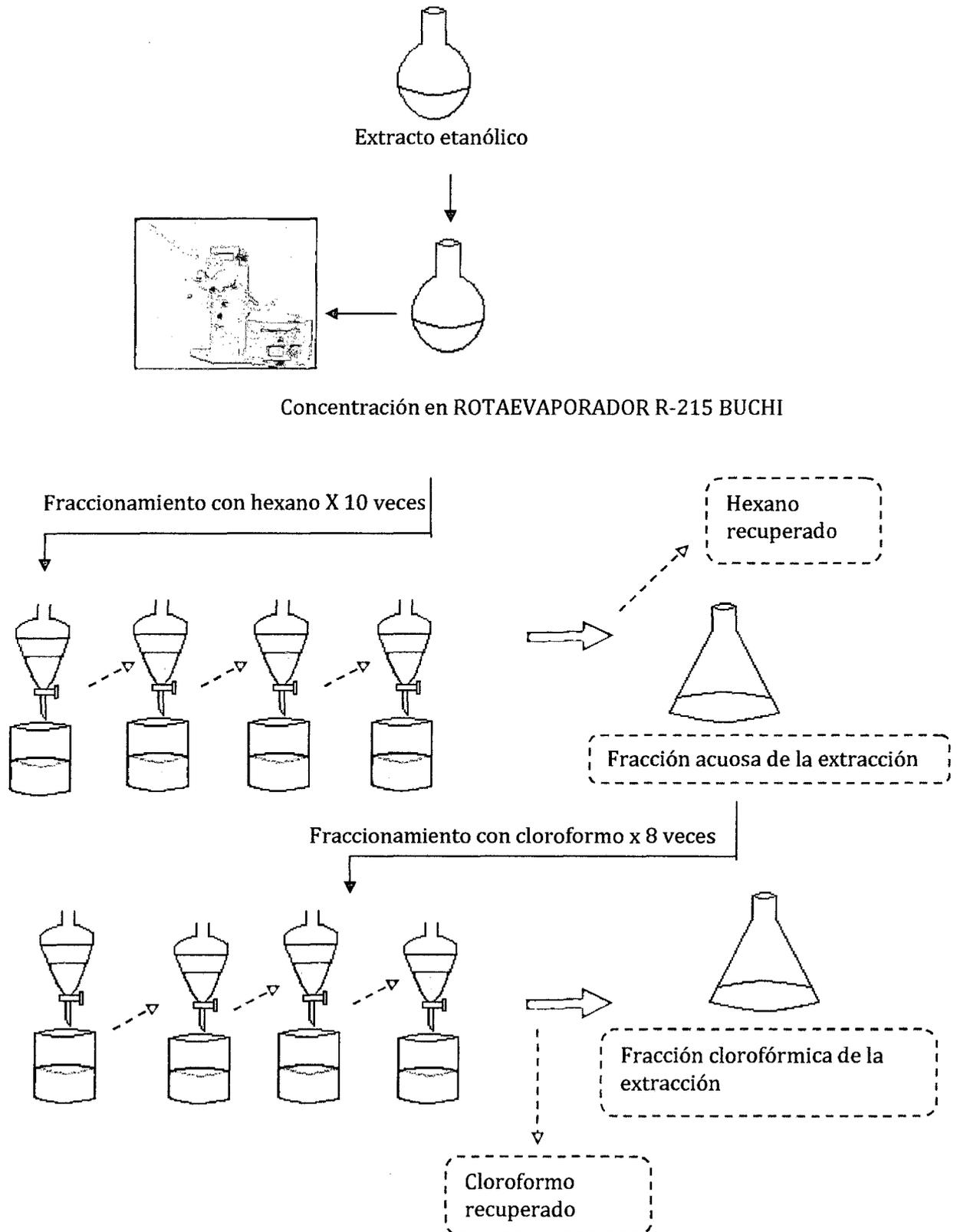
El proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Para realizar la extracción de las Acetogeninas a partir del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba), se siguió el método sugerido por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional de México. (58)

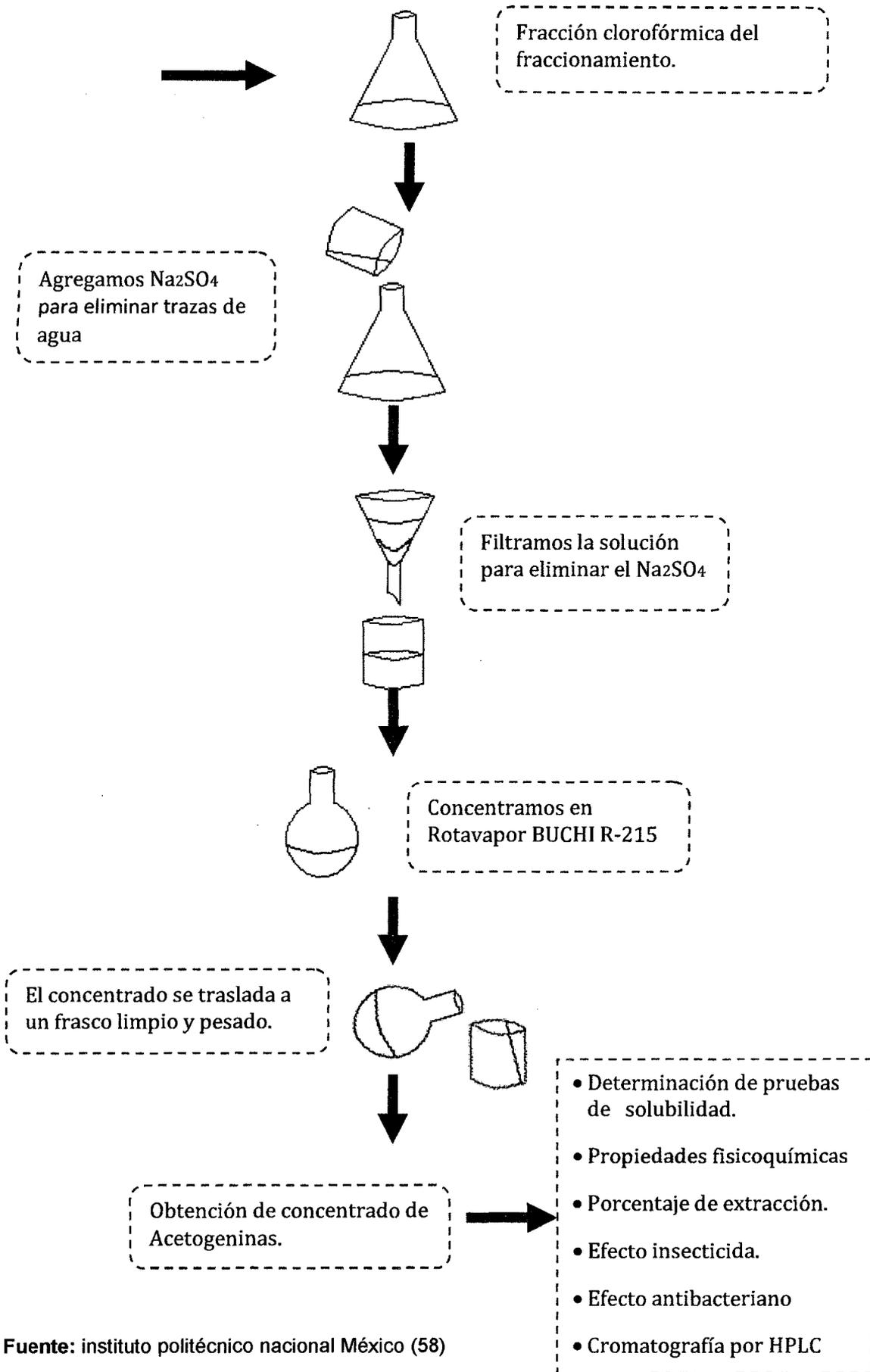


FIGURA N°13: fotografía del Rotaevaporador R-215 BUCHI a lado el extracto Etanólico de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

FLUJOGRAMA N° 02: OBTENCION DE ACETOGENINAS A PARTIR DEL EXTRACTO ETANOLICO.





Fuente: instituto politécnico nacional México (58)

3.7.3.1 Procedimiento.

Extracción por solventes orgánicos: El extracto etanólico obtenido, fue llevada a un proceso de extracción por decantación con solventes de diferentes grados de polaridad, según el protocolo seguido para la obtención de Acetogeninas.

El proceso de extracción por decantación fue realizada en dos fases:

❖ **Primera fase:**

El extracto crudo etanólico en una primera fase fue sometida a extracción con 50ml de Hexano QP durante diez veces consecutivas.

La fracción hexánica es retirada de la pera de decantación quedando solamente la fracción Acuosa, la cual es de nuestro interés, logrando recuperar hexano.

La fracción acuosa fue sometida a una segunda fase de extracción con un solvente más apolar según el protocolo establecido.

La fracción acuosa obtenida fue llevada a concentrar en el Rotaevaporador R-215 BUCHI con la finalidad de retirar trazas de hexano QP que pudiera haber quedado.

❖ **Segunda fase:**

La fracción acuosa concentrada fue llevada nuevamente a un proceso de extracción por decantación utilizando como solvente cloroformo QP. El procedimiento fue realizado por 8 veces consecutivas utilizando en cada operación 50ml de cloroformo.

Posterior a este procedimiento la fracción clorofórmica fue retirada de la pera de decantación; recuperando de esta manera cloroformo quedando solo la fracción de nuestro interés.

La fracción de nuestro interés y que contiene las Acetogeninas fueron concentradas en el Rotaevaporador R-215 BUCHI con la finalidad de eliminar trazas de cloroformo. Esta fracción fue denominada fracción Bioactiva, la cual es de nuestro interés en la presente investigación.

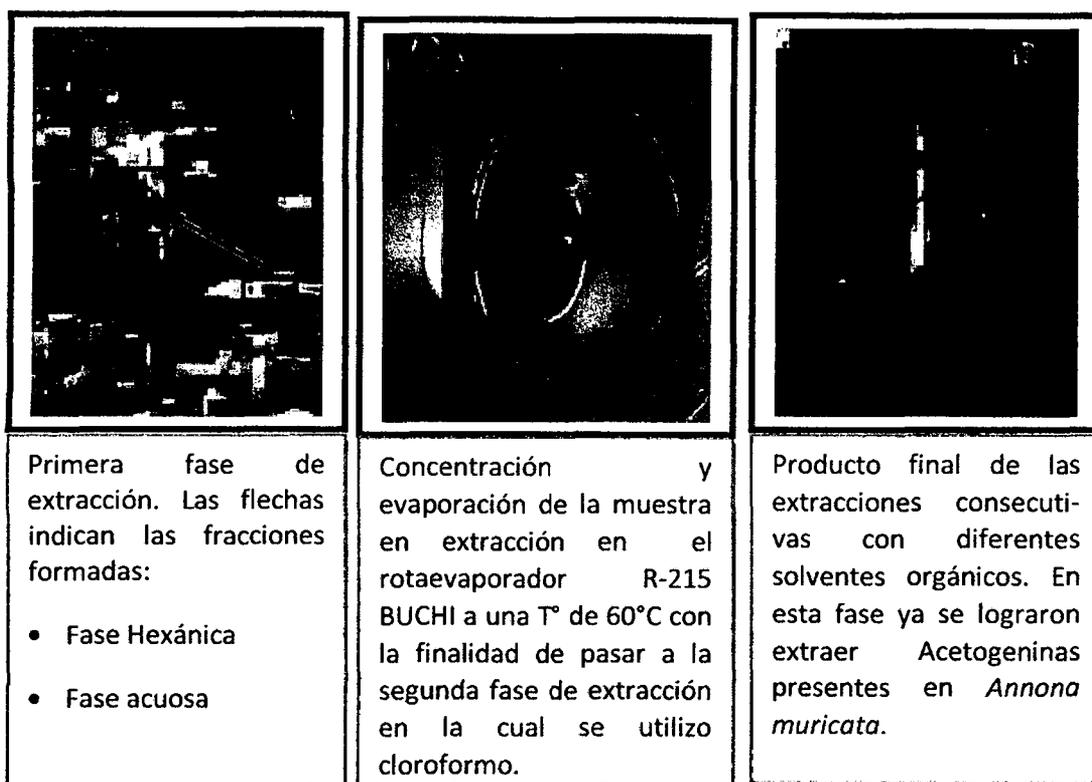


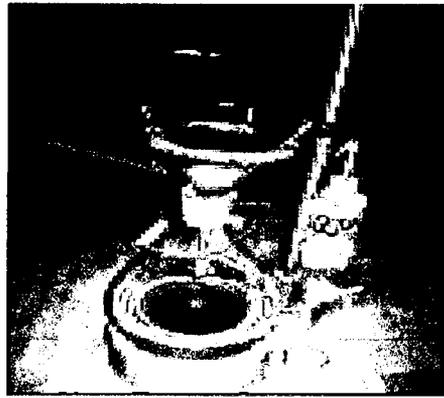
FIGURA N°14: fotografías del proceso de extracción de Acetogeninas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Desecación de la fracción Bioactiva: La fracción Bioactiva (concentrado de Acetogeninas), se procedió a desecar con sulfato de sodio anhidro (NaSo₄), con la finalidad de eliminar trazas de agua, para luego ser filtrado. El concentrado de Acetogeninas se depositó en un balón y fue llevado al Rotavapor R-215 BUCHI a una temperatura de 60°C y una presión al vacío de 474 mbar.



Desecación del concentrado de Acetogeninas con sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua.



Filtrado del concentrado de Acetogeninas para retirar el sulfato de sodio. La flecha indica el sulfato de sodio retenido en el embudo.

FIGURA N°15: fotografías del proceso de desecación de Acetogeninas

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Etiquetado y almacenamiento: Posterior a la desecación el concentrado de Acetogeninas se envasó en un frasco de vidrio limpio y previamente pesado dejándolo en la campana extractora para eliminar el exceso de cloroformo concentrado. El concentrado de Acetogeninas obtenido se almacena bajo sombra y a temperatura ambiente en el laboratorio de Fitoquímica hasta su posterior uso.

Con el concentrado de Acetogeninas obtenidas se realizaron los siguientes ensayos:

3.7.4. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN.

Para determinar el porcentaje de extracción se tomó en cuenta el volumen peso del concentrado de Acetogeninas extraído hasta agotamiento de la muestra y se correlaciono con la cantidad de extracto crudo etanólico que se obtuvo en un inicio. Para calcular el porcentaje de extracción se usó la siguiente fórmula: (61)

$$\% E = \frac{P_f}{P_i} \times 100$$

Donde:

%E: Porcentaje de extracción.

P_i: Peso de la muestra molida.

P_f: Peso del extracto seco.

3.7.5. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS

El concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba) fue sometido a las siguientes pruebas:

3.7.5.1. Características Organolépticas

A través de este análisis se observó y determinaron características en cuanto a su aspecto, color, olor y sabor.

3.7.5.2 Ensayos Físicos:

Pruebas de Solubilidad del concentrado de Acetogeninas de Annona muricata L. (Masasamba).

Por la naturaleza de las Acetogeninas se puede deducir que son parcialmente solubles en agua, sin embargo se verá el comportamiento de estas sustancias en diferentes solventes de diferente polaridad como alcohol, cloroformo, éter de petróleo y benceno.

❖ Procedimiento:

Para el ensayo de solubilidad se pesó 10mg aprox. del concentrado de Acetogeninas en varios tubos de ensayo, luego se agregaron a cada uno de ellos 2-3 ml. de un solvente de diferente polaridad.

TABLA N° 9: Polaridad de algunos solventes.

SOLVENTE	POLARIDAD
H₂O	78.5
Acetonitrilo	36.2
Metanol	32.6
Etanol	24.3
Acetona	20.7
Diclorometano	8.9
Acido acético	6.2
Acetato de etilo	6.0
Clorobenceno	5.6
Cloroformo	4.7
Éter dietílico	4.3
Benceno	2.3
Hexano	1.9

Fuente: (Sharapin, 2000) (60)

Análisis cromatográfico

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez (61).

Cromatografía en capa fina:

La cromatografía en capa fina es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias, identificar, caracterizar o determinar semicuantitativamente componentes individuales.

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a la fase móvil (normalmente un disolvente) y a la fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o silicagel).

Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. Las separaciones se realizan por el procedimiento "ascendente", introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa.(61)

Reveladores: los reveladores son reactivos apropiados que se usan cuando las sustancias separadas en las placas de silicagel no son coloreadas con esta operación se vuelven visibles logrando identificarlas. (61)

❖ Procedimiento:

- 1.- Se emplearon placas de Silicagel 60. Sobre una placa de silicagel se aplican 10 µl del concentrado de Acetogeninas se procedió a secar con una secadora con la finalidad de que la muestra se fije de mejor manera a la placa de silicagel.
- 2.- Por otro lado se preparó el líquido desarrollador que consiste en la mezcla de los siguientes solventes orgánicos Cloroformo: Acetato de etilo: Metanol en las siguientes proporciones (6:3:1) respectivamente.
- 3.- El líquido desarrollador se introdujo en la cámara desarrolladora.
- 4.- La placa de silicagel que contiene la muestra es introducida a la cámara desarrolladora y se deja que el líquido desarrollador suba por la placa hasta su límite superior.

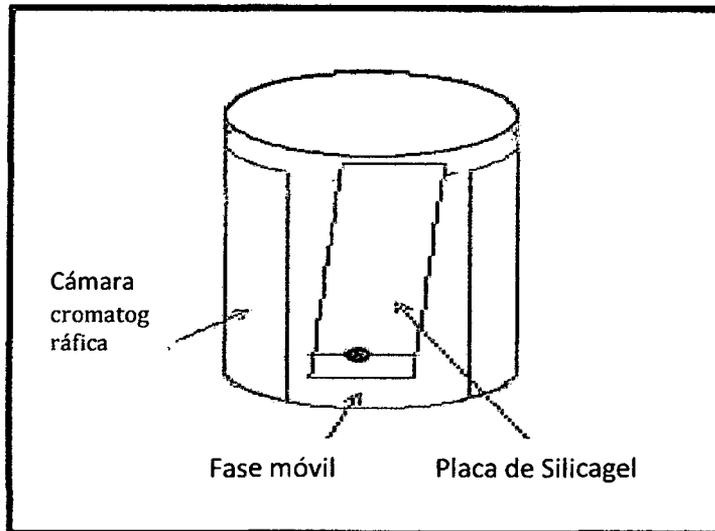


GRAFICO N°8: Representación grafica de cromatografía en capa fina

Fuente: Florez, L. (extractos bioactivos) (55)



La cromatografía en capa fina se realizo en la campana de extracción. En la figura se puede observar la placa de Silicagel posterior a la interacción entre la muestra y el líquido desarrollador.

FIGURA N°16: Fotografía del proceso de cromatografía en capa fina.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

5.- Como las sustancias separadas en la placa de silicagel no son coloreadas se procedió a rociarlas con un revelador, para la cual se uso el reactivo de Kedde mediante esta operación se pudo identificarlas y ponerlas en evidencia.

Reactivo de Kedde: El reactivo de Kedde es una solución al 2% (p/v) de ácido 3,5-dinitrobenzoico en etanol denominada fracción A y una fracción B que la constituye hidróxido de potasio (KOH) al 6% en etanol. La reacción consiste en

poner en contacto un pequeño volumen de la fracción A sobre la muestra a ensayar la cual previamente se puso en contacto con la fracción B. La aparición de una coloración de rosa a violeta - intenso, delata la presencia en la muestra a ensayar de una molécula con un resto y – lactónico.(72)

6.-Procedimiento del revelado: La placa de silicagel de la cromatografía en capa delgada fue revelada con el reactivo de Kedde, para lo cual primero fue rociada con la fracción A, se dejó actuar por un minuto para posteriormente ser rociada con la fracción B.(62)(72)

Análisis cromatográfico por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

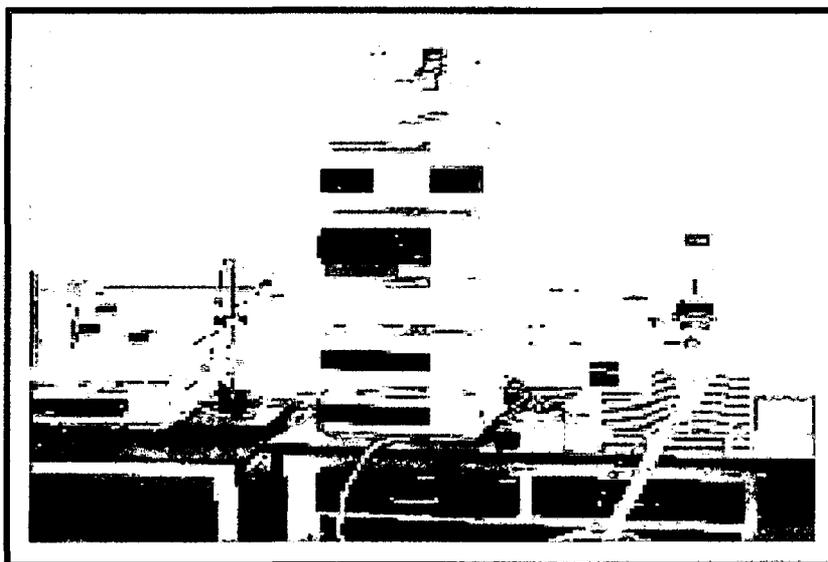
Denominada también como Cromatografía líquida de alta eficacia, es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. (61)

❖ Aparato

El equipo consiste en un Desgasificador, Bomba binaria de dos cabezales encargada de succionar los solventes y mezclarlas, puerto de inyección o Autosampler, un horno o compartimento termostático que contiene la columna cromatográfica, un detector DAD (detector por arreglo de diodos) y un sistema de adquisición de datos. La muestra en estudio atraviesa por la columna con un caudal y una presión controlada y seguidamente pasa a través del detector. La cromatografía se realiza a temperatura constante utilizando un programa dado.

- **Procedimiento:**

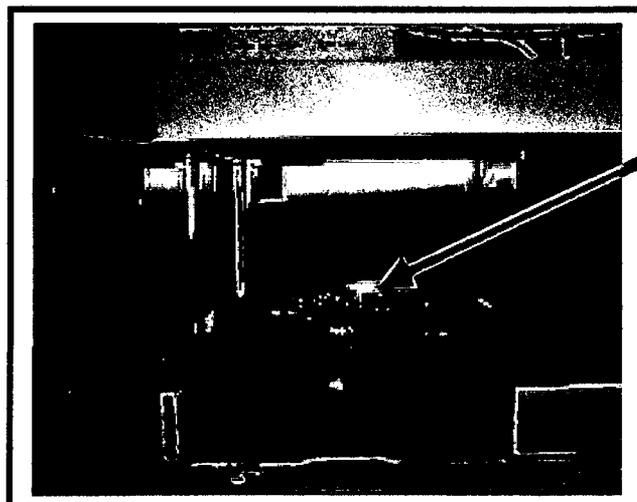
El análisis cromatográfico por HPLC fue realizado en el laboratorio de cromatografía de la facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. El análisis consiste en equilibrar la columna, la cámara de inyección y el detector a la temperatura caudal de la muestra especificada en la monografía. Preparamos la solución problema, para lo cual se utilizó 100mg de muestra aproximadamente diluida en metanol HPLC. Se tuvo en cuenta en esta prueba que la solución de la muestra debe estar exenta de partículas sólidas.



El análisis cromatográfico por HPLC de fase reversa se llevo a cabo en un modelo GC-MS AGILENT TECHNOLOGIES 1200S instalado a un sistema de columna Zorbax eclipse XDB-C18 ANALITYCAL con 250mm de largo reticulado, 4.6mm de diámetro y 5 μ m de espesor de película. La temperatura fue de 30°C y se mantuvo constante durante todo el proceso cromatográfico. La detección se realizo a 220nm.

FIGURA N°17: Fotografía del equipo de HPLC.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



Acetogeninas
de *Annona
muricata*.

La muestra de Acetogeninas (1.0 microlitro) fue inyectada como solución al 1% en metanol. Los componentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masa y tiempos de retención utilizando como referencias una colección de datos de la INTERNATIONAL JOURNAL of BIOMEDICAL SCIENCE.

FIGURA N°18: Fotografía del concentrado de Acetogeninas en el Autosampler del equipo de HPLC.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

- **Especificaciones del análisis cromatográfico de las Acetogeninas de *Annona muricata* L.**

Se siguieron los siguientes criterios para el análisis cromatográfico:

- ✓ Columna: C-18 (250 mm x 4.6 x 5 μ m).
- ✓ Detección: 220nm.
- ✓ Temperatura: 30°C constante.
- ✓ Fase móvil: A: Agua
B: Metanol 85%.
- ✓ Gradiente: 1°: 0 - 40min 85% B
2°: 40 - 60min 85%- 95% B.
- ✓ Flujo: 1ml/min.

Fuente: Yang, International Journal of Biomedical Science (63)

SEGUNDA PARTE

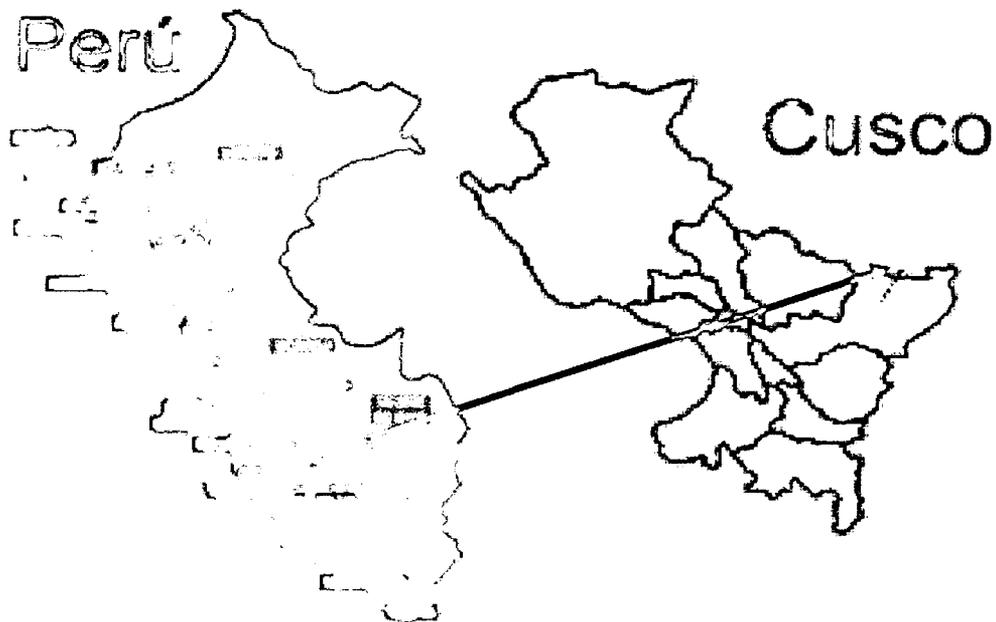
3.8. DE LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA

3.8.1 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA.

3.8.1.1 Recolección de la especie insectil *Aedes aegypti*.

El ciclo de vida de los mosquitos *Aedes aegypti* se desarrolla en cuatro etapas las que son huevo, larva, pupa y adulto; para el ensayo insecticida se colectaron larvas de 4mm aproximadamente correspondientes al estadio larval III tardío o IV temprano aproximadamente cuatro días después de su eclosión de ser huevo. Estas larvas fueron recolectadas en las localidades de Quince mil, Huacyumbre, Limonchayoc y san Lorenzo del distrito de Camanti a 643msnm, provincia de Quispicanchis, región Cusco durante el mes de Julio del 2011.

La vegetación de la zona de recolección está constituida por matorrales, arbustos, bosques de árboles frutales y madereros. La zona se caracteriza por un clima caliente con una temperatura comprendida entre 24 °C a 26°C en esta época del año, abundante humedad comprendida entre 85 % a 90%, lluvias continuas leves y torrenciales según las condiciones del tiempo. A su vez existen numerosos ríos y riachuelos que recorren por estas zonas siendo un hábitat ideal para numerosos insectos así tenemos: cigarras, libélulas, mariposas, chinches, moscas comunes, simúlidos, reptiles pequeños, anfibios y otras especies.



La flecha indica la provincia de Quispicanchis dentro de la región Cusco.



La flecha indica la ubicación geográfica del distrito de Camanti ubicada dentro de la provincia de Quispicanchis-Cusco

FIGURA N°19: Ubicación geográfica del lugar de recolección de larvas de *Aedes aegypti*.

Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI-2006 (56)



Se recolectaron insectos de *Aedes aegypti* en su fase larval en las zonas urbanas, que comprenden viviendas que fueron seleccionada al azar con un criterio de delimitación de 200m a la redonda.

FIGURA Nº 20: fotografía vista general del área de recolección de larvas de *Aedes aegypti*.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

El proceso de recolección de larvas empezaba de 8:00am - 13:00pm y de 14:00pm - 17:00pm horario que fue establecido y sugerido por el Entomólogo de la unidad de saneamiento ambiental y control vectorial; responsable de la coordinación de vigilancia entomológica DIRESA- Cusco (Dirección Regional de Salud), en coordinación con el Entomólogo responsable de vigilancia Entomológica de la Red de Servicios de Salud Cusco Sur y Bióloga Responsable de Laboratorio y Vigilancia Entomológica del centro de salud Quincemil.

Método de colecta de larvas de *Aedes aegypti*:

La recolección se realizó siguiendo las pautas recomendadas por el manual de campo para la vigilancia Entomológica, 2001; elaborado por la DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental) (64).

De acuerdo al manual de campo para la vigilancia entomológica antes de realizar la colecta de larvas (procedimiento denominado larveo), primero es necesario realizar un mapeo, reconocimiento y sectorización de las localidades

pertenecientes a una determinada zona a inspeccionar intradomiciliariamente y peridomiciliariamente (en nuestro caso el distrito de Camanti), la cual nos fue facilitada por la Bióloga Responsable de Laboratorio y Vigilancia Entomológica del centro de salud Quincemil. El reconocimiento de la zona a inspeccionar toma como criterio delimitar y dividir la zona en fragmentos de zona que considera viviendas que estén comprendidas dentro de un área circular de 200 m de radio y serán inspeccionadas las casa más representativas y/o sospechosas.

El manual menciona que la búsqueda de larvas se realiza casa por casa, en todos los recipientes de agua, sea para consumo humano, para animales de corral, para regar; en los lugares de clima tropical y lluvioso, es importante buscar en cualquier recipiente u objeto que pudiera contener agua, especialmente aquellos denominados inservibles., y eliminarlos (a la basura) o poniéndolos boca abajo, también se recomienda utilizar una picota para agujerear los recipientes inservibles. Los criaderos de *Aedes aegypti* son usualmente los recipientes de agua artificiales de uso doméstico, como floreros, baldes, pozos o tanques de agua de consumo humano o para los animales. También es posible hallarlos en floreros, cementerios, llantas en desuso, y en zonas lluviosas, es importante la búsqueda en los llamados inservibles como latas vacías, botellas, etc.

Se requieren los siguientes materiales: Cucharón para colecta de larvas, Goteros o pipetas, Viales con tapa etiquetado, Lápiz y Formato de Inspección domiciliar para *Aedes aegypti*.

La búsqueda se hace utilizando el cucharón para tomar una muestra, se puede vaciar el contenido del recipiente (si es posible) en una bandeja o balde, o simplemente usando un gotero, para coleccionar los ejemplares y ponerlos en un vial etiquetado; a medida que se van registrando todos los recipientes de agua se van apuntando en la hoja de inspección domiciliar; se hace la búsqueda en todos los recipientes de la casa, sin excepción.

Todo lo recomendado en el manual de campo para la vigilancia Entomológica, 2001; (64).fue seguido exactamente en nuestra investigación.El mapeo fue asignado por barrios de la zona a los cuales les denominamos con letras mayúsculas en el presente estudio.



Se recolectaron larvas de *Aedes aegypti* en las viviendas donde se encontraron depositados generalmente en recipientes de uso domestico que contienen agua de lluvia y abundante material orgánico, así como en los llamados inservibles (llantas, latas vacías, botellas, etc). La búsqueda se realizó utilizando un cucharón con el cual cogíamos muestras biológicas de diferentes recipientes encontrados en la zona cuyo contenido fueron vaciados en una bandeja. Fueron recolectados en horas donde las temperaturas fluctuaban entre 23 -25 °C y 78-82% de humedad relativa, esto sucedió a las 9:00-17:00 horas.

FIGURA N° 21: fotografía general del procedimiento de recolección de larvas de *Aedes aegypti* en zonas urbanas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



Con la ayuda de una pipeta Pasteur de material de plástico con punta de boca ancha se procedió a succionar las larvas de diferentes mosquitos de los recipientes donde fueron encontrados (llantas, material domestico en desuso, botellas, latas, etc), luego fueron almacenadas y rotuladas en recipientes limpios de material de plástico de fácil manipulación debido a las caminatas, las cuales contenían agua del mismo recipiente de recolección con la finalidad de darles las mismas condiciones del hábitat donde se las encontró.

FIGURA N°22: Fotografía de recolección, almacenamiento y transporte de larvas de *Aedes aegypti*.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

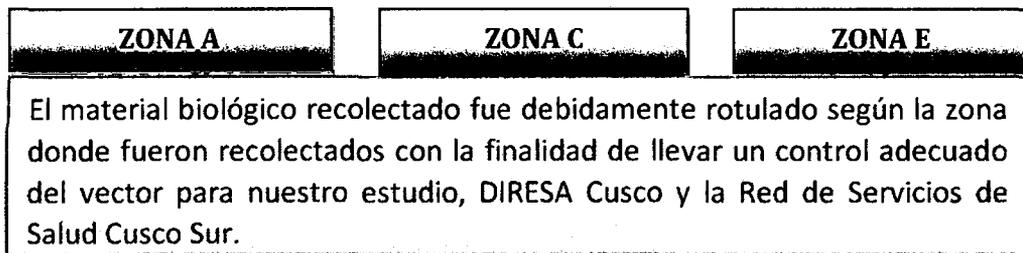


FIGURA N°23: fotografías de recipientes con larvas rotuladas por cada zona de recolección.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Material domestico

Material de construcción

Llantas



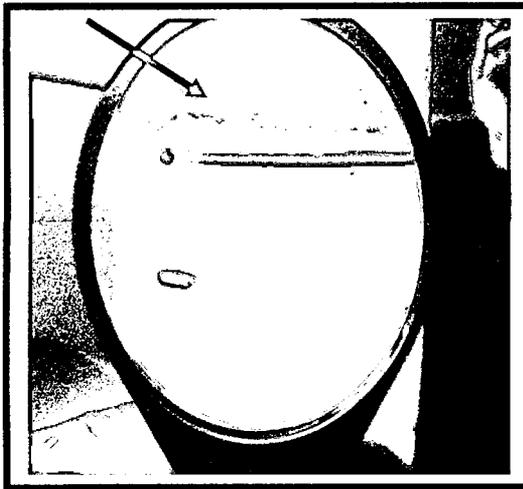
Los mosquitos hembras de *Aedes aegypti* ovopositan sus huevos en estos recipientes, las que generalmente contienen agua por las lluvias continuas en la zona dándole un hábitat adecuado para su ciclo biológico.

FIGURA N°24: fotografías de recipientes en los que se encontraron larvas de *Aedes aegypti*.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

3.8.1.2. Identificación de la muestra insectil

La identificación de la muestra insectil se realizó en el laboratorio del área de entomología del centro de salud de Quincemil perteneciente a la Red de Servicios de Salud Cusco Sur, la identificación fue realizada por el especialista Entomólogo de la Dirección Regional de Salud Cusco, personal de salud del centro de salud de Quincemil del área encargada del control del vector *Aedes aegypti* y nosotros como ejecutores de la investigación.



Del material biológico que se obtuvo se procedió a identificarlos con la ayuda de un microscopio ya que las características de las larvas no se aprecian a simple vista y es necesario realizarlo microscópicamente para lograr identificarlos y diferenciarlos de otros mosquitos pertenecientes a la misma familia y que también se encuentran en la zona.

FIGURA N°25: fotografía de larvas recolectadas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Características de larvas de Aedes aegypti para su identificación:

Presentan las siguientes características:

- Fase acuática, alimentación y crecimiento.
- Cabeza, tórax y 9 segmentos abdominales.
- Sifón respiratorio cortó por el cual respira y se mantiene en la superficie casi vertical.
- Poseen 4 espinas torácicas, dos a cada lado.
- 8vo segmento con una hilera de 7-12 dientes.
- Tiene un movimiento serpenteante.

Estas características las diferencian de otros mosquitos que pertenecen a la misma familia quienes presentan el mismo ciclo de vida. (64)

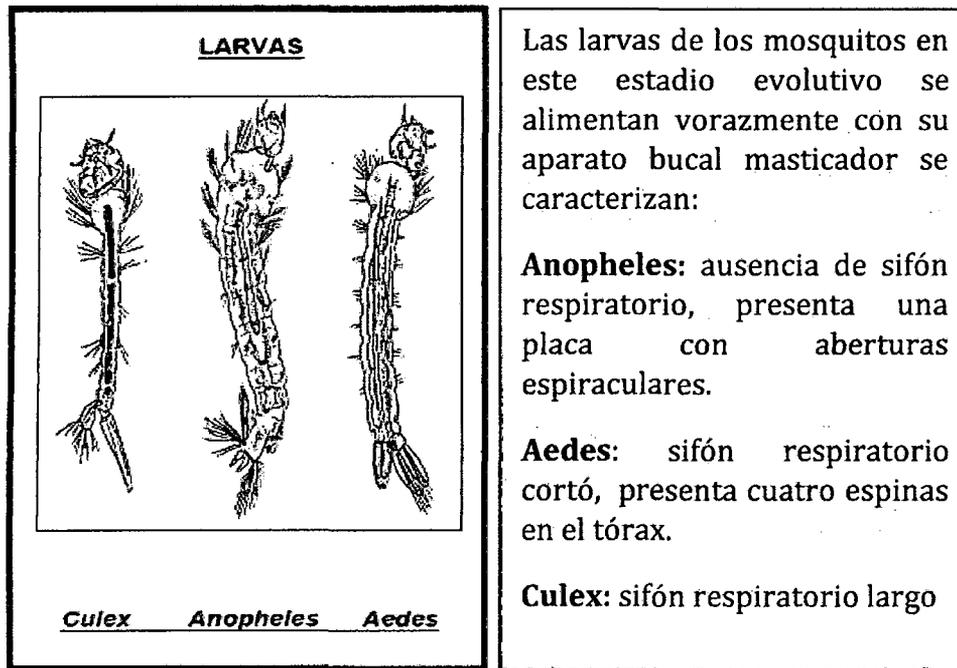


FIGURA N°26: Diferencia de Aedes frente a otros géneros de mosquitos.

Fuente: Florez, L. Pruebas de Actividad biológica (47)

Identificación de Aedes aegypti en laboratorio

Una vez obtenida el material biológico fue transportada al laboratorio para su identificación, la cual se realizó de la siguiente manera:

- se eligieron 1-2 larvas de cada recipiente previamente rotulado correspondiente a una determinada zona de recolección.
- Las larvas se someten a etanol 70 ° para matarlas con la finalidad de evitar movimiento de estas al ser observadas en el microscopio.
- Las larvas muertas son preparadas en láminas porta objetos para su identificación en el microscopio con un objetivo de 10X.



De todos los grupos de material biológico recolectado se escogieron al azar dos larvas, las que presentaban completas todas las partes de su cuerpo. Una vez seleccionadas las larvas se procedió a observarlos en el microscopio a un objetivo de 10X.

FIGURA N°27: Fotografía de preparación de material biológico para su identificación.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

De los grupos de material biológico que fueron recolectados y tras un exhaustivo proceso de identificación se logró tipificar e identificar en el grupo "E" larvas de *Aedes aegypti*, con la ayuda de un microscopio a un objetivo de 10X, siguiendo las claves taxonómicas propuestas y presentadas en el "Manual of Neartic Diptera" (McAlpine, 1981) y manual de campo para la vigilancia Entomológica, 2001 elaborado por la DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental) (55).

Los demás grupos fueron identificados como larvas del mosquito del genero *Culex* los cuales no son de mucho interés en el área de salud y fueron debidamente descartados bajo la supervisión del personal de DIRESA Cusco y personal de Red de Servicios de Salud Cusco Sur.



Fig. A: espinas torácicas



Fig. B: sifón respiratorio corto



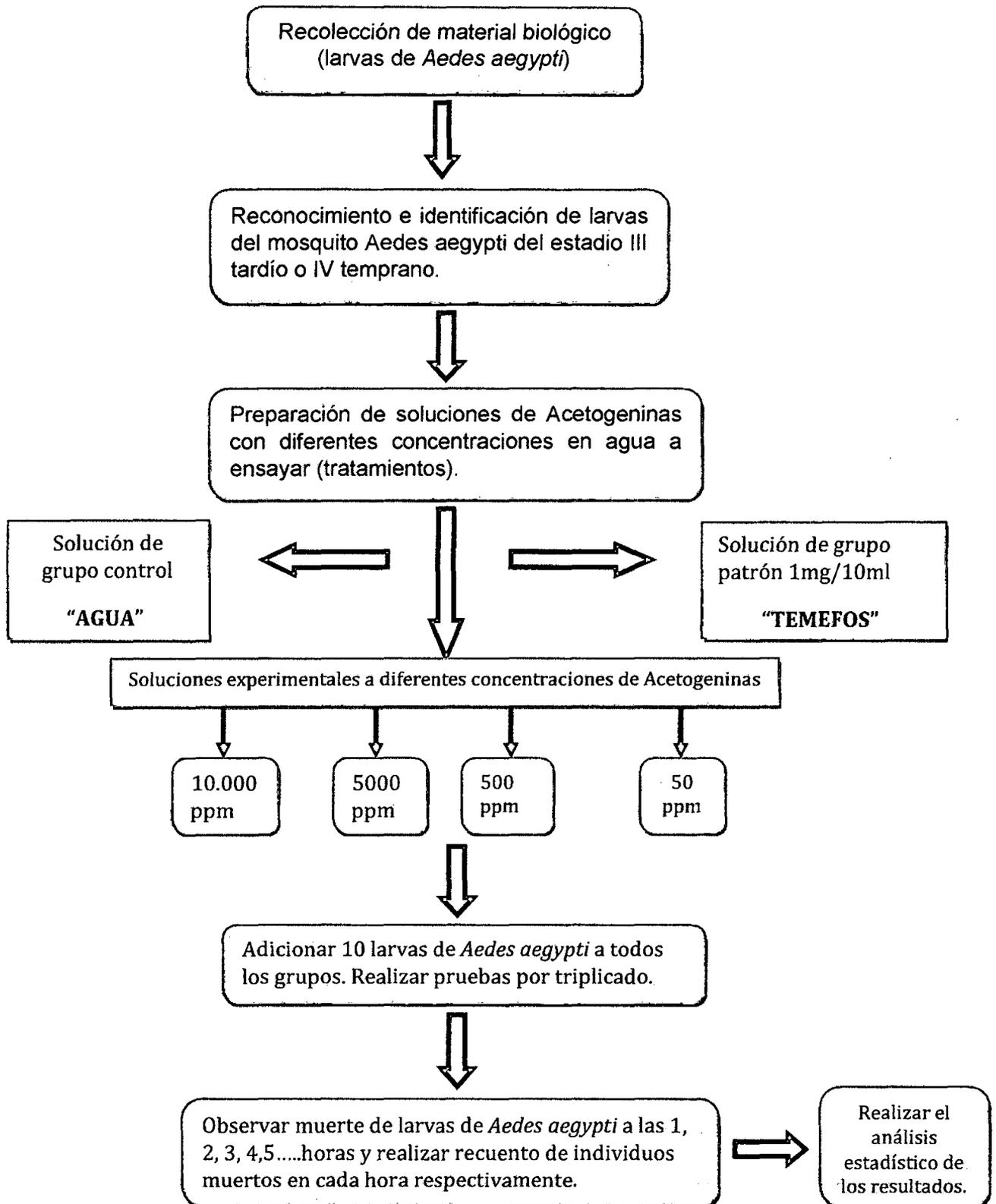
Fig. C: cuerpo arqueado y cabeza pegada al tórax

La observación, el análisis e identificación de la muestra insectil (larvas), se fundamentó básicamente en las características morfológicas que presenta el insecto *Aedes aegypti* en su estadio larval como se muestran en las figuras N°28, mencionadas características confirmaron la presencia de larvas de *Aedes aegypti*.

FIGURA N°28: Fotografías de las características de *Aedes aegypti* identificadas en laboratorio.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

FLUJOGRAMA N° 3: Procedimiento para la evaluación del efecto insecticida contra larvas de *Aedes aegypti*.



Fuente: Elaboración propia.

3.8.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA EN LARVAS DE LOS MOSQUITOS DE *Aedes aegypti*.

3.8.2.1. Bioensayo del efecto insecticida:

Los bioensayos se realizaron en un ambiente acondicionado en el centro de salud Quincemil distrito Camanti perteneciente a la Red de Servicios de Salud Cusco Sur.

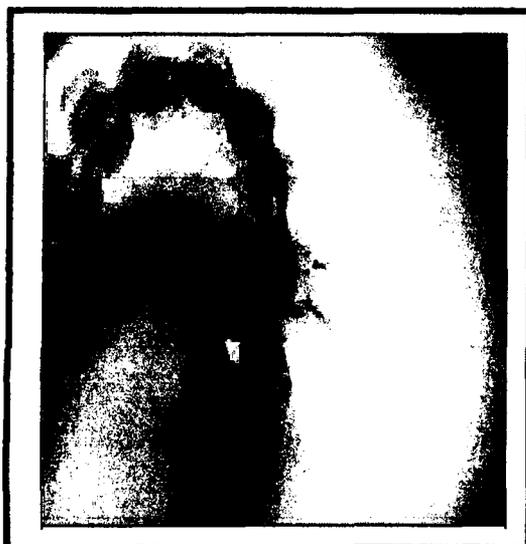


El centro de salud Quincemil, se encarga de llevar un adecuado control y vigilancia de la población del mosquito *Aedes aegypti* (vector del dengue y fiebre amarilla). Así como también se encarga de erradicarlos cuando su población aumenta con la finalidad de evitar focos de infección de fiebre amarilla y dengue, por tal motivo nos facilitaron un ambiente para poder realizar el presente estudio.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Modelo biológico: Los bioensayos contemplaron el uso de larvas de *Aedes aegypti* de 4mm aproximadamente correspondientes al estadio larval III tardío o IV temprano, ya que estas son fácilmente manipulables y vistas al ojo del observador.

Se siguió el modelo propuesto por la RELCOV (Red Latinoamericana en Control de Vectores)(39), con algunas adaptaciones según la UNAL– Colombia (56).



Las larvas que se lograron identificar como *Aedes aegypti* fueron sometidos a pruebas de actividad biológica frente a Acetogeninas a diferentes concentraciones obtenidas de *Annona muricata* para determinar actividad biopesticida para lo cual se trabajó según el protocolo propuesto por la RELCOV con algunos acondicionamientos según la universidad tecnológica de Pereira – Colombia.

FIGURA N°29: *Aedes aegypti* en su estado evolutivo de larva.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Tratamientos: en los bioensayos se evaluaron 6 tratamientos que consistieron en soluciones a base de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba) a diferentes concentraciones (10.000ppm, 5.000ppm, 500ppm, 50ppm), un insecticida comercial denominado Temefós recomendado por la RELCOV (red latinoamericana de control de vectores) y agua de lluvia contenidas en recipientes donde se encontraron las larvas como control negativo, ya que esta no produce efecto insecticida. Cada tratamiento se repitió tres veces en el tiempo para disminuir el error experimental (Park et al.- 2004).

Procedimiento:

Para la evaluación de la actividad insecticida se utilizó el bioensayo de respuesta a estímulo físico el cual se basa en la determinación de respuesta que es expresada en el movimiento de las larvas sometidas a experimentación al ser tocadas con un puntero romo en la región cervical. Después de cada hora de exposición a las Acetogeninas se realiza el conteo de larvas muertas y moribundas (no pueden nadar normalmente) en todos los grupos de experimentación. Se consideran muertas cuando no reaccionan al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical y en todos los grupos las larvas moribundas se contabilizan como muertas.

Las pruebas para determinar el efecto insecticida fueron conducidas según el método propuesto por la RELCOV (red latinoamericana de control de vectores),

con algunas adaptaciones según la universidad de Quindío – Colombia. Se utilizaron viales de vidrio con capacidad de 20ml de volumen, con una altura de 5.8 cm y un diámetro de 2.8 cm. Medidas que fueron recomendadas por la UNAL – Colombia.



Las pruebas de actividad biológica se desarrollaron por triplicado para cada grupo experimental. Las pruebas se realizaron en viales de vidrio estéril, aséptico y libre de contaminación con sustancias extrañas.

FIGURA N°30: fotografía de los grupos de experimentación.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Los diferentes tratamientos con Acetogeninas a diferentes concentraciones fueron preparados en viales estériles de la siguiente manera:

- **preparación de solución de Acetogeninas de diferentes concentraciones:**

✓ primero se preparó una solución con una concentración de Acetogeninas de 10.000ppm disueltos en 10ml de agua, la cual fue denominada solución madre, de la cual se realizaron diluciones para preparar las siguientes concentraciones utilizadas.

Cálculos para preparar las soluciones de Acetogeninas:

1ppm = 1mg/L, entonces:

10.000ppm = 10.000mg/L; se debe de preparar en 10ml de agua, para lo cual la cantidad en peso de Acetogeninas a usar es la siguiente:

10g	→	1000ml
X	→	10ml
x = 0.1g de Acetogeninas		

0.1g de Acetogeninas se pesaron para ser disueltas en 10ml de agua y dar lugar a una solución de 10.000ppm, la cual fue denominada solución madre. De esta solución se realizaron diluciones para obtener las demás soluciones con las concentraciones deseadas que fueron utilizados en el bioensayo; esta operación se realizo de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} C1.V1 &= C2.C2 \\ (10.000\text{ppm})(X\text{ml}) &= (5000\text{ppm})(10\text{ml}) \\ x &= 0.5\text{ml} \end{aligned}$$

Se sacaron 0.5ml de la solución madre y se llevo a aforar con agua hasta el volumen de 10ml para obtener una solución de 5000ppm.

Bajo este procedimiento se obtuvieron soluciones con concentraciones de 5.000ppm, 500ppm y 50ppm requeridas para el bioensayo. En el ensayo experimental cada concentración fue designada a un grupo experimental de la siguiente manera:

Grupo I: solución de Acetogeninas con concentración de 10.000ppm.

Grupo II: solución de Acetogeninas con concentración de 5.000ppm.

Grupo III: solución de Acetogeninas con concentración de 500ppm.

Grupo IV: solución de Acetogeninas con concentración de 50ppm.

Grupo V: solución de insecticida patrón "Temefós" 1mg/10ml

Grupo VI: agua.

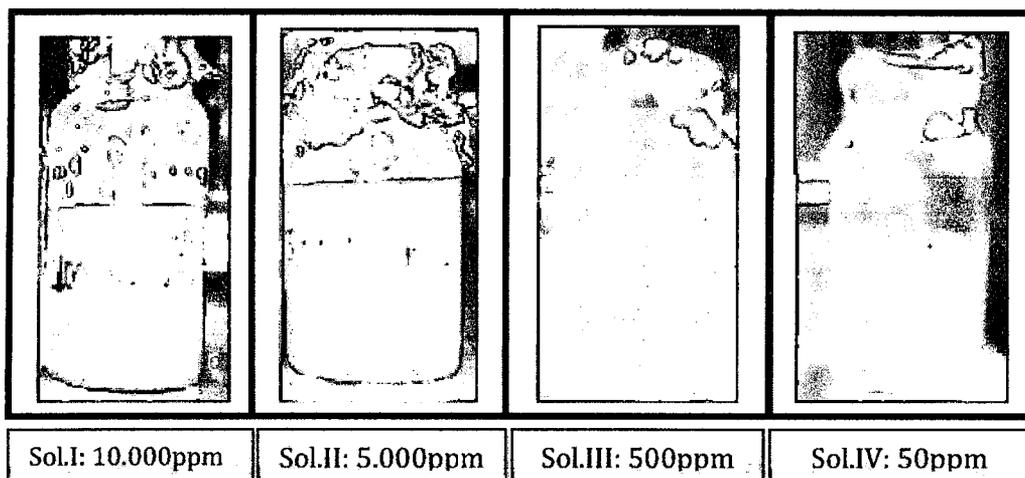


FIGURA N°31: fotografía de soluciones de Acetogeninas a diferentes concentraciones en ppm.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

- **Adición de larvas *Aedes aegypti*:**

Se introduce 10ml de agua a los viales que están agrupados de a tres seguidamente se les adiciono las soluciones de Acetogeninas de la siguiente manera:

Grupo I : Agua 10ml + 50ul de solución 1

Grupo II : Agua 10ml + 50ul de solución 2

Grupo III: Agua 10ml + 50ul de solución 3

Grupo IV: Agua 10ml + 50ul de solución 4

Grupo V : Agua 10ml + 50ul de solución de insecticida patrón "Temefós"

Grupo VI: únicamente agua.

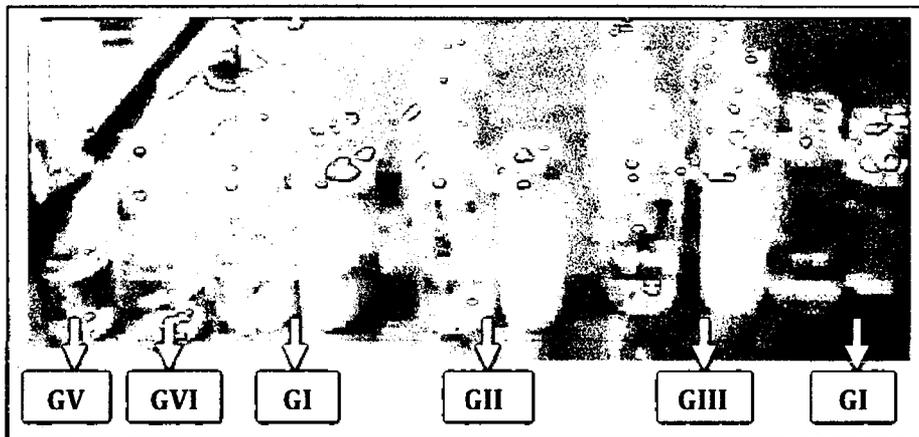
Una vez listas los grupos experimentales se adicionaron 10 larvas de *Aedes aegypti* a cada vial. La mortalidad de las larvas se observo a cada hora para cada grupo experimental. En el transcurso del ensayo se mide la temperatura y la humedad relativa dentro y fuera del ambiente de experimentación con la finalidad de llevar un control adecuado de las condiciones ambientales.



Con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico se adicionaron 10 larvas a cada grupo experimental, se tomo en cuenta la hora inicial de exposición de los grupos experimentales a las diferentes concentraciones de Acetogeninas, así como el grupo control positivo y grupo control negativo.

FIGURA N°32: fotografía de adición de larvas a los grupos experimentales.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



Todos los grupos experimentales contienen 10 larvas de *Aedes aegypti*. Cada grupo experimental fue evaluado cada hora, el ensayo biológico se realizó a una Temperatura ambiente que variaba entre 22.3°C a 25°C y una humedad relativa entre 77% a 89%. Esto sucedía a las 8:00pm, el 14 de julio del 2011.

FIGURA N°33: Fotografía de los grupos experimentales

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

- **Análisis de mortalidad de las larvas:**

Las lecturas de mortalidad se realizaron a cada hora en un lapso de 43 horas, tiempo en el que todas las larvas de los grupos experimentales expuestos murieron (grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V), con excepción del grupo control negativo (grupo VI), el cual no fue sometido a

ningún agente. Las larvas se consideran muertas cuando no reaccionan al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical. Los datos fueron registrados en número de larvas que murieron a un tiempo determinado.

3.8.2.2 Análisis Estadístico:

Los datos de recuento se analizaron estadísticamente por medio de un test ANOVA (análisis de la varianza factorial), y las diferencias de medias por la prueba Post Hoc o Post Test Scheffe. (63)

TERCERA PARTE

3.9. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

3.9.1 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

Con la finalidad de comprobar la ausencia de microorganismos contaminantes en el concentrado de Acetogeninas, se procedió a su determinación de acuerdo a los siguientes criterios:

TABLA N°10: CRITERIOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO.

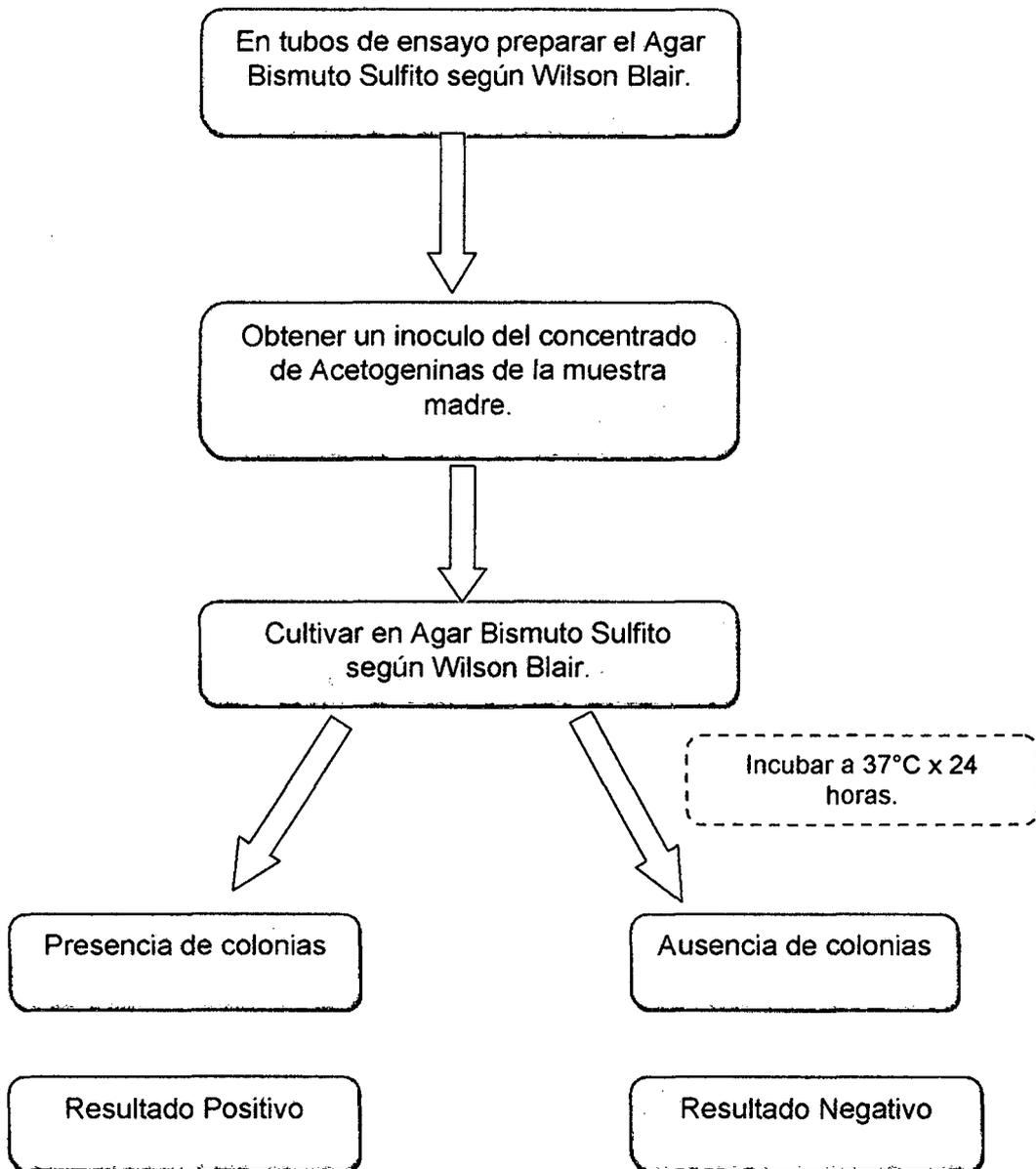
CRITERIO	MICROORGANISMO	NÚMERO PERMISIBLE
IMPERATIVO	Salmonella	Ausente
INDICATIVO DE HIGIENE	Coliformes fecales (<i>Escherichia coli</i>)	Ausente
DE ALERTA O LIMITES CRITICOS	- Aerobios Mesófilos - Hongos y Levaduras	✓ $10^4 - 10^5$ UFC/g ✓ $10^2 - 10^3$ UFC/g

Fuente: DIGESA. Dirección General de Salud "Criterio de Calidad Sanitaria e inocuidad de alimentos (51).

El control microbiológico del concentrado de Acetogeninas se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, como se muestra a continuación en los siguientes flujogramas.

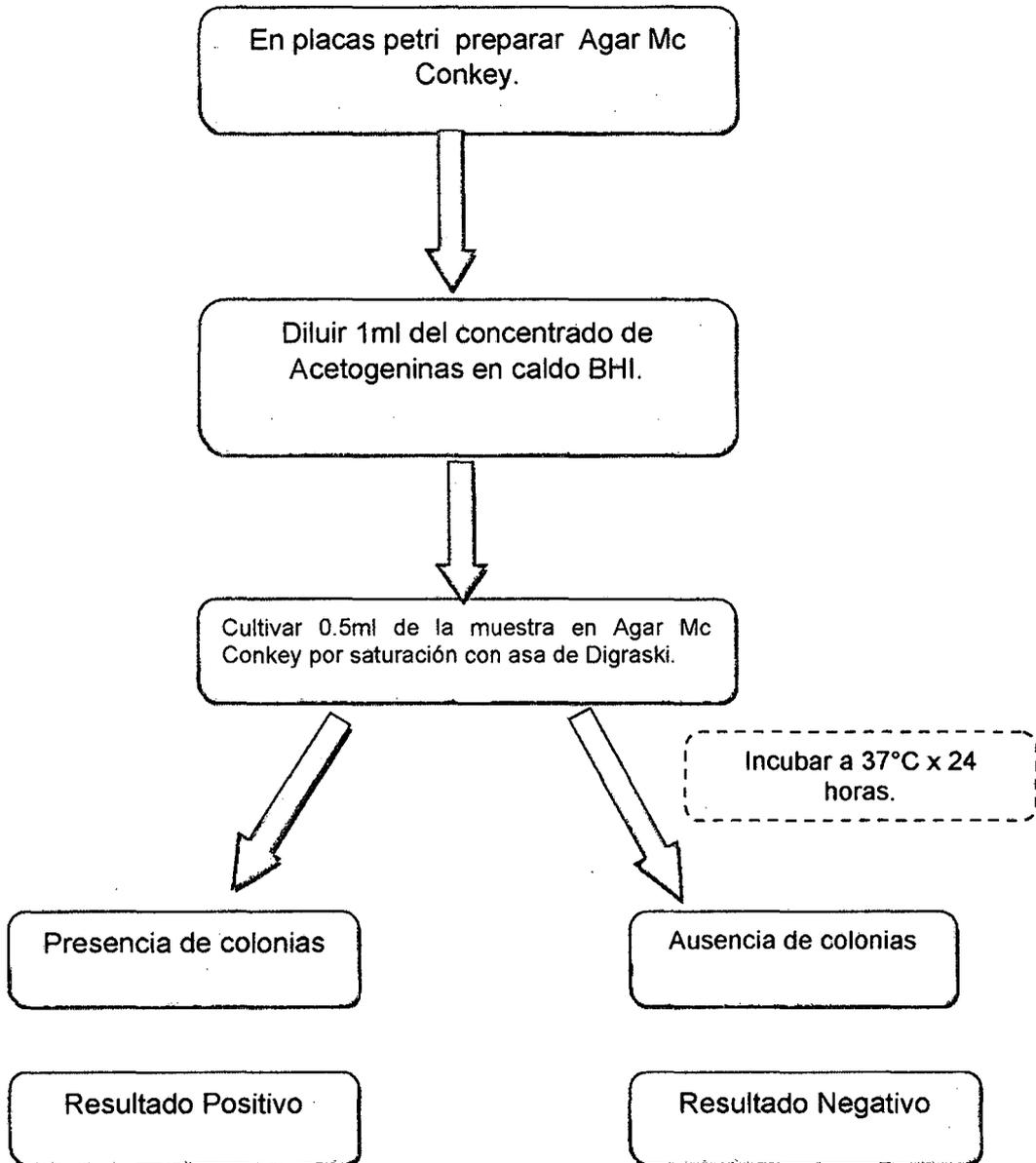
FLUJOGRAMAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO.

FLUJOGRAMA N°4: Control microbiológico del concentrado de acetogeninas obtenidas del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) “criterio imperativo – investigación de *Salmonella*”



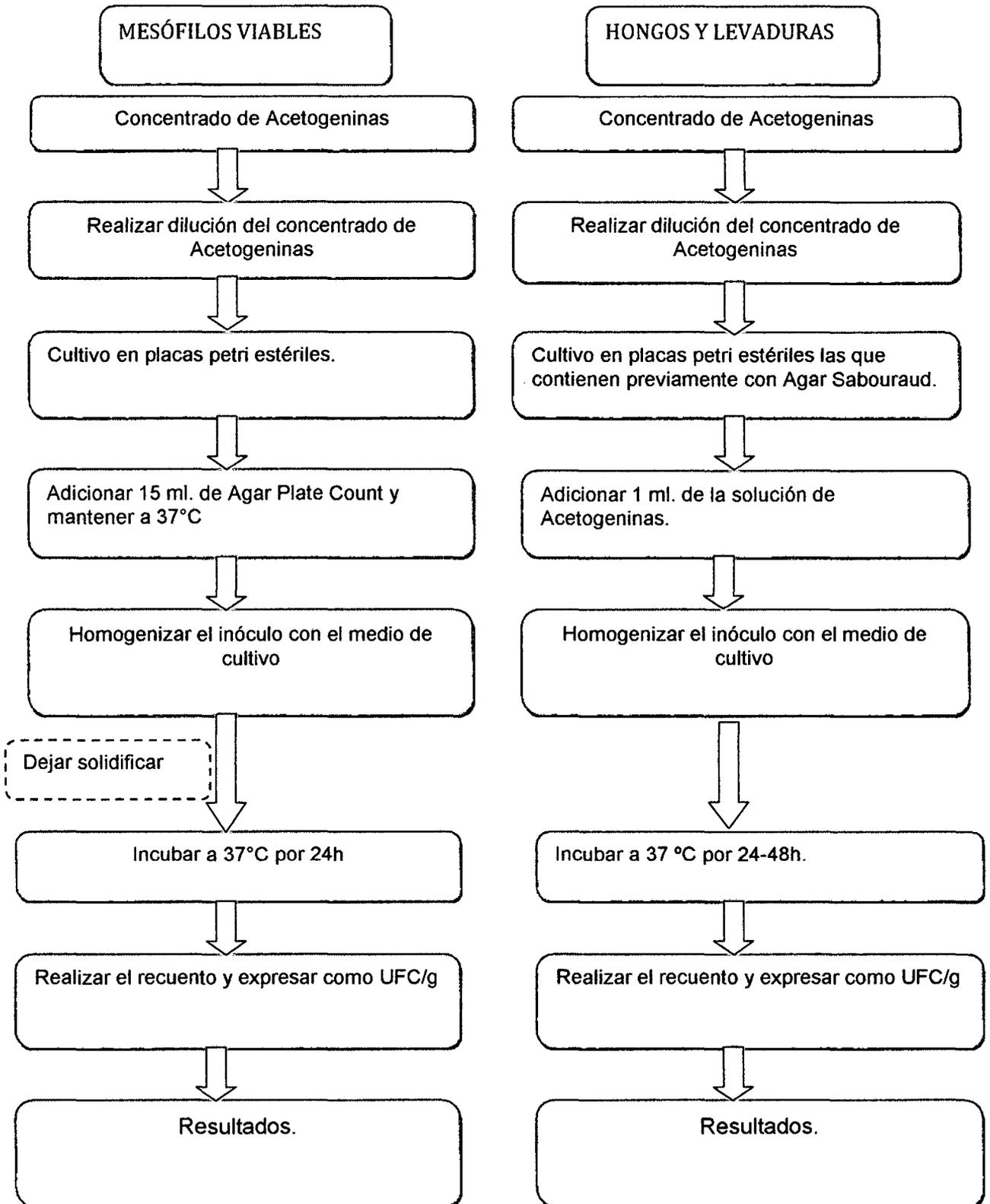
Fuente: Manual de medios de cultivo (66)

FLUJOGRAMA N°5: Control del concentrado de Acetogeninas obtenidas del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) “criterio indicativo de higiene – investigación de coliformes fecales (*E. coli*)”



Fuente: Manual de medios de cultivo (66)

FLUJOGRAMA N° 6: control microbiológico del concentrado de Acetogeninas obtenidas del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) “criterios de alerta o límites críticos – investigación de mesófilos viables, hongos y levaduras”



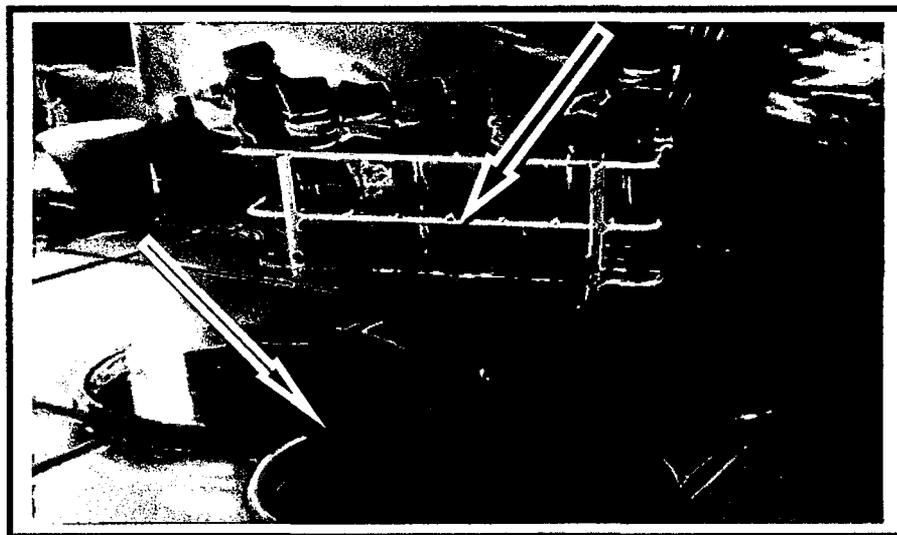
3.9.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

3.9.2.1. Activación e identificación de *Salmonella typhi* spp.

Las cepas de salmonella fueron activadas e identificadas en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco siguiendo un protocolo.

Se trabajaron con 10 muestras tipificadas por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco que se encontraban refrigeradas en agar Wilson Blair y agar Hectoen (ANEXO N°11), realizaron las siguientes pruebas:

Activación: se tomó un inóculo del tubo que contenía a la bacteria en estudio y se inóculo a un tubo que contenía caldo BHI, se incubó durante 24h a 37°C, posteriormente se tomó una muestra del caldo y se sembró en agar Hectoen (ANEXO N°11) se incubó por 24 horas a 37°C y se observó el crecimiento de la bacteria.



La flecha roja (arriba) señala cepas de *Salmonella typhi* spp en tubos con agar Bismuto Sulfito según Wilson Blair. Las colonias son de coloración negra característico de *S. typhi* en este medio de cultivo. Mientras que la flecha azul (abajo) señala colonias de *Salmonella typhi* spp en agar Hectoen (anexo N°4).

FIGURA N°34: Activación de las cepas de *Salmonella typhi* spp.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Identificación: para la identificación se procedió según el "Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo" (67).

- **Serología en lámina para la identificación de *S. Typhi spp.***

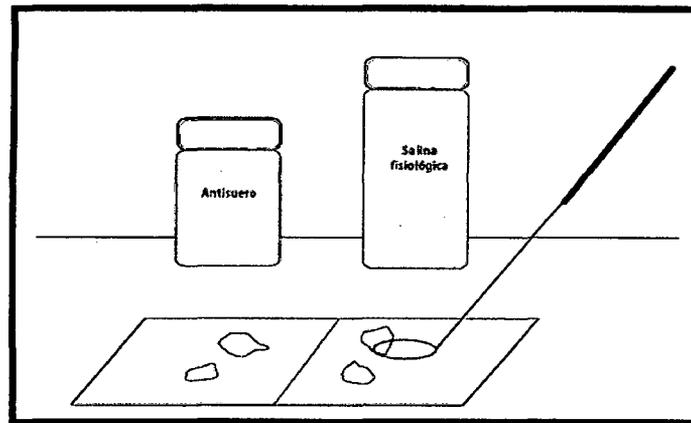
Las pruebas de aglutinación serológicas se realizaron en una placa de Petri o en una lámina de cristal limpia.



Se tomaron 1 a 2 colonias de *Salmonella typhi spp* del Agar Hectoen correspondientes a las diferentes muestras y se emulsionaron con 3ml de suero fisiológico en diferentes viales como se muestra en la figura N°35.

FIGURA N° 35: Preparación de la muestra bacteriana para la prueba de aglutinación.

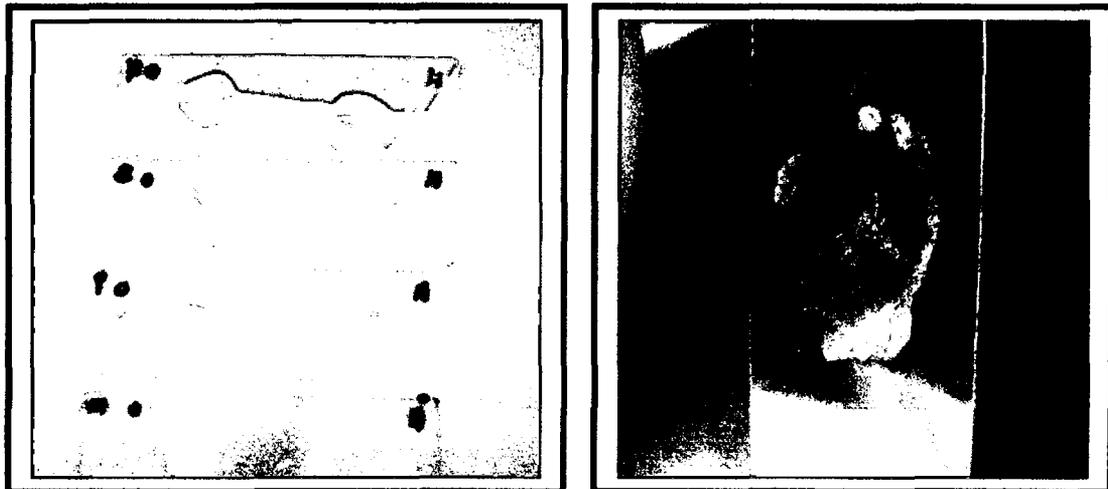
Fuente: Callo J y Farfán K.E.



Se utilizaron los antígenos O (somático) y el H (flagelar).

GRÁFICO N°9: Representación de la prueba de aglutinación.

Fuente: (67)



Cada muestra se mezcló con los dos antígenos en una placa rotulada, se dejó reaccionar y se observó la aglutinación en todas las muestras pero la muestra N°4 dio una aglutinación más vistosa como se aprecia en la figura N°36 de lado derecho.

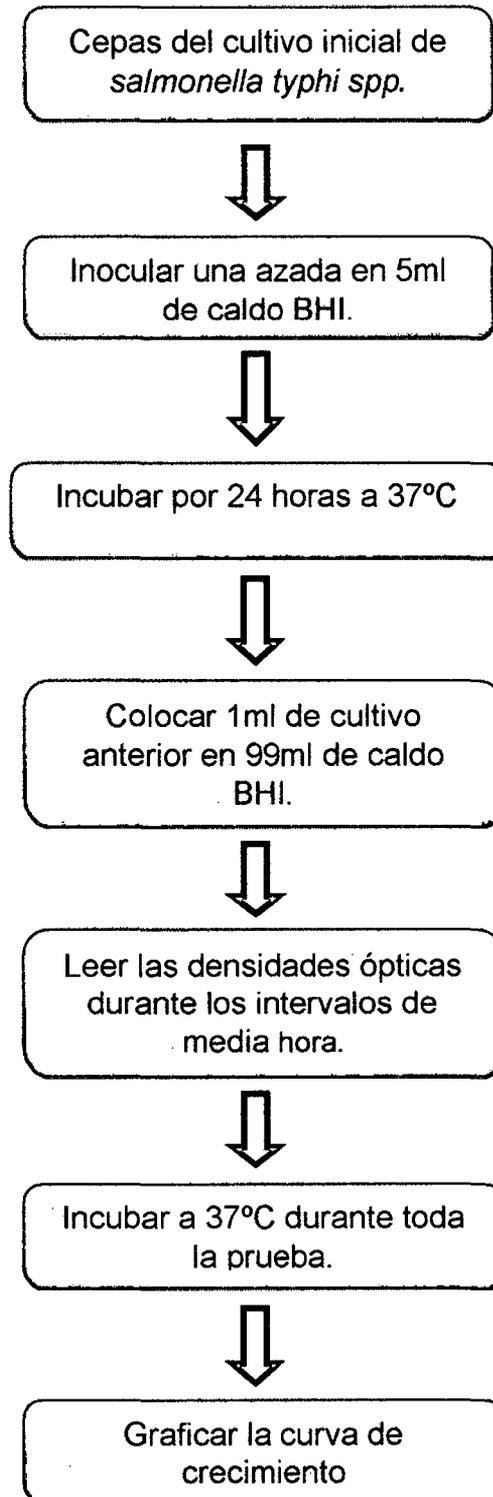
FIGURA N°36: Fotografía de la prueba de aglutinación para la tipificación de *Salmonella typhi* spp.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Una vez confirmada la identificación de las cepas de *Salmonella typhi* se eligió la muestra N°4 para cultivarla en un medio selectivo (Wilson Blair (ANEXO N° 11) y trabajar la parte antibacteriana con muestras de bacterias fresca.

3.8.2.2. Estandarización de la curva de crecimiento de *salmonella typhi* spp.

FUJOGRAMA N°7: estandarización de la curva de crecimiento de *Salmonella typhi* spp.



Fuente: (68).

Procedimiento:

Del cultivo inicial de *salmonella typhi spp*, se propagó con ayuda de una asa de siembra un inculo en 5 ml. de caldo de cultivo BHI por 24 horas a 37°C, transcurrido ese tiempo se tomó 1 ml de este caldo con bacterias y se traspasó a un matraz con 99 ml de caldo BHI puro incubándose a 37°C por 24 horas.

La evaluación del crecimiento bacteriano se determinó haciendo lectura de la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 670 nm en el espectrofotómetro con intervalos de media hora. (68).

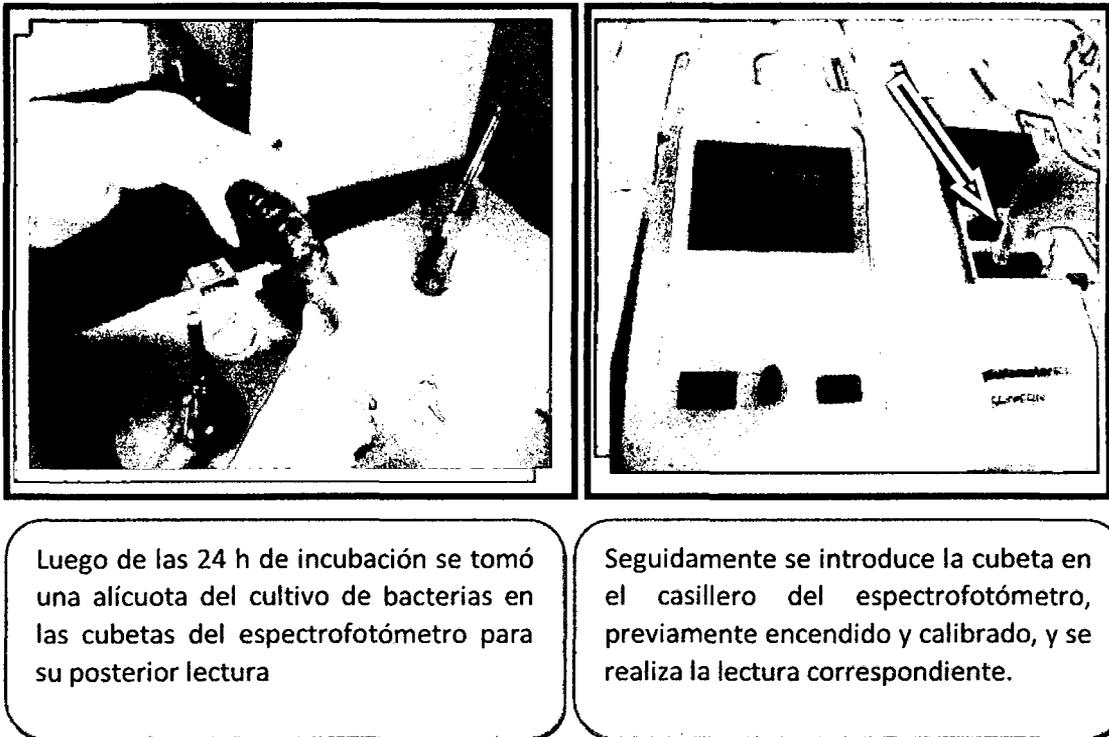
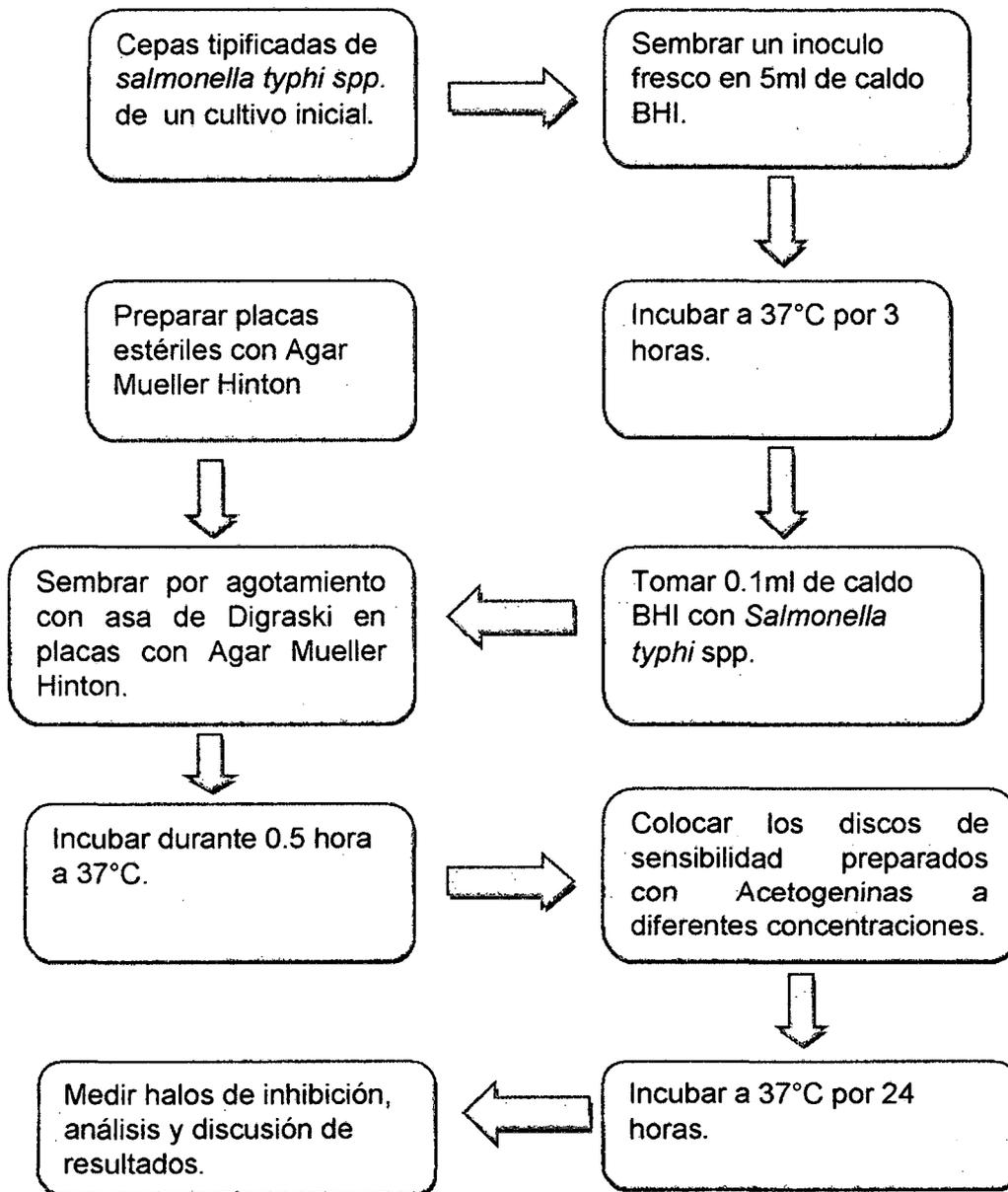


FIGURA N°37: Fotografías de la estandarización de la curva de crecimiento.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

3.9.2.3 Estandarización de la concentración antibacteriana del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba) por el método de difusión disco en placa.

FUJOGRAMA N°8: Proceso del ensayo de la actividad antibacteriana in vitro.



Fuente: Elaboración Propia.

Prueba piloto.

La prueba piloto se realizó para determinar las concentraciones máxima y mínima del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. obtenida a partir del extracto etanólico, para la bacteria *Salmonella typhi* spp. Con la finalidad de realizar una estandarización de las concentraciones antibacterianas. Para este ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de Acetogeninas; los cuales se presentan a continuación.

TABLA N°11: Concentraciones usadas en las pruebas piloto

Concentraciones para la actividad antibacteriana in vitro de Acetogeninas en (mg/disco)									
5	10	15	20	30	40	50	60	70	80

Concentraciones para la actividad antibacteriana in vitro de Acetogeninas en (mg/disco)									
90	100	150	200	250	300	350	400	450	500

Fuente: datos experimentales.

Donde:

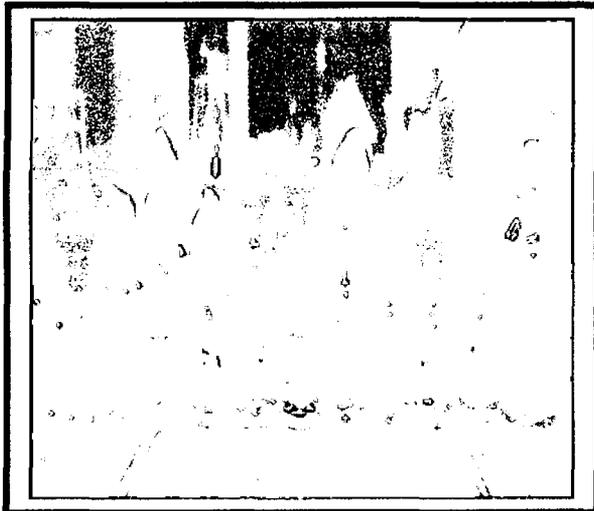
mg: miligramos

✓ Preparación de los discos de sensibilidad.

Para la preparación de discos de sensibilidad, se procedió a disolver diferentes concentraciones del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba), obtenida a partir de extracto etanólico en 100 µl. de dimetilsufoxido, con la ayuda de una jeringa de tuberculina, se aplicó las diferentes disoluciones en discos de papel filtro blanco de 0.6mm. de espesor y 6mm. de diámetro, se llevó a secar a 40°C en una estufa y se almacenaron en recipientes estériles hasta el momento de su análisis.



La flecha señala las diferentes soluciones de Acetogeninas preparadas a diferentes concentraciones que van desde 5mg hasta 500mg. Estas concentraciones fueron inyectadas cuidadosamente a cada disco de sensibilidad con la ayuda de una jeringa de tuberculina. Los discos una vez inyectados de las concentraciones fueron secados en una estufa a 40°C.



La figura N°38 muestra los discos de sensibilidad preparados con diferentes concentraciones de Acetogeninas secos y rotulados y almacenados en frascos de vidrio estériles. Los discos secos preparados con las diferentes concentraciones de Acetogeninas fueron almacenados bajo sombra y a temperatura ambiente hasta el momento del análisis del efecto antibacteriano.

FIGURA N°38: Fotografías de la obtención de discos de sensibilidad a diferentes concentraciones de Acetogeninas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

✓ **Procedimiento de la prueba piloto.**

El efecto antibacteriano se demostró utilizando una modificación del método de difusión en placas de agar; el procedimiento originalmente descrito por Bauer y colaboradores. (35)

Primero se inoculó en tubos de caldo BHI una colonia fresca de la bacteria *Salmonella typhi* spp. y se incubaron a 37°C. durante 3 horas según el

crecimiento de la bacteria hasta lograr su fase exponencial y dar turbidez en el caldo BHI.

Luego esta suspensión estandarizada se sembró por inundación en la superficie de placas que contiene agar Mueller Hinton (ANEXO N° 11) con asas de Digraski estériles y atóxicos, el cultivo se dejó secar durante 30 minutos en la incubadora a 37°C, posteriormente con una pinza estéril se colocaron los discos de sensibilidad impregnados con la solución de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, se realizó una ligera presión en los discos para garantizar el contacto con el agar y se llevó a incubar a 37°C durante 24 horas.



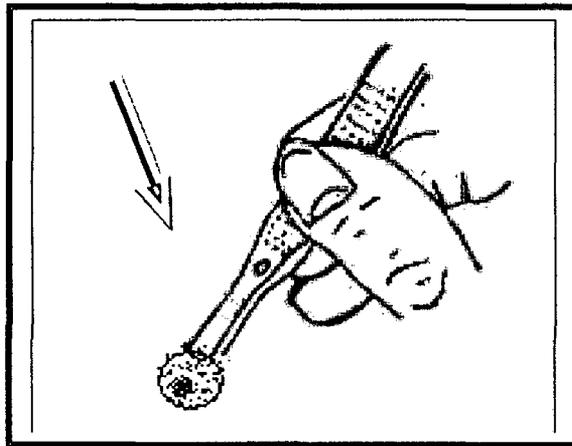
Se sembró un inculo de bacterias del caldo BHI (0.1ml). en placas con agar Mueller Hinton (anexo N° 11) con la ayuda de una asa de Digraski.



Las placas se llevaron a incubar a 37°C por un periodo de tiempo de 30 min.

FIGURA N°39: fotografías de la prueba de sensibilidad bacteriana en la prueba piloto.

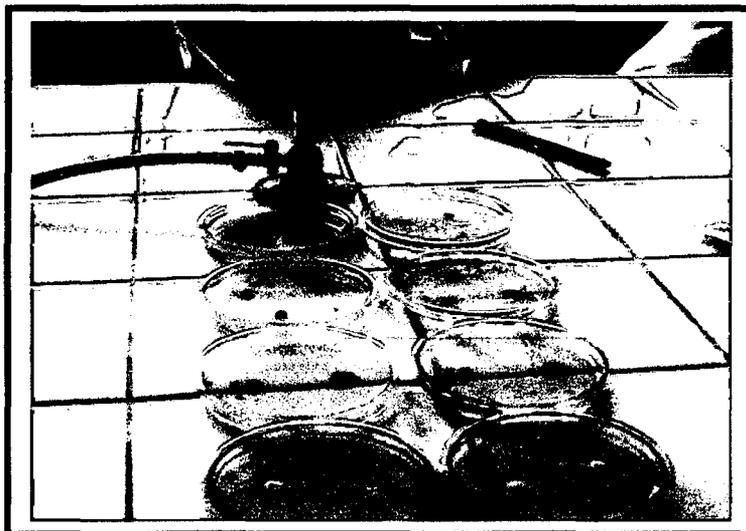
Fuente: Callo J y Farfán K.E.



La adición de discos de sensibilidad a las placas con agar Mueller Hinton (anexo N° 11) se realizó con la ayuda de una pinza estéril.

GRÁFICO N°10: representación grafica de la adición de discos en el agar Mueller Hinton.

Fuente: (67)



Placas impregnadas con discos de sensibilidad de las diferentes concentraciones de Acetogeninas. Se llevarón a incubar a 37°C durante 24h.

FIGURA N°40: Fotografía: placa de agar Mueller Hinton con discos de sensibilidad de diferentes concentraciones de Acetogeninas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Pasada las 24 horas se observó qué concentración de Acetogeninas produjo inhibición del crecimiento bacteriano, para que a partir de ella se estandaricen las concentraciones.

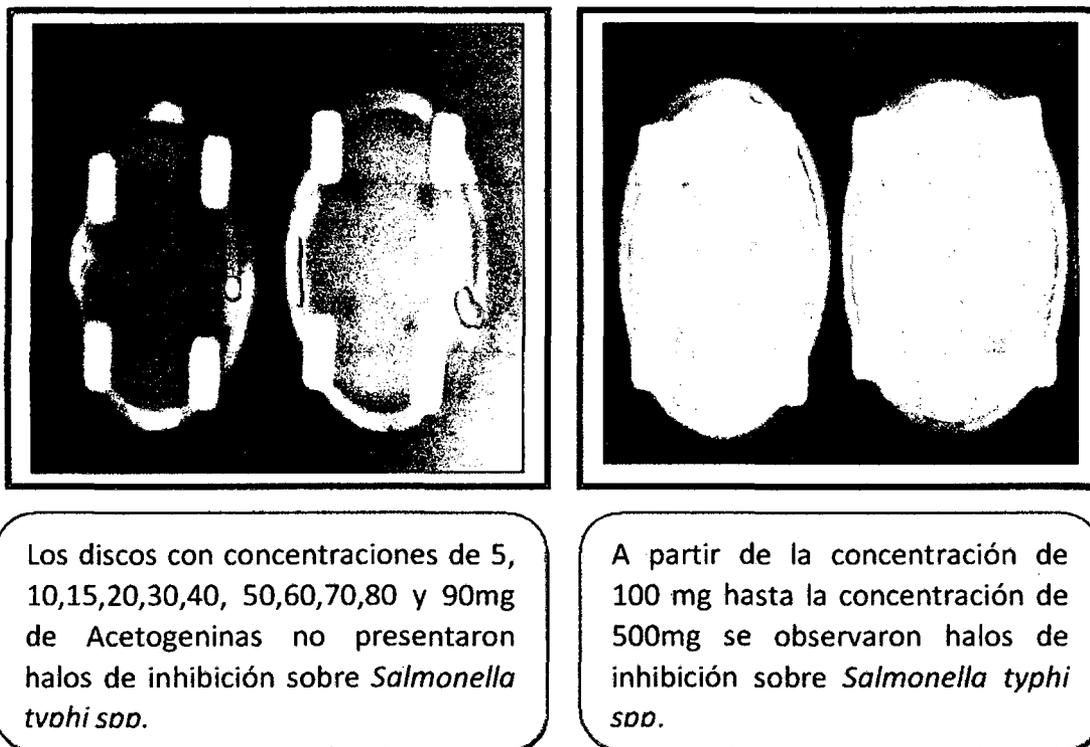


FIGURA N°41: Fotografía de los halos de inhibición obtenidas en la prueba piloto.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Estandarización de la concentración antibacteriana.

Las concentraciones se determinaron hallando el factor de incremento de la bacteria en estudio, teniendo en cuenta las concentraciones máxima y mínima que serán obtenidas de la prueba piloto, así:

$$F = \sqrt[r]{I}$$

Donde:

F= factor de incremento

$$I = \frac{\text{concentración máxima}}{\text{Concentración mínima}}$$

r = N-1 numero de dosis en la serie logarítmica.

N = n° de concentraciones con las que se trabajo

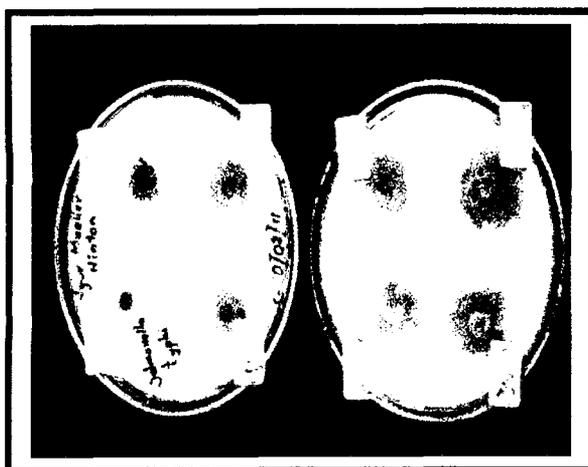
Para determinar las concentraciones con las que se trabajó se procedió de la siguiente manera:

TABLA N°12: Determinación de las concentraciones estandarizadas para el ensayo de la actividad antibacteriana de Acetogeninas aisladas de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

OPERACION	Nº DE CONCENTRACION
Concentración mínima	Concentración 1
Concentración 1 x F	Concentración 2
Concentración 2 x F	Concentración 3
concentración 3 x F	Concentración 4
concentración 4 x F	Concentración 5
concentración 5 x F	Concentración 6
concentración 6 x F	Concentración 7
concentración máxima	Concentración 8

Fuente: datos experimentales

Una vez calculadas las concentraciones estandarizadas se elaboraron discos con estas concentraciones de Acetogeninas. Para la determinación del efecto antibacteriano con estas concentraciones se realizaron los mismos procedimientos como en la prueba piloto.



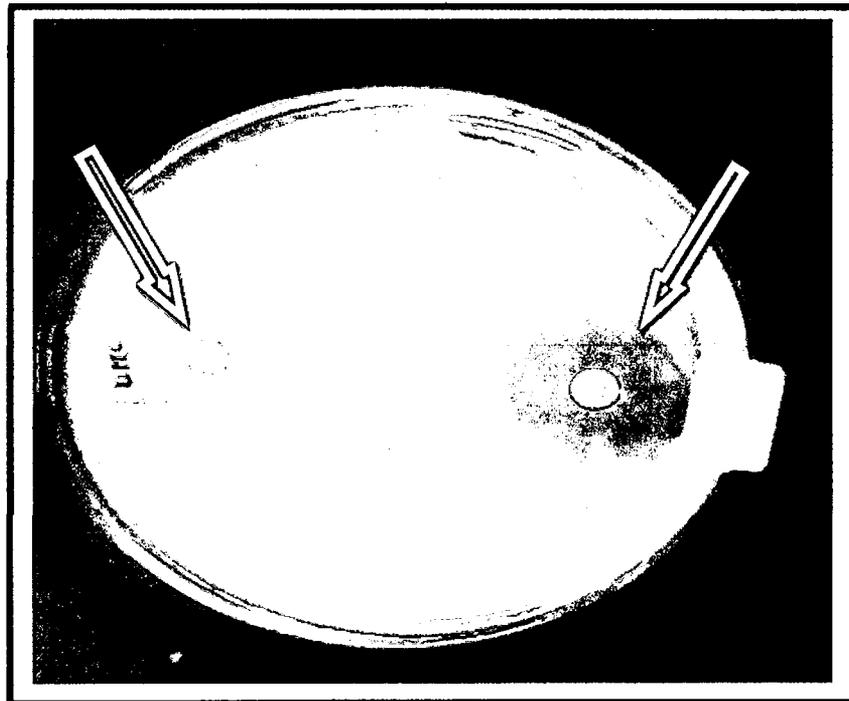
Los halos se midieron con ayuda de una regla milimetrada, se considero todo el diámetro del halo de inhibición, la fotografía muestra los halos de inhibición generados por Acetogeninas sobre *Salmonella typhi* spp. en placas con agar Mueller Hinton (anexo N°11)

FIGURA N°42: Fotografía de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones de Acetogeninas sobre *Salmonella typhi* spp.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

Ensayo con el fármaco patrón.

Para el ensayo se utilizó un agente antibacteriano de acción bactericida y de efecto rápido denominado Ciprofloxacino. En este caso se usaron discos de de sensibilidad de Ciprofloxacino 5 μ g.



A lado derecho la flecha nos señala el halo generado por el disco de ciprofloxacino. Al lado izquierdo se aprecia el disco del grupo control negativo correspondiente a dimetilsulfoxido la cual no género halo de inhibición por lo que no afecto el crecimiento bacteriano

FIGURA N°43: Fotografía del halo de inhibición generado por el grupo control positivo (ciprofloxacino 5 μ g) y grupo control negativo (dimetilsulfoxido) sobre *Salmonella typhi* spp.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

CAPITULO IV

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

PRIMERA PARTE

4.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO

4.1.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

Se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA N°13: Determinación del porcentaje de humedad.

NÚMERO DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	PORCENTAJE DE HUMEDAD
1	8.6 g	2.9 g	66.28%
2	8.6 g	2.8 g	67.44 %
3	8.6 g	2.8 g	67.44%
PROMEDIO			67.05%

Fuente: datos experimentales

Dónde:

g= gramos

Análisis y discusión.

El proceso de deshidratación, permite disminuir el agua libre presente en la muestra vegetal, el proceso de secado es muy importante porque interrumpe los procesos de degradación metabólicos catalizados por enzimas y alteración de metabolitos presentes en la muestra vegetal.

El porcentaje de humedad promedio obtenido para las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba), fue de 67.05%. Como se puede observar, presentó un alto porcentaje de humedad, por lo tanto el secado y la conservación de esta especie vegetal es dificultosa e importante, y la hace propensa a que se produzcan reacciones de hidrólisis, oxidación o deshidrogenación y condensación o polimerización. De esta manera las semillas de la especie

vegetal corren el riesgo de sufrir diversas contaminaciones por bacterias y hongos en especial por estas últimas ya que proliferan en lugares donde hay humedad.

Gracias a este dato se pudo tomar las medidas adecuadas y necesarias para realizar el secado de las semillas de la especie vegetal, y con este procedimiento se pudo obtener una muestra adecuada para el estudio.

4.1.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

El porcentaje de extracción por maceración y extracción por decantación, hasta la obtención de Acetogeninas mostro los siguientes resultados.

TABLA N°14: Porcentaje de extracción de Acetogeninas de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

MASA DE SEMILLAS (g)	MASA (g) FRACCIÓN 1 (EtOH)	% DE RENDIMIENTO FRACCIÓN 1	MASA (g) FRACCIÓN 2 (CH₃Cl)	% DE RENDIMIENTO FRACCIÓN 2
1116	46.56	4.1720	22.0412	47.34

Fuente: Datos experimentales.

Donde:

- g = gramos
- EtOH: etanol
- CH₃Cl: cloroformo.

Análisis y discusión

El porcentaje de extracción de Acetogeninas a partir de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) mediante el método de extracción por solventes de diferente polaridad es de 47.34%.

Gracias a este resultado se pudo determinar la cantidad de material vegetal adecuada, para obtener el concentrado de Acetogeninas necesario para la realización de la presente investigación, además nos facilita información que permite determinar si la especie vegetal en estudio es buena materia prima o lo

contrario. Por el porcentaje de extracción determinado que es de 47.34% podemos concluir que las semillas de *Annona muricata* L. presentan un buen porcentaje de extracción por lo que también se puede concluir que son buena materia prima.

4.1.3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS.

El concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba), fue sometido a las siguientes pruebas:

4.1.3.1. Características organolépticas:

Las características del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba), son las siguientes:

TABLA N°15: Resultados de las características organolépticas del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

ASPECTO	: Oleoso
COLOR	: Café acaramelado
OLOR	: Ligeramente aromático
SABOR	: Ligeramente dulce

Fuente: datos experimentales.

4.1.3.2. Pruebas de solubilidad de las Acetogeninas de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Para las pruebas de solubilidad de las Acetogeninas se utilizó diferentes solventes de diferente polaridad, obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N°16: Resultados de la pruebas de solubilidad de las Acetogeninas de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

SOLVENTE	GRADO DE SOLUBILIDAD
Agua (H ₂ O)	++
Acetonitrilo	+++
Metanol	+++
Etanol 70%	+++
Etanol 96%	+++
Acetona	+++
Acido acético	+++
Acetato de etilo	+++
Cloroformo	+++
Éter dietílico	++
Hexano	-

Fuente: Datos experimentales

Donde:

- +++ : totalmente soluble
- ++ : parcialmente soluble
- + : poco soluble
- - : insoluble.

Análisis y discusión.

La tabla N°16 muestra los resultados de la prueba de solubilidad de las Acetogeninas presentes en las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) frente a diferentes solventes de polaridad decreciente. Se observa que las Acetogeninas son parcialmente soluble en Agua y en éter dietílico, completamente solubles en metanol, etanol 70%, etanol 96%, acetona, ácido acético, acetato de etilo y cloroformo. Mientras que en hexano es completamente insoluble. Según estos resultados las Acetogeninas presentes en las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba), tienen una naturaleza medianamente polar.

Se realizó una prueba de solubilidad adicional con dimetilsulfoxido, ya que en uno de los ensayos biológicos fue usado como solvente para el concentrado de Acetogeninas dando como resultado completamente soluble.

4.1.3.3. Análisis cromatográfico:

Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizó como un análisis preliminar con la finalidad de identificar, caracterizar o determinar semicuantitativamente los componentes Acetogénicos presentes en el concentrado de Acetogeninas obtenido a partir de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Se llevó a cabo la caracterización química de las Acetogeninas en placas cromatográficas de Silicagel obtenidas a partir de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba), utilizando un revelador universal y específico para Acetogeninas como es el reactivo de Kedde en aerosol.

Reactivo Kedde: Conformado por:

Fracción A: solución al 2% (p/v) de ácido 3,5-dinitrobenzoico en etanol.

Fracción B: hidróxido de potasio (KOH) al 6% en etanol. Obteniéndose el siguiente resultado:

Análisis y discusión:

En el anexo N° 15 (fotografía N° 2) se puede apreciar una coloración de rosa sobre la placa de Silicagel usada en el análisis cromatográfico en capa delgada

la cual nos indica resultado positivo para Acetogeninas y se delata la presencia en la muestra de una molécula con un resto γ -lactónico. Este análisis preliminar nos lleva a deducir cualitativamente que la muestra en estudio *Annona muricata* L. (Masasamba), si presenta Acetogeninas la cual es de nuestro interés para desarrollar los objetivos de la presente investigación. En este análisis no fue posible identificar las Acetogeninas por sus R_f , pues la aparición de manchas continuas muestra la alta complejidad de estas sustancias y la posible existencia de Acetogeninas isoméricas de diversas polaridades.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Para este análisis no se utilizaron estándares la comparación se realizó por referencias bibliográficas de estudios realizados por organismos internacionales.

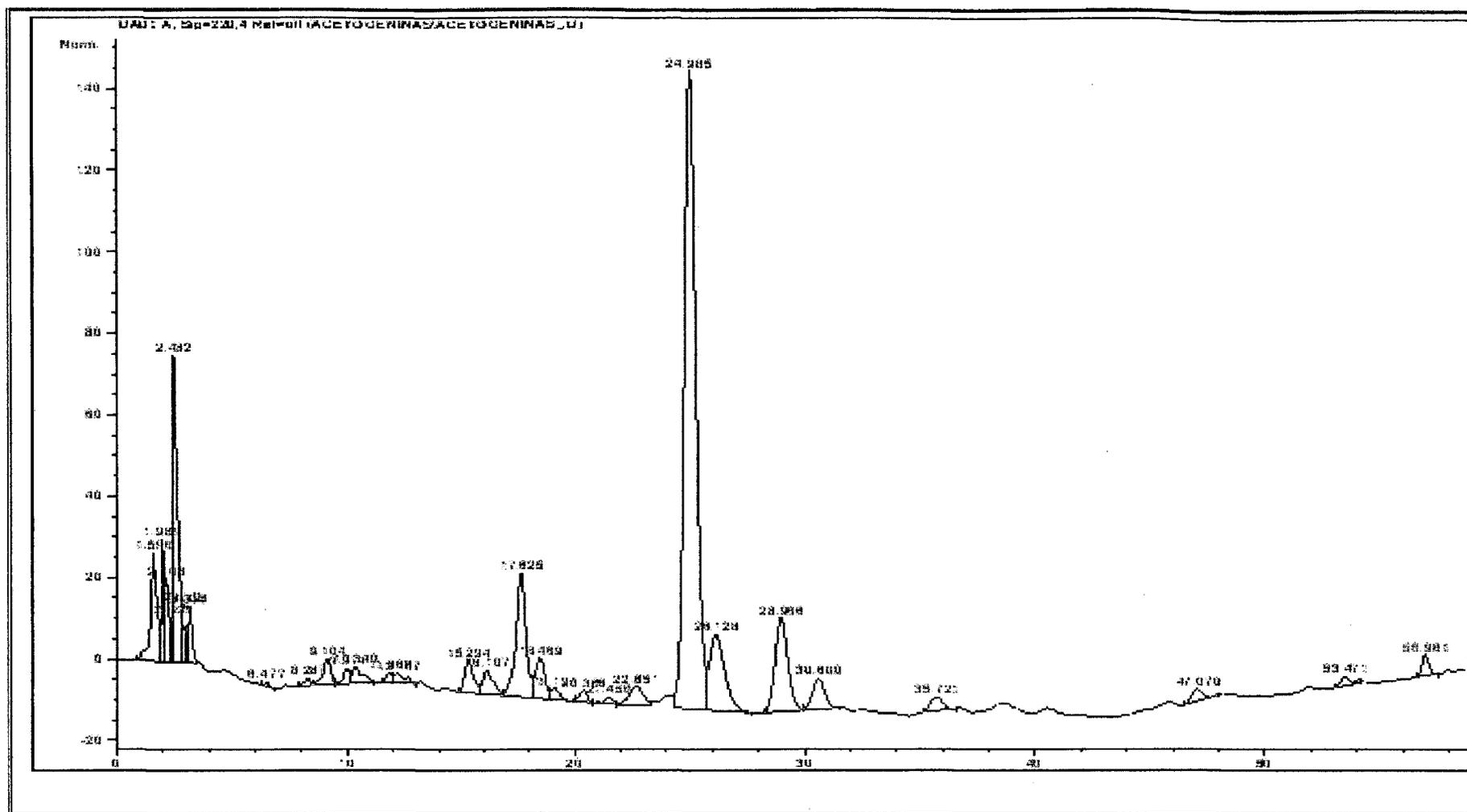


FIGURA N°44: Cromatograma del concentrado de Acetogeninas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

En la figura N°44, se muestra el cromatograma realizado para las Acetogeninas obtenidas de extractos etanólicos a partir de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) se puede observar la presencia de 32 compuestos, de los cuales posiblemente solo 8 corresponden a Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba) teniendo en cuenta el rango de los espectros UV en el cual se absorben Acetogeninas de *Annonaceae* al revisar estudios ya realizados basados en los espectros UV de estas sustancias. Las señales que se detectan en longitudes de onda entre 254nm y 280nm, corresponden a compuestos como: alcaloides bencilisoquinolínicos 225-280nm, flavonoides entre 240nm a 285nm, fenoles a 270nm entre otros; y por eso no se tendrán en cuenta para realizar la cuantificación. Tomándose en cuenta los compuestos que presentan longitudes de onda entre 200nm+/- 15nm según bibliografía. (53)(56)

TABLA N°17: Resultados del cromatograma del concentrado de Acetogeninas.

PICO	TIEMPO DE RETENCION (min)	(λ) MAXIMO	% AREA
11	9.104	201	1.2107
18	17.625	205	7.2367
19	18.469	202	2.2883
24	24.985	210	43.1206
26	28.966	211	6.9241
27	30.600	210	2.2712
28	35.721	200	0.9546
30	53.471	203	0.5279

Fuente: datos experimentales.

Análisis y discusión.

En la tabla N°17 se muestran valores de los criterios que se toman en cuenta en el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Este ensayo se fundamentó en el tiempo de retención de algunos componentes mediante un detector DAD; luego mediante estándares conocidos se determinó la composición cuali-cuanti centesimal de ocho posibles Acetogeninas.

El cromatograma del análisis por HPLC demostró la presencia de 32 compuestos, los 32 compuestos mostraron picos que fueron analizados uno a uno para determinar su UV máximo, es decir el rango del espectro UV en el que son absorbidos y tiempos de retención. Posterior al análisis realizado de todos los picos se llegó a la conclusión de que solo ocho corresponden posiblemente a Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba) teniendo en cuenta el rango de los espectros UV en el cual se absorben las Acetogeninas de *Annonaceae*. De esto decimos que el concentrado de Acetogeninas obtenidas a partir de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) se encuentran posiblemente ocho Acetogeninas, las cuales por sus valores UV máximos y tiempos de retención podrían ser las que a continuación se muestran en la tabla:

TABLA N°18: Resultados del análisis del cromatograma visualizando posibles Acetogeninas.

PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	λ. MAX.	POSIBLE ACETOGENINA	% AREA
11	9.104	201	12,15, cis-squamostatin	1.2107
18	17.625	205	Squamostatin A	7.2367
19	18.469	202	Bullatacina	2.2883
24	24.985	210	Squamostatin D	43.1206
26	28.966	211	Squamocina	6.9241
27	30.600	210	Iso-desacetiluaricina	2.2712
28	35.721	200	Asimicina.	0.9546
30	53.471	203	Desacetiluaricina.	0.5279

Fuente: (63),(69),(70),(71),(72),(73),(74),(75),(76),(77),(78).

El análisis cualitativo de los principales componentes y porcentajes del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba) se muestra en la tabla N° 18, en el que ocho componentes fueron estudiados e identificados por comparación de espectros con los datos de biblioteca (International Journal of Biomedical Science) y por la combinación de los datos de espectros de masas y los índices de retención.

En el estudio comparativo realizado se llegó a determinar que posiblemente Squamostatin D es el componente principal del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (43.1206%); Squamostatin A (7.2367%); Squamocina (6.9241%); Bullatacina (2.2883%) , Iso-desacetilivaricina (2.2712%), Asimicina (0.9546%) y Desacetilivaricina (0.5279%) en menor proporción, los que representan el 64.5341% del total del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. y el 35.4659% restante representa a las sustancias no identificadas por la base de datos.

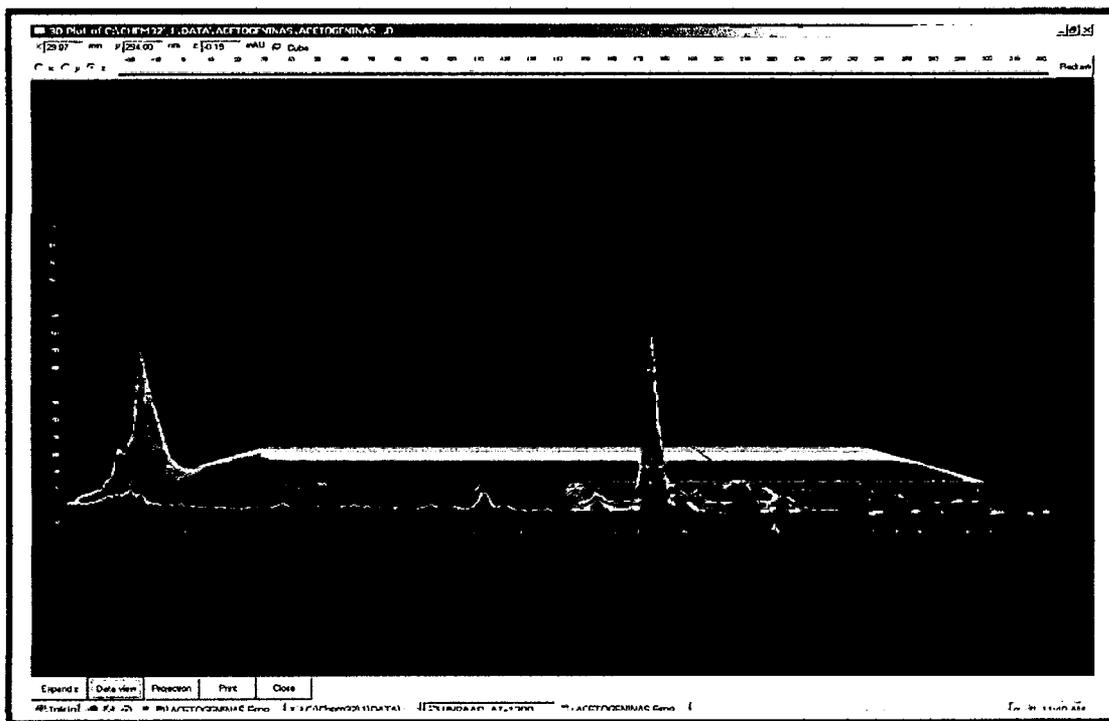
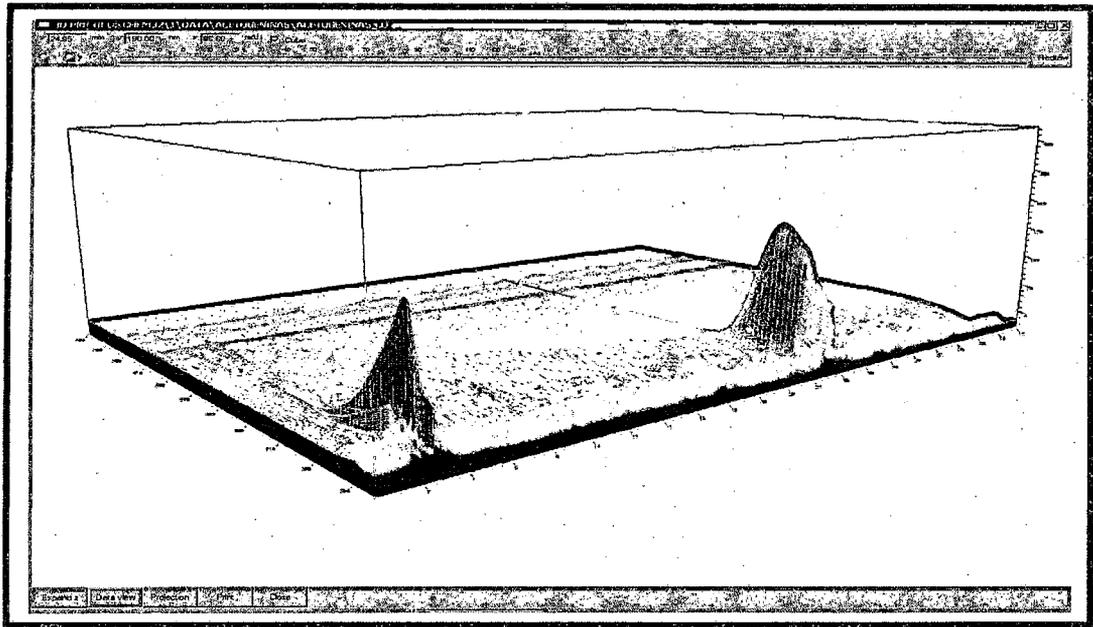


FIGURA N°45: Espectros UV en 3D del concentrado de Acetogeninas (vista frontal)

Fuente: Datos experimentales.



**FIGURA N°46: Espectros UV en 3D del concentrado de Acetogeninas
(vista desde otro ángulo).**

Fuente: Datos experimentales.

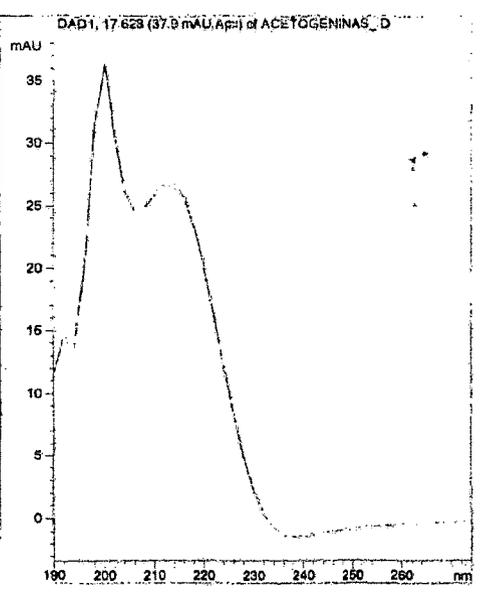
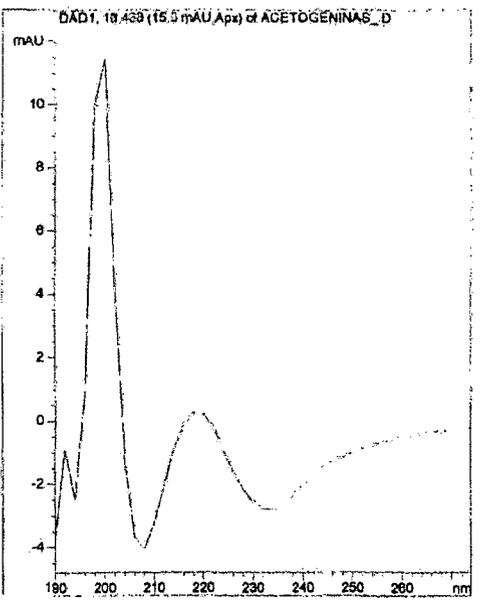
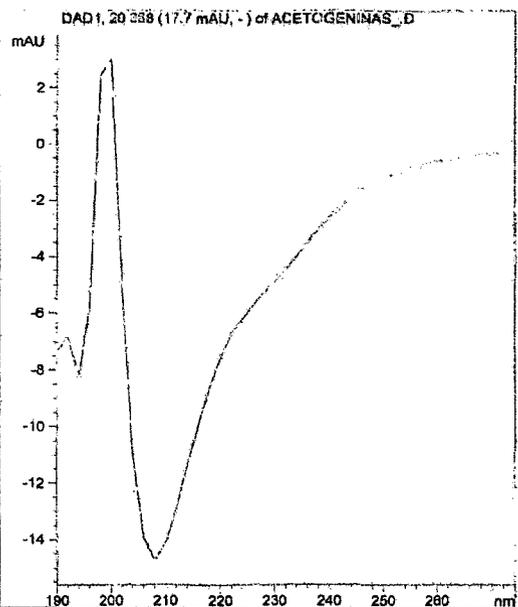
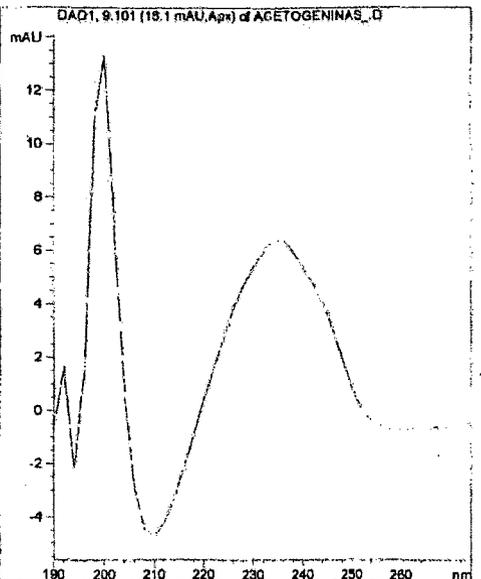
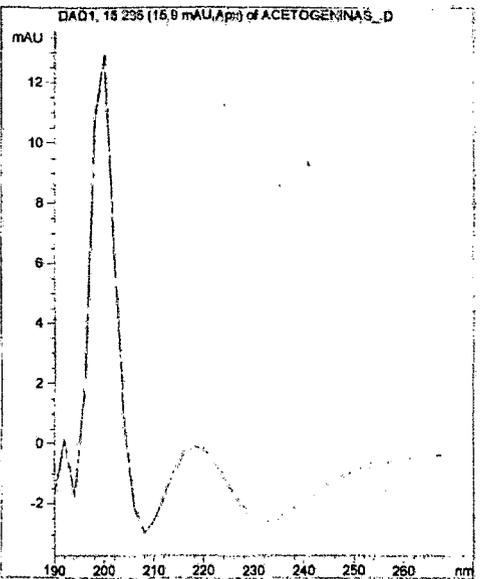
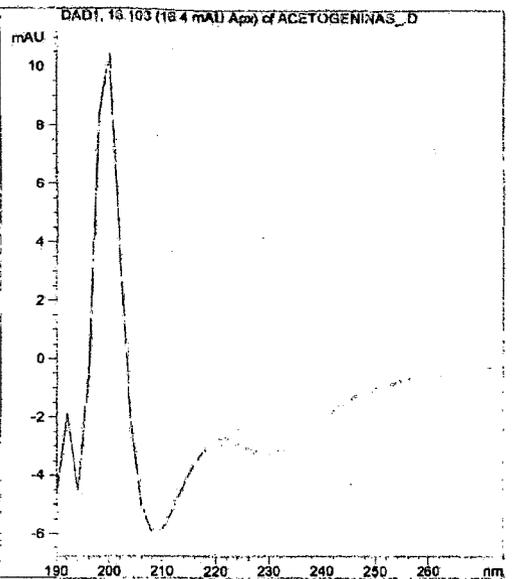


FIGURA N°47: Espectros UV de los picos más representativos obtenidos en el cromatograma del análisis de acetogeninas de *Annona muricata* L. (MASASAMBA)

Fuente: datos experimentales

Sigue.....

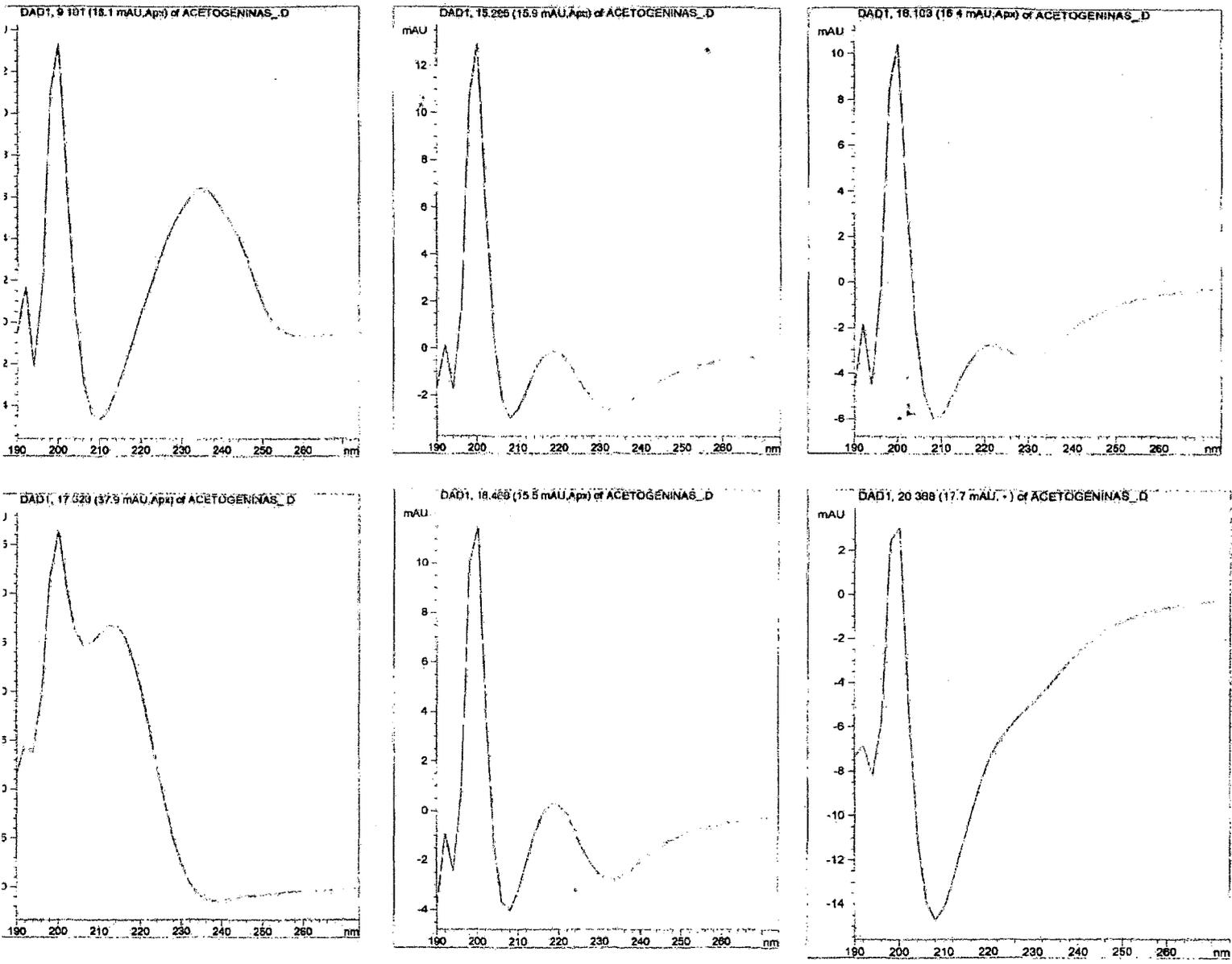


FIGURA N°47: Espectros UV de los picos más representativos obtenidos en el cromatograma del análisis de acetogeninas de *Annona muricata* L. (MASASAMBA)

Fuente: datos experimentales.

Sigue.....

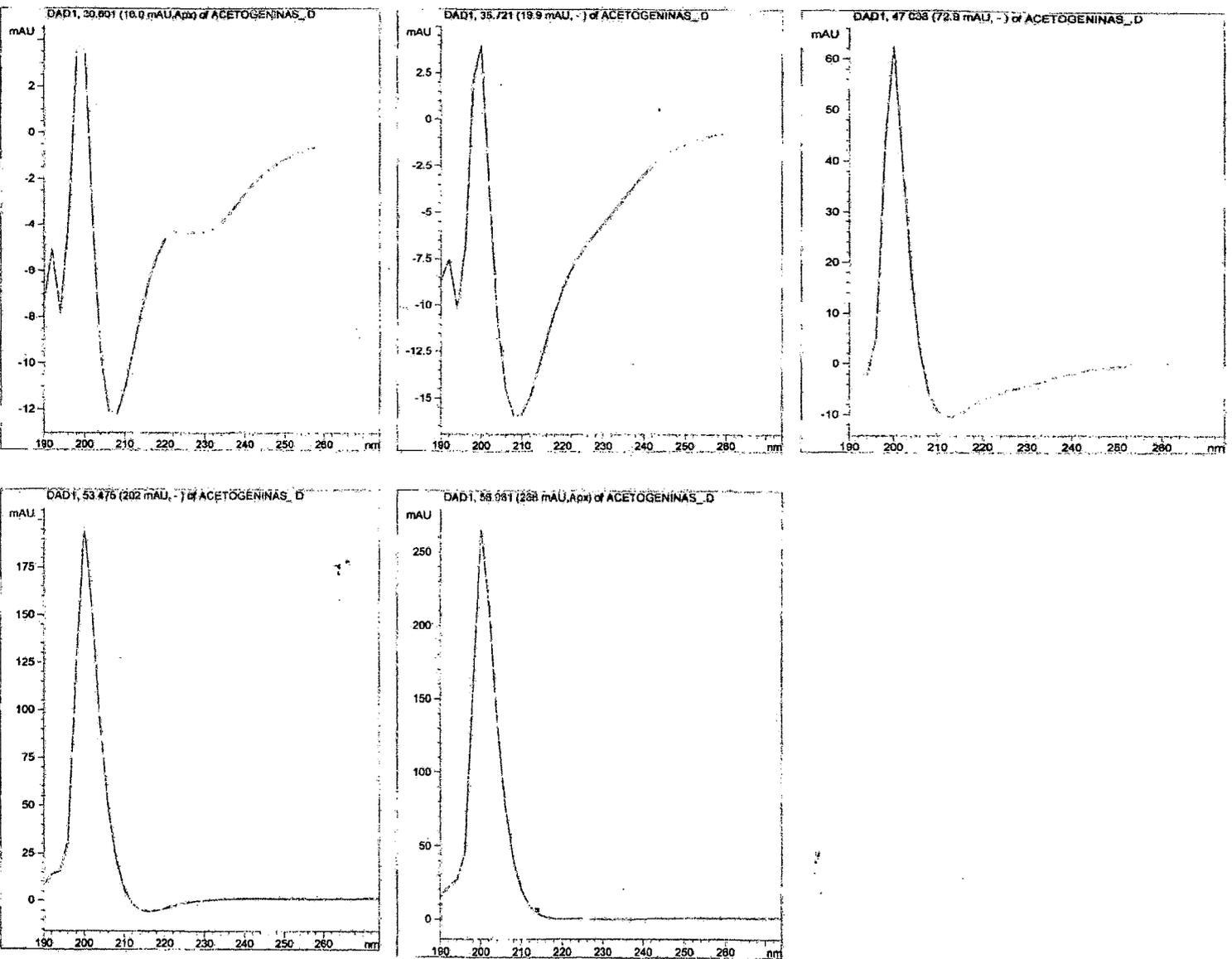


FIGURA N°47: Espectros UV de los picos más representativos obtenidos en el cromatograma del análisis de acetogeninas de *Annona muricata* L. (MASASAMBA)

Fuente: datos experimentales

SEGUNDA PARTE

4.2 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA DE LAS ACETOGENINAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba) FRENTE A LARVAS DE *Aedes aegypti*.

La administración de las diferentes concentraciones de Acetogeninas asignadas a los diferentes grupos conformados (cada grupo conformado por 10 larvas de *Aedes aegypti*) provocó la muerte de todos los individuos de experimentación a diferentes tiempos proporcionalmente a la concentración de la solución de Acetogeninas sometidas.

4.2.1 OBSERVACIONES EN EL ANÁLISIS.

Se hicieron dos observaciones en la especie insectil como criterios de análisis del efecto de las Acetogeninas sobre estas; las cuales fueron:

1. Coloración adquirida por las larvas de *Aedes aegypti* por contacto con la solución de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba).
2. Movimiento de la especie insectil de cada grupo (grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV, grupo V) en cada hora de observación. Este criterio es considerado el más importante ya que mediante ella se logró determinar la mortalidad de la especie insectil en estudio. El criterio consiste en que las larvas de *Aedes aegypti* se consideran muertas cuando no reaccionan al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical lo cual se ve reflejada en su movimiento como respuesta al estímulo recibido.

Observación N° 1:

El criterio número 1 fue observado con la ayuda de una lupa para todos los grupos de experimentación.



FIGURA N°48: Fotografía: diferencias en coloración de larvas de *Aedes aegypti* adquirida por contacto con solución de Acetogeninas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.

La figura N° 53 muestra la observación número 1 como un criterio de análisis de la presente investigación, la cual se observó progresivamente en cada grupo de larvas que fueron sometidos a diferentes concentraciones de solución de Acetogeninas.

Observación N° 2:

La observación número 2 fue realizada a cada hora con la ayuda de un puntero como en todos los grupos de experimentación. Esta observación fue considerada el de mayor interés puesto que mediante este criterio se pudo determinar la mortalidad de la especie insectil en estudio. Los resultados se muestran a continuación en la siguiente tabla:

TABLA N°19: Movimiento de larvas en cada grupo experimental por cada hora de observación.

MOVIMIENTO DE LARVAS																		
T	Grupo I			Grupo II			Grupo III			Grupo IV			Grupo V			Grupo VI		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	*	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	+	+	+
2	*	*	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	+	+	+
3	*	*	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	+	+	+
4	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	+	+	+
5	*	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	*	*	*	+	+	+
6	*	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	*	*	*	+	+	+
7	*	**	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+	**	**	**	+	+	+
8	**	**	**	*	*	*	*	*	+	+	+	+	**	**	**	+	+	+
9	**	**	**	*	*	*	*	*	*	+	+	+	**	**	**	+	+	+
10	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	**	**	**	+	+	+
11	**	**	**	*	**	*	*	*	*	*	*	*	—	—	—	+	+	+
12	**	**	**	*	**	**	*	*	*	*	*	*				+	+	+
13	**	**	**	**	**	**	*	*	*	*	*	*				+	+	+
14	—	—	—	**	**	**	*	*	*	*	*	*				+	+	+
15				**	**	**	*	*	*	*	*	*				+	+	+
16				**	**	**	*	*	*	*	*	*				+	+	+
17				—	—	**	**	*	**	*	*	*				+	+	+
18						—	**	**	**	*	*	*				+	+	+
19							**	**	**	*	*	*				+	+	+
20							**	**	**	*	*	*				+	+	+

Sigue....

Continuación de tabla N°19:

MOVIMIENTO DE LARVAS																		
T	Grupo I			Grupo II			Grupo III			Grupo IV			Grupo V			Grupo VI		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
21							**	**	**	*	*	*				+	+	+
22							**	**	**	*	*	*				+	+	+
23							**	**	**	*	*	*				+	+	+
24							**	**	**	*	*	*				+	+	+
25							**	**	**	*	*	*				+	+	+
26							**	**	**	*	*	*				+	+	+
27							**	**	**	*	*	*				+	+	+
28							**	**	**	*	*	*				+	+	+
29							**	**	**	*	*	*				+	+	+
30							**	**	**	*	*	*				+	+	+
31							**	**	**	*	*	*				+	+	+
32							**	**	**	**	*	**				+	+	+
33							**	**	**	**	**	**				+	+	+
34							**	**	**	**	**	**				+	+	+
35							**	**	**	**	**	**				+	+	+
36							**	—	**	**	**	**				+	+	+
37							—		—	**	**	**				+	+	+
38										**	**	**				+	+	+
39										**	**	**				+	+	+
40										**	**	**				+	+	+
41										**	**	**				+	+	+
42										**	**	—				+	+	+
43										—	—					+	+	+

Fuente: Datos experimentales.

Donde:

+: Movimiento normal.

*: Movimiento lento.

** : Movimiento muy lento.

— : No existe movimiento (larvas muertas).

T: Tiempo en horas,

A, B, C: Subgrupos de cada grupo experimental (cada grupo por triplicado).

4.2.2 RESULTADOS GENERALES DEL EFECTO INSECTICIDA

TABLA N°20: Resultados de la actividad insecticida en los diferentes grupos de experimentación.

NUMERO DE LARVAS MUERTAS POR CADA HORA DE EXPOSICIÓN A ACETOGENINAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES.																		
T	Grupo I			Grupo II			Grupo III			Grupo IV			Grupo V			Grupo VI		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1			1															
2	2		3										3					
3		2			2									3	2			
4		3		1	3								4	4	3			
5	3	5	4												4			
6				2	4								5	5	5			
7	4		5	3		3							6	6	6			
8	7	8				6							7	7	7			
9			7	4	5	7							8	8	8			
10	8	9			7								9	9	9			
11	9		8		8	8							10	10	10			
12			9	5														
13				6														
14	10	10	10	7														1
15				8	9	9												
16				9														
17				10	10			1										
18						10	1	2	1									
19																		
20									2									
21							2	3										
22									3									
23																		

Sigue....

Continuación de la tabla N°20

NÚMERO DE LARVAS MUERTAS POR CADA HORA DE EXPOSICIÓN A ACETOGENINAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES.																		
T	Grupo I			Grupo II			Grupo III			Grupo IV			Grupo V			Grupo VI		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
24							3	4	4	1	1	1						
25											2							
26							4	5	5			2						
27											3							
28								6		2								
29							5					3						
30							6	7	6	3	4							
31									7	4		4						
32							7	8			5							
33									8	5		5						
34							8	9			6							
35									9	6		6						
36							9	10				7						
37							10		10	7	7							
38												8						
39										8	8							
40												9						
41										9	9							
42												10						
43										10	10					a	a	a

Fuente: Datos experimentales

Donde:

T: tiempo en horas

A, B, C: Subgrupos de cada grupo experimental (cada grupo por triplicado).

a: Adultos.

Análisis y discusión.

La tabla N°20 muestra el número de larvas de *Aedes aegypti* muertas en todos los grupos experimentales a un determinado tiempo que en todos los casos

fueron positivos, lo que nos indica que el concentrado de Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. presenta EFECTO INSECTICIDA, a excepción en el grupo VI donde el valor es aproximadamente cero en el cual las larvas llegaron a completar su ciclo de vida hasta llegar a ser adultos puesto que en mencionado grupo no se administró ninguna sustancia y nos sirvió como grupo control negativo la que nos indica que el tratamiento es neutro al ser comparado con el grupo control positivo.

Respecto al efecto insecticida de todos los grupos experimentales en comparación con el insecticida patrón "TEMEFÓS" grupo control positivo se puede decir que el grupo I, en el cual la concentración de Acetogeninas administradas fue de 10.000 ppm, presenta un efecto insecticida parecido al grupo control positivo teniendo en cuenta el número de larvas que murieron en un tiempo muy próximo al del grupo control positivo cuya diferencia en horas es de 3 horas.

El grupo II en el cual la concentración de Acetogeninas administradas fue de 5000 ppm, presenta un efecto insecticida medio con respecto al grupo control positivo teniendo en cuenta el número de larvas que murieron en un tiempo moderadamente diferente con respecto del grupo control positivo la cual se diferencia aproximadamente en 6 horas.

El grupo III en el cual la concentración de Acetogeninas administradas fue de 500 ppm, se puede observar que el efecto insecticida es baja con respecto al grupo control positivo teniendo en cuenta el número de larvas que murieron con respecto del grupo control positivo la cual se diferencia por aproximadamente en aproximadamente 25 horas.

El grupo IV en el cual la concentración de Acetogeninas administradas fue de 50 ppm, se puede observar que el efecto insecticida es mínima con respecto al grupo control positivo teniendo en cuenta el número de larvas que murieron con respecto del grupo control positivo; la cual se diferencia por aproximadamente en 32 horas.

Estos resultados obtenidos del proceso experimental fueron llevados a análisis estadístico.

4.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO INSECTICIDA

TABLA N°21: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua) durante las seis primeras horas de exposición.

HORA DE MEDICIÓN	CONCENTRACIÓN	MEDIA O PROMEDIO	DESVIACIÓN TÍPICA	95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
				LIMITE INF.	LIMITE SUP
DURANTE LAS 6 PRIMERAS HORAS	10000 ppm	4	1	3,064	4,936
	5000 ppm	2	2	1,064	2,936
	500 ppm	0	0	0	0
	50 ppm	0	0	0	0
	TEMEFOS(1mg/10ml)	5	0	4,064	5,936
	AGUA	0	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Donde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión:

La tabla N° 21 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante las seis primeras horas del proceso de experimentación a distintas concentraciones de Acetogeninas así como el grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (Agua).

La media para la concentración de 10.000ppm (grupo I) es de 4, representa el número de larvas muertas en promedio por cada subgrupo que se formaron dentro de cada grupo experimental (cada grupo experimental se ensayó por triplicado).

Para la concentración de 5000ppm la media es de 2 lo cual significa que dentro de las seis primeras horas el promedio de mortalidad en los subgrupos experimentales fue de 2 larvas lo cual es menor en comparación del grupo I. La media para las concentraciones de 500ppm, 50ppm y agua es de cero lo cual

significa que no hubo muerte de larvas hasta las seis horas del proceso de experimentación.

Se aprecia que para el grupo control positivo (grupo V) la media es de 5 durante las seis primeras horas lo cual refleja que el Temefós produjo la mayor cantidad de muertes en promedio en todos los subgrupos del grupo experimental durante este intervalo de tiempo.

La desviación típica de la cantidad de larvas muertas en cada grupo experimental es una medida de dispersión de los datos. En los grupos I y II (10.000ppm y 5000ppm respectivamente) en las que hubo mortalidad la desviación típica es de 1 y 2 respectivamente de la cual se interpreta no existió mucha variabilidad de los datos con respecto a la mortalidad en cada subgrupo experimental. En los demás grupo experimentales no hubo muertes de ahí el valor de cero sin embargo en el grupo control positivo también es de cero esto se explica debido a que en todos los subgrupos el número de larvas muertas fue constante.

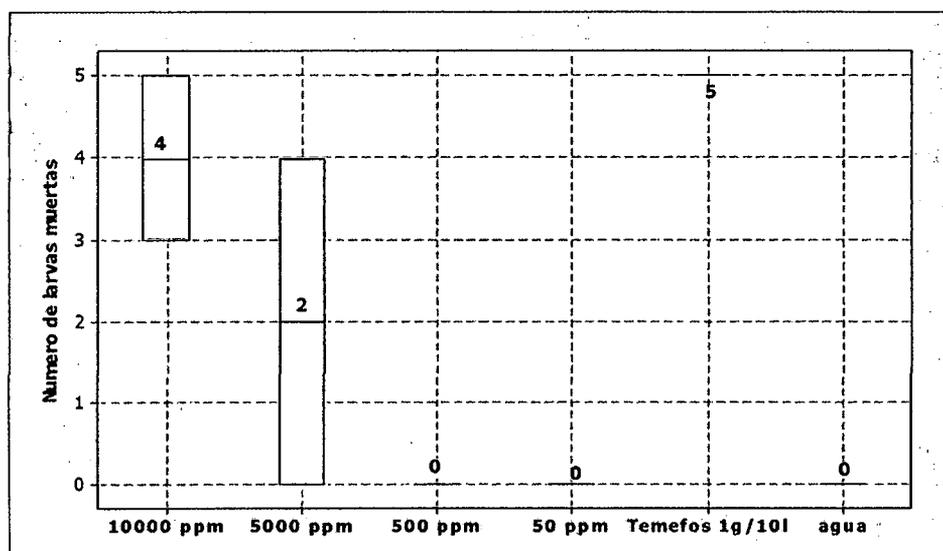


GRAFICO Nº11: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y control negativo (agua) durante las seis primeras horas de exposición.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

El gráfico N° 11 representa la distribución de larvas muertas durante las primeras seis horas del proceso experimental sometidas a distintas concentraciones de Acetogeninas así como grupo control positivo y grupo control negativo. En este gráfico se aprecia la mortalidad de los diferentes

grupos experimentales en un tiempo inicial con el número mínimo de larvas que murieron hasta el efecto máximo así como el número máximo de muertes durante este periodo de tiempo en todos los grupos de experimentación. En los grupos donde no se aprecia gráfico de cajas la mortalidad fue de cero así como para el grupo control positivo en donde fue constante el número de muertes.

TABLA N° 22: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua) durante la séptima a la duodécima horas de exposición.

<i>HORA DE MEDICIÓN</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>MEDIA O PROMEDIO</i>	<i>DESVIACIÓN TÍPICA</i>	<i>95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA</i>	
				<i>LIMITE INF.</i>	<i>LIMITE SUP</i>
7-12 HORAS	10000 ppm	5	1	4,064	5,936
	5000 ppm	5	2,64	4,064	5,936
	500 ppm	0	0	0	0
	50 ppm	0	0	0	0
	TEMEFOS(10mg/10ml)	5	0	4,064	5,936
	AGUA	0	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Dónde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión:

La tabla N° 22 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante la séptima a la duodécima horas del proceso de experimentación a distintas concentraciones de Acetogeninas así como el grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua).

La media para la concentración de 10.000ppm (grupo I) es de 5, representa el número de larvas muertas en promedio por cada subgrupo formado dentro de cada grupo experimental (cada grupo experimental se ensayó por triplicado).

Para la concentración de 5000ppm la media es de 5 lo cual significa que dentro de la séptima a la duodécima horas el promedio de mortalidad en los subgrupos experimentales fue de 5 siendo el periodo de tiempo en el que murieron mayor número de larvas para esta concentración. La media para las concentraciones de 500ppm, 50ppm y agua es de cero lo cual significa que hasta este momento no hubo muertes de larvas para estos grupos.

Para el grupo control positivo (grupo V) la media es de 5 durante este periodo de tiempo lo cual refleja que el Temefós mantiene constante el número de larvas que mata en comparación con los demás grupos experimentales y sigue siendo el grupo que produce el mayor número de muertes de larvas en comparación con los demás grupos experimentales.

Con respecto a la desviación típica para los grupos I y II (10.000ppm y 5000ppm respectivamente), grupos donde existen muertes el valor es de 1 y 2.64 respectivamente la cual se interpreta como la existencia de una mínima variación de los datos con respecto al número de muertes en cada subgrupo experimental. En los grupos experimentales III, IV y VI no hubo muertes de ahí que el valor es de cero; sin embargo el grupo control positivo tiene una desviación típica de cero esto se explica debido a que en todos los subgrupos el número de larvas muertas es constante en este grupo experimental.

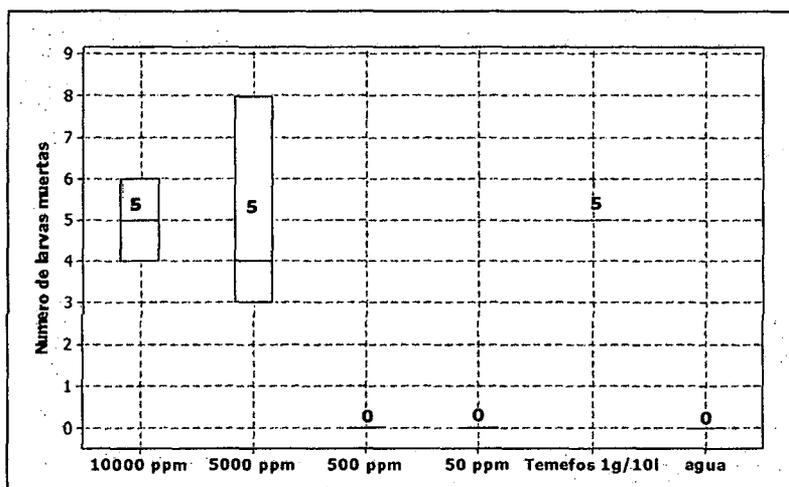


GRÁFICO Nº12: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo blanco y control durante la séptima a la duodécima horas de exposición.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

El gráfico N° 12 representa la distribución de larvas muertas durante la séptima a la duodécima horas del proceso experimental sometidas a distintas concentraciones de Acetogeninas así como grupo control positivo y grupo control negativo. En este grafico se aprecia la mortalidad de los diferentes grupos experimentales en un tiempo inicial con el número mínimo de larvas que murieron hasta el efecto máximo y el número máximo de muertes durante este periodo de tiempo en todos los grupos experimentales. En los grupos donde no se aprecian grafico de cajas la mortalidad fue de cero; sin embargo en el grupo control positivo (Temefós) no se aprecia un gráfico de cajas puesto que la mortalidad fue constante razón por la cual el valor de la media es de 5.

TABLA N° 23: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo blanco y control durante la trigésima a la decimoctava horas de exposición.

<i>HORA DE MEDICIÓN</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>MEDIA O PROMEDIO</i>	<i>DESVIACIÓN TÍPICA</i>	<i>95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA</i>	
				<i>LIMITE INF.</i>	<i>LIMITE SUP</i>
13-18 HORAS	10000 ppm	1	0	0,64	1,936
	5000 ppm	3	1,73	2,064	3,936
	500 ppm	1	0	0,64	1,936
	50 ppm	0	0	0	0
	TEMEFOS(1mg/10ml)	-	-	-	-
	AGUA	0,33	0,577	0,0602	1,269

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Dónde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión:

La tabla N° 23 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante la trigésima a la decimoctava horas de exposición a las distintas concentraciones de Acetogeninas así como para el grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua).

La media para la concentración de 10.000ppm (grupo I) es de 1, Para la concentración de 5000ppm la media es de 3 lo cual significa que dentro de la trigésima a la decimoctava horas el promedio del número de larvas muertas en los subgrupos experimentales fue de 3 larvas. La media para la concentración de 500ppm es de 1 es decir que en todos los subgrupos de este grupo experimental el promedio del número de larvas muertas es de 1 larva, así como también se puede deducir que en este periodo de tiempo empezó la muerte de larvas evidenciándose con el valor de la media. La media para la concentración de 50ppm sigue siendo igual a cero de la que afirmamos que no existen muertes.

En el grupo experimental control negativo (grupo VI) se observó un valor de la media de 0.33 para este intervalo de tiempo, valor numérico que representa la muerte de una larva en uno de los subgrupos de todo el grupo experimental, la cual es irracional y sin lógica puesto que el grupo control negativo (grupo VI) no fue sometido a ninguna sustancia, por lo que se presume que la muerte sea por algún factor externo (condiciones del medio ambiente, alimentación, estrés etc.) que pudo haber afectado las condiciones de supervivencia de la larva. Este valor de 0.33 para la media en este intervalo de tiempo fue despreciado y considerado un acontecimiento casual, puesto que los demás individuos de experimentación perteneciente al mismo grupo experimental no murieron y en condiciones óptimas con un movimiento normal.

Se aprecia que para el grupo control positivo (grupo V) la media no está representada por un valor numérico esto se explica a que en este periodo de tiempo en este grupo ya no existen larvas vivas ya todos murieron en el anterior periodo de tiempo.

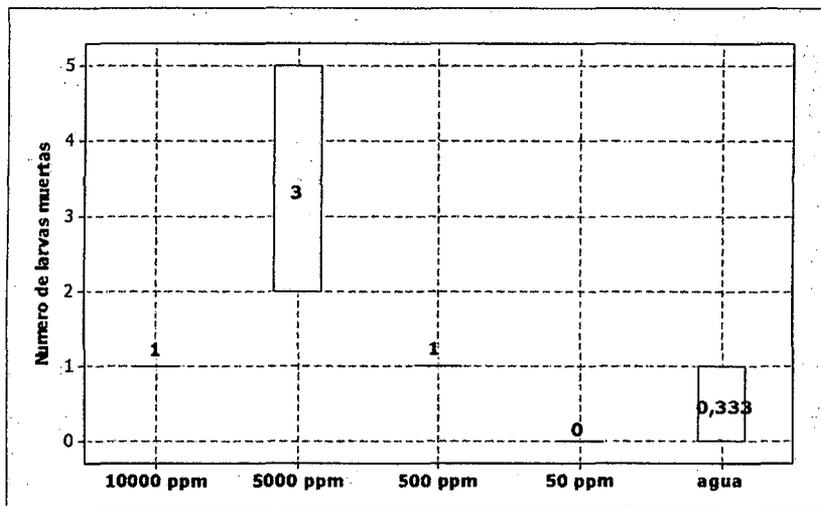


GRAFICO N°13: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo (agua) durante la trigésima a la decimoctava horas de exposición.

Fuente: Ficha de datos experimentales.

El gráfico N° 13 representa la distribución de larvas muertas durante la trigésima a la decimoctava horas del proceso experimental sometidas a distintas concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo. En este gráfico se aprecian que los grupos experimentales sometidos a una concentración de 10.000ppm y 500ppm de Acetogeninas el número de larvas muertas se mantiene constante, mientras que para el grupo control negativo se aprecia un gráfico de caja en un tiempo inicial con el número mínimo de larvas que murieron hasta el efecto máximo y el número máximo de muertes y una media de 0.333. El grupo control positivo no figura en este gráfico debido a que para este periodo de tiempo ya no existen larvas vivas.

TABLA N°24: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua) durante la decimonovena a la vigesimocuarta horas de exposición.

<i>HORA DE MEDICIÓN</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>MEDIA O PROMEDIO</i>	<i>DESVIACIÓN TÍPICA</i>	<i>95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA</i>	
				<i>LIMITE INF.</i>	<i>LIMITE SUP</i>
19-24 HORAS	10000 ppm	-	-	-	-
	5000 ppm	-	-	-	-
	500 ppm	2,667	0,57	1,731	3,602
	50 ppm	1	0,57	0,64	1,936
	TEMEFOS(1mg/10ml)	-	-	-	-
	AGUA	0	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Donde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión:

La tabla N° 24 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante la decimonovena a la vigesimocuarta horas de exposición a las distintas concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua).

La media para la el grupo experimental sometida a una concentración de Acetogeninas de 500ppm (grupo III) es de 2.667, es decir que dentro de la decimonovena a la vigesimocuarta horas el promedio del número de larvas muertas en los subgrupos experimentales fue de aproximadamente 3 larvas, valor que aumento considerablemente con respecto al anterior período de tiempo. Las concentraciones de 10.000ppm, 5000ppm y grupo control positivo (Temefós) las medias no están representadas por un valor numérico esto se explica a que en este período de tiempo en estos grupos ya no existen larvas vivas ya todas murieron en el período de tiempo anterior.

En el grupo experimental control negativo (grupo VI) se observa que el valor de la media es de 0 valor numérico que representa que todas las larvas en experimentación están vivas.

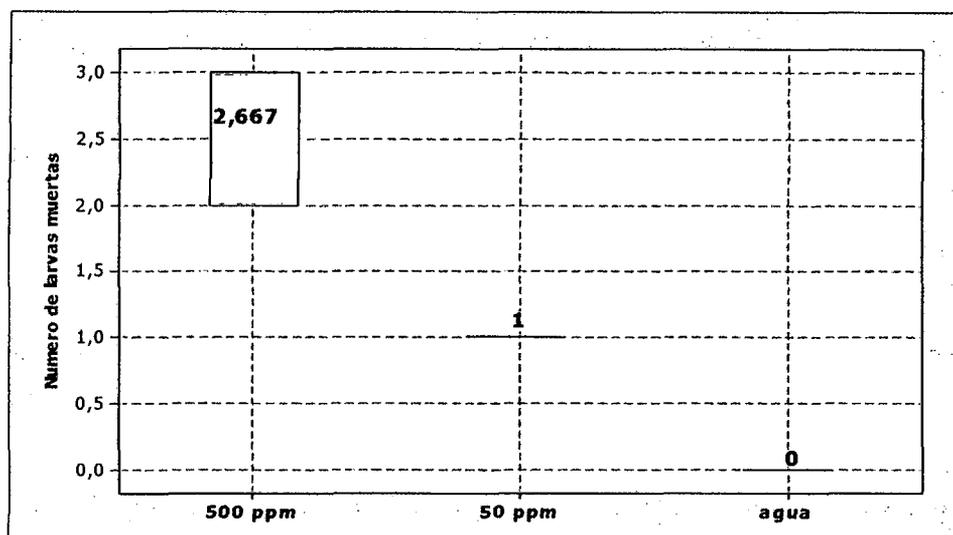


GRAFICO N°14: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control negativo (agua) durante la decimonovena a la vigesimocuarta horas de exposición.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

El gráfico N° 14 representa la distribución de larvas muertas durante decimonovena a la vigesimocuarta horas del proceso experimental sometidas a distintas concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo. En este gráfico se aprecia que el grupo experimental sometido a una concentración de Acetogeninas de 500ppm el número de larvas muertas es variable en cada subgrupo donde el número de individuos muertos mínimo es de 2 y el máximo es de 3 larvas siendo el promedio 2.667, el grupo experimental sometido 50ppm de solución de Acetogeninas el número de larvas muertas es constante, mientras que en el grupo control negativo no se manifiestan muertes.

TABLA N°25: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua) durante la vigesimoquinta a la trigésima horas de exposición.

<i>HORA DE MEDICIÓN</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>MEDIA O PROMEDIO</i>	<i>DESVIACIÓN TÍPICA</i>	<i>95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA</i>	
				<i>LIMITE INF.</i>	<i>LIMITE SUP</i>
25-30 HORAS	10000 ppm	-	-	-	-
	5000 ppm	-	-	-	-
	500 ppm	2,667	0,57	1,731	3,602
	50 ppm	2,333	0,57	1,398	3,269
	TEMEFOS(1mg/10ml)	-	-	-	-
	AGUA	0	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Dónde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión

La tabla N° 24 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante la vigesimoquinta a la trigésima horas de exposición a dos distintas concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo y grupo control negativo.

La media para el grupo experimental sometido a una concentración de 500ppm (grupo III) es de 2.667, valor que se mantiene constante en comparación con el anterior período de tiempo analizado, de lo cual se deduce que el número de larvas muertas sigue siendo la misma que en el anterior período de tiempo.

La media para el grupo experimental que fue sometido a una concentración de 50ppm (grupo IV) es de 2.33, valor numérico de la cual concluimos que en este periodo de tiempo el número de larvas muertas aumento.

Las concentraciones de 10.000ppm, 5000ppm y grupo control positivo (Temefós) las medias no están representadas por un valor numérico esto se

explica a que en este período de tiempo en estos grupos ya no existen larvas vivas en experimentación.

En el grupo experimental control negativo (grupo VI) se observa que el valor de la media es de 0 valor numérico que representa que todos los individuos de experimentación están vivas.

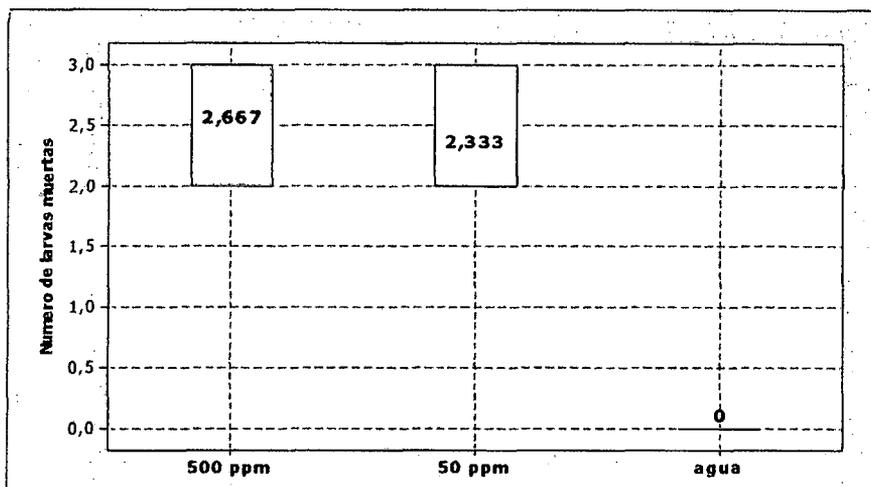


GRAFICO Nº15: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo (agua) durante la vigesimoquinta a la trigésima horas de exposición.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

El gráfico N° 15 representa la distribución de larvas muertas durante vigesimoquinta a la trigésima horas del proceso experimental sometidas a dos distintas concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo. En este gráfico de cajas se observa que los grupos experimentales sometidos a 500ppm y 50ppm de solución de Acetogeninas el número de larvas muertas para ambos grupos se asemejan además que para este periodo de tiempo en el grupo experimental IV el número de larvas muertas ha aumentado. El grupo control positivo se mantiene constante.

TABLA N°26: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas a las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo blanco y control durante la trigésima a la trigésimo sexta horas de exposición.

<i>HORA DE MEDICIÓN</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>MEDIA O PROMEDIO</i>	<i>DESVIACIÓN TÍPICA</i>	<i>95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA</i>	
				<i>LIMITE INF.</i>	<i>LIMITE SUP</i>
31-36 HORAS	10000 ppm	-	-	-	-
	5000 ppm	-	-	-	-
	500 ppm	3	0,35	2,064	3,936
	50 ppm	3	1	2,064	3,936
	TEMEFOS(1mg/10ml)	-	-	-	-
	AGUA	0	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Donde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión:

La tabla N° 26 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante la trigésima a la trigésimo sexta horas de exposición a distintas concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo y grupo control negativo.

La media para las concentraciones de 500ppm y 50ppm (grupo III y grupo IV respectivamente) son de 3, es decir que dentro de la trigésima a la trigésimo sexta horas el promedio del número de larvas muertas en los subgrupos experimentales fue de 3 larvas, así como también el número de larvas muertas para ambos grupos experimentales ha ido incrementándose en este período de tiempo. En el grupo experimental control negativo (grupo VI) se observa que el valor de la media es de 0 valor numérico que representa que todos los individuos de experimentación están vivos.

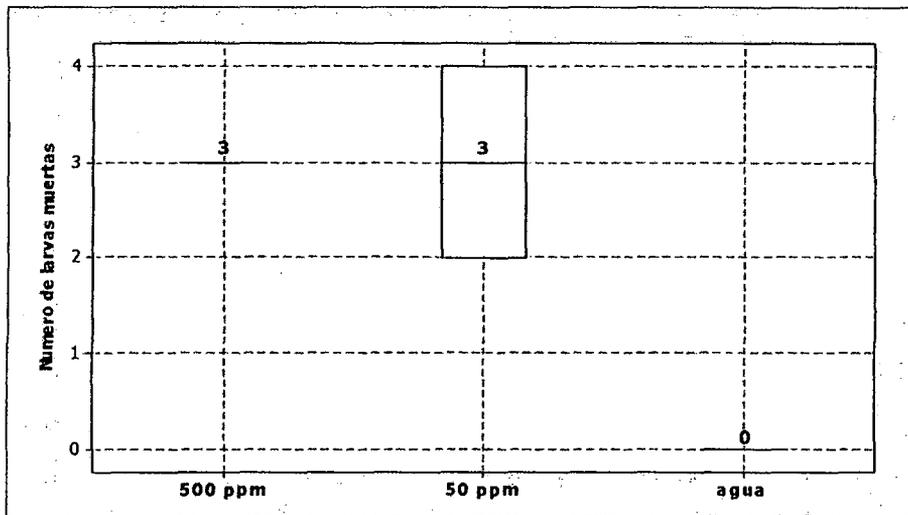


GRÁFICO N°16: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo blanco y control durante la trigésima a la trigésimo sexta horas de exposición.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

El gráfico N° 16 representa la distribución de larvas muertas durante la trigésima a la trigésimo sexta horas del proceso experimental sometidas a dos distintas concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo. En este gráfico se observa que el grupo experimental sometido a una concentración de Acetogeninas de 500ppm el número de larvas muertas es constante en todos los subgrupos experimentales. El grupo experimental sometido a una concentración de Acetogeninas de 50ppm el número de larvas muertas es variable en cada subgrupo teniendo como promedio de larvas muertas a 3 larvas, también se observa que en este período de tiempo el número de larvas muertas aumentó. El grupo control negativo se mantiene constante.

TABLA N° 27: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas a las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua) durante la trigésimo sexta a la cuadragésimo segunda horas de exposición.

<i>HORA DE MEDICIÓN</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>MEDIA O PROMEDIO</i>	<i>DESVIACIÓN TÍPICA</i>	<i>95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA</i>	
				<i>LIMITE INF.</i>	<i>LIMITE SUP</i>
37-42 HORAS	<i>10000 ppm</i>	-	-	-	-
	<i>5000 ppm</i>	-	-	-	-
	<i>500 ppm</i>	1	0,001	0,64	2,146
	<i>50 ppm</i>	3,667	0,577	2,731	4,602
	<i>TEMEFOS(1mg/10ml)</i>	-	-	-	-
	<i>AGUA</i>	0	0	0	0

Fuente: Ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C.

N° de individuos: 10 larvas/concentración

HR: humedad relativa: 82 +/- 5%

N° de ensayos: triplicado/concentración

Dónde:

ppm: partes por millón.

ml: mililitro.

Análisis y discusión:

La tabla N° 27 representa la distribución de las medias de tendencia central y de dispersión durante la trigésimo sexta a la cuadragésimosegunda horas de exposición a distintas concentraciones de Acetogeninas grupo control positivo y grupo control negativo.

La media para la concentración de 500ppm es 1, valor numérico que disminuyó con respecto al tiempo, es decir que dentro de la trigésimo sexta a la cuadragésimo segunda horas el promedio del número de larvas muertas en los subgrupos experimentales fue de 1 larva; esto se explica debido a que en este período de tiempo el número de larvas muertas se encuentran cercanas a completar el total de larvas en experimentación en todos los subgrupos pertenecientes a este grupo experimental. La media para la concentración de 50ppm es 3.667 valor numérico que muestra un incremento lo cual nos lleva a concluir que en este periodo de tiempo el número de larvas muertas ha sido mayor en este grupo experimental. En el grupo experimental control negativo

(grupo VI) se observa que el valor de la media es de 0 valor numérico que representa que todos los individuos de experimentación están vivos.

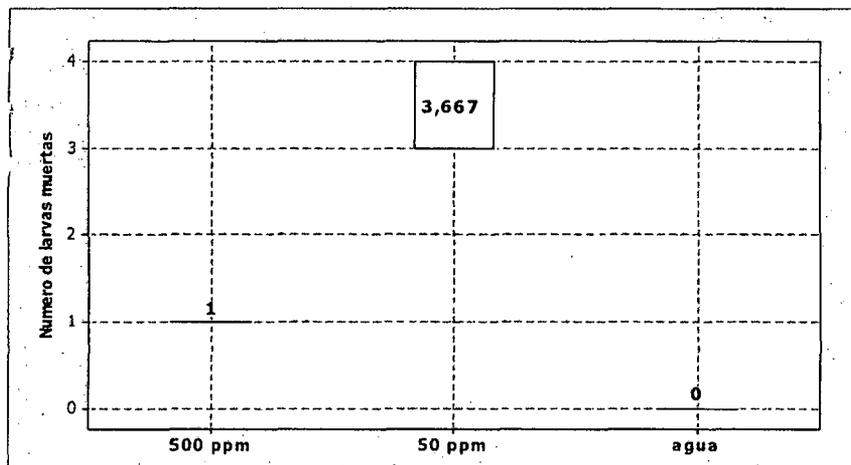


GRÁFICO N°17: Distribución numérica de las medias de tendencia central y dispersión de la cantidad de larvas muertas de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo blanco y control durante la trigésimo sexta a la cuarenta y dos horas de exposición.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

El gráfico N° 17 representa la distribución de larvas muertas durante trigésimo sexta a la cuarenta y dos horas del proceso experimental sometidas a dos distintas concentraciones de Acetogeninas y grupo control negativo. En este gráfico se observa que el grupo experimental sometido a una concentración de Acetogeninas de 500ppm el número de larvas muertas es constante en cada subgrupo y para el grupo experimental sometido a una concentración de Acetogeninas de 50ppm el número de larvas muertas es variable en cada subgrupo teniendo una media de 3.667 además se observa que en este período de tiempo el número de muertes aumento. El grupo control positivo se mantiene constante.

TABLA N° 28: Anova factorial (análisis de la varianza factorial) para la comparación del efecto larvicida de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (agua).

	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	ESTADÍSTICO F	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
GRUPOS EN COMPARACIÓN	5	7,036	10,742	0,000
HORA DE LA MEDICIÓN	5	38,935	59,445	0,000
ERROR	57	0,655	-	.

Fuente: ficha de recolección de datos.

T°: 23 +/- 3°C. HR: humedad relativa: 82 +/- 5%. P<0.05

(P): Significancia (sig) donde:

Sig: >0.05, no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales.

Sig: ≤0.05, existe diferencia significativa entre los grupos experimentales.

Análisis y discusión:

En la tabla N° 28 se observan los grados de libertad la cual hace referencia a la cantidad de grupos formados que son 6 (las distintas concentraciones que son 4, además le sumamos el grupo control positivo y grupo control negativo en total son 6) a esto se le resta una unidad y se tiene los grados de libertad.

En el caso de las horas de medición se formaron 6 grupos menos 1 en total los grados de libertad son 5, en la segunda y tercera columna tenemos la suma de cuadrados y el estadístico F de Fisher respectivamente, estos dos valores son importantes para el cálculo de la significancia asintótica o "p".

En la última columna se observa que la significancia asintótica "p" en ambos casos tanto para los grupos en comparación (distintas concentraciones), así como para las distintas horas de medición es p=0.000, esto significa que cuando la p <0.05 se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas al comparar la cantidad de larvas muertas por cada grupo de medición (distintas concentraciones y distintas horas).

TABLA N°29: Prueba post hoc o post test Scheffe para la comparación del efecto larvicida de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, grupo control positivo (Temefós) y grupo control negativo (Agua).

GRUPOS EN COMPARACIÓN		DIFERENCIA DE MEDIAS	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
CONCENTRACIÓN A 10000ppm	CONCENTRACIÓN A 5000ppm	0,00	1,00	-1,32	1,32
	CONCENTRACIÓN A 500 ppm	1,83	0,00	0,71	2,95
	CONCENTRACIÓN A 50 ppm	1,90	0,00	0,79	3,02
	TEMEFOS (1mg/10ml)	-1,67	0,016	-3,14	-0,20
	AGUA (GRUPO BLANCO)	3,29	0,000	2,17	4,40
CONCENTRACIÓN A 5000ppm	CONCENTRACIÓN A 500 ppm	1,83	0,00	0,71	2,95
	CONCENTRACIÓN A 50 ppm	1,90	0,00	0,79	3,02
	TEMEFOS (1mg/10ml)	-1,67	0,016	-3,14	-0,20
	AGUA (GRUPO BLANCO)	3,29	0,000	2,17	4,40
CONCENTRACIÓN A 500 ppm	CONCENTRACIÓN A 50 ppm	0,07	1,00	-0,80	0,94
	TEMEFOS (1mg/10ml)	-3,50	0,000	-4,86	-2,28
	AGUA (GRUPO BLANCO)	1,45	0,000	0,52	2,24
CONCENTRACIÓN A 50 ppm	TEMEFOS (1mg/10ml)	-3,57	0,000	2,28	4,86
	AGUA (GRUPO BLANCO)	1,38	0,000	3,66	6,24
TEMEFOS (1G/10L)	AGUA (GRUPO BLANCO)	4,95	0,000	-6,24	-3,66

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Dónde:

ppm: partes por millón

ml: mililitro.

Análisis y discusión.

La presente tabla de post test o post hoc compara cada uno de los grupos formados simultáneamente, en la primera columna se observa la diferencia de medias esto significa que se ha restado la media de los grupos experimentales. Los resultados son diversos en esta diferencia desde cero que significa que las

medias son iguales hasta valores positivos como 1,83 lo cual indica que la media de la concentración mayor fue mayor que las de menor concentración, también se observa valores negativos, en la segunda columna se observa la significancia asintótica o p, cuando la p es menor a 0,05 se dice que existe diferencias estadísticamente significativas de lo contrario no.

En la última columna se observa el intervalo de confianza para la diferencia de medias su intención consiste en determinar un posible rango de valores o intervalo, en los que pueda precisarse con una determinada probabilidad que el valor de un parámetro se encuentra dentro de estos límites.

TABLA N°30: Subconjuntos para la comparación a un nivel de significancia de 0,05.

GRUPOS EN COMPARACIÓN	N	SUB CONJUNTO PARA ALFA = 0,05			
		1	2	3	4
GRUPO BLANCO (AGUA)	21	0,05			
CONCENTRACIÓN A 50 ppm	21		1,43		
CONCENTRACIÓN A 500 ppm	21		1,50		
CONCENTRACIÓN A 10000 ppm				3,33	
CONCENTRACIÓN A 5000 ppm	9			3,33	
PATRÓN TEMEFOS	9				5,00

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Donde:

ppm: partes por millón.

(P): Significancia (sig) donde:

Sig: >0.05, no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales.

Sig: ≤0.05, existe diferencia significativa entre los grupos experimentales.

En la tabla N° 30 se observan subconjuntos formados para la comparación a un nivel de significancia de 0,05, con la finalidad de generar grupos o de agrupar a los grupos que son similares y de separar a los que son distintos, esto con la finalidad de que al comparar los grupos experimentales con los demás se observa que existen diferencias estadísticamente significativas.

TERCERA PARTE

4.3. RESULTADOS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.

4.3.1. DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LAS ACETOGENINAS AISLADAS A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SEMILLAS DE *Annona muricata* L. (Masasamba).

TABLA N°31: Resultados del control microbiológico de las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

CRITERIOS	BACTERIAS	CANTIDAD PERMISIBLE
CRITERIO IMPERATIVO: la presencia de este microorganismo indica riesgo elevado, la prueba debe de resultar negativa.	Salmonella	Negativo
CRITERIO INDICATIVO DE HIGIENE: su presencia indica la deficiente higiene del producto y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformes fecales (Escherichia coli)	Negativo
CRITERIOS DE ALERTA O LIMITES CRITICOS: el producto no debe de exceder los límites específicos.	Aerobios mesófilos. Hongos y levaduras.	Negativo

Fuente: Datos experimentales

Análisis y discusión.

En la tabla N°31 se observan los resultados del control microbiológico realizado al concentrado de Acetogeninas las que fueron aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Los resultados nos indican que el concentrado de Acetogeninas se encuentra libre de contaminación por *Salmonella*, coliformes fecales (*Escherichia coli*), aerobios mesófilos, hongos y levaduras lo que nos permitió seguir con el desarrollo de la evaluación de la actividad antibacteriana "in vitro"; ya que de haber resultado positivo en alguno de los controles se detenía la determinación del efecto antibacteriano porque nos podía dar resultados falsos positivos.

4.3.2. RESULTADOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Salmonella typhi* spp.

TABLA N°32: Resultados de la curva de crecimiento de *Salmonella typhi* spp.

TIEMPO (HORAS)	ABSORVANCIA (A 670 nm)
0	0.025
1	0.041
1.5	0.079
2	0.179
2.5	0.435
3	0.865
3.5	1.294
4	1.418
4.5	1.444
5	1.452
5.5	1.390
6	1.251

Fuente: Datos experimentales.

Dónde:

nm: nanómetros.

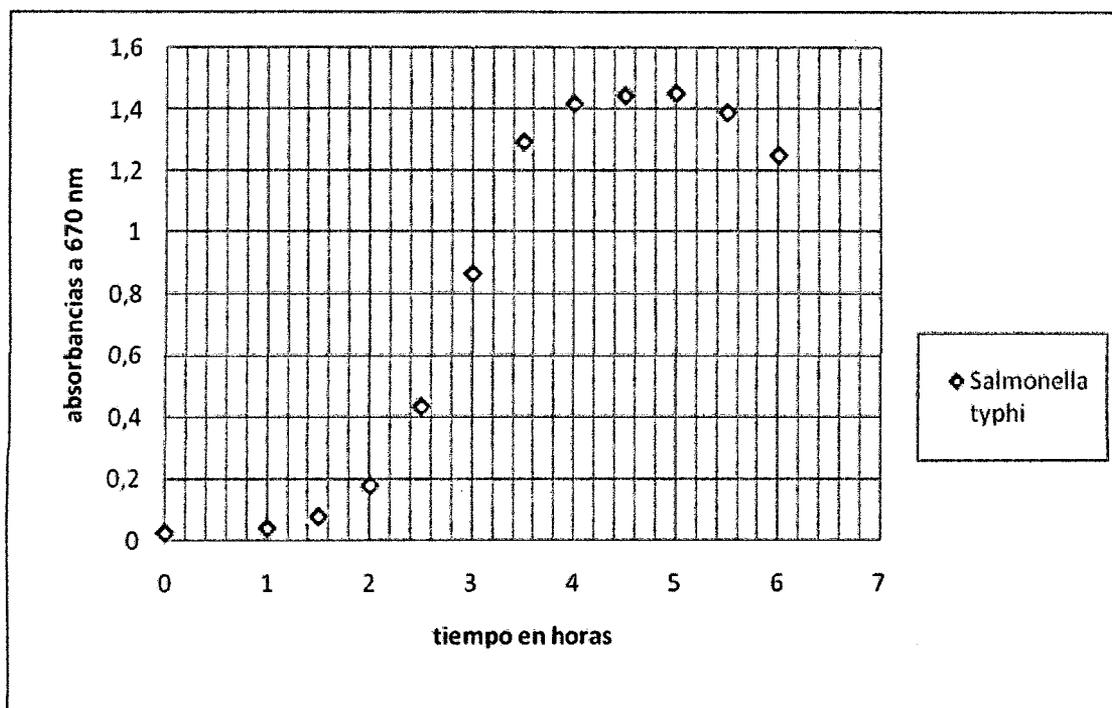


GRAFICO N°19: Curva de crecimiento de *Salmonella typhi* spp

Fuente: Datos experimentales.

Análisis y discusión

El gráfico N°19 muestra la curva de crecimiento bacteriano de *Salmonella typhi* spp, en donde se puede apreciar las 4 fases típicas del crecimiento bacteriano como son: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

En la curva se observa que la fase de latencia o log dura aproximadamente 2 horas y media, lo cual indica que en esta fase las bacterias de *Salmonella typhi* spp se estuvieron adaptando a su nuevo ambiente; la fase exponencial logarítmica del crecimiento está entre segunda y quinta hora, en esta fase la bacteria logra adaptarse a su nuevo medio por lo que presenta un crecimiento exponencial, según Brokc, un inóculo tomado en el punto medio de esta fase son indicadas para la realización de diferentes estudios; a partir de la quinta hora la bacteria entra en fase estacionaria; esto debido a que los nutrientes del medio de cultivo se estaban agotando y además se está desarrollando la acumulación de desechos metabólicos de la bacteria; la fase de muerte empieza a partir de sexta hora la que se evidencia por un descenso en las lecturas.

La curva del crecimiento bacteriano de *Salmonella typhi* spp. se obtuvo graficando la absorbancia vs tiempo con los datos que se obtuvieron en el ensayo realizado.

Gracias a los resultados de la curva de crecimiento podemos decidir en qué tiempo es necesario realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana tomando como punto de partida la fase logarítmica o de crecimiento exponencial.

4.3.3. DEL ENSAYO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

4.4.3.1. De la prueba piloto

TABLA N° 33: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana de las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) obtenidos en la prueba piloto.

N° de disco	Concentración de Acetogeninas (mg/disco)	Diámetro del Halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Salmonella typhi</i> spp.		
		IG	IIG	Promedio
1	5	0.00	0.00	0
2	10	0.00	0.00	0
3	15	0.00	0.00	0
4	20	0.00	0.00	0
5	30	0.00	0.00	0
6	40	0.00	0.00	0
7	50	0.00	0.00	0
8	60	0.00	0.00	0
9	70	0.00	0.00	0
10	80	0.00	0.00	0
11	90	0.00	0.00	0
12	100	13	12.5	12.75
13	150	17.5	17.8	17.65
14	200	19.5	19.5	19.5
15	250	24	24.5	24.25
16	300	26.8	26.5	26.65
17	350	27.5	27.5	27.5
18	400	30	30.5	30.25
19	450	32	32	32
20	500	29	28.5	28.75

Fuente: Ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición (Anexo N° 9).

Leyenda:

IG: primer grupo de placas.

IIG: segundo grupo de placas.

mm: milímetros.

Análisis y discusión

En la tabla N°33 se encuentran los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en la prueba piloto, se observa que las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) POSEE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “in vitro” sobre cepas de *Salmonella typhi* spp.

En la tabla podemos observar que las Acetogeninas presentan un halo mínimo de inhibición de 12.75 mm en promedio a una concentración de 100mg/disco y un halo máximo de inhibición de 32.0 mm en promedio a una concentración de 450mg/disco. Con estas dos medidas promedio de halos de inhibición se realizó la estandarización de las concentraciones antibacterianas de las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) con la finalidad de seguir con la siguiente fase de la investigación.

4.3.3.2. De la estandarización de las concentraciones antibacterianas

Cálculos:

Reemplazando valores con los datos obtenidos en la prueba piloto se tiene:

$$I = \frac{450}{100} ; r = 8 - 1 = 7$$
$$F = \sqrt[7]{4.5} = 1.2009$$

Como se observa en la fórmula el factor de incremento F, obtenido es de 1.2009 con este dato se realizó la estandarización de las concentraciones procediendo según la tabla N°34.

TABLA N°34: Determinación de las concentraciones estandarizadas para el ensayo de la actividad antibacteriana de las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

OPERACIÓN	Nº DE CONCENTRACIÓN	RESULTADO mg/disco
Concentración mínima	Concentración 1	100
Concentración 1 x F	Concentración 2	123.97
Concentración 2 x F	Concentración 3	153.69
concentración 3 x F	Concentración 4	190.52
concentración 4 x F	Concentración 5	236.19
concentración 5 x F	Concentración 6	292.81
concentración 6 x F	Concentración 7	362.99
concentración máxima	Concentración 8	450

Fuente: Datos experimentales.

Análisis y discusión

En la tabla N°34 se muestran los valores de las concentraciones antibacterianas estandarizadas las cuales fueron determinadas después de hallar el valor del factor de incremento con los datos obtenidos en la prueba piloto.

Con estas concentraciones se realizó un nuevo ensayo de la actividad antibacteriana "in vitro".

4.3.3.3. Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas.

TABLA N°35: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de de las concentraciones estandarizadas de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba), fármaco patrón (ciprofloxacino) y dimetilsulfoxido (grupo “blanco”) sobre cepas de *Salmonella typhi* spp.

N° de disco	concentración de Acetogeninas (mg/disco), ciprofloxacino 5µg, DMS	Diámetro del Halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Salmonella typhi</i> spp.			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	100	13.0	12.5	13.0	12.83
2	123.97	13.5	14.0	14.0	13.83
3	153.69	17.50	18.50	18.0	18.0
4	190.52	20.0	19.50	20.0	19.83
5	236.19	22.50	21.0	22.0	21.83
6	292.81	25.0	26.0	26.0	25.67
7	362.99	27.50	28.50	28.0	28.0
8	450	32.0	31.0	32.0	31.67
9	ciprofloxacino	28	28	27	27.67
10	DMS	0	0	0	0

Fuente: ficha de recopilación de los diámetros de los halos de inhibición (Anexo N° 09).

Dónde: **DMS:** Dimetilsulfoxido; **mg:** miligramos; **mm:** milímetros;

IG, IIG, IIIG: grupos.

Análisis y discusión

En la tabla N° 35 podemos observar los diámetros de los halos de inhibición que resultaron con las concentraciones estandarizadas. Se observa que al incrementarse la concentración de Acetogeninas el diámetro del halo de inhibición se incrementa. Así como también se puede observar los diámetros de los halos de inhibición del fármaco patrón (ciprofloxacino 5µg) teniendo este un diámetro promedio de 27.67mm, en el caso del dimetilsulfoxido (grupo blanco) no genero inhibición lo que descarta la posibilidad de que los halos generados por las Acetogeninas se vea influenciado por el dimetilsulfoxido que se utilizó como solvente para la preparación de los discos de sensibilidad.

Esta tabla también se aprecia que las concentraciones de 362.99 y la de 450 mg/disco generan un diámetro mayor de inhibición sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* spp. en comparación con el diámetro del ciprofloxacino.

4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

TABLA N°36: Distribución numérica de las medidas de tendencia central y dispersión de la dimensión de los halos de inhibición.

COCENTRACIÓN DE ACETOGENINAS	MEDIA O PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN	DESVIACIÓN TÍPICA	95% DE INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
			LIMITE INF.	LIMITE SUP
100mg/100ul	12,60	0,173	12,17	13,03
123,97mg/100ul	13,833	0,288	13,116	14,550
153,69mg/100ul	18	0,50	16,758	19,242
190,52mg/100ul	19,833	0,288	19,116	20,550
236,19mg/100ul	21,833	0,763	19,936	23,731
292,81mg/100ul	25,667	0,577	24,232	27,101
362,99mg/100ul	28	0,50	26,758	29,242
450mg/100ul	31,667	0,577	30,232	33,101
ciprofloxacino	27,667	0,577	26,232	29,101
dimetilsulfoxido	0	0	0	0

Fuente: ficha de recolección de datos

Donde:

µl: microlitros.

Análisis y discusión

En la presente tabla se puede observar la media (promedio) de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, del fármaco patrón (ciprofloxacino) y del grupo blanco (dimetilsulfoxido); así como también la desviación típica que en todos los grupos experimentales es menor a la unidad lo cual significa que en cada grupo las medidas de los diámetros de los halos de inhibición para cada concentración, fármaco patrón y grupo control negativo fueron de igual o cercano diámetro, es decir que las tres mediciones de los diámetros del halo de inhibición para cada concentración fueron casi constantes; en la última columna de la tabla se muestra los intervalos de confianza de cada concentración, que se interpreta como los límites entre los

que se encuentra la media de los diámetros de los halos de inhibición y que la probabilidad de que estén fuera de este intervalo es del 5% solamente.

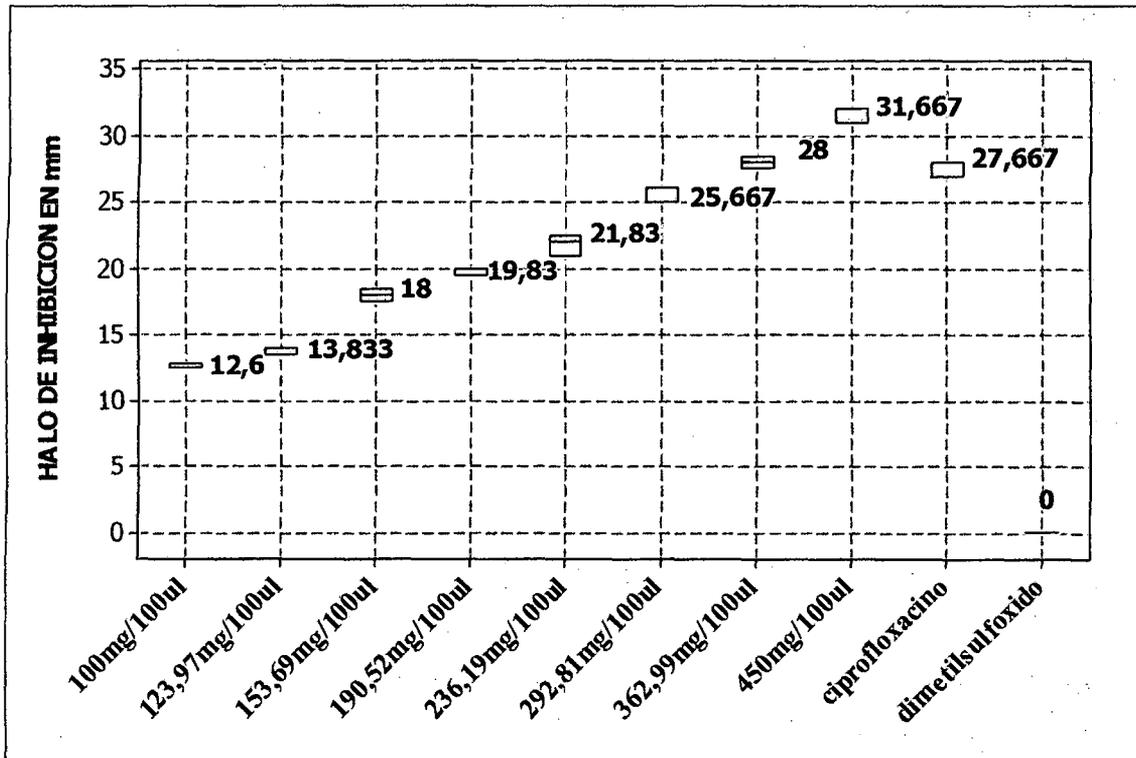


GRÁFICO N°20: Gráfico de cajas de los diámetros de los halos de inhibición de las concentraciones estandarizadas de Acetogeninas, ciprofloxacino y dimetilsulfoxido.

Fuente: ficha de recolección de datos

Análisis y discusión

El gráfico N° 20 muestra los diferentes diámetros de los halos de inhibición de las concentraciones estandarizadas de Acetogeninas, Ciprofloxacino y dimetilsulfoxido, apreciándose que a medida que se incrementa la concentración aumenta el diámetro del halo e incluso las concentraciones de 362.99 y 450mg/disco generan un mayor diámetro de halo de inhibición comparado con el del fármaco patrón (ciprofloxacino). De aquí y comparando con datos bibliográficos se puede afirmar que el concentrado de Acetogeninas a 362.99 y 450 mg/disco tiene una buena actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhi spp* y según la tabla N°37 *Salmonella typhi spp.* es susceptible

cuando el diámetro del halo es ≥ 21 mm, intermedia cuando va de 16 – 20mm y es resistente cuando el diámetro del halo es \leq a 15mm, estos datos corresponden al Ciprofloxacino, y haciendo una comparación con los diámetros de los halos generados por las diferentes concentraciones estandarizadas de Acetogeninas podemos decir que la bacteria *Salmonella typhi* spp. es susceptible a las Acetogeninas cuando el diámetro del halo es ≥ 28 mm, intermedia cuando va de 19 – 20mm y es resistente cuando el diámetro del halo es \leq a 18mm.

TABLA N°37: Interpretación estándar del tamaño del diámetro de la zona de inhibición para enterobacteriaceae (para ciertos discos de antimicrobianos para la prueba de *Salmonella ser. typhi*)

Agente antimicrobiano	Potencia del disco (μ g)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			Límites del diámetro de la zona (mm) para la cepa CC de NCCLS <i>E. coli</i> ATCC 25922
		Susceptible [equiv CIM.]	Intermediate [equiv CIM.]	Resistant [equiv CIM.]	
Ampicilina	10 μ g	≥ 17 mm ($\leq 8 \mu$ g/ml)	14 – 16 mm (16 μ g/ml)	≤ 13 mm ($\geq 32 \mu$ g/ml)	16 – 22 mm
Chloramphenicol	30 μ g	≥ 18 mm ($\leq 8 \mu$ g/ml)	13 – 17 mm (16 μ g/ml)	≤ 12 mm ($\geq 32 \mu$ g/ml)	21 – 27 mm
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	1,25 / 23,75 μ g	≥ 16 mm ($\leq 2/38 \mu$ g/ml)	11 – 15 mm (4/76 μ g/ml)	≤ 10 mm ($\geq 8/152 \mu$ g/ml)	23 – 29 mm
Acido nalidixico	30 μ g	≥ 19 mm ($\leq 8 \mu$ g/ml)	14 – 18 mm (16 μ g/ml)	≤ 13 mm ($\geq 32 \mu$ g/ml)	22 – 28 mm
Ciprofloxacino	5 μ g	≥ 21 mm ($\leq 1 \mu$ g/ml)	16 – 20 mm (2 μ g/ml)	≤ 15 mm (≥ 4 mg/ml)	30 – 40 mm

Fuente: Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo (59).

TABLA N°38: ANOVA (Análisis de la Varianza) para la comparación de las medias de los halos de inhibición

COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS EN EXPERIMENTACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	ESTADÍSTICO F (FISHER)	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
<i>Halos de inhibición</i>	9	263,699	0,000

Fuente: Ficha de recolección de datos

Leyenda:

(P): Significancia (sig) donde:

Sig: >0.05, no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig: ≤0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición

Análisis y discusión

La tabla N°38 muestra los resultados arrojados por el ANOVA donde compara los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de Acetogeninas, ciprofloxacino (fármaco patrón) y dimetilsulfoxido (grupo blanco), la comparación es entre grupos generándose así 9 grados de libertad y a raíz de esto se produce un "F" de Fisher de 263.699. El Análisis de la Varianza (ANOVA) da una significancia (P) de 0.000 lo que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros de los halos de inhibición generados por las diferentes concentraciones de Acetogeninas, Ciprofloxacino y dimetilsulfoxido.

TABLA N°39: Distribución numérica de las medidas de tendencia central y dispersión de la dimensión de los halos de inhibición

GRUPOS EN COMPARACIÓN		DIFERENCIA DE MEDIAS	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
100mg/100ul	123,97mg/100ul	-1,23	0,399	-3,04	0,576
	153,69mg/100ul	-5,40	0,000	-7,209	-3,591
	190,52mg/100ul	-7,23	0,000	-9,043	-5,424
	236,19mg/100ul	-9,23	0,000	-11,04	-7,424
	292,81mg/100ul	-13,06	0,000	-14,876	-11,257
	362,99mg/100ul	-15,40	0,000	-17,209	-13,591
	450mg/100ul	-19,06	0,000	-20,876	-17,257
	ciprofloxacino	-15,06	0,000	-16,876	-13,257
	dimetilsulfoxido	12,60	0,000	10,791	14,409
123,97mg/100ul	153,69mg/100ul	-4,1667 [*]	0,000	-5,976	-2,357
	190,52mg/100ul	-6	0,000	-7,809	-4,191
	236,19mg/100ul	-8	0,000	-9,809	-6,191
	292,81mg/100ul	-11,83	0,000	-13,643	-10,024
	362,99mg/100ul	-14,166	0,000	-15,976	-12,357
	450mg/100ul	-17,83	0,000	-19,643	-16,024
	ciprofloxacino	-13,83	0,000	-15,643	-12,024
	dimetilsulfoxido	-13,83	0,000	12,024	15,643
	153,69mg/100ul	190,52mg/100ul	-1,833	0,045	-3,643
236,19mg/100ul		-3,833	0,000	-5,643	-2,024
292,81mg/100ul		-7,667	0,000	-9,476	-5,857
362,99mg/100ul		-10,0	0,000	-11,809	-8,191
450mg/100ul		-13,66	0,000	-15,476	-11,857
ciprofloxacino		-9,66	0,000	-11,476	-7,857
dimetilsulfoxido		18	0,000	16,191	19,809
236,19mg/100ul		-2	0,022	-3,809	-,191
190,52mg/100ul	292,81mg/100ul	-5,83	0,000	-7,643	-4,024
	362,99mg/100ul	-8,166	0,000	-9,976	-6,357
	450mg/100ul	-11,83	0,000	-13,643	-10,024
	ciprofloxacino	-7,83	0,000	-9,643	-6,024
	dimetilsulfoxido	19,83	0,000	18,024	21,643
	292,81mg/100ul	-3,833	0,000	-5,643	-2,024
236,19mg/100ul	362,99mg/100ul	-6,16	0,000	-7,976	-4,357
	450mg/100ul	-9,83	0,000	-11,643	-8,024
	ciprofloxacino	-5,83	0,000	-7,643	-4,024
	dimetilsulfoxido	21,83	0,000	20,024	23,643
	362,99mg/100ul	-2,33	0,005	-4,143	-0,524
292,81mg/100ul	450mg/100ul	-6	0,000	-7,809	-4,191
	ciprofloxacino	-2	0,022	-3,809	-0,191
	dimetilsulfoxido	25,66 [*]	0,000	23,857	27,47

Fuente: ficha de recolección de datos

Análisis y discusión.

En la tabla N°39 se puede apreciar los grupos experimentales en comparación; los grupos experimentales a diferentes concentraciones de Acetogeninas , así como también con el ciprofloxacino (grupo control positivo) y dimetilsulfoxido (grupo control negativo), donde se observa la diferencia de medias de las concentraciones comparadas, se puede apreciar que esta diferencia es negativa para todos los casos excepto cuando las concentraciones se comparan con el dimetilsulfoxido, el valor negativo resulta porque se resta un valor menor (diámetro del halo de una concentración) con un valor mayor (diámetro del halo de una concentración sometida a comparación). Para el caso del dimetilsulfoxido que no genera halo de inhibición la diferencia de la media es positiva porque todas las concentraciones, incluido el ciprofloxacino, generan halo de inhibición, y es lógico que la diferencia sea positiva.

La tabla también muestra la significancia asintótica que compara los diámetros de los halos y da como resultado si existe o no diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados según la significación sea \leq ó \geq a 0.05 respectivamente, vemos que solo para un caso no existe diferencia estadísticamente significativa (100mg/100ul- 123,97mg/100ul) que significa que a estas dos concentraciones se produce un halo de inhibición de parecido diámetro. Las demás comparaciones dan una significancia \leq a 0.05 lo que nos da a entender que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros de halos de inhibición generados.

En la última columna de la tabla se muestra los intervalos de confianza de la diferencia de medias de las concentraciones que se interpreta como los límites entre los que se encuentra la diferencia de medias de los diámetros de los halos de inhibición y que la probabilidad de que estén fuera de este intervalo es del 5% solamente.

CONCLUSIONES

1. Las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L si presentan actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti* mosquito vector de la fiebre amarilla y dengue lo que indica que sería posible el aprovechamiento de las semillas para la obtención de un biopesticida.
2. Las Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos de semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" si presentan efecto antibacteriano frente a cepas de *Salmonella Typhi spp* agente causal de enfermedades diarreicas agudas en nuestra comunidad.
3. En la presente investigación se obtuvo los extractos etanólicos al 70% de las semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" mediante el método de maceración con un rendimiento de 4.1720%
4. Se obtuvo las Acetogeninas presentes en los extractos etanólicos al 70% de las semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L. "Masasamba" mediante el método de extracción por solventes de diferente polaridad con un rendimiento de 47.34%.
5. Se caracterizó las propiedades fisicoquímicas del concentrado de Acetogeninas aisladas a partir de extractos etanólicos al 70% de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) mediante la cual concluimos que las Acetogeninas presentes en *Annona muricata* L. son medianamente polares, a su vez se realizó el análisis cualitativo mediante cromatografía en capa delgada y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) siendo el componente mayoritario squamostatin D con un 43.1206%.
6. Se recolectaron e identificaron larvas de *Aedes aegypti* en el distrito de Camanti de la provincia de Quispicanchis - cusco. La identificación fue realizada por el responsable de la unidad de saneamiento ambiental vigilancia entomológica y control de vectores de la DIRESA - Cusco, mediante técnicas estandarizadas.
7. Se comparó la actividad insecticida in vitro de las Acetogeninas obtenidas de extractos etanólicos al 70% a partir de semillas de de *Annona muricata* L.

(Masasamba) con el insecticida estándar Temefós, insecticida recomendado por la red latinoamericana de control de vectores. El efecto insecticida de las Acetogeninas de *Annona muricata* L. se demostró notablemente en los grupos que fueron sometidos a altas concentraciones de Acetogeninas mostrando un efecto insecticida parecido al estándar Temefós.

8. Se obtuvieron cepas de bacterias *Salmonella typhi* spp. para la determinación del efecto antibacteriano de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos al 70% de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).
9. Se realizó el control microbiológico de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos al 70% de *Annona muricata* L. reportándose libres de agentes contaminantes y en óptimas condiciones para la determinación del efecto antibacteriano.
10. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), de las Acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos al 70% de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba) frente a cepas de *salmonella typhi* spp. siendo la concentración de 100mg del concentrado de Acetogeninas a partir de la cual se produce inhibición del crecimiento bacteriano.
11. Se comparó la actividad antibacteriana in vitro de las Acetogeninas obtenidas de extractos etanólicos al 70% a partir de semillas de la especie vegetal *Annona muricata* L (Masasamba) con un antibacteriano estándar (Ciprofloxacino). El efecto antibacteriano fue muy marcado en dos concentraciones estandarizadas (362.99 mg y 450mg) con respecto al antibacteriano estándar generando un halo de inhibición mayor que esta.
12. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada ensayo. Mediante este análisis de los datos se corroboró que las Acetogeninas de *Annona muricata* L. presentan actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti* y antibacteriana frente a bacterias de *salmonella typhi* spp. objetivos principales de la presente investigación.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

- Realizar proyectos de investigación de diversas especies vegetales con actividad insecticida que ayuden a sostener el medio ambiente y disminuir la contaminación por insecticidas sintéticos.
- Realizar bioensayos con otros organismos vectores de enfermedades para confirmar la actividad biológica que poseen las semillas de *Annona muricata* L. y comparar esos resultados, con los obtenidos en esta investigación frente a *Aedes aegypti*.
- Continuar con estudios de fraccionamiento, identificación y separación de los diferentes componentes de los extractos de las semillas de *Annona muricata* L. para evaluar su actividad individual y en mezclas.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos de las hojas, flores, tallo y raíz de la *Annona muricata* L. para elegir los extractos con mayor actividad para su aplicación como biopesticida.
- Realizar estudios con otras enterobacterias para confirmar la actividad antibacteriana que poseen las semillas de *Annona muricata* L. y comparar esos resultados, con los obtenidos en esta investigación frente a cepas de *salmonella typhi* spp.
- Realizar estudios con cepas ATCC de *salmonella typhi* con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en la presente investigación de la actividad antibacteriana de las Acetogeninas de *Annona muricata* L. frente a cepas de *salmonella typhi* spp
- Fomentar la investigación para poner en práctica los conocimientos adquiridos durante nuestra formación profesional.
- Realizar convenios con instituciones que se dediquen a prevenir y controlar problemas de salud en nuestra localidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la salud. Nota informativa N°100. Diciembre de 2009. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/es/>
2. Parra Henao G.J.; García p. C.M; Cotes T.J.M.
Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* vector del Dengue en Colombia. 2007.
3. Carrero, J.
Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales. 1 Ed.
Mundi-Prensa. Madrid 1996.
4. Cardona W.
Acetogeninas en el Extracto Hexánico de Raíces de *Rollinia membranaceae*.
Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, 1993.
5. Vassena c, Picollo m
Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *triatoma infestans* y *rhodnius prolixus*, insectos vectores de la enfermedad de chagas
Tesis. Provincia de Buenos Aires. Argentina; 2003.
6. Programa de Divulgación Científica. El virus de la fiebre amarilla Un virus científicamente olvidado; Universidad, Ciencia y Desarrollo; fas 8, TOM II
Disponible en:
<http://www.urosario.edu.co/investigacion>
7. Revista peruana de medicina experimental y salud pública ISSN 1726- 4634
versión impresa.
Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos del dengue en el Perú -2001.
8. Reportes de dengue, sistema de vigilancia epidemiológica DIRESA cusco
2009 – 2011
9. Farmer J.J.
Enterobacteriaceae: introducción e identificación manual de microbiología clínica octava edición. 2003.
10. Reportes de fiebre tifoidea y paratifoidea en consulta externa, por año, según región: 2002 - 2010 MINSA – Unidad Estadística.

11. Ministerio de Salud de la Nación. Normas Nacionales de Vacunación. 2003-2004. Disponible en:
<http://www.msal.gov.ar>.
12. Barriga R.
Plantas Útiles de la Amazonía Peruana. Concytec. 1994.
13. Márquez A,C., Lara O,F., Esquivel R.B.
Plantas medicinales de México II composición, uso y actividad biológica ed. UNAM México.
14. Figueroa M.
Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas” revista BIOFARBO; Instituto De Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas Universidad Mayor de San Andrés-Bolivia, 1995.
15. Robinan C.
Investigación Científica y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe seminario tramil N°. 2. 1986.
16. Murillo J.
las *Annonaceae* de Colombia. biota colombiana. 2001, 2:49-58
17. Escobar T, W., Zarate R. Bastidas A.
Biología floral y polinización artificial del guanábano “*Annona muricata* L.” en condiciones del valle del cauca Colombia. pp. 1994. 7-11.
18. Montoya J.
Acetogeninas de *Annonaceae* como pesticidas naturales sobre larvas del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (lep: noctuidae). Boletín del museo de Entomología de la Universidad del Valle, 32-40.2005.
19. Marmara, L.M.
Veinte plantas medicinales, instituto de ciencia y tecnología agrícola, publicaciones recursos naturales, 28-35.2004.
20. Mc. Lughlin, L.; Zeng, N.H. Oberlies, GX; Zhao Z,M.
Recent avances in phytochemistry. Mata, R and Romeo, J.T Plenum Pres, 249-310.1995. Disponible en:
<http://recursosbiblioteca.edu.co/tesisdigitales/texto/58322C395.pdf>.

21. Romain A.D, Poupon, E, Romero V.E, Peris E, Lewin G, Cortes D, Brandt V, Hocquemiller R.
Acetogeninas presentes en semillas de plantas de la familia Annonaceae como *A. muricata* *A. cherimolia*, *A. esquamosa* y de otras Anonáceas 62,6248-6257.
22. Cave, A. Figadere, B., Laurens, A and Cortes, D.
Acetogenin from *annonaceae* progress in the chemistry of organic natural products springer – verlay, New York 81-287.
23. Pereira, A.M.;Ferro D.
Monografía de diez plantas medicinales. Unidad de conservación de plantas medicinales de cerrado- Brasil. p7- 2008.
24. TAPIA M.
Semillas Andinas. CONCYTEC. 1993.
25. MINSA, Unidad de Estadística e Informática del Hospital de Apoyo Departamental Cusco, 2010.
26. Comisión Nacional Forestal.
Annona muricata. L. (1753). Publicado en: Species Plantarum 1: 536-537. 1753.1991.
27. CORREA C. A.
Acetogeninas en las Semillas de *Rollinia membranaceae*. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín 1992.
28. CORREA J, BERNAL H.
Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello Tomo I. Editorial Guadalupe Ltda. Bogotá, Colombia 1989.
29. GARCIA KK.
Aislamiento y caracterización estructural de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona muricata* y *Annona cherimolia*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterápico. Tesis México, 2009. Disponible en:
<http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisdigitales/texto/58322C355.pdf>
30. Florez, L., Mesa V.
Monografía sobre Pruebas de Actividad biológica con dos organismos modelos en Acetogeninas de *Annonaceae* con actividad biopesticida. Colombia 2007.

31. Bernard P, Charles V, Urbano terrón P.
Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa Madrid. 2004.
32. Romero R.
Microbiología y Parasitología Humana bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias 3° edición 1997.
33. Borda C. E, Mosqueda L. Sario, H.
Vector de la Fiebre Amarilla Urbana y el Dengue en la Ciudad Corriente de Argentina Centro Nacional de Parasitología y Enfermedad Tropicales.
34. Organización Panamericana de la Salud (OPS).
Revisión del dengue por la Comisión de infecciones emergentes revista v.18 versión impresa 2001.
35. Instituto nacional de Salud (INS) Protocolo de vigilancia y control de Dengue INT-R02.002.4020-009 Página 6 – 18 V00, 2010
36. SALVATELLA AGRELO R.
Aedes aegypti Linneaus 1762, Diptera Culicidae. El vector del dengue y fiebre amarilla Consultor nacional de OPS/OMS en Uruguay.
37. ATIAS A.
Parasitología clínica, sociedad médica de Santiago publicaciones medicas el Mediterráneo, 1999.
38. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL) - Oficina de Comunicaciones y Administración, 2009. Disponible en : www.rap-al.org / info@rapal.cl.
39. Red Latinoamericana de Control de Vectores, protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Iguazú, 2005.
40. ROMERO R.
Microbiología y Parasitología Humana bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias 3° edición 1997.
41. JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG
Microbiología medica 18 ed. México. Editorial Manual Moderno, 2008.

42. BRAVO R, PUGA M.S, BARREIRO D.
Presentación de un caso atípico de fiebre tifoidea. República cubana p.54-57. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000100009&lng=es&nrm=iso
43. BERNARD D. DUVELCO H.E.
Tratado de Microbiología con inclusión de Inmunología y Genética Molecular, 3 edición, México, Salvat Editores
44. KONEMAN E W., STEPHEN D. ALLER.
Diagnostico Microbiológico. Madrid España. Editorial Médica Panamericana, 1992.
45. LASTRA J, ARIAS E.
Disponible en:
<http://monografias.com.trabajos10/10cinrec/10cinrec.shtm#dos>.
46. GOODMAN & GILMAN.
Las bases farmacéuticas de la terapéutica, decimo primera ed. Editorial McGraw – Hill, México 2006.
47. ALVARADO J.C.
Antibióticos y Quimioterápicos 2 edición. AMP ediciones.2006.
48. Martínez J.A., Sánchez F.
Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínico. Barcelona. España. Agencia de Salud Pública. Barcelona. España.
Disponible en: http://enfermedades.infecciosas/barcelona_españa2141.es.
49. Brock, D.T.
Microbiología. 1991, primera edición. México editorial Pretince Hill.
50. MENDO RUBIO MANUEL.
Medios de cultivo en microbiología, manual de laboratorio 5º edición, Ediciones laboratoriales SRL. 2005
51. DIGESA. Dirección General de Salud “Criterio de Calidad Sanitaria e inocuidad de alimentos” Cusco – Perú 1999.
52. Red de Salud de Cuba
INFOMED. Disponible en:
http://www.sld.cu/servicios/medicamentos/medicamentos_list.php?id=470

53. VILLENA M.
Métodos de investigación científica y tecnológica.
54. UNAL procedimientos de laboratorio en la evaluación de toxicidad de agentes naturales. departamento de química grupo de productos naturales - Colombia.
55. Florez, Y.
Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en Semillas de *Annona muricata L.* de la región cafetera, tesis Colombia 2010.
56. Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI-2006.
57. Domínguez, X.
Métodos de investigación fitoquímica, tercera edición editorial Limusa, S.A. México D.F. pp.229-238.
58. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México.
Tesis "Aislamiento y caracterización estructural de Acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona cherimolia*, evaluación genotóxica y potencial Quimioterápico". 2009.
59. Lock de Ugaz, O.
Investigación fitoquímica métodos en el estudio de productos naturales, segunda edición, Editorial de la Universidad Pontificia Católica de Lima pp.1-53,281.
60. Sharapin Nicolay (2000)"fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos segunda edición".
61. Skoog, L.
Aislamiento e identificación de sustancias por técnicas cromatográficas cuarta edición, 2000.
62. Cave, A; Hocquemiller, R.
Utilización de Acetogeninas en terapéutica, en cuanto a sustancias antiparasitarias. España 1994.
63. Yang H., Zhang N., Zeng Q.
HPLC Method for the simultaneous determination of ten Annonaceus Acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. International Journal of Biomedical Science 2010.
64. Manual de campo para la vigilancia Entomológica, 2001 elaborado por la DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental).

65. Baron F,J., Tellez F.
Apuntes de bioestadística, primera edición. 1998.
66. MERCK. Manual de medios de cultivo- 1994.
67. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades: Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas y Organización Mundial de la Salud, Enfermedades Transmisibles: Vigilancia y Respuesta.
"Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo". 2004.
68. MALDONADO, G; SIANCAS, V.
Tesis "Actividad Antibacteriana in vitro de *Tropaeolum majus* (MASTUERZO) frente a bacterias Gramnegativas causantes de Infecciones Urinarias y Bacterias Grampositivas Causantes de Infecciones Respiratorias en Pacientes del Hospital Regional del Cusco de Noviembre del 2002 a Febrero del 2003" Tesis para optar al Título Profesional de Químico-Farmacéutico. Cusco-2003.
69. Yang-chang W.
cytotoxic *Annonaceous*, acetogenins from *Annona muricata*. pub. US 2003/0144348A1. United States.2003.
70. Roblot, F., Laugel, T., Lebceuf, M., Cavet, A.
Two acetogenins from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry*, vol. 34, Nº1, pp. 281-285.1993.
71. Zhe-Ming, G., Xin-ping, F., lu zeng, K., McLaughlin, J.
Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from seeds of *Annona muricata*. Purdue University, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy 1995.
72. Fontana, JD., Lancas, F.M., Passos, M.
Selective polarity and absorption guided extraction/ purification of *Annona sp.* Polar Acetogenins and biological assay against agricultural pests.
73. Haijun, Y., Xiang L., Yuping T., Ning Z., Jianwei C., Baochang C.
Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008.

74. Hui, Y.J., Rupprecht, J.K., Liu, M., Anderson, J.E., Smith D.L., Chang C-J, and McLaughlin, J.
bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive Acetogenins from *annona bullata*. *Journal of Natural Products* Vol. 52. No. 3, pp. 463-477. Maydun 1989.
75. PhD PharmD Alice Melot, PharmD Gue´rineau, V., PharmD, PhD Eng, C., PharmD, PhD Djibril F.
Quantification of Acetogenins in *Annona muricata* Linked to Atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *Institut de Chimie des Substances Naturelles*, 2005.
76. Geng-Xian Zhao, Laura R. Miesbauer, David L. Smith, and Jerry L. McLaughlin
Asimin, Asiminacin, and Asiminecin: Novel Highly Cytotoxic Asimicin Isomers from *Asimina triloba* *Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue Univeresity, West Lafayette, Indiana 47907 Received November 24, 1993.*
77. Feras Q. Alali, Xiao-Xi Liu, and Jerry L. McLaughlin*
Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 4790. 1998.*
78. Rupprecht, J.K., Hui Y-H, and L. McLaughlin J.
Annonaceous Acetogenins: a review. *Department of Medicinal Chemistry and Phamacognosy, School of Pharmacy and Pharmacol Sciences, Pur& University, West Lafayette, Indiana 47907. 1990.*

ANEXOS

ANEXO N°1 CERTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.

CERTIFICACION.

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado al Herbario Vargas (CUZ); certifica, que el Señorita **Judith Callo Condori** y el Señor **Harol Eduardo Farfán Barrientos**, Bachilleres de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado a éste Herbario una muestra botánica, para su determinación taxonómica, la que al ser diagnosticada utilizando bibliografía especializada y comparar con muestras del Herbario; corresponde a la siguiente especie: ***Annona muricata*** Linnaeus y cuya posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Arthur Cronquist (1988) compatibilizado con las propuestas de Judd, Campbell, Kellogg y Stevens (1999), es la siguiente:

División : Magnoliophyta (= Angiospermas)
Clase : Magnoliopsida (= Dicotiledoneas)
Subclase : Magnolidae (=Tricolpados – Eudicotiledoneas)
Super Orden : Magnolianaes
Orden : Magnoliales
Familia : Annonaceae
Género : *Annona*
Especie : ***Annona muricata*** Linnaeus

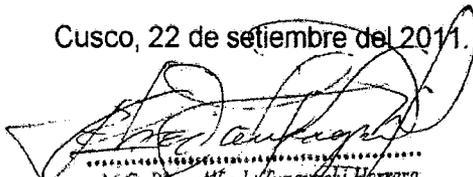
Sinonimias :

Annona bomplandiana H.B.K.
Annona cearensis Barbosa Rodrigues.
Annona macrocarpa Wercklé.
Annona muricata var. *borinquensis* Morales.
Guanabanus muricatus (L.) Gómez.

Nombres comunes : "masa samba"; "guanábana"; "huanábano";

Se les expide la presente certificación, para los fines que vieran por conveniente los interesados.

Cusco, 22 de setiembre del 2011.


M.C. B. go. Alfredo Tupayachi Herrera
Prof. Investigador Asociado al Herbario Vargas (CUZ)

ANEXO N°2 CERTIFICACION DEL ANALISIS CROMATOGRÁFICO.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS,
FARMACIA e INFORMÁTICA
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD - ÁREA DE CROMATOGRFÍA**

CONSTANCIA

Los que suscriben, Responsables del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad De Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, dejan Constancia.

Que los Bachilleres: **JUDITH CALLO CONDORI Y KAROL EDUARDO FARFÁN BARRIENTOS**, de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, han presentado al Laboratorio de Cromatografía una muestra de concentrado de acetogeninas de *Annona muricata L.* para la caracterización e identificación de componentes acetogénicos. Dicho material ha sido caracterizado utilizando el Cromatógrafo líquido Agilent 1200- acoplado a un detector de arreglo de diodos. La identificación se basó en la comparación de los tiempos de retención de los picos del cromatograma con referencias bibliográficas determinados bajo las mismas condiciones. Del análisis efectuado se reportan 8 posibles acetogeninas de 32 componentes determinados para los cuales se indican los tiempos de retención y la longitud de onda máxima.

PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	λ MAX.	POSIBLE ACETOGENINA
11	9.104	201	12,15, cis-squamostatin A
18	17.625	205	Squamostatin A
19	18.469	202	Bullatacina
24	24.985	210	Squamostatin D
26	28.966	211	Squamocina
27	30.600	210	Iso-desacetilivaricina
28	35.721	200	Asimicina.
30	53.471	203	Desacetilivaricina.

Se expide la siguiente constancia a solicitud de los interesados para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 12 de Setiembre del 2011.

Qco. Jorge Choquenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía -
UNSAAC.

Mgt. Nancy Accostupa Quispe
Analista del Laboratorio de Cromatografía -
UNSAAC.

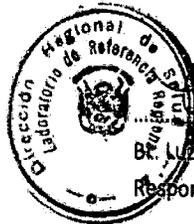


GOBIERNO REGIONAL DEL CUSCO
DIRECCION REGIONAL DE SALUD CUSCO
LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL



“CUSCO CAPITAL HISTORICA DEL PERÚ”
“AÑO DE LA CONSOLIDACION DEMOCRATICA”

INFORMÉ DE RESULTADOS													
Establecimiento		Centro de Salud Quincemil (Equipo de Investigación)											
Referencia		Muestras entomológicas del mes de JULIO 2011											
Fecha de Recepción Laboratorio Referencial								: 23/07/2011		Fecha de Emisión		: 26/07/2011	
N°	FECHA	DISTRITO	LOCALIDAD	EE.SS.	TIPO	COLECTOR	ESTADIO	DIGESA	LABORAT. REFERENC.	TOTAL	OBSERVAC.		
84	13.07.1	Camanti	Quincemil	Quincemil	Larveo	Eq. Investig.	larva	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>	190			


 B^{ta} Luzmila Chevarría Pacheco
 Responsable de Entomología

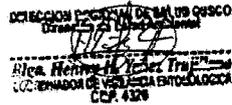

 Dirección Regional de Salud Cusco
 Blgo. Luis Ayma Comejo
 CDP 11501
 Director(a) Laboratorio de Referencia Regional

ANEXO N°4: CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DE LARVAS DE *Aedes aegypti*.

FICHA DE ENVIO DE MUESTRAS PARA CONTROL DE CALIDAD

FECHA	EE.SS.	PROVINCIA	DISTRITO	LOCALIDAD	ESPECIE	ESTADO	TOTAL
13/07/2011	QUINCE MIL	QUISPICANCHIS	CAMANTI	QUINCE MIL	Aedes aegypti	LARVA	190

COLECTORES: Blgo. Henry Yañez Trujillo DIRESA Cusco
 Blgo. Luis Leon Olayunca Red Sur
 Bach. Judith Callo Condori UNSAAC
 Bach. Eduardo Farfan Barrientos UNSAAC


 DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD DEL CUSCO
 Alca. Henry Yañez Trujillo
 COORDINADOR DE SERVICIOS ENTOMOLÓGICOS
 CEP. 4326



23 JUL. 2011

**ANEXO N°5: FICHA DE ENVIO DE MUESTRAS (larvas de Aedes aegypti)
 PARA EL CONTROL DE CALIDAD**

ANEXO N°7: CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS EXTRAIDAS A PARTIR DE EXTRACTOS ETANOLICOS AL 70% DE SEMILLAS DE *Annona muricata* L. (MASASAMBA)

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL CONCENTRADO DE ACETOGENINAS EXTRAIDAS A PARTIR DE EXTRACTOS ETANOLICOS AL 70% DE SEMILLAS DE *Annona muricata* (Masasamba).

SOLICITANTES: Br. Judith Callo Condori.

Br. karol Eduardo Farfan Barrientos

PARA: Tesis de Investigación

MUESTRA: Concentrado de Acetogeninas extraídas a partir de extractos etanolicos al 70% de semillas de *Annona muricata* (Masasamba).

FECHA: 25/06/2011

RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO.

Cuadro N° 1: Reporte De Resultados Del Control De Calidad Microbiológico del Concentrado de Acetogeninas extraídas a partir de extractos etanolicos al 70% de semillas de *Annona muricata* (Masasamba).

RMAMV (ufc)/ml	NMPCT	NMPC Termotolerantes	Investigación de Salmonella	RH Y L (ufc)/ml
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Donde:

Los indicadores microbiológicos tomados en cuenta para el análisis de la muestra en estudio son:

RMAMV = RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS VIABLES

NMPCT = NUMERO MAS PROBABLE DE COLIFORMES TOTALES

NMPC = NUMERO MAS PROBABLE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

R H Y L = RECUENTO DE HONGOS Y LEVADURAS.

Ufc/ml = UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS POR MILILITRO.

METODOLOGÍA

Se siguió la metodología recomendada por el Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación de Bacteriología Alimentaria (**CLEIBA**).

CONCLUSION:

Por los resultados obtenidos, se tiene que la muestra cumple con los valores guía de la **OMS**, sobre calidad microbiológica.

El concentrado de Acetogeninas extraídas a partir de extractos etanolicos al 70% de semillas de *Annona muricata* (Masasamba), se encuentra libre de contaminación por gérmenes patógenos por lo que permite realizar la investigación correspondiente, sin ningún tipo de alteración microbiológica en los procedimientos a ensayar.

Interpretación de los resultados:

- Los microorganismos de salmonella, al no encontrarse en la presente muestra indica materias primas no contaminadas, limpieza y desinfección correcta.
- Los microorganismos de Coliformes totales, al no encontrarse en la presente muestra indica materias primas no contaminadas, limpieza y desinfección correcta.
- Los microorganismos aerobios mesófilos, al no encontrarse en la presente muestra indica materias primas no contaminadas, limpieza y desinfección correcta condicione adecuadas de tiempo y temperatura durante la producción o conservación.
- Al recuento de hongos y levaduras, indica que las condiciones de almacenamiento y conservación así como la sanitización de equipos y la calidad higiénica sanitaria del producto es buena.

BIBLIOGRAFÍA:

DIGESA (1999) dirección general de salud "Criterios de Calidad Sanitaria e Inocuidad de Alimentos" Cusco – Perú.


Mgt. Yanet Mendoza Muñoz
CBP N° 2617
ESPECIALIDADES ANALISIS BIOLÓGICOS
EDUCACIÓN UNIVERSITARIA E INVESTIGACIÓN
UNSAAC 1341 - FAC. MEDICINA HUMANA

ANEXO N°9: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LA PRUEBA ANTIBACTERIANA

N° de disco	concentración de Acetogeninas (mg/disco)	Diámetro del Halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Salmonella typhi</i> spp.		
		IG	IIG	Promedio
1	5			
2	10			
3	15			
4	20			
5	30			
6	40			
7	50			
8	60			
9	70			
10	80			
11	90			
12	100			
13	150			
14	200			
15	250			
16	300			
17	350			
18	400			
19	450			
20	500			

Fuente: Elaboración propia para registro de datos experimentales

ANEXO N°10: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LA PRUEBA ANTIBACTERIANA CON CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS.

N° de disco	concentración de Acetogeninas (mg/disco), ciprofloxacino	Diámetro del Halo de inhibición (mm) en cepas de <i>Salmonella typhi</i> spp.			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1	100				
2	123.97				
3	153.69				
4	190.52				
5	236.19				
6	292.81				
7	362.99				
8	450				
9	ciprofloxacino				
10	DMS				

Fuente: Elaboración propia para registro de datos experimentales

ANEXO N°11 MEDIOS DE CULTIVO

AGAR BISMUTO SULFITO SEGÚN WILSON y BLAIR

Indicaciones:

Selectivo para aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi* y otras Salmonellas, a partir de material clínico y otras clases.

Características:

El verde brillante y el bismuto inhiben considerablemente a los gérmenes de acompañamiento. Las colonias de salmonellas H₂S – positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias.

Composición (g/litro):

- Extracto de carne 5,0
- Peptona de carne 10,0
- D(+) – Glucosa 5,0
- Di-sodio hidrogenofosfato 4,0.
- Hierro (II) sulfato 0,3
- Verde brillante 0,025.
- Indicador bismuto sulfito 8,0.
- Agar – agar 15,0.

Preparación:

Disolver 47 g/L calentando durante unos 30 minutos en baño maría hirviendo o a vapor fluyente, no esterilizar al autoclave. Tras la distribución homogénea del precipitado producido se vierte en placas, en capa gruesa.

Este medio de cultivo, turbio debe presentar un color verde pálido. En caso de coloración parduzca el medio de cultivo no es utilizable.

AGAR PLATE COUNT

Indicaciones:

Medio de cultivo exento de sustancias inhibidoras y de indicadores, concebido predominantemente para la determinación del número total de gérmenes en leche, productos lácteos, agua y otros materiales.

Características:

Se utiliza para el reconocimiento de gérmenes caseolíticos, puede añadirse leche descremada o caseinato.

Composición (g/litro):

- Peptona de caseína 5,0.
- Extracto de levadura 2,5
- D (+) glucosa 1,0.
- Agar – agar 14,0

Preparación:

Disolver 22,5 g/L y esterilizar al autoclave. Eventualmente incorporar – antes de esterilización – 10 ml/litro de leche descremada, o bien, 1,0 g/litro de leche descremada en polvo. PH: $7,0 \pm 0,1$.

AGAR MC CONKEY

Indicaciones:

Agar selectivo para aislamiento de Salmonella, Shigella y bacterias coliformes, a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales, etc.

Características:

Las sales brillantes y el violeta cristal inhiben considerablemente a la flora gran-positiva. La lactosa junto con el indicador de pH rojo neutro, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar.

Composición (g/litro):

- Peptona de caseína 17,0
- Peptona de carne 3,0.
- Cloruro de sodio 5,0.
- Lactosa 10,0.
- Mezcla de sales biliares 1,5.
- Rojo neutro 0.03.
- Violeta cristal 0,001.
- Agar – agar 13,5.

Preparación:

Disolver 50,0 g/L esterilizar al autoclave y verter en placas. PH: 7,1 ± 0,1.

AGAR MUELLER HINTON

Indicaciones:

Para el ensayo de la sensibilidad, para ensayos de resistencia de agentes patógenos, clínicamente importantes frente a antibióticos y sulfamidas, para la realización del ensayo de difusión en placas, para mejorar de forma considerable el crecimiento de microorganismos exigente, puede añadirse sangre al agar Mueller Hinton.

Características:

La composición de estos medios de cultivo garantiza, por una parte, condiciones favorables de crecimiento y por otra parte, cuenta con la ausencia, muy considerable, de antagonistas de las sulfamidas.

Composición:

- Infusión de carne 2.0
- Caseína hidrolizado 17.5
- Almidón 1.5
- Agar-agar 13.0

Preparación:

Disolver 34 gr en 1000ml de agua destilada, esterilizar con cuidado en autoclave durante 15 minutos a 122°C, enfriar eventualmente a 45-50°C posteriormente verter en placas petri dejar enfriar y endurecer. Para pruebas de control de calidad de la muestra, incubar a 37°C por 24 horas, posteriormente queda listo para ser utilizada. PH 7.4 más menos 0.2.

AGAR HECTOEN

Indicaciones:

Agar selectivo para demostración y para aislamiento de bacterias intestinales patógenas, inclusive *Shigella*, a partir de los más diversos materiales, como heces, alimentos, etc.

Frente a otros medios de cultivo selectivos, como por ejemplo agar SS, agar PBL y agar bismuto sulfito, el agar Hectoen ejerce escasa inhibición de *Salmonellas* y *Shiguellas* y, por tanto permite la obtención de altos rendimientos de estos germen.

Características:

Debido a ambos indicadores (azul de bromotimol y fucsina acida), las colonias lactosa-positivas muestran una expresiva diferencia frente a las colonias lactosa-negativas. Igual ocurre en el caso de colonias que fermentan lentamente la lactosa y fácilmente la sacarosa y la salicina (sustancias reaccionables fermentables con facilidad), lo que impide hallazgos patógenos falsamente positivos. La combinación de tiosulfato como sustancia reaccionante y una sal de hierro como indicador, presenta coloración negra a las colonias H₂S-positivas. Una mezcla de sales biliares reprime a una gran parte de flora de acompañamiento.

Composición (g/litro):

- Proteosa-pectona 12,0
- Cloruro de sodio 5,0
- Extracto de levadura 3,0.
- Levadura 12,0
- Lactosa 12,0.
- Salicina 2,0
- Sodio tiosulfato 5,0
- Amonio y hierro (III) citrato 1,5.
- Mezcla de sales biliares 9,0.
- Azul de bromotimol 0,064.
- Fucsina acida 0,04.
- Agar-agar 13,5.

Preparación:

Disolver 75g/L, no esterilizar al autoclave.

CALDO BHI

Indicaciones:

Para cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes.

Características:

Este medio de cultivo es apropiado para el cultivo de muchas bacterias exigentes como estreptococos, pneumococos, meningococos y otros.

El caldo cerebro-corazon es especialmente adecuado para el cultivo de estafilococos destinados al ensayo de plasmacoagulasa y para la realización de hemocultivos. El crecimiento de germen anaerobios o microaerofilos resulta decisivamente mejorado por la adición de pequeñas cantidades de agar agar.

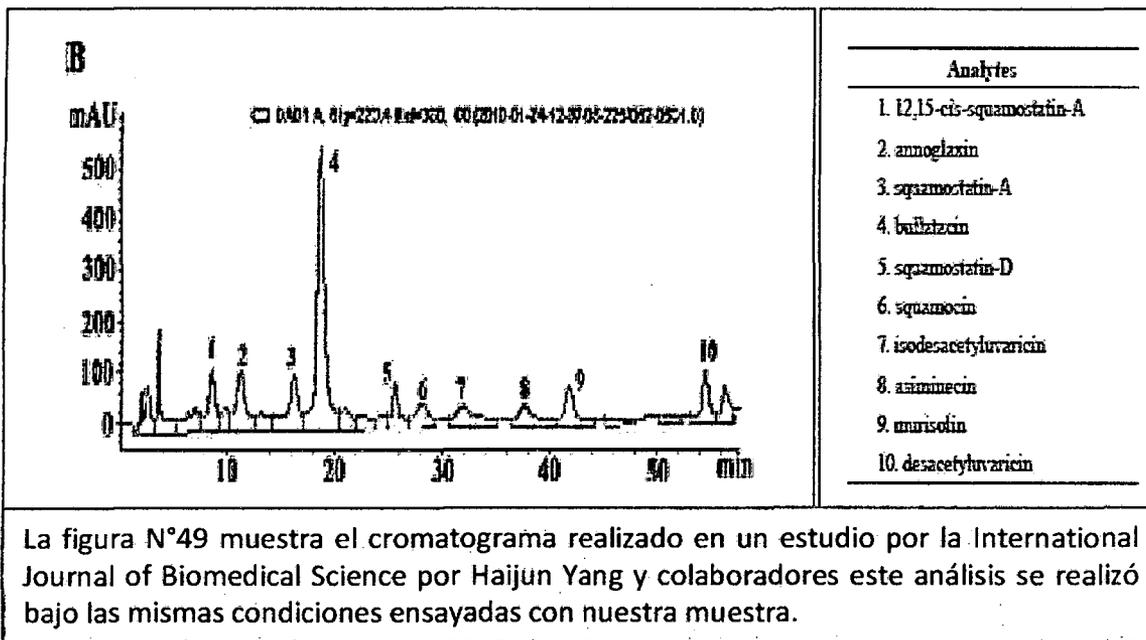
Composición (g/litro):

- Infusion de cerebro 12,5.
- Infusión de corazón 5,0.
- Proteosa-peptona 10,0
- D (+) glucosa 2,0.
- Cloruro de sodio 5,0.
- Di-sodio hidrogenofosfato 2,5.

Preparación:

Disolver 37 g/L y esterilizar al autoclave.

ANEXO N°12: CROMATOGRAMA DE ACETOGENINAS EN SEMILLAS DE ANNONA SQUAMOSA COMPARADO CON EL CROMATOGRAMA DE ANNONA MURICATA L. BAJO LAS MISMAS CONDICIONES DE ANÁLISIS.



Fuente: Yang, H. (International Journal of Biomedical Science) (61).

ANEXO Nº 13: REPORTE DE CASOS DE DENGUE Y FIEBRE AMARILLA EN LA REGION CUSCO.

DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD
 DIRECCIÓN DE INTELIGENCIA SANITARIA
 DIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGIA

CASOS REPORTADOS DE DENGUE AL SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DIRESA CUSCO 2009 – 2011

DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	2009	2010	2011			
			SIN SEÑALES DE ALARMA	SIN SEÑALES DE ALARMA	SIN SEÑALES DE ALARMA	CON SEÑALES DE ALARMA	GRAVE	TOTAL
CUSCO	QUISPICANCHI	CAMANTI			57			57
MADRE DE DIOS	MANU	HUEPETUHE		1	4	1		5
MADRE DE DIOS	MANU	MADRE DE		1				
MADRE DE DIOS	MANU	MANU			1			1
MADRE DE DIOS	TAHUAMANU	IBERIA			1	1		2
MADRE DE DIOS	TAHUAMANU	TAHUAMANU			1			1
MADRE DE DIOS	TAMBOPATA	INAMBARI		1	13		1	14
MADRE DE DIOS	TAMBOPATA	LABERINTO			3	1		4
MADRE DE DIOS	TAMBOPATA	TAMBOPATA	1	9	30	5	1	36
Total General			1	12	110	8	2	120

CASOS REPORTADOS DE FIEBRE AMARILLA AL SISTEMA DE VIGILANCI EPIDEMIOLÓGICA

DIRESA CUSCO 2000 – 2011

DEPARATAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	2000	2002	2003	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011
CUSCO	LA CONVENCION	ECHARATE		7	4	1	3	4	1	1	3	
CUSCO	LA CONVENCION	VILCABAMBA			2			6			5	
CUSCO	PAUCARTAMBO	KOSÑIPATA	1									
JUNIN	CHAMCHAMAYO	PICHANAQUI				1						
JUNIN	SATIPO	PANGO					1					
MADRE DE DIOS	TAMBOPATA	TAMBOPATA										1
Total General			1	7	6	2	4	10	1	1	5	1

ANEXO N°14: CASOS REGISTRADOS DE FIEBRE TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA EN CONSULTA EXTERNA, POR AÑO, SEGÚN REGIÓN: 2002 – 2010

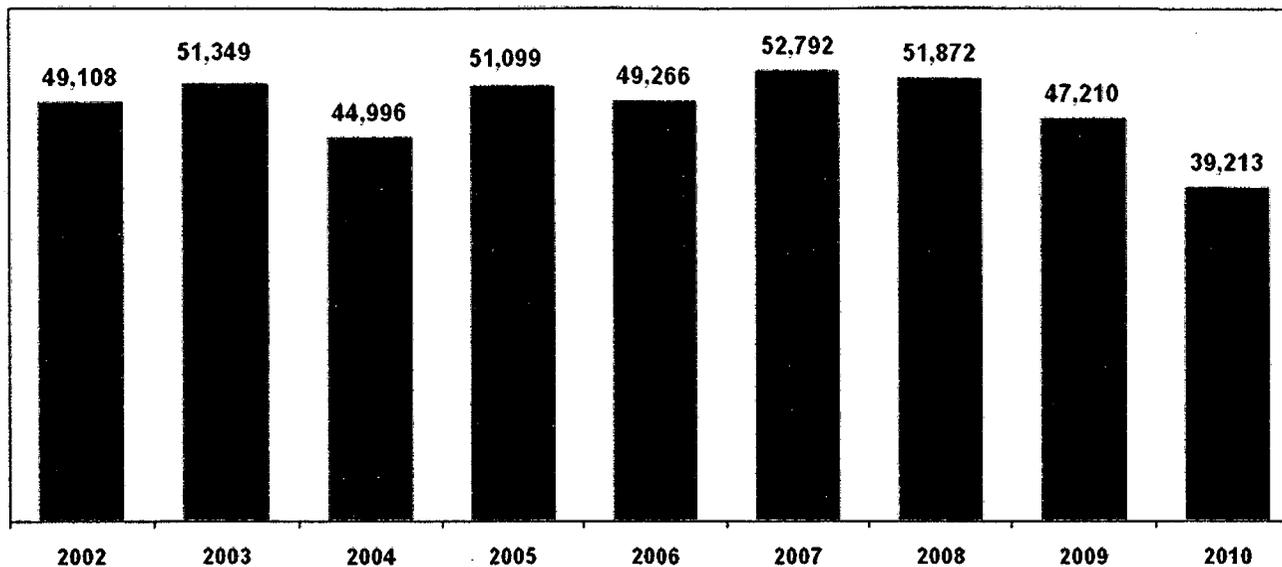
Casos registrados de fiebre tifoidea y paratifoidea en consulta externa, por año, según región: 2002 - 2010

Región	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Total	49,108	51,349	44,996	51,099	49,266	52,792	51,872	47,210	39,213
Amazonas	4,243	4,832	3,858	3,929	4,749	4,490	6,835	4,896	4,017
Ancash	1,029	1,414	1,367	1,089	927	996	844	801	612
Apurímac	583	508	728	1,048	954	904	939	677	552
Arequipa	1,896	1,814	1,569	1,835	1,464	1,515	1,172	1,080	777
Ayacucho	7,408	9,185	9,278	10,294	9,037	10,218	9,943	8,170	6,719
Cajamarca	10,862	11,057	10,406	10,996	10,854	10,570	8,702	7,094	5,241
Callao	1,254	1,125	660	431	304	373	462	414	423
Cusco	3,515	4,645	3,646	6,489	6,108	7,706	8,661	9,037	7,427
Huancavelica	223	171	213	227	206	328	241	371	257
Huánuco	938	832	748	691	632	1,059	738	663	1,006
Ica	707	738	538	774	874	798	892	916	951
Junin	1,283	1,163	1,068	1,253	1,411	1,354	1,060	1,120	1,196
La Libertad	2,503	2,160	1,781	2,358	2,267	2,349	2,071	1,841	1,175

Fuente: MINSA

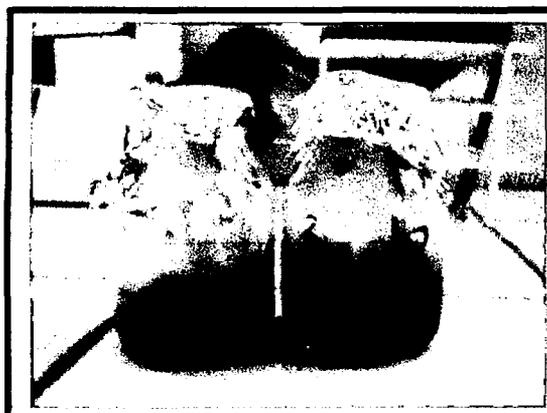
Elaboración: MVCS - OGEI - Unidad Estadística

**PERÚ: Casos registrados de fiebre tifoidea y paratifoidea en consulta externa
(2002 - 2009)**



Fuente: Ministerio de Salud
Elaboración: MVCS - OGEI - Unidad Estadística

ANEXO N°15: ARCHIVO FOTOGRAFICO DE RESULTADOS.

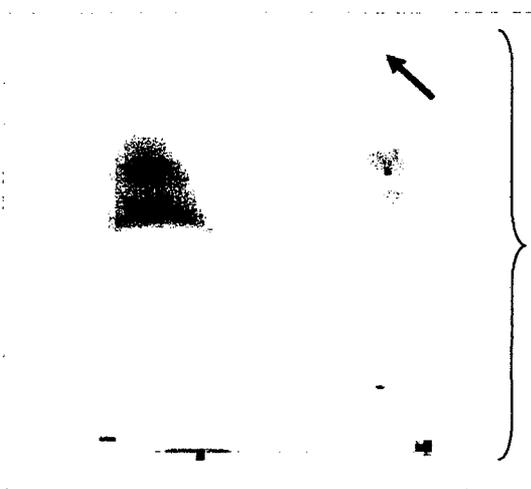


ACETOGENINAS DE *Annona muricata* L.

En esta figura se aprecia el resultado final de todo el proceso de extracción con solventes de diferente polaridad hasta obtener las Acetogeninas (producto final), cuyas características organolépticas son corroborados con bibliografía.

Fotografía N°01 concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



El resultado después del análisis cromatográfico en capa fina de la muestra en análisis dió resultado positivo al reactivo de Kedde. La flecha indica la coloración rosa tenue que es apreciable a lo largo de la cromatoplaça ensayada en las tres corridas simultáneas realizadas, lo cual indica la presencia de Acetogeninas en la muestra extraída de semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Fotografía N°02:placa de Silicagel revelada con reactivo de Kedde

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



En la siguiente figura se muestran los resultados de las pruebas de solubilidad que se le realizó al concentrado de Acetogeninas, para lo cual se usaron solventes de diferente polaridad como se aprecia en la tabla N° 16 que va en orden decreciente de polaridad desde el solvente mas polar como es el Agua hasta el solvente más apolar como es el Hexano.

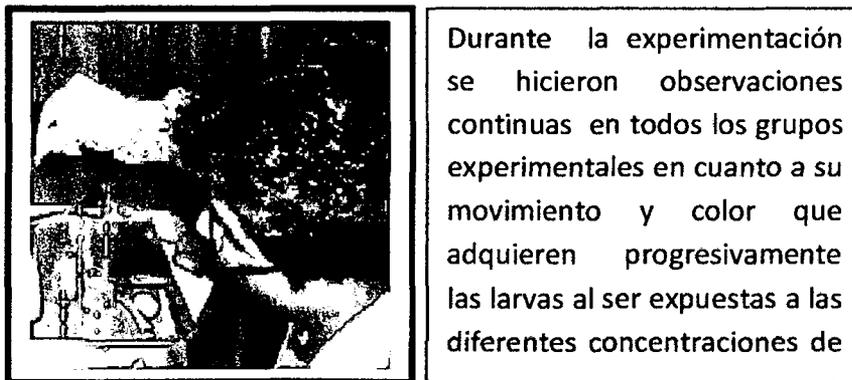
Fotografía N°03: Resultados de las pruebas de solubilidad de las Acetogeninas de las semillas de *Annona muricata* L. (Masasamba).

Fuente: Callo J y Farfán K.E



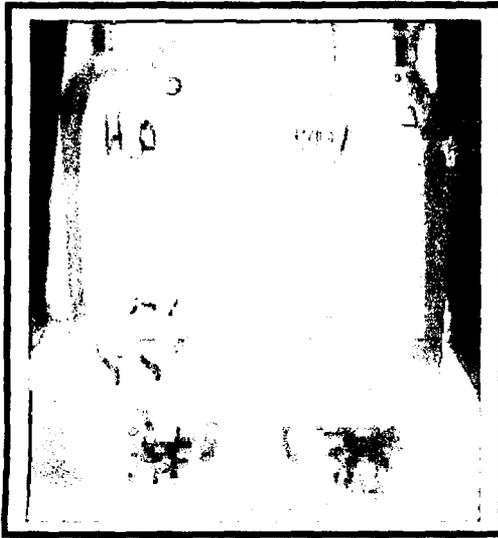
Fotografía N04: Equipo de HPLC mostrando los espectros UV del concentrado de Acetogeninas.

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



Fotografía N° 05 de las observaciones del efecto insecticida.

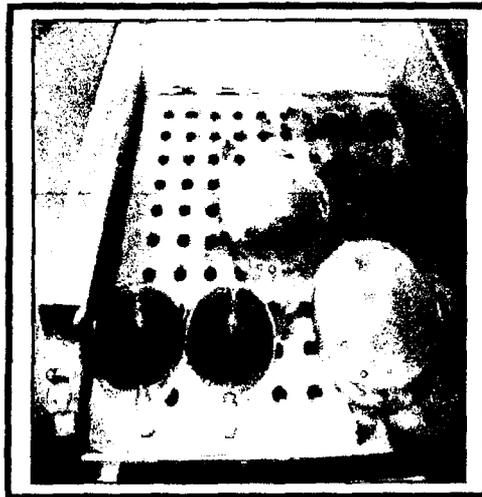
Fuente: Callo J y Farfán K.E.



En esta figura se puede observar claramente la diferencia de mortalidad existente entre el grupo experimental que no fue sometido a ninguna sustancia (grupo control negativo) y el grupo experimental I que fue sometido a una concentración de Acetogeninas de 10.000ppm. Se aprecia claramente la muerte en el grupo experimental sometido a Acetogeninas, mientras que en el grupo control negativo las larvas continúan vivas.

Fotografía N°06: Análisis comparativo de larvas muertas del grupo control negativo frente al grupo experimental I (concentración de Acetogeninas de 10000ppm).

Fuente: Callo J y Farfán K.E.



Los diferentes criterios de evaluación del control microbiológico resultaron negativos, evidenciándose en cada caso la ausencia de crecimiento microbiológico en los respectivos medio de cultivo.

Fotografía N°07: Control microbiológico del concentrado de Acetogeninas de *Annona muricata* L. (Masasamba)

Fuente: Callo J. y Farfán K.E.