



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA AGROINDUSTRIA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE GUAYUSA
FRENTE *Escherichia coli*
TRABAJO EXPERIMENTAL**

**Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención del título de
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**AUTOR
MOSCOSO CONTRERAS JORGE ENRIQUE**

**TUTOR
ING. ZÚÑIGA MORENO LUIS, M.Sc.**

GUAYAQUIL – ECUADOR

2024



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA AGROINDUSTRIA

APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, **Zúñiga Moreno Luis**, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE GUAYUSA FRENTE *Escherichia coli***, realizado por la estudiante **MOSCOSO CONTRERAS JORGE ENRIQUE**; con cédula de identidad **N° 0951530724** de la carrera **AGROINDUSTRIA**, Unidad Académica Campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz - Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Firma del Tutor

Guayaquil, 30 de junio del 2023.



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA AGROINDUSTRIA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación:” **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE GUAYUSA FRENTE *Escherichia coli***”, realizado por la estudiante **MOSCO SO CONTRERAS JORGE ENRIQUE**, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

Ing. Luis Calle, M.Sc.
PRESIDENTE

Ing. Yoansy García, M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Luis Zúñiga, M.Sc.
EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 18 de junio del 2024.

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico de manera especial a Dios quien me da las fuerzas necesarias y guía incondicional todos los días para luchar por mis metas, a mi padre y madre quienes siempre incentivaron e inculcaron en mí el deseo de superación y fueron el mayor soporte que tuve cada día, con su amor entrega y sacrificio me demostraban que aunque el camino es complicado los sueños se cumplen si luchas por ellos, a mis hermanas, familiares y amigos cercanos, quienes han estado presente a lo largo de mi vida estudiantil mostrándome su paciencia y apoyo absoluto.

Agradecimiento

Comienzo agradeciendo infinitamente a Dios por guiar los pasos que me hicieron llegar hasta este momento. Agradezco también de manera infinita a mis padres, que estuvieron a mi lado sin importar cuánto esfuerzo demandó, haciendo posible e incentivando cada acción que me acercara más a mis objetivos y metas de vida, a mi familia quienes me brindan su ayuda, consejos y disciplina cuando es necesario. Agradezco a los profesores que formaron parte de mi educación profesional por sus enseñanzas y correcciones, las cuales me ayudaron a mejorar académicamente con la finalidad de desempeñarme en el mundo laboral, y por supuesto, a compañeros y amigos que fueron ese apoyo continuo en momentos cruciales de mi vida en los que necesité aquellas palabras de ánimo reconfortantes para seguir.

Autorización de Autoría Intelectual

Yo, **MOSCO SO CONTRERAS JORGE ENRIQUE**, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE GUAYUSA FRENTE *Escherichia coli*”** para optar el título de Ingeniero Agroindustrial, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, 18 de junio del 2024

MOSCO SO CONTRERAS JORGE ENRIQUE
C.I. 0951530724

Índice general

PORTADA.....	1
APROBACIÓN DEL TUTOR	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimiento	5
Autorización de Autoría Intelectual	6
Índice general	7
Índice de tablas	12
Índice de figuras.....	14
Resumen	16
Abstract.....	17
1. Introducción.....	18
1.1 Antecedentes del problema.....	18
1.2 Planteamiento y formulación del problema	19
1.2.1. Planteamiento del problema.	19
1.2.2. Formulación del problema.	21
1.3 Justificación de la investigación	21
1.4 Delimitación de la investigación	22
1.5 Objetivo general	22
1.6 Objetivos específicos.....	22
1.7 Hipótesis	23

2. Marco teórico.....	24
2.1 Estado del arte.....	24
2.2 Bases teóricas	26
2.1.1. Guayusa.....	26
2.1.1.1. Descripción botánica.....	26
2.1.1.2. Taxonomía.	26
2.1.1.3. Ecología.	27
2.1.1.4. Compuestos químicos.....	27
2.1.2. Extractos vegetales.	27
2.1.2.1. Método de extracción.	28
2.1.2.1.1. Maceración.	28
2.1.3. Aditivos.....	28
2.1.3.1. Definición.....	28
2.1.3.2. Clasificación.....	29
2.1.3.2.1. Aditivos naturales y artificiales.	29
2.1.4. Microorganismos.	29
2.1.4.1. Definición.....	29
2.1.4.2. Clasificación.....	29
2.1.4.2.1. Microorganismos patógenos.	29
2.1.4.2.2. Bacterias gram positivas.	30
2.1.4.2.3. Bacterias gram negativas.....	30
2.1.4.2.4. Escherichia coli.	30

2.1.5. Crecimiento bacteriano.	31
2.1.5.1. Definición.	31
2.1.5.2. Fases de crecimiento de microorganismos.	31
2.1.5.2.1. Fase de latencia.....	31
2.1.5.2.2. Fase exponencial.	32
2.1.6. Método de evaluación actividad antimicrobiana.	32
2.1.6.1. Antibiograma Disco-Placa.	32
2.1.6.1.1. Definición.	32
2.1.6.1.2. Lectura de Antibiograma.	32
2.2.6.2. Oxitetraciclina.	32
2.2 Marco legal.	33
3. Materiales y métodos	36
3.1 Enfoque de la investigación	36
3.1.1. Tipo de investigación.	36
3.1.2. Diseño de investigación.	36
3.2 Metodología	37
3.2.1. Variables.	37
3.2.1.1. Variable independiente.....	37
3.2.1.2. Variables dependientes.	37
3.2.2. Tratamientos.	37
3.2.3. Diseño experimental.	39
3.2.4. Recolección de datos.	39

3.2.4.1. Recursos.....	39
3.2.4.1.1. <i>Materia prima.</i>	39
3.2.4.1.2. <i>Material biológico.</i>	39
3.2.4.1.3. <i>Reactivos.</i>	39
3.2.4.1.4. <i>Materiales y equipos.</i>	39
3.2.4.2. Métodos y técnicas.....	40
3.2.4.2.1. <i>Diagrama de flujo obtención extracto etanólico.</i>	40
3.2.4.2.2. <i>Descripción diagrama de flujo obtención extracto etanólico.</i>	41
3.2.4.2.3. <i>Diagrama de flujo obtención extracto metanólico.....</i>	42
3.2.4.2.4. <i>Descripción diagrama de flujo obtención extracto metanólico.</i>	42
3.2.4.2.5. <i>Diagrama de flujo obtención extracto etanol + metanol.</i>	44
3.2.4.2.6. <i>Descripción diagrama de flujo obtención extracto etanol + metanol. ..</i>	44
3.2.4.2.7. <i>Antibiograma.</i>	45
3.2.4.2.8. <i>Monitoreo tiempo de efectividad de extracto.....</i>	46
3.2.5. Análisis estadístico.....	47
4. Resultados	49
4.1 Obtención los extractos de la hoja de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) mediante solventes orgánicos: etanol, metanol, etanol-metanol	49
4.2 Análisis <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) frente a <i>Escherichia coli</i> mediante medición de los halos de inhibición como resultado de una prueba antibiograma	49
4.2.1. Actividad antimicrobiana extracto de guayusa con etanol.....	50

4.2.2. Actividad antimicrobiana extracto de guayusa con metanol.....	51
4.2.3. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos + metanólicos de guayusa.....	52
4.3 Determinación del tiempo en el que la cepa bacteriológica pasa de la fase de latencia a la fase exponencial incubado <i>in vitro</i> con los extractos de la hoja de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> Loes) con los solventes orgánicos	53
5. Discusión	56
6. Conclusiones.....	59
7. Recomendaciones.....	60
8. Bibliografía.....	61
9. Anexos	71
9.1 Anexo 1. Descripción taxonómica de la guayusa y estructuras celulares...	71
9.2 Anexo 2. Código de regulación para el uso de la oxitetraciclina	72
9.3 Anexo 3. Decretos legislativos y normativas ecuatorianas reguladoras de alimentos.....	73
9.4 Anexo 4. Obtención de extractos de guayusa	75
9.5 Anexo 5. Datos tabulados de porcentaje actividad antimicrobiana	77
9.6 Anexo 6. Datos recopilados de las fichas crecimiento de cepa bacteriológico.....	84
9.7 Anexo 7. Prueba de normalidad.....	94

Índice de tablas

Tabla 1. Obtención de solventes	37
Tabla 2. Tratamientos antimicrobianos	38
Tabla 3. Predicción de crecimiento <i>Escherichia coli</i>	46
Tabla 4. Esquema para análisis ANOVA antibiograma	48
Tabla 5. Porcentajes de halo de inhibición extracto de guayusa con etanol	51
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del extracto de guayusa con metanol	52
Tabla 7. Porcentaje de inhibición del extracto de guayusa con etanol+metanol ..	53
Tabla 8. Porcentajes de inhibición de todos los tratamientos.....	54
Tabla 9. Media de crecimiento UFC por tratamiento 1	54
Tabla 10. Media de crecimiento UFC tratamiento 5	55
Tabla 11. Taxonomía de la guayusa	71
Tabla 12. Datos tabulados de los once tratamientos.....	80
Tabla 13. Análisis de varianza.....	81
Tabla 14. Placa 1, tratamiento 1.....	84
Tabla 15. Placa 2, tratamiento 1.....	84
Tabla 16. Placa 3, tratamiento 1.....	85
Tabla 17. Placa 4, tratamiento 1.....	85
Tabla 18. Placa 5, tratamiento 1.....	86
Tabla 19. Placa 6, tratamiento 1.....	86
Tabla 20. Placa 7, tratamiento 1.....	87
Tabla 21. Placa 8, tratamiento 1.....	87
Tabla 22. Placa 9, tratamiento 1.....	88
Tabla 23. Placa 10, tratamiento 1.....	88
Tabla 24. Placa 1, tratamiento 5.....	89
Tabla 25. Placa 2, tratamiento 5.....	89

Tabla 26. Placa 3, tratamiento 5.....	90
Tabla 27. Placa 4, tratamiento 5.....	90
Tabla 28. Placa 5, tratamiento 5.....	91
Tabla 29. Placa 6, tratamiento 5.....	91
Tabla 30. Placa 7, tratamiento 5.....	92
Tabla 31. Placa 8, tratamiento 5.....	92
Tabla 32. Placa 9, tratamiento 5.....	93
Tabla 33. Placa 10, tratamiento 5.....	93

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo extracto etanólico	40
Figura 2. Diagrama de flujo extracto metanólico	42
Figura 3. Diagrama de flujo obtención extracto de etanol+metanol	44
Figura 4. Ficha para monitoreo	47
Figura 5. Pared celular gram positivas	71
Figura 6. Pared celular gram negativa	71
Figura 7. Uso de oxitetraciclina	72
Figura 8. Constitución de la República del Ecuador	73
Figura 9. Soberanía Alimentaria, Constitución de la República del Ecuador	73
Figura 10. Constitución de la República del Ecuador, Art.15	74
Figura 11. Normas INEN Aditivos.....	74
Figura 12. Normas INEN, Definiciones.....	75
Figura 13. Obtención de polvo fino de guayusa	75
Figura 14. Solventes orgánicos utilizados para extracción.....	76
Figura 15. Obtención de extractos mediante rotavapor.....	76
Figura 16. Obtención de extractos mediante rotavapor.....	76
Figura 17. Placas para siembra.....	77
Figura 18. Extractos de guayusa y placas listas para siembra de microorganismo	77
Figura 19. Siembra de placas y colocación de discos	77
Figura 20. Colocación de discos en las placas.....	78
Figura 21. Muestras de blanco, extractos y antibiótico.....	78
Figura 22. Muestras de extracto con etanol al 30 %	78
Figura 23. Muestras de metanol + guayusa al 30 %	79
Figura 24. Muestras de disco en blanco.....	79

Figura 25. Análisis estadístico extracto etanol	81
Figura 26. Análisis estadístico extracto metanol	82
Figura 27. Análisis estadístico extracto etanol+metanol.....	82
Figura 28. Resultados de prueba no paramétrica de Kruskall Wallis	83
Figura 29. Tratamiento 1 (guayusa + etanol al 30 %)	94
Figura 30. Monitoreo tratamiento 5 (guayusa + metanol al 40 %).....	94
Figura 31. Prueba de normalidad Shapiro Wilks	94

Resumen

La evaluación de los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) empleando solventes orgánicos como etanol y metanol como antimicrobianos contra *Escherichia coli* es un trabajo experimental que se desarrolló debido a la resistencia generada por este microorganismo. Esta investigación se basó en la obtención de los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) mediante solventes orgánicos: Etanol, metanol, etanol-metanol una vez realizada este paso, se analizó *in vitro* la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) frente a *Escherichia coli* mediante medición de los halos de inhibición como resultado de una prueba antibiograma cuyos resultados expusieron que los mejores tratamientos fueron T1 y T5 correspondientes al extracto de hoja de guayusa con etanol al 30 % y al extracto con hoja de guayusa con metanol al 40 %. De estos tratamientos que resultaron los mejores entre los utilizados (exceptuando al antibiótico el cual obtuvo diferencias significativas) se determinó el tiempo en el que la cepa bacteriológica pasó de la fase de latencia a la fase exponencial incubado *in vitro* el resultado de dicha evaluación demostró que estos poseían un tiempo mayor de 24 horas y con un pH ácido de 2.2.

Palabras claves: *Escherichia coli*, metanol, etanol, guayusa, actividad antimicrobiana.

Abstract

The evaluation of guayusa leaf extracts (*Ilex guayusa* Loes) using organic solvents such as ethanol and methanol as antimicrobials against *Escherichia coli* is an experimental work that was carried out due to the resistance generated by this microorganism. This research was based on obtaining guayusa leaf extracts (*Ilex guayusa* Loes) using organic solvents: ethanol, methanol, ethanol-methanol. Once this step was completed, the antimicrobial activity of the guayusa leaf extracts (*Ilex guayusa* Loes) against *Escherichia coli* was analyzed in vitro by measuring the inhibition zones resulting from an antibiogram test. The results showed that the best treatments were T1 and T5, corresponding to guayusa leaf extract with 30% ethanol and guayusa leaf extract with 40% methanol, respectively. Among these treatments, which were the best among those used (excluding the antibiotic, which showed significant differences), the time for the bacterial strain to transition from the latency phase to the exponential phase was determined by in vitro incubation. The result of this evaluation demonstrated that these treatments had a time greater than 24 hours and an acidic pH of 2.2.

Keywords: *Escherichia coli*, methanol, ethanol, guayusa, antimicrobial activity.

1. Introducción

1.1 Antecedentes del problema

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) es una planta amazónica utilizada desde tiempos remotos por las poblaciones indígenas asentadas en la región amazónica debido a sus propiedades medicinales, en la actualidad, existen estudios como el realizado por Portela (2020) en el cual evalúa los extractos de guayusa obtenidos mediante el uso de solventes orgánicos como el etanol para poder determinar la actividad o inactividad de esta frente a cepas de microorganismos patógenos como *Helicobacter pylori* principal causa de enfermedades infecciosas estomacales.

Ruiz y Roque (2009) expusieron que, en los últimos años se ha evidenciado un incremento de enfermedades infecciosas, entre las cuales destacan las fúngicas, poniendo en riesgo la salud de pacientes inmunocomprometidos, de modo que, debido a la alta toxicidad que poseen algunos fármacos es que se esta procurando el uso de nuevos agentes antifúngicos con mayor potencial y mucho más seguros, entre los cuales se encuentra la hoja de la guayusa.

Bajo este mismo concepto, numerosos estudios han demostrado que la mayor cantidad de casos de enfermedades infecciosas o toxicológicas en el mundo son de transmisión alimentaria. Algunas de estas enfermedades son la enteritis o enfermedades diarreicas (aproximado 70%) provocadas por ciertos factores como la costumbre o el desarrollo de ciertas actividades como comer fuera de casa (Dueñas, Jarret, Cummins y Logan, 2016; Zúñiga y Caro, 2017; Djaja, Ramadini y Wispriyono, 2018).

La seguridad alimentaria y el impacto en la salud humana han cambiado el concepto de alimento haciéndole sufrir una transformación radical en los últimos tiempos. La aparición de casos múltiples de infecciones e intoxicaciones

causadas por microorganismos patógenos se ha vuelto la segunda mayor preocupación de la seguridad alimentaria (Briz y De Felipe, 2021).

Microorganismos como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, entre otras se han vuelto una preocupación debido a que se encuentran principalmente en las carnes crudas y recurrentemente en la comida rápida preparada deficientemente por lo que se han ido desarrollando investigaciones en torno a la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y aceites esenciales con el fin de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* para uso alternativo de antimicrobianos sintéticos y desarrollo de una nueva fuente antimicrobiana de manera natural y su posible aprovechamiento en alimentos (Huda, Julfiker, Sirajul, Khan y Begum, 2013; Cabrera, 2019; Fulham, Webster, Power y Gray, 2022; Xu *et al.*, 2022).

En años recientes, Wintola y Afolayan (2015) realizaron un estudio en el cual exponen el uso de ciertas plantas consideradas medicinales para el tratamiento de enfermedades como la guayusa, convirtiéndolas en la base de la fabricación de nuevos medicamentos, no obstante, para ello, fue necesario caracterizar cada una de las plantas a utilizar y realizar diferentes ensayos para clasificarlos como viables. Por tal motivo, el presente trabajo investigativo tiene la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de dos concentraciones de extractos de la hoja de guayusa empleando dos solventes orgánicos.

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1. Planteamiento del problema.

Durante los últimos años existieron alertas sanitarias debido a la contaminación por *Escherichia coli* encontrada en alimentos frescos como la espinaca, alimentos congelados como faláfel, carne de res, ensaladas empacadas entre otras realizadas por el Centro de Enfermedades Control y Prevención de los Estados Unidos, entre 2021 y 2022 (Centro de enfermedades, control y prevención, 2022).

En contraste con el Ecuador, la aparición de esta cepa causante de enfermedades infecciosas estomacales es menos probable; sin embargo, no es imposible. En el Ecuador se registran casos de infecciones por *Escherichia coli*, en la gaceta ETAS SE 41-2022 expuesta por el Ministerio de Salud Pública (2022) y hasta el momento de esta investigación, los casos de *Escherichia coli* se encuentran contados entre los 5855 casos de infecciones/intoxicaciones causadas por alimentos hasta octubre del año 2022.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son de origen bacteriológicos entre las cuales se encuentra *Escherichia coli*, la cual representa una gran amenaza en la industria alimentaria a nivel mundial, por lo tanto, es de gran importancia mantener un control debido mediante Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para salvaguardar la salud de los consumidores ya que ha demostrado tener resistencia frente a las quinolonas, en Australia aumentó su resistencia de 7% en 2001 a un 25.5% en 2010 y representa un 30% de las enfermedades de origen alimenticio en Reino Unido (Vásquez, 2003; Aguilar, 2015; Fernández *et al.*, 2021).

Debido a que esta bacteria ha aumentado su resistencia hacia los antibióticos convencionales se proponen el desarrollo de investigaciones para que de esta forma surjan nuevas alternativas naturales las cuales tengan la capacidad de inhibir su crecimiento bacteriano como la guayusa (López, León, Jiménez y Chaidez, 2009; Beltrán, Lavilla, Cebollada, Calderón y Torres, 2020).

La guayusa al ser considerada una planta medicinal con poder antioxidante, estimulante, energizante y diurético se ha puesto en la mira de investigadores con las ansias de demostrar que esta posea propiedades antimicrobianas que pueden ser utilizadas para inhibir la proliferación de enfermedades producidas por *Escherichia coli* (Radice y Vidari, 2007; Tituaña, 2013).

1.2.2. Formulación del problema.

De las concentraciones propuestas, ¿Cuál fue el extracto que presentó mayor efectividad antimicrobiana contra la cepa de *Escherichia coli*?

1.3 Justificación de la investigación

Ecuador es un país que posee una extensa flora, haciendo que, el uso de las hierbas o plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades se remonte al propio surgimiento del hombre. Plantas como la guayusa han sido utilizadas para el tratamiento de infecciones agudas o crónicas; sin embargo, existen pocos estudios en la literatura científica sobre ello, la cual está destinada a comprobar propiedades atribuidas por los antepasados.

Un estudio realizado por Castañeda et al. (2022) sobre *Helicobacter pylori* como una bacteria asociada a enfermedades gastrointestinales y cáncer gástrico expone que en la actualidad la combinación de dos o tres antibióticos es utilizada para erradicar infección; no obstante, debido al aumento a la resistencia, la eficacia de estos tratamientos ha disminuido, por lo tanto, se han evaluado extractos polares de plantas como la guayusa las cuales poseen reportes a nivel de medicina ancestral de obtener resultados favorables.

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) también conocida como wayusa, huayusa, guañusa y aguayusa, como se menciona anteriormente, es una planta poco investigada a nivel de la actividad antimicrobiana que está pueda tener, por otra parte, si existen estudios sobre como su composición química pueda influir puesto que es calificada como altamente curativa siendo beneficiosa para la salud, e incluso se ha propuesto su análisis para servir como sustituto del ácido sórbico (E200) el cual se encuentra clasificado como un aditivo con alta capacidad antimicrobiana (Caicedo et al., 2021).

Según las organizaciones de salud como la CDC (2022) de Estados Unidos y el Ministerio de Salud del Ecuador (2022), la *Escherichia coli* se encuentra entre los microorganismos patógenos que causan infecciones por la ingesta de alimentos contaminados y genera efectos adversos en la salud, por lo que es necesario mantener esta bacteria controlada, en cierta medida, se ha demostrado que esta posee resistencia a los antibióticos utilizados normalmente, por lo que es de gran importancia hallar nuevas soluciones que aporten una solución frente a esta bacteria (Centro de Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2022).

1.4 Delimitación de la investigación

- **Espacio:** La presente investigación se realizó en el laboratorio de procesamiento de alimentos y laboratorio de biotecnología de la carrera de Ingeniería Agrícola mención Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias Dr. Jacobo Bucaram Ortiz, en la Universidad Agraria del Ecuador.
- **Tiempo:** La investigación se desarrolló en un tiempo de 4 meses, desde abril hasta agosto del 2023.
- **Población:** Para uso industrial.

1.5 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de dos concentraciones de los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) empleando dos solventes orgánicos.

1.6 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) mediante solventes orgánicos: etanol, metanol, etanol-metanol.

- Analizar *in vitro* la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) frente a *Escherichia coli* mediante medición de los halos de inhibición como resultado de una prueba antibiograma.
- Determinar el tiempo en el que la cepa bacteriológica pasa de la fase de latencia a la fase exponencial incubado *in vitro* con los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) con los solventes orgánicos.

1.7 Hipótesis

En dosificaciones de 30 y 40 µg/ml de los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) obtenidos con diferentes solventes orgánicos, presentan actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Escherichia coli* cultivada *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1 Estado del arte

Mendoza et al. (2016) exponen que la contaminación de los alimentos causada por microorganismos ha representado un problema en la salud pública importante en todo el mundo ya que los alimentos preparados en condiciones insalubres representan un aproximado de 2.000.000 de muertes al año. En su estudio sobre la evaluación de actividad antimicrobiana de extractos de *Vanilla spp.* obtuvieron resultados con concentraciones al 3.1 %, correspondientes a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en bacterias Gram positivas, resultados que pueden variar entre especies de una misma familia.

Los procesos de degradación de alimentos según Rodríguez y Alvarez (2021) se encuentran relacionados con diversas alteraciones que conllevan a generar cambios en las características nutricionales, fisicoquímicas y organolépticas, las cuales pueden provocar problemas de salud a quienes lo consuman, de modo que, en su estudio sobre la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L. la cual utilizaron concentraciones de 30, 50, 70 y 90 °GL con rendimientos en su halo de inhibición que van de 2.72 ± 0.09 , 3.53 ± 0.14 , 4.25 ± 0.30 , 4.34 ± 0.83 sucesivamente.

Adeboye, Kyei y Bukari (2020) en su estudio sobre el riesgo de contaminación de alimentos por *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli* en el sistema de producción de aves de corral explican que este tipo de organismos patógenos son prevalentes en varios países con porcentajes que pueden ir desde el 0 al 100 %, siendo de esta forma patógenos de alta peligrosidad. En el caso de la *Escherichia coli* su prevalencia en alimentos va desde el 11.67 %, siendo este porcentaje significativo para sistemas de producción.

Por ello, Cabrera (2019) expuso en su estudio sobre la actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto de *Citrus paradisi* y tres aceites esenciales de *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia* y *Cymbopogon citratus*, que en el caso de extractos estos pueden tener buenos resultados en organismos patógenos como la *Escherichia coli* en el que se pueden obtener halos de inhibición de 9.67 ± 0.47 , además que los extractos etanólicos pueden mejorar el desempeño del sistema conservante.

Consiguiente a esto, Díaz et al. (2017) obtuvo resultados similares en su estudio sobre la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. en *Escherichia coli* la cual presentaba halos de inhibición de 9.25 ± 0.38 considerando de esta forma que la actividad es eficaz en un 70 % en comparación con antibióticos como la azitromicina y ciprofloxacino.

Torres, León y Tomas (2017) en su estudio sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* frente a patógenos de origen clínico obtuvieron halos de inhibición con medidas de 25 mm con extracto etanólico y 14 mm de extracto acuoso, superando el extracto etanólico al control positivo de este estudio el cual obtuvo un halo de inhibición de 23,2 con un concentración de 80 mg/mL.

Ramírez, Isaza, Pérez y Martínez (2017) en su estudio sobre la evaluación antibacteriana de los extractos obtenidos a partir del *Solanum Dolichosepalum* Bitter (frutillo) observaron que el tipo de solvente orgánico con el que se realiza la extracción influye en los resultados de inhibición antimicrobiana frente a diversos microorganismos patógenos, en lo cuales se incluye a la *Escherichia coli*, describiendo la concentración mínima inhibitoria para el ensayo de actividad antimicrobiana utilizando solventes orgánicos como el metanol y el etanol en

concentraciones mayores a 45 mg/mL con resultados de fracciones cromatográficas de entre 600 y 35 en concentración mínima inhibitoria frente a *Escherichia coli*.

2.2 Bases teóricas

2.1.1. Guayusa.

La guayusa (*Ilex guayusa* Loes) se lo denomina wais debido al vocablo shuar, también, se conoce como wayusa panka en kichua, y guayusa o guayusa de monte comúnmente en comunidades habla castellana. Esta hierba se ha consumido como un té de hierbas durante cientos de años en las regiones amazónicas occidentales, incluidas Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, debido a que los estudios etnográficos informan ampliamente sobre sus propiedades estimulantes y saludables (Krause y Ness, 2017).

2.1.1.1. Descripción botánica.

Los árboles de guayusa son descritos como nativos de la región amazónica, estos tienden a crecer aproximadamente 10 m, pero existen excepciones en las cuales hay árboles que sobrepasan estas medidas. Poseen hojas simples pero dentadas ligeramente que pueden medir hasta 16 cm de largo, 6 cm de ancho, y son de color verde, al igual que sus flores que son de un color blanco-verdosas. Este cultivo alcanzará su madurez cada cuatro años (Santander y Wise, 2018).

2.1.1.2. Taxonomía.

La guayusa pertenece al género *Ilex*, de la familia *Aquifoliaceae*, su especie por lo tanto es *Ilex guayusa* (Loes) (ver Anexo 1, Tabla 11). Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, donde es silvestre, pero además se puede encontrar en lugares subtropicales (Chiriboga, 2017).

2.1.1.3. Ecología.

Se conocen alrededor de 600 especies de *Ilex* son reconocidas y la mayoría de ellas se encuentra en la América tropical y Asia oriental. *Ilex* crece mayormente en los trópicos, pero se extiende en las regiones templadas de climas oceánicos hasta los 63° N (América, Eurasia) y a 35° S (América, África). Existe alrededor de 300 especies en América tropical, cerca de 250 especies en el sureste de Asia, cerca de 30 especies en América del Norte, cuatro especies en Europa (incluyendo las especies endémicas de las Islas Canarias, Madeira y Azores), unas pocas especies en las islas del Pacífico, uno en el noreste de Australia y uno en África subsahariana (Melo, 2014).

2.1.1.4. Compuestos químicos.

Los principales constituyentes de *Ilex spp.* son compuestos fenólicos. Estos compuestos son de gran interés ya que se les atribuyen diversos efectos biológicos beneficiosos; lo más relevante es la actividad antioxidante, que es importante para contrarrestar el estrés oxidativo. Los estudios de laboratorio adicionales sobre la composición química de la guayusa brindan respaldo científico para esas afirmaciones basadas en su composición de cafeína, aminoácidos y antioxidantes (García et al., 2017).

2.1.2. Extractos vegetales.

Los extractos vegetales permiten obtener fácilmente un compuesto activo de las hojas, tallo, raíz, flores o de toda una planta, y se obtienen como resultado de la maceración de estos con diferentes solventes en un determinado tiempo y presentando un riesgo bajo de toxicidad (Correa, Nino, Ospina y Mosquera, 2007).

Estos comprenden una mezcla compleja con una cantidad grande de compuestos químicos, los cuales se pueden obtener mediante procesos físicos,

químicos y microbiológicos a partir de una fuente de origen natural y son utilizables en cualquier campo de la tecnología. La característica principal de estos es que se pueden obtener diferentes extractos de una misma planta con diferentes principios activos, dependiendo del solvente empleado (Ramírez, 2020; López, Chávez, Gonzalez, Castro y Rodríguez, 2022).

2.1.2.1. Método de extracción.

2.1.2.1.1. Maceración.

Para la extracción de extractos vegetales se utilizan métodos y técnicas especializadas de acuerdo con las características fitoquímicas de la planta ya sea completa o un componente en específico de ésta, vertiéndose en diferentes solventes orgánicos para poder conservar de esta forma la mayoría de sus metabolitos secundarios. Este método requiere de dos fases: La fase de reposo y la fase de filtrado para poder eliminar sólidos de la solución final que se requiere utilizar (Pérez, Rojas, Chamorro y Pérez, 2011).

2.1.3. Aditivos.

2.1.3.1. Definición.

Los aditivos son sustancias o compuestos no nutritivos que se adicionan de forma directa a gran parte de los productos alimentarios que son industrializados, con el propósito de proporcionar estabilidad fisicoquímica al alimento, mejorar las características sensoriales y para poder alargar la vida de anaquel del alimento. El uso de estos en la industria alimentaria obliga a establecer mecanismos de control para su correcta utilización (Suárez, González, Reséndiz y Sánchez, 2014).

2.1.3.2. Clasificación.

2.1.3.2.1. Aditivos naturales y artificiales.

Según el libro publicado por el Servicio Nacional del Consumidor (SERNAC) (2004) los aditivos alimentarios se derivan de diferentes tipos de fuentes:

- Productos de origen vegetal
- Productos idénticos al natural, producidos por síntesis o fotosíntesis
- Productos obtenidos por modificación de sustancias naturales
- Antioxidantes artificiales
- Endulzantes de alta densidad

2.1.4. Microorganismos.

2.1.4.1. Definición.

Los microorganismos son seres vivos de tamaño microscópico, los cuales son capaces de realizar procesos vitales tales como crecer, alimentarse, producir energía y reproducirse. Su principal característica es la variedad de ambientes en los que pueden vivir. En su gran mayoría los microorganismos juegan papeles muy importantes en la salud de prácticamente de todos los animales y de la tierra (Bueno, Palavecino, Tobar y Nieto, 2013).

2.1.4.2. Clasificación.

2.1.4.2.1. Microorganismos patógenos.

Los microorganismos patógenos son aquellos que provocan daños en la salud humana, y son principalmente bacterias, virus y protozoarios. Algunos de ellos son causa de una elevada mortalidad. La continua interacción entre los humanos y los microorganismos a las condiciones que permiten una actividad compartida; es decir, la alimentación microbiana y humana incluye similares factores como el

agua, carbohidratos (azúcares) y otras sustancias que proporcionan energía esencial para vivir (Montaño, Sandoval, Camargo y Sánchez, 2010).

2.1.4.2.2. *Bacterias gram positivas.*

Los bacilos gram positivos formadores de esporas son las especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Estos bacilos forman esporas y pueden sobrevivir en el ambiente por muchos años. El género *Bacillus* es aerobio mientras que los clostridios son anaerobios obligados. La pared celular de estas bacterias está conformada por una envoltura rígida entre la membrana y la cápsula diferente a las bacterias gram negativas, éstas poseen Mureína-Peptidoglicano-Neuropéptido (responsable de la integridad estructural de la pared), ácidos teicoicos (forman hasta el 50 % del peso seco de la pared), son polímeros hidrosolubles que contienen residuos de ribitol o glicerol (ver Anexo 1, Figura 6), (Macías *et al.*, 2019).

2.1.4.2.3. *Bacterias gram negativas.*

Una de las características más importantes de las bacterias gram negativas es la pared celular la cual está compuesto por una capa de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el periplasma (espacio periplásmico), una sustancia gelatinosa que se encuentra entre la membrana externa y la membrana plasmática (ver Anexo 1, Figura 7) (Morejón, 2015; Bush y Schmidt, 2022).

2.1.4.2.4. *Escherichia coli.*

El *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, y se le considera un

microorganismo de flora normal, sin embargo, existen cepas que pueden ser patógenos causando daños produciendo cuadros clínicos de intoxicaciones e infecciones (Rodríguez, 2002).

Este patógeno se adquiere por la ingesta de alimentos contaminados y genera efectos adversos en la salud, y en estudios realizados los últimos años se ha demostrado que posee resistencia hacia antibióticos utilizados normalmente, por lo que es de gran importancia hallar nuevas soluciones que aporten resistencia frente a esta bacteria (Pinillos, Gómez, Elizalde y Dueñas, 2003; Puig, Espino y Leyva, 2011).

2.1.5. Crecimiento bacteriano.

2.1.5.1. Definición.

El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. El aumento de la masa celular producido por acumulación de productos de reserva no constituye crecimiento. En celular individuales el crecimiento consiste en el aumento del tamaño y peso de las células que precede a la división celular, las bacterias se dividen por fisión binaria, a través de una célula madre al alcanzar un determinado volumen se divide dando dos células hijas (Benitende, Sánchez y Sterren, 2002).

2.1.5.2. Fases de crecimiento de microorganismos.

2.1.5.2.1. Fase de latencia.

Durante la fase de latencia las bacterias que son transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación. Existe un aumento en los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, con un nivel de

división celular que va en aumento de a poco sensible a diversos factores físicos y químicos (Varela y Grotiuz, 2008).

2.1.5.2.2. Fase exponencial.

La fase exponencial es el momento en el cual las células se empiezan a dividir a velocidad constante, debido a la naturaleza de la bacteria y a las condiciones de medio. Existiendo durante esta fase un gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial (Varela y Grotiuz, 2008).

2.1.6. Método de evaluación actividad antimicrobiana.

2.1.6.1. Antibiograma Disco-Placa.

2.1.6.1.1. Definición.

El antibiograma disco placa es una prueba de sensibilidad que a menudo se recomienda para uso en laboratorios clínicos, y se base en la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, principalmente porque es una prueba rápida, práctica y reproducible (Bernal y Guzman, 1984).

2.1.6.1.2. Lectura de Antibiograma.

La lectura de un antibiograma debe hacerse 18 horas después de que se ha incubado el antibiograma ya preparado, se lee el diámetro de las zonas de inhibición con una regla y su medida se transforma a milímetros (mm). Lo que se mide de esta prueba son las zonas alrededor de los discos las cuales no poseen ningún crecimiento (García et al., 2000).

2.2.6.2. Oxitetraciclina.

La oxitetraciclina es un antibiótico con la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en microorganismos que son susceptibles en su presencia, por lo que es capaz de impedir que se agreguen aminoácidos a la cadena peptídica en formación, aunque las células del huésped no poseen el sistema de transporte

activo que tienen las bacterias, este antibiótico también puede alterar la síntesis proteínica en las células del huésped en concentraciones elevadas, en dosis terapéuticas, este antibiótico es bacteriostático y es eficaz contra bacterias grampositivas y gramnegativas (Rodríguez, 2015).

2.2 Marco legal

2.2.1. Constitución de la República del Ecuador (Modificada 25 de enero 2021).

Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales. El Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria (p. 13)

Art. 281.- La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiado de forma permanente: Asegurar el desarrollo de la investigación científica y de la innovación tecnológica apropiadas para garantizar la soberanía alimentaria (p. 69).

2.2.2. Norma general para los aditivos alimentarios (CODEX STAN 192-1995, IDT).

Preámbulo, ámbito de aplicación, inciso 1.1. Aditivos alimentarios incluidos en esta Norma.- En los alimentos sólo se reconocerá como adecuado el uso de los aditivos alimentarios que se indican en esta Norma.1 Únicamente se estudiará la inclusión en la presente Norma de los aditivos alimentarios a los cuales se ha asignado una ingesta diaria admisible (IDA) o cuya inocuidad² ha quedado establecida, con arreglo a otros criterios, por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA)³, y de aquellos a los que el Codex ha atribuido una designación con arreglo al Sistema Internacional de Numeración (SIN). Se considera que el uso de aditivos de acuerdo con las disposiciones de esta Norma se encuentra tecnológicamente justificado (p. 2).

Preámbulo, ámbito de aplicación, inciso 1.2. Alimentos en los que se pueden utilizar aditivos. - En la presente Norma se establecen las condiciones en que se pueden utilizar aditivos alimentarios en todos los alimentos, se hayan establecido o no anteriormente normas del Codex para ellos. El uso de aditivos en los alimentos para los que existan normas del Codex está sujeto a las condiciones de uso establecidas por las normas para productos del Codex y por la presente Norma. La Norma General para los Aditivos Alimentarios (NGAA) deberá constituir la única referencia de autoridad con respecto a los aditivos alimentarios (p. 2).

Preámbulo, ámbito de aplicación, inciso 1.4. Dosis máximas de uso para los aditivos alimentarios. - El objetivo principal de establecer dosis máximas de uso para los aditivos alimentarios en diversos grupos de alimentos es asegurar que la ingesta de un aditivo en todos sus usos no exceda de su IDA. Los aditivos alimentarios cubiertos por la presente Norma y sus dosis máximas de uso se basan en parte en las disposiciones sobre aditivos alimentarios establecidas en anteriores normas del Codex para productos o en peticiones de los gobiernos, tras someter las dosis máximas propuestas a un método apropiado a fin de verificar la compatibilidad de la dosis máxima propuesta con la IDA (p. 2).

Definiciones, inciso a .- Se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales (p. 3).

Principios generales para el uso de aditivos alimentarios, 3.1. Inocuidad de los aditivos alimentarios, inciso a.- Únicamente se aprobarán e incluirán en la presente Norma los aditivos alimentarios que, en la medida en que puede juzgarse por las pruebas que dispone el JECFA, no presentan riesgos apreciables para la salud de los consumidores en las dosis de uso propuestas (p. 3).

Principios generales para el uso de aditivos alimentarios, 3.2. Justificación del uso de aditivos. - El uso de aditivos alimentarios está justificado únicamente si ello ofrece alguna ventaja, no presenta riesgos apreciables para la salud de los consumidores, no induce a error a éstos, y cumple una o más de las funciones tecnológicas establecidas por el Codex y los requisitos que se indican a continuación en los apartados a) a d), y únicamente cuando estos fines no pueden alcanzarse por otros medios que son económica y tecnológicamente factibles (p. 3).

Principios generales para el uso de aditivos alimentarios, 3.2. Justificación del uso de aditivos, inciso a – d .- a) Conservar la calidad nutricional del alimento; una disminución intencionada en la calidad nutricional de un alimento estaría justificada en las circunstancias indicadas en el subpárrafo b) y también en otras circunstancias en las que el alimento no constituye un componente importante de una dieta normal; b) Proporcionar los ingredientes o constituyentes necesarios para los alimentos fabricados para grupos de consumidores que tienen necesidades dietéticas especiales; c) Proporcionar los ingredientes o constituyentes necesarios para los alimentos fabricados para grupos de consumidores que tienen necesidades dietéticas

especiales; d) Proporcionar los ingredientes o constituyentes necesarios para los alimentos fabricados para grupos de consumidores que tienen necesidades dietéticas especiales (p. 3).

3. Materiales y métodos

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1. Tipo de investigación.

El desarrollo del siguiente anteproyecto se realizó a través de la investigación de tipo documental, de laboratorio y experimental. De modo que permitió la evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos de hoja de guayusa frente a *Escherichia coli*, partiendo de la recolección de información la cual permitió conocer los antecedentes, definir bases teóricas y conocer el aplicativo de diferentes normativas (internacionales o nacionales) en el objeto de estudio. El estudio se caracterizó por ser experimental por partir de la idea del uso de una especia propia del Ecuador de fácil disponibilidad, para el uso de su extracto como conservantes en alimentos de cuarta gama y procesados.

De modo que se realizaron tres tratamientos con cantidades distintas y el uso de dos solventes orgánicos como el metanol y etanol, y a su vez los dos en conjuntos para evaluar por su método de extracción y el uso del solvente orgánico la actividad antimicrobiana que poseen dichos extractos de la guayusa.

3.1.2. Diseño de investigación.

La investigación comenzó con el desarrollo de tres tratamientos del extracto, utilizando etanol puro, metanol puro y una combinación de etanol y metanol mediante maceración. Una vez obtenidos los extractos, se evaluó su capacidad antibiótica utilizando la metodología de antibiograma normada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI) M100-S20 2021, asegurando así la validez del proceso.

3.2 Metodología

3.2.1. Variables.

3.2.1.1. Variable independiente.

La variable independiente es:

- Concentraciones de los extractos de guayusa.

3.2.1.2. Variables dependientes.

- Halos de inhibición de *E. coli*.
- Tiempo de fase de latencia a exponencial.

3.2.2. Tratamientos.

Se obtuvieron los extractos de la hoja de guayusa deshidratada mediante diferentes solventes orgánicos (metanol, etanol, combinación de ambos), lo que se detalla a continuación, en la tabla 1.

Tabla 1. Obtención de solventes

Método de extracción	Solvente orgánico		
	T1	T2	T3
Maceración	etanol	metanol	etanol + metanol

Descripción del proceso de obtención de los extractos por diferentes solventes orgánicos.

Moscoso, 2024

En función de los extractos obtenidos se realizó la tabla 2 la cual explica las cantidades en gramos del reactivo y materia prima que se utilizó para realizar las extracciones de cada uno de los tratamientos propuestos. En los cuales la solución que compone el 100 % se comprende por 300 ml de solvente orgánico con 10 gramos de materia prima por cada 100 ml. Los datos se eligieron en base al estudio realizado por Vergara, Páucar, Morales, Castro y Pizarro (2018) en el que realizan la obtención de extractos de la hoja de guanábana mediante el uso de solventes orgánicos.

Luego de esto se procedió a la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos mediante etanol, metanol y la mezcla de etanol + metanol, mediante antibiograma realizado por difusión en agar según el método de Kirby-Bauer según la norma de la National Committee for Clinical Laboratory Standards CLSI M100 – S20 2010. Para este procedimiento se realizaron dos tratamientos, a diferentes cantidades para cada uno de los extractos obtenidos.

Tabla 2. Tratamientos antimicrobianos

Materia prima	Tratamiento	Dosis (µg/ml)
Macerado de etanol (90 %) y guayusa (10 %)	T1	30
	T2	40
Etanol puro (100 %)	T3	-
Macerado de metanol (90 %) y guayusa (10 %)	T4	30
	T5	40
Metanol puro (100 %)	T6	-
Macerado de metanol (45 %), etanol 45 %) y guayusa (10 %)	T7	30
	T8	40
Etanol + metanol (50/50 %)	T9	-
Oxitetraciclina	T10	30
Blanco	T11	0

Tratamiento a utilizar para el antibiograma.
Moscoso, 2024

El volumen a utilizar en el antibiograma fue tomado en referencia al estudio realizado por Cogo y Dalla (2010) en un estudio realizado para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas utilizados para enfermedades gastrointestinales.

Para finalizar, se determinó el momento en el que la cepa de *Escherichia coli* pasó de la fase de latencia a la fase exponencial, realizando una comparación en

horas utilizando los extractos de la guayusa obtenidos y como control positivo el Oxitetraciclina.

3.2.3. Diseño experimental.

La investigación se realizó mediante un diseño completamente al azar con submuestreo, compuesto por 11 tratamientos, 10 repeticiones y cinco submuestreos; se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) con un margen de error del 5 % ($p \leq 0,05$).

3.2.4. Recolección de datos.

La materia prima, materiales y equipos que se emplearon para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de guayusa por solventes orgánicos como etanol y metanol.

3.2.4.1. Recursos.

3.2.4.1.1. Materia prima.

- Hoja de guayusa deshidratada

3.2.4.1.2. Material biológico.

- *Escherichia coli* 10798

3.2.4.1.3. Reactivos.

- Etanol puro (100 %)
- Metanol puro (100 %)
- Agua destilada
- Medio enriquecido

3.2.4.1.4. Materiales y equipos.

- Balanza analítica (300 g)
- Cocina a gas
- Rotavapor RV 8

- Frascos ámbar 300 ml
- Micropipeta (100 - 1000 μ L)
- Puntas
- Caja Petri

3.2.4.2. Métodos y técnicas.

3.2.4.2.1. Diagrama de flujo obtención extracto etanólico.

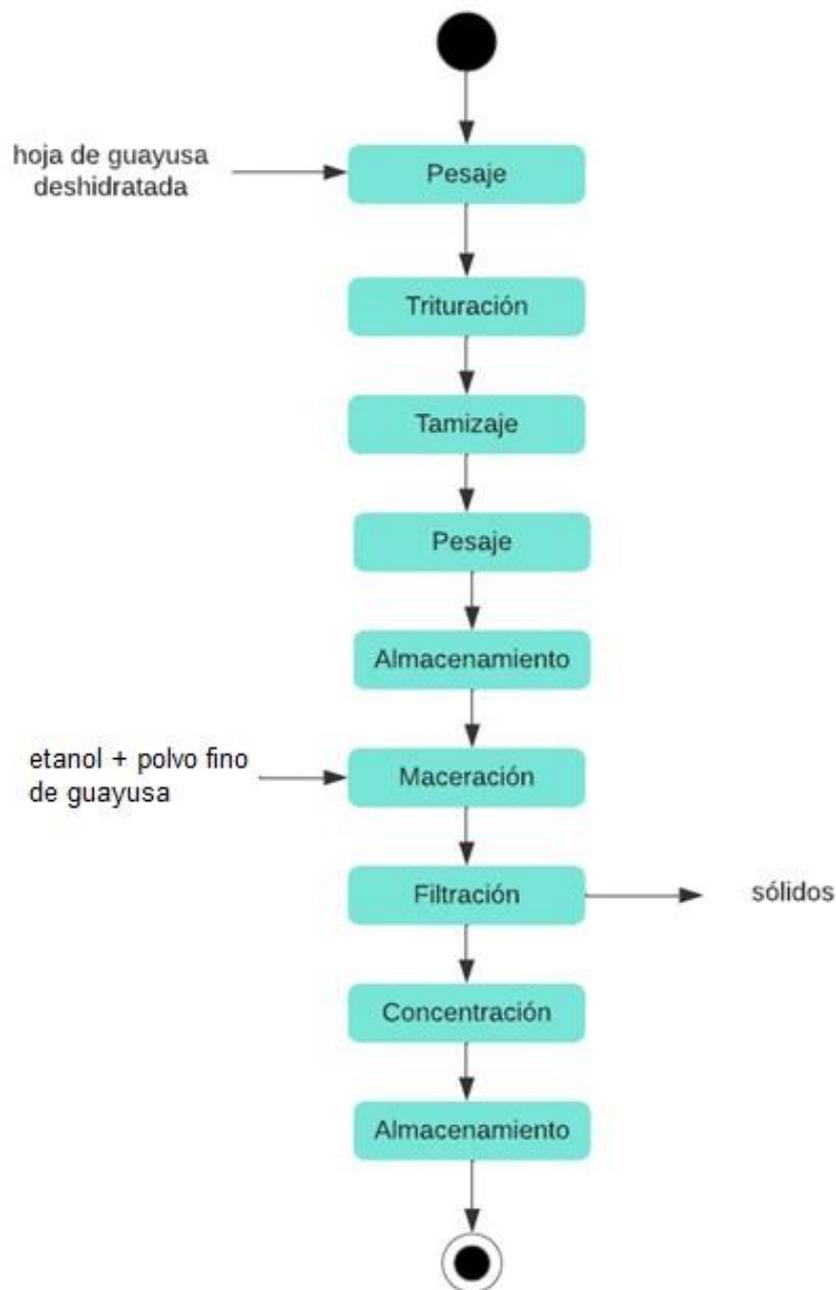


Figura 1. Diagrama de flujo extracto etanólico Moscoso, 2024

3.2.4.2.2. *Descripción diagrama de flujo obtención extracto etanólico.*

Pesaje: Se pesó la hoja de guayusa para poder empezar con el procedimiento.

Trituración: Se trituró 500 g de la hoja de guayusa deshidratada hasta obtener el tamaño de partículas pequeñas obteniendo un polvo fino de la materia prima.

Tamizaje: Se tamizó el polvo fino de hoja de guayusa en un tamiz de 200 micras.

Pesaje: Se pesó 175g del polvo fino de la hoja de guayusa tamizada.

Almacenamiento: Se almacenó en bolsas ziploc (selladas al vacío) en refrigeración a 4 °C.

Maceración: En este paso las muestras de polvo fino se colocaron con etanol en los frascos de vidrio color ámbar, se dejaron macerar durante tres días a temperatura ambiente (25 °C) y se agitaron manualmente una vez por día.

Filtración: Se filtró la muestra luego del proceso de maceración con filtro de papel para eliminar sólidos.

Concentración: Se realizó un concentrado por rotavapor para eliminar cualquier micro residuo y para la eliminación del solvente.

Almacenamiento: En frascos de color ámbar a temperatura ambiente.

3.2.4.2.3. Diagrama de flujo obtención extracto metanólico.

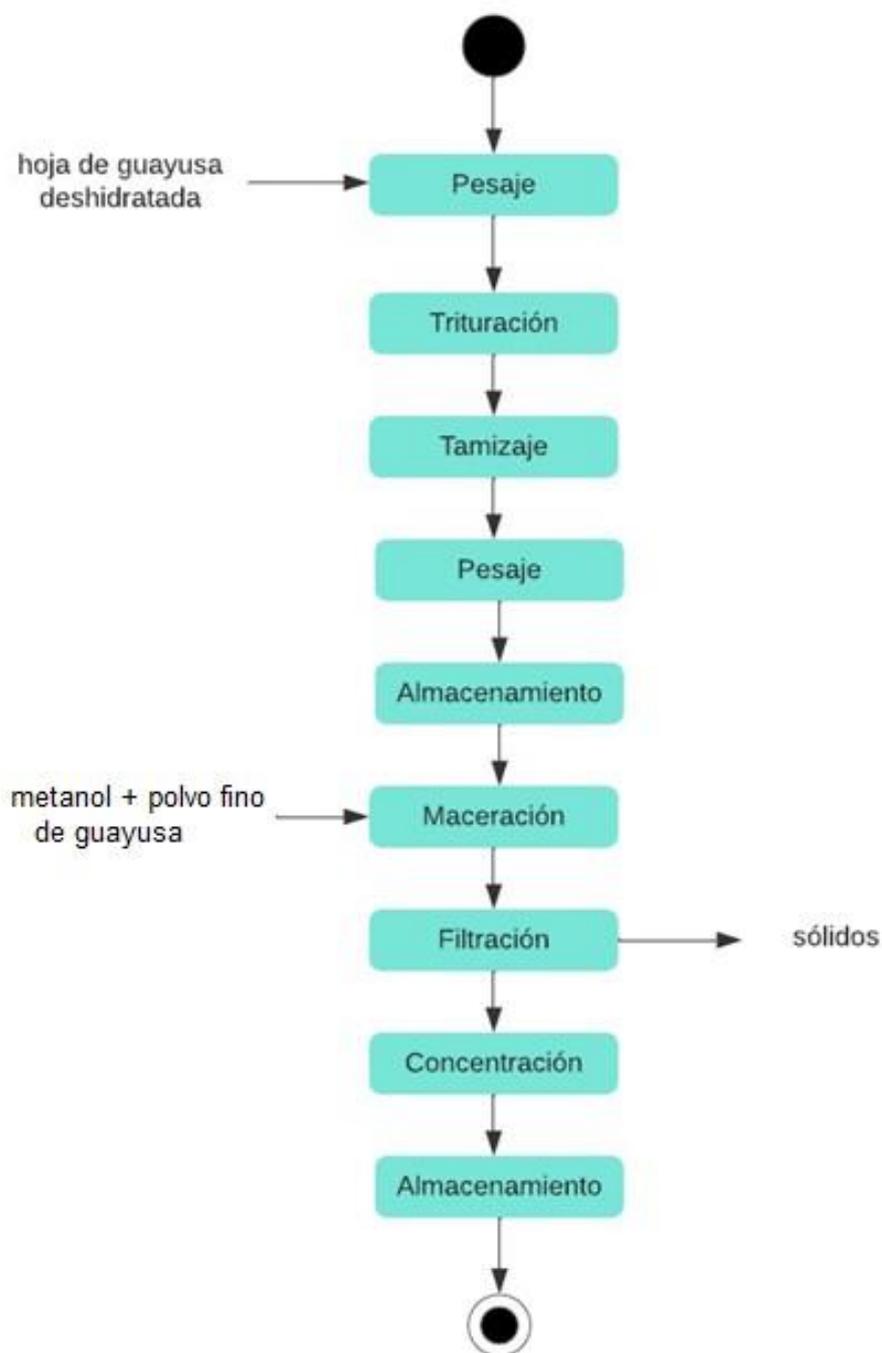


Figura 2. Diagrama de flujo extracto metanólico
Moscoso, 2024

3.2.4.2.4. Descripción diagrama de flujo obtención extracto metanólico.

Pesaje: Se pesó la hoja de guayusa para poder empezar con el procedimiento.

Trituración: Se trituró 500 g de la hoja de guayusa deshidratada hasta obtener partículas pequeñas obteniendo un polvo fino de la materia prima.

Tamizaje: Se tamizó el polvo fino de hoja de guayusa en un tamiz de 200 micras.

Pesaje: Se pesó 175 g del polvo fino de la hoja de guayusa tamizada.

Almacenamiento: Se almacenó en bolsas ziploc (selladas al vacío) en refrigeración a 4 °C.

Maceración: En este paso las muestras de polvo fino con el metanol se colocaron en los frascos de vidrio color ámbar y se dejaron macerar durante tres días a temperatura ambiente (25 °C) y se agitará manualmente una vez por día.

Filtración: Se filtró la muestra luego del proceso de maceración con filtro de papel para eliminar sólidos.

Concentración: Se realizó un concentrado por rotavapor para eliminar cualquier micro residuo y el solvente.

Almacenamiento: En frascos de color ámbar a temperatura ambiente.

3.2.4.2.5. Diagrama de flujo obtención extracto etanol + metanol.

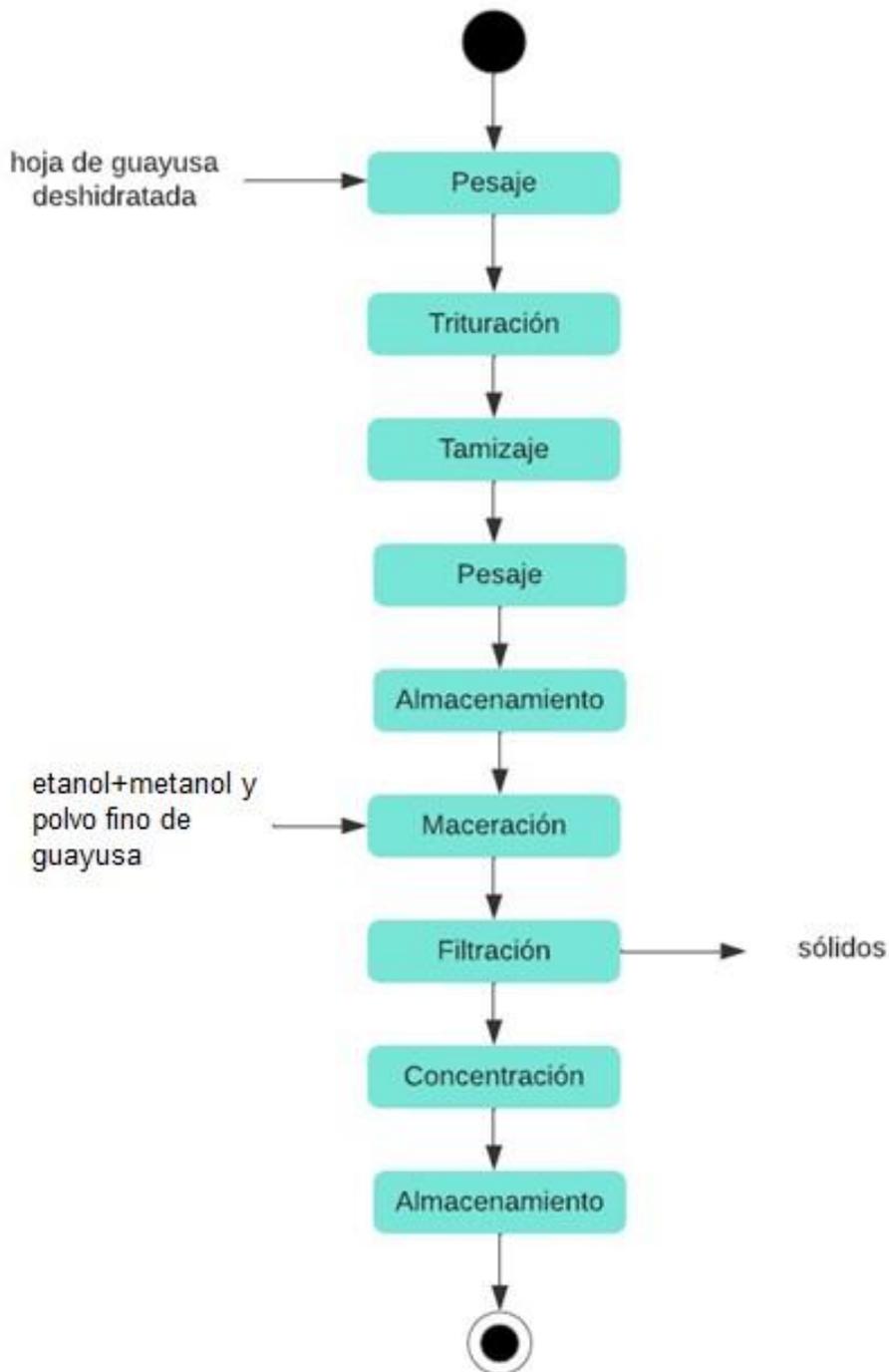


Figura 3. Diagrama de flujo obtención extracto de etanol+metanol Moscoso, 2024

3.2.4.2.6. Descripción diagrama de flujo obtención extracto etanol + metanol.

Pesaje: Se pesó la hoja de guayusa para poder empezar con el procedimiento.

Trituración: Se trituró 500 g de la hoja de guayusa deshidratada hasta obtener el tamaño de partículas pequeñas obteniendo un polvo fino de la materia prima.

Tamizaje: Se tamizó el polvo fino de hoja de guayusa con un tamiz de 200 micras.

Pesaje: Se pesó 175g del polvo fino de la hoja de guayusa tamizada.

Almacenamiento: Se almaceno en bolsas ziploc (selladas al vacío) en refrigeración a 4 °C.

Maceración: En este paso las muestras hechas de polvo fino con el etanol+metanol y se colocaron en los frascos de vidrio color ámbar y se dejaron macerar durante tres días a temperatura ambiente (25 °C) y se agitaron manualmente una vez por día.

Filtración: Se filtró la muestra luego del proceso de maceración con filtro de papel para eliminar sólidos.

Concentración: Se realizó un concentrado por rotavapor para eliminar cualquier micro residuo y para la eliminación del solvente.

Almacenamiento: En frascos de color ámbar a temperatura ambiente.

3.2.4.2.7. Antibiograma.

La elaboración del antibiograma se realizó en base a lo realizado por Bernal y Guzman (1984) y lo descrito por Sánchez, Castillo y García (2016) según la National Committee for Clinical Laboratory Standards.

1. Se preparó el Agar Muller Hinton suspendiendo 37 g de polvo en 1 litro de agua purificada.
2. Una vez realizado dicho paso, se dejó embeber el agar de 10 a 15 minutos.
3. Una vez pasado el tiempo de hidratación del polvo de agar, este se agitó fuertemente mientras se calentó y se dejó hervir un minuto para su disolución total, y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

4. El agar se colocó en la caja Petri, y se esperó a que este sólido, para poder inocular la bacteria a evaluar.
5. Una vez realizado este procedimiento se colocarán los discos de antibióticos impregnados con los extractos y se dejó incubando durante 24 h a 37 °C.
6. Se dejó transcurrir 24 h en la incubadora para poder observar los halos de inhibición.
7. La lectura del halo de inhibición se realizó una vez pasadas entre 18-24h de incubación y se realizó con una regla (medida debe registrarse en mm).
8. La medición se realizó a contra luz al reverso de la placa en función de la norma de la National Committe for Clinical Laboratory Standards.

3.2.4.2.8. Monitoreo tiempo de efectividad de extracto.

Se efectuó una etapa de monitoreo de las horas de efectividad que posee el extracto con mayor capacidad antimicrobiana frente al control positivo que se utilizó (Oxitetraciclina), esto se realizó en base a los datos de predicción colocados en la plataforma COMBASE del crecimiento de *Escherichia coli* como se observa, en la tabla 3.

Tabla 3. Predicción de crecimiento *Escherichia coli*

Organismo	<i>Escherichia coli</i>
Temperatura mínima de crecimiento	10 °C
Temperatura máxima de crecimiento	42 °C
Tiempo en unidades	Horas
Inoculo	2
Temperatura ambiente	37 °C
Actividad del agua	0.997
Estado fisiológico inicial	0.041
Velocidad máxima de crecimiento	0.857
Tiempo Lag	1.62
Crecimiento bacteriano	8.7

Crecimiento de *Escherichia coli* a temperatura 37 °C.
Moscoso, 2024

En base a esto, se realizó un monitoreo cada media hora con una ficha propuesta la cual se detalla a continuación, en la figura 4.



Universidad Agraria del Ecuador

Día _____

Fecha _____

Monitoreos	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	30 min			
2	1h			
3	1h30			
4	2h			
5	2h30			
6	3h			

Figura 4. Ficha para monitoreo
Moscoso, 2024

3.2.5. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de este estudio los datos se analizaron utilizando el programa estadístico InfoStat, en el cual se realizó un análisis de varianza ANOVA, evaluando los valores promedio de los resultados que arrojen la parte experimental de la comparación de extractos obtenidos. Se utilizó la prueba de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis con un margen del error del 5 % ($p \leq 0.05$) tal y como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Esquema para análisis ANOVA antibiograma

Fuentes de variación	Grados de libertad
Tratamientos (T-1) (11-1)	10
Submuestreo (discos) (Tr(s-1) (11*10(5-1))	440
Error experimental (T(r-1)) (11(10-1))	99
Total (Trs-1) (11*10*5-1)	549

Esquema propuesto para análisis de antibiograma mediante ANOVA.
Moscoso, 2024

Hipótesis

H0: No existió acción inhibitoria de *E. coli* de los extractos de la hoja de guayusa.

H1: Si existió acción inhibitoria de *E. coli* de los extractos de la hoja de guayusa.

4. Resultados

4.1 Obtención los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) mediante solventes orgánicos: etanol, metanol, etanol-metanol

La obtención de los extractos con solventes orgánicos como etanol, metanol y la combinación de etanol-metanol se realizaron mediante la elaboración de un macerado con polvo fino de guayusa seca (ver Anexo 4, Figura 13). Se elaboró 1750 ml de cada extracto con diferentes solventes en sus grados más puros, para metanol grado HPCL, y para etanol grado extra puro (100 %), a los solventes se les agregó 175 g de guayusa convertida en polvo fino una vez que pasó por un proceso de secado, molido y tamizado (ver Anexo 4, Figuras 13 – 16).

Una vez pasado por el proceso de maceración los extractos obtenidos a partir de la guayusa se pasaron por rotavapor durante 6 horas por dos días consecutivos hasta obtener los siguientes resultados:

Extracto etanólico: 148 ml

Extracto metanólico: 154 ml

Extracto etanólico-metanólico: 152 ml

4.2 Análisis *in vitro* de la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) frente a *Escherichia coli* mediante medición de los halos de inhibición como resultado de una prueba antibiograma

Para el análisis *in vitro* de la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja de guayusa frente a *Escherichia coli* se realizó el procedimiento respectivo de la preparación de las cajas Petri con el agar propuesto (Müller Hinton). Se realizaron 110 placas con 20 ml de agar Müller Hinton y se procedió a la siembra de un ml de *Escherichia coli*, según el estándar de turbidez de la escala de McFarland al 0.5.

Luego de realizar la siembra en las placas se realizó la colocación de los discos previamente impregnados con cada uno de los 11 tratamientos (ver Anexo 5, Figura 17 – 21, 24).

Luego de haber sembrado y colocado los discos de sensibilidad en las placas se procedió a incubar las cajas Petri con el microorganismo sembrado por 24 horas hasta la lectura del halo de inhibición a una temperatura de 37 °C.

Para la lectura del halo de inhibición se tomó una fórmula para poder sacar el porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos, la cual se describe de la siguiente manera:

$$\%Inhibición = \frac{(\Phi_{haloextracto} - \Phi_{haloblanco})}{(\Phi_{halocontrolpositivo} - \Phi_{blanco})} * 100$$

De esta forma se tuvieron los resultados expuestos en la tabla 6 (ver Anexo 4, Tabla 12).

En base a estos datos se realizó un análisis de varianza el cual demostró los siguientes resultados (ver Anexo 5, Tabla 13).

El análisis de varianza obtenido demuestra que el p-valor que se obtuvo de los datos tabulados de los 11 tratamientos posee evidencia necesaria para rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa en esta investigación (Los extractos de la guayusa si poseen capacidad antimicrobiana). Además, se llevó a cabo un análisis para determinar si los datos recolectados cumplían con los supuestos de normalidad (ver anexo 7, figura 31) necesarios para un análisis de Tukey. Sin embargo, al no cumplir con estos supuestos, se procedió a realizar un análisis de varianza no paramétrico.

4.2.1. Actividad antimicrobiana extracto de guayusa con etanol.

Para el análisis de la actividad antimicrobiana del extracto de guayusa con etanol (ver Anexo 5, Figura 22) se realizó un análisis de varianza no paramétrica

de Kruskall Wallis (ver Anexo 5, Figura 25), que demostró los siguientes resultados que se encuentran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Porcentajes de halo de inhibición extracto de guayusa con etanol

Tratamientos	Medias
T10	100 ^a
T1	37.97 ^b
T2	16.69 ^c
T3	3.67 ^d
T11	0.00 ^d
p-valor	0.0001

Prueba de Kruskall Wallis. Letras con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0.05$.

Moscoso, 2024

La prueba de Kruskall Wallis demuestra que los tratamientos de la guayusa con etanol poseen diferencias significativas entre sí incluso frente al antibiótico utilizado que corresponde al T10 (oxitetraciclina), no obstante, siendo el de mayor capacidad antimicrobiana el control positivo utilizado en la investigación. Entre los tratamientos utilizados de la guayusa estos poseen diferencias significativas entre sí, teniendo mejores resultados el T1 correspondiente al extracto etanólico al 30 %, y quedando en segundo lugar el T2 con una concentración al 40 %.

4.2.2. Actividad antimicrobiana extracto de guayusa con metanol.

Para el análisis de la actividad antimicrobiana del extracto de guayusa con metanol (ver Anexo 5, Figura 23) se realizó un análisis de Kruskall Wallis (ver Anexo 5, Figura 26), que demostró los siguientes resultados que se encuentran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del extracto de guayusa con metanol

Tratamientos	Medias
T10	100 ^a
T5	36.57 ^b
T4	23.38 ^c
T6	0 ^d
T11	0 ^d
p-valor	0.0001

Prueba de Kruskal Wallis . Letras con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0.05$.

Moscoso, 2024

Los resultados expuestos en la tabla 6 demuestran que el mejor tratamiento es aquel que corresponde al antibiótico utilizado (oxitetraciclina), no obstante, los extractos obtenidos a partir de la hoja de la guayusa con metanol también poseen diferencias significativas frente a los demás tratamientos. Siendo T5 el mejor tratamiento de los extractos con una concentración al 40%, quedando T4 en segundo lugar (también con diferencias significativas). Los resultados demuestran que el T11 (correspondiente al blanco) y el T6 (metanol) no poseen diferencias frente a los demás tratamientos.

4.2.3. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos + metanólicos de guayusa.

Para el análisis de la actividad antimicrobiana del extracto de guayusa con etanol+metanol (ver Anexo 5, Figura 21) se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (ver Anexo 5, Figura 27), que demostró los siguientes resultados que se encuentran en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del extracto de guayusa con etanol+metanol

Tratamientos	Medias
T10	100
T7	22.53
T8	13.2
T11	0
T9	0
p-valor	0.0001

Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Letras con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0.05$.

Moscoso, 2024

La tabla 7 demuestra que de los resultados obtenidos el mejor tratamiento es aquel que corresponde al antibiótico utilizado (oxitetraciclina). Sin embargo, de los extractos obtenidos a partir de la hoja de la guayusa con metanol también poseen diferencias significativas frente a los demás tratamientos. Siendo T7 el mejor tratamiento de los extractos con una concentración al 30%, quedando T8 en segundo lugar (también con diferencias significativas) el cual posee una concentración al 40 %. Los resultados demuestran que el T11 (correspondiente al blanco) y el T9 (etanol+metanol) no poseen diferencias frente a los demás tratamientos.

4.3 Determinación del tiempo en el que la cepa bacteriológica pasa de la fase de latencia a la fase exponencial incubado *in vitro* con los extractos de la hoja de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) con los solventes orgánicos

Para la determinación del tiempo en que la cepa bacteriológica pasó de la fase de latencia a la fase exponencial se tomó en cuenta los mejores tratamientos obtenidos (después del control positivo; oxitetraciclina) según la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis los cuales son T1 y T5 (ver Anexo 6, Figura 28 – 29) tal y como se ve en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de inhibición de todos los tratamientos

Tratamientos	Medias
T10	100
T1	37.97
T5	37.4
T4	23.38
T7	22.53
T2	16.69
T8	13.20
T3	3.67
T11	0
p-valor	0.0001

Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Letras con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0.05$.

Moscoso, 2024

Según estos resultados se llenó una ficha por cada placa del tratamiento 1 y 5 luego de 24 horas de incubación. Obteniendo los resultados de las tablas 14-33 (ver Anexo 4, Tabla 14 a la 33). Mediante la cual se realizó una media de todos los datos obtenidos que se encuentran en la tabla 14 son los datos del tratamiento 1, y en la tabla 24 con los datos del tratamiento 5.

Tabla 9. Media de crecimiento UFC por tratamiento 1

Media de Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.45
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.7
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	21.05
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	29.1
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40.05
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.45

Media de tiempo en el que la cepa bacteriológica pasa de la fase de latencia a la fase exponencial incubado in vitro.

Moscoso, 2024

Los datos en la tabla 9 demuestran que la efectividad (por horas) del tratamiento uno supera a la del control positivo que se encuentra testado frente

a este microorganismo (duración de la capacidad antimicrobiana 4 – 8 horas), demostrando que posee capacidad antimicrobiana aún después de 24h de incubado el microorganismo con halos de inhibición que no se encuentran infectados luego de transcurrir 24 horas.

Tabla 10. Media de crecimiento UFC tratamiento 5

Media de Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	12.9
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.1
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.2
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40.1
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	49.5

Media de tiempo en la cual la cepa bacteriológica pasa de la fase de latencia a exponencial incubado in vitro.

Moscoso, 2024

Los datos en la tabla 10, del tratamiento 5 demuestran tener similitud con la efectividad (por horas) del tratamiento uno, superando ambos tratamientos a la duración de efectividad a la del control positivo que se encuentra testado frente a este microorganismo (duración de la capacidad antimicrobiana 4 – 8 horas), demostrando que posee capacidad antimicrobiana aún después de 24h de incubado el microorganismo con halos de inhibición que no se encuentran infectados luego de transcurrir 24 horas, sin embargo, se demuestra que el tratamiento 5 luego de terminar monitoreo posee mayor crecimiento de UFC que el tratamiento 1.

5. Discusión

Los resultados obtenidos de los extractos de guayusa de esta investigación fueron los siguientes: Extracto etanólico 148 ml, extracto metanólico 154 ml, extracto etanólico-metanólico: 152 ml. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Mendoza et al. (2016) sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de vainilla quién obtuvo cantidades similares a las obtenidas en esta investigación con el uso de solventes orgánicos, no obstante, la concentración de dichos extractos obtenidos a partir de la vainilla varió con concentraciones de 100 %, 50 %, 25 % y 1.5 %, mientras que los obtenidos en esta investigación fueron al 100%.

En base a lo antes expuesto, los resultados de esta investigación concuerdan con aquellos expuestos por Rodríguez y Álvarez (2021) en su estudio sobre la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L. quienes extrajeron una solución de 1:10 utilizando etanol con diferente procedimiento al utilizado en esta investigación con los extractos de guayusa, sin embargo, se utilizó la misma proporción a la utilizada por los investigadores mencionados anteriormente, con resultados similares en cuanto a rendimiento por ml.

Los tratamientos de extracto de guayusa con etanol, guayusa + metanol y guayusa etanol + metanol demostraron que entre los tratamientos evaluados los mejores fueron T1 (guayusa + etanol al 30 %), T5 (guayusa + metanol al 40 %) y T7 (guayusa + etanol + metanol al 30 %), cuyos resultados poseían halos de inhibición de 4.0 ± 1.0 mm, 5.0 ± 3.0 mm y 5.0 ± 1.0 mm sucesivamente similares resultaron tuvieron Rodríguez y Alvarez (2021) en su estudio sobre *Calendula officinalis* L. la cual utilizaron concentraciones de 30, 50, 70 y 90 °GL con

rendimientos en su halo de inhibición que van de 2.72 ± 0.09 , 3.53 ± 0.14 mm, 4.25 ± 0.30 mm, 4.34 ± 0.83 mm sucesivamente.

Por otro lado, el estudio de Cabrera (2019) sobre la actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto de *Citrus paradisi* y tres aceites esenciales de *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia* y *Cymbopogon citratus* el cual afirma que en el caso de extractos estos pueden tener buenos resultados en organismos patógenos como la *Escherichia coli* en el que se pueden obtener halos de inhibición de 9.67 ± 0.47 , se confirma debido a que los halos del mejor tratamiento con guayusa posee halos de alrededor de 6.0 ± 2.0 correspondiente al extracto de guayusa con etanol al 30 %, demostrando que los extractos etanólicos si mejoran el desempeño del sistema conservante.

Los resultados del estudio del tiempo de duración de los mejores tratamientos de guayusa los cuales fueron T1 y T5 demostraron que estos poseían un tiempo de inhibición de más de 24 horas con una eficacia del 37.97 % contra *E. coli* en base a esto, no se obtuvieron resultados similares al que posee Díaz et al. (2017) en su estudio sobre la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. en *Escherichia coli* puesto que además de encontrarse diferencias con la materia prima utilizada (pudiendo afectar a la capacidad antimicrobiana de los extractos), la eficacia de la *Morus alba* L. es de un 70 % mayor al de la guayusa y otros antibióticos como la azitromicina y ciprofloxacina.

La mayoría de los resultados como los obtenido por Torres, León y Tomas (2017) y Ramírez, Isaza, Pérez y Martínez (2017) en sus estudios sobre capacidad antimicrobiana en plantas como la *Luma chequen* o la *Solanum Dolichosepalum Bitter* varían de aquellos obtenidos en esta investigación debido a la materia prima utilizada y al tratamiento de los extractos obtenidos a partir de esas materias primas, demostrando que a pesar de que la hoja de guayusa posee

capacidad antimicrobiana su porcentaje de inhibición es menor a la de otras especies utilizadas para investigación.

6. Conclusiones

En conclusión, se obtuvieron volúmenes de extracto de 148 ml para el extracto etanólico, 154 ml para el extracto metanólico y 152 ml para el extracto etanólico-metanólico. Estos resultados demuestran que se logró una extracción efectiva de los compuestos presentes en la guayusa utilizando los solventes seleccionados.

Los resultados demuestran que los extractos obtenidos con etanol, metanol, etanol+metanol con la hoja de guayusa obtuvieron resultados positivos para inhibir *Escherichia coli*. Entre los mejores tratamientos para inhibir dicho microorganismo se encuentra el tratamiento 1 (concentración al 30 % de etanol+guayusa) y el tratamiento 5 (concentración al 40 % de metanol+guayusa) los cuales demostraron tener un porcentaje de inhibición en un rango de 37 – 37.5 %.

En cuanto a la duración de los mejores tratamientos de esta investigación (tratamientos 1 y 5), ambos demostraron una capacidad antimicrobiana superior al control positivo (oxitetraciclina) incluso después de 24 horas de incubación. Los datos recopilados en las tablas 32 y 33 revelan que tanto el tratamiento 1 como el tratamiento 5 lograron prevenir la transición de la fase de latencia a la fase exponencial de la bacteria in vitro, con halos de inhibición que no presentaban signos de infección tras 24 horas. Sin embargo, es importante destacar que el tratamiento 5 mostró un mayor crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) en comparación con el tratamiento 1 al finalizar el monitoreo.

7. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de mecanismos de acción, dado que se ha demostrado la efectividad de los extractos de guayusa en la inhibición del crecimiento bacteriano, sería recomendable llevar a cabo investigaciones adicionales con el fin de comprender mejor los mecanismos de acción de estos extractos. En este sentido, se podrían realizar estudios a nivel molecular para identificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana y analizar cómo interactúan con los microorganismos objetivo. La comprensión de los mecanismos de acción proporcionará información crucial para futuros desarrollos en la aplicación de estos extractos como agentes antimicrobianos.

Además de ello es necesario evaluar la eficacia y seguridad en condiciones reales. A pesar de que los resultados demuestran una prometedora actividad antimicrobiana *in vitro*, es necesario llevar a cabo estudios adicionales para evaluar la eficacia y seguridad de los extractos de guayusa en situaciones reales. En este sentido, sería pertinente realizar ensayos en alimentos contaminados con microorganismos patógenos para determinar la capacidad de los extractos para prevenir la proliferación bacteriana. Además, resulta fundamental realizar pruebas de toxicidad con el objetivo de garantizar la seguridad de los extractos en aplicaciones relacionadas con la seguridad alimentaria.

Finalmente se recomienda investigar otras posibles aplicaciones además de su actividad antimicrobiana, resultaría interesante explorar otras posibles aplicaciones de los extractos de guayusa. En este sentido, se podrían llevar a cabo estudios para evaluar su actividad antioxidante, antiinflamatoria u otras propiedades bioactivas.

8. Bibliografía

- Aguilar, D. (2015). *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Rev Invest Med Sur Mex*, 22(2), 57-63. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2015/ms152b.pdf>
- Asamblea del Ecuador. (2008). *Constitución de la República del Ecuador*. Congreso Nacional del Ecuador, Ecuador. Obtenido de http://www.oas.org/juridico/PDFs/mesicic4_ecu_const.pdf
- Beltrán, A., Lavilla, M., Cebollada, R., Calderón, J., y Torres, L. (2020). Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 13(3), 198-202. Obtenido de <https://scielo.isciii.es/pdf/albacete/v13n3/1699-695X-albacete-13-03-198.pdf>
- Benitende, S., Sanchez, C., y Sterren, M. (2002). Unidad Temática 3: Crecimiento Bacteriano. En *Microbiología agrícola* (págs. 1-8). Universidad Nacional de Entre Ríos.
- Bergaglio, J., y Bergaglio, O. (2020). Contaminación de alimentos por *Escherichia coli* y la inocuidad alimentaria como eje fundamental. *Innova Untref*(5), 1-17. Obtenido de <https://www.revistas.untref.edu.ar/index.php/innova/article/view/596/585>
- Bernal, M., y Guzman, M. (1984). El antibograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*, 4(3 y 4), 1-10. Obtenido de <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1891/1917/>

- Briz, J., y De Felipe, I. (2021). Consumo y Seguridad Alimentaria: Evolución y Tendencia. *E.T.S. Ingeniería Agrónoma*, 1-17. Obtenido de https://oa.upm.es/4947/1/INVE_MEM_2008_61210.pdf
- Bueno, S., Palavecino, C., Tobar, H., y Nieto, P. (2013). *Microorganismos y enfermedades*. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Obtenido de http://www.imii.cl/wp-content/uploads/2015/10/Libro_IMII_Microbiologia.pdf
- Bush, L., y Schmidt, C. (2022). Introducción a las bacterias gram negativas. En *Infecciones*. MSD.
- Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias-gram-negativas>
- Cabrera, C. (2019). Actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales. *Ciencia e Investigación*, 22(1), 21-25. doi:<https://doi.org/10.15381/ci.v22i1.16811>
- Caicedo, C., Paredes, N., Pico, J., Congo, C., Burbano, R., Chanaluisa, A., y Viera, W. (2021). Especies con características funcionales y medicinales de la agrobiodiversidad de la Amazonia ecuatoriana. *INIAP*, 25(2), 71-81. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5822>
- Caranqui, J., y Humanante, A. (2011). Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) del Cantón Pastaza. *Artículo Forestal*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Pastaza.
- Castañeda, S., Hernandez, A., Portela, L., Rangel, A., Costa, G., y Trespalcios, A. (2022). Evaluación de la actividad antimicrobiana y caracterización química de fracciones y compuestos de *Ilex guayusa* Loes frente a

Helicobacter pylori. *Productos naturales*, 5(2), 29-30.

doi:<https://doi.org/10.3407/rpn.v5i2.6767>

Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (2022). *Escherichia coli* (*E. coli*). U.S. Departamento de salud y Servicios Humanos. Obtenido de <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html#print>

Centro de enfermedades, control y prevención. (2022). *Brotos de E. coli*. CDC. Obtenido de <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>

Chiriboga, J. (2017). Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en Ecuador. Enfoque en la guayusa (*Ilex guayusa* Loes). *Etnobiología*, 15(3), 79-88. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/322208679>

Cogo, L., y Dalla, L. (2010). Actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos vegetales utilizados tradicionalmente para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. *Revista Brasileña de Microbiología*, 41, 304-309. doi:<https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200007>

Correa, Y., Nino, J., Ospina, J., y Mosquera, O. (2007). Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijensis* Morelet. *Scientia Et Technica*, 9(33), 425-426. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84933120>

Díaz, M., Lugo, Y., Fonte, L., Castro, I., López, O., y Montejó, I. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 43-48. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v40n1/pyf06117.pdf>

Djaja, M., Ramadini, A., y Wispriyono, B. (2018). Alimentos contaminados de *Escherichia coli* del comedor de la facultad en la Universidad X, Yakarta. *Revista de Microbiología Pura y Aplicada*, 12(1), 223-227. doi:<http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.1.28>

- Dueñas, J., Jarret, C., Cummins, I., y Logan, E. (2016). Guayusa Amazónica (*Ilex guayusa* Loes.): Una Reseña Histórica y Etnobotánica. *Botánica Económica*, 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>
- Fernández, S., Marcía, J., Bu, J., Baca, Y., Chavez, V., Montoya, H., . . . Ore, F. (2021). Enfermedades transmitidas por Alimentos (Etas); Una Alerta para el Consumidor. *Ciencia Latina*, 5(2), 2284-2298. doi:https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i2.433
- Fulham, M., Webster, B., Power, M., y Gray, R. (2022). Implicaciones de la diversidad de la comunidad de *Escherichia coli* en crías de pinnípedo australiano en libertad. *Infección, Genética y Evolución*, 104, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105351>
- García, A., Baenas, N., Benítez, A., Stinco, C., Meléndez, A., Moreno, D., y Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) nuevo té: composición fenólica, carotenoide y capacidad antioxidante. *Diario de la Ciencia de la Agricultura Alimentaria*, 97(12), 3929-3936. doi:<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8255>
- García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., y Villa, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En *Procedimientos en Microbiología Clínica* (págs. 1-54). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Huda, T., Julfiker, J., Sirajul, H., Khan, I., y Begum, A. (2013). Caracterización de resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Revista de Ciencias Médicas Bangladesh*, 1(9), 114-115. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/309606830_Characteriiaation_of_

Drug_Resistant_Escherichia%27_coli_and_Klebsiella_spp_Causing_Urinary_Tract_Infections_of_Kidney_Patients

- Krause, T., y Ness, B. (2017). Energizando la agroforestería: *Ilex guayusa* como un producto adicional para diversificar el sistema agroforestal amazónico. *Revista Internacional de Ciencias de la Biodiversidad, Servicios y Gestión de los Ecosistemas*, 13(1), 191.
doi:<http://dx.doi.org/10.1080/21513732.2017.1303646>
- López, O., León, J., Jiménez, M., y Chaidez, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(2), 119-126. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0187-73802009000200007
- Macías, A., Mera, L., Espinoza, M., Vite, F., Vallejo, P., y Mendoza, L. (2019). *Microbiología y Salud*. 3Ciencias.
doi:<http://dx.doi.org/10.17993/Med.2019.62>
- Melo, V. (2014). Composición y análisis químico de la especie *Ilex guayusa* Loes. *Tesis de Pregrado*. Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- Mendoza, N., Lobato, C., Reyes, D., Pezzat, E., Ita, M., y Lara, E. (2016). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extracto de *Vanilla* spp. *Cus Teziutlán* 1-2.
Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/303651954_Evaluacion_de_la_actividad_antimicrobiana_de_extractos_de_Vanilla_spp
- Ministerio de Salud Pública. (2022). *Enfermedades transmitidas por agua y alimentos, otras intoxicaciones alimentarias*. Ministerio de Salud Pública.
Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/11/ETAS-41.pdf>

- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., y Sánchez, J..(2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Ciencia y cultura*, 17(77), 15-23. Obtenido de <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=29411989003>
- Morejón, L. (2015). *Morfología y Estructura de los microorganismos*. Universidad Central de Venezuela. Obtenido de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfologia.pdf
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M., y Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. *Química viva*, 8(3), 192-199. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86320633005>
- Pérez, A., Rojas, J., Chamorro, L., y Pérez, K. (2011). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Acta Agronómica*, 60(2), 158-164. Obtenido de <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169922373007>
- Pinillos, M., Gómez, J., Elizalde, J., y Dueñas, A. (2003). Intoxicación por alimentos, plantas y setas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 1-10.
- Portela, L. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extractos vegetales de *Ilex guayusa* e *Ilex paraguariensis* frente a *Helicobacter pylori*. *Tesis de Pregrado*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Puig, Y., Espino, M., y Leyva, V. (2011). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*, 30-38. Obtenido de <http://revpanorama.sld.cu/index.php/panorama/article/view/74/pdf>

- Radice, M., y Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*(6), 3-11. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047390002.pdf>
- Ramírez, A., Isaza, G., Pérez, J., y Martínez, M. (2017). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum Dolichosepalum* Bitter (Frutillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-11. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla08117.pdf>
- Ramírez, J. (2020). Efecto sinérgico de distintos extractos vegetales y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para el control de *Aedes aegypti* (L). *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León.
doi:<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.27213.92640>
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico*, 44(5), 464-475.
Obtenido de <http://www.insp.mx/salud/index.html>
- Rodríguez, J., y Prado, D. (2005). *Microbiología: Lo esencial y lo práctico*. Organización Panamericana de la Salud. Obtenido de https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51601/MicrobiologiaPractico_spa.pdf?sequence=1
- Rodríguez, R., y Alvarez, Y. (2021). Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L. *Revista ION*, 34(1), 97-110.
doi:<https://doi.org/10.18273/revion.v34n1-2021008>
- Ruiz, J., y Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente Peruano. *Ciencia e investigación*, 12(1), 41- 47. Obtenido de

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/3387/4507/0>

Sánchez, E., Castillo, S., y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Dialnet*, 77-100. Obtenido de

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8595966>

Santander, D., y Wise, G. (2018). Análisis comparativo de composición de hojas secas de *Ilex guayusa* (Loes.). *Revista de Investigación de Alimentos y Nutrición*, 6(10), 638-644. doi:<http://dx.doi.org/10.12691/jfnr-6-10-4>

Servicio Ecuatoriano de Normalización. (2016). *Norma General para los Aditivos Alimentarios (CODEX STAN 192-1995. IDT) NTE INEN CODEX 192*.

Quito:

INEN..Obtenido de https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen-codex_192.pdf

Servicio Nacional del Consumidor. (2004). *Aditivos alimentarios: Definiciones básicas e información para un uso responsable*. SERNAC. Obtenido de <http://www.administracion.usmp.edu.pe/institutoconsumo/wp-content/uploads/2013/08/Aditivos-alimentarios.-2004-SERNAC.pdf>

Solano, A., y Jácome, C. (2022). La *Ilex guayusa* Loes empleada como nutracético en el tratamiento de la Diabetes tipo II. *MIKARIMIN Revista Multidisciplinaria*, 8(1), 61-70.

Obtenido de <http://45.238.216.13/ojs/index.php/mikarimin/article/view/2698/1995>

Suárez, T., González, E., Reséndiz, Y., y Sánchez, S. (2014). La importancia de los aditivos alimentarios en los alimentos industrializados. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad*

Autónoma del Estado de Hidalgo, 1-8.

doi:<http://dx.doi.org/10.29057/icsa.v2i4.752>

Tituaña, G. (2013). *Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la Asociación Flor de Campo en la Estancia y Mushukwiñary en Tambalo de Pasa, para promover su desarrollo*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.

Torres, J., León, J., y Tomas, G. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray arrayán frente a patógenos de origen clínico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 37, 10-16.

Obtenido de <http://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v37n1/art04.pdf>

Varela, G., y Grotiuz, G. (2008). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Academia.

Obtenido de <https://www.academia.edu/download/35485435/FisiologiyMetabolismoBacteriano.pdf>

Vásquez, G. (2003). La Contaminación de los Alimentos, un Problema por Resolver. *Salud UIS*, 35(1), 48-57.

Obtenido de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/728/1014>

Vergara, A., Páucar, K., Morales, C., Castro, O., y Pizarro, P. (2018). Obtención de extractos de hojas de *Annona muricata* L. (Guanábana) inducidos por su efecto inhibidor de la corrosión. *Sociedad química del Perú*, 84(1), 119-132. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2018000100011yscript=sci_arttextytlng=en

Wintola, O., y Afolayan, A. (2015). La evaluación antibacteriana, fitoquímica y antioxidante de los extractos de raíz de *Hydnora africana* Thunb. utilizado

como antidisentérico en la provincia de Eastern Cape, Sudáfrica. *PubMed*, 15(307), 1-10. doi:<https://doi.org/10.1186%2Fs12906-015-0835-9>

Xu, C., Kong, L., Liao, Y., Tian, Y., Wu, Q., Liu, H., y Wang, X. (2022). Mini-revisión: *Escherichia coli* resistente a los antibióticos de Farm. *Antibióticos*, 11, 1-18. doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics11111535>

Zúñiga, I., y Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95-104.

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

9. Anexos

9.1 Anexo 1. Descripción taxonómica de la guayusa y estructuras celulares

Tabla 11. Taxonomía de la guayusa

Clasificación	Descripción
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Aquifoliales Senft</i>
Familia	<i>Aquifoliaceae Bercht y J. Presl</i>
Género	<i>Ilex</i>
Especie	<i>I. Guayusa</i>

Clasificación taxonómica de *Ilex guayusa*.
Krause y Ness, 2017

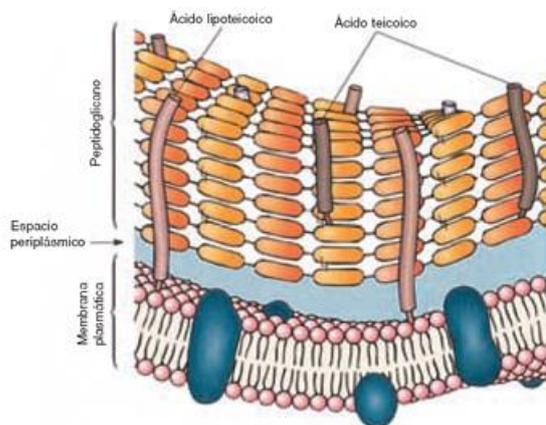


Figura 5. Pared celular gram positivas
Macías et al., 2019

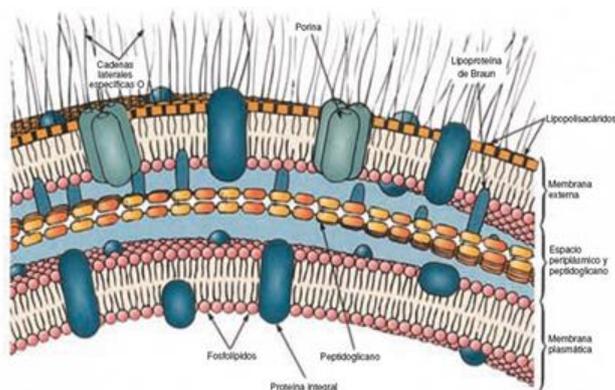


Figura 6. Pared celular gram negativa
Morejón, 2015

9.2 Anexo 2. Código de regulación para el uso de la oxitetraciclina

```
[Code of Federal Regulations]
[Title 21, Volume 6]
[CITE: 21CFR558.450]

TITLE 21--FOOD AND DRUGS
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
SUBCHAPTER E - ANIMAL DRUGS, FEEDS, AND RELATED PRODUCTS

PART 558 -- NEW ANIMAL DRUGS FOR USE IN ANIMAL FEEDS
Subpart B - Specific New Animal Drugs for Use in Animal Feeds

Sec. 558.450 Oxytetracycline.

(a) Specifications. Each pound of Type A medicated article contains:
(1) Oxytetracycline (from oxytetracycline quaternary salt) equivalent to 50 or 100 grams oxytetracycline hydrochloride; or oxytetracycline (from oxytetracycline dihydrate base) equivalent to 10, 30, 50, 100, or 200 grams oxytetracycline hydrochloride.
(2) Oxytetracycline (from oxytetracycline dihydrate base) equivalent to 50, 100, or 200 grams oxytetracycline hydrochloride; or 100 grams oxytetracycline hydrochloride.
(b) Sponsors. See sponsors in § 510.600(c) of this chapter as follows:
(1) No. 066104: Type A medicated articles as in paragraph (a)(1) of this section.
(2) No. 069254: Type A medicated articles as in paragraph (a)(2) of this section.
(c) Related tolerances. See § 556.500 of this chapter.
(d) Special considerations. (1) Federal law restricts medicated feed containing this veterinary feed directive (VFD) drug to use by or on the order of a licensed veterinarian.
```

Figura 7. Uso de oxitetraciclina
Código de Regulación Federal, 2023

9.3 Anexo 3. Decretos legislativos y normativas ecuatorianas reguladoras de alimentos

CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR

Decreto Legislativo 0
 Registro Oficial 449 de 20-oct.-2008
 Última modificación: 25-ene.-2021
 Estado: Reformado

CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR 2008

INDICE

PREÁMBULO

TÍTULO I
 ELEMENTOS CONSTITUTIVOS DEL ESTADO

Capítulo primero
 Principios fundamentales

Capítulo segundo
 Ciudadanas y ciudadanos

TÍTULO II
 DERECHOS

Capítulo primero
 Principios de aplicación de los derechos

Capítulo segundo
 Derechos del buen vivir

- Sección primera
 Agua y alimentación
 - Sección segunda
 Ambiente sano
 - Sección tercera
 Comunicación e información
 - Sección cuarta
 Cultura y Ciencia
 - Sección quinta
 Educación
 - Sección sexta
 Hábitat y vivienda
 - Sección séptima
 Salud
 - Sección octava
 Trabajo y seguridad social

Capítulo tercero
 Derechos de las personas y grupos de atención prioritaria

- Sección primera
 Adultas y adultos mayores
 - Sección segunda
 Jóvenes

Figura 8. Constitución de la República del Ecuador
 Asamblea del Ecuador, 2008

Capítulo segundo
 Derechos del buen vivir

Sección primera
 Agua y alimentación

Art. 12.- El derecho humano al agua es fundamental e irrenunciable. El agua constituye patrimonio nacional estratégico de uso público, inalienable, imprescriptible, inembargable y esencial para la vida.

Concordancias:

LEY ORGÁNICA DE RECURSOS HÍDRICOS USOS Y APROVECHAMIENTO DEL AGUA, Arts. 1, 3, 4, 5, 7, 15, 16, 64
 CÓDIGO CIVIL (LIBRO II), Arts. 606, 612, 673, 674
 CÓDIGO DE DERECHO INTERNACIONAL PRIVADO SÁNCHEZ DE BUSTAMANTE, Arts. 117
 LEY ORGÁNICA DE SALUD, Arts. 06

Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales.

El Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria.

Concordancias:

Figura 9. Soberanía Alimentaria, Constitución
 de la República del Ecuador
 Asamblea del Ecuador, 2008

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho al agua.

Se prohíbe el desarrollo, producción, tenencia, comercialización, importación, transporte, almacenamiento y uso de armas químicas, biológicas y nucleares, de contaminantes orgánicos persistentes altamente tóxicos, agroquímicos internacionalmente prohibidos, y las tecnologías y agentes biológicos experimentales nocivos y organismos genéticamente modificados perjudiciales para la salud humana o que atenten contra la soberanía alimentaria o los ecosistemas, así como la introducción de residuos nucleares y desechos tóxicos al territorio nacional.

Figura 10. Constitución de la República del Ecuador, Art.15
Asamblea del Ecuador, 2008



**NORMA
TÉCNICA
ECUATORIANA**

NTE INEN-CODEX 192
Revisión 2016
2016-12

**NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS (CODEX
STAN 192-1995, IDT)**

GENERAL STANDARD FOR FOOD ADITIVES (CODEX STAN 192-1995)

Correspondencia:

Esta Norma Técnica Ecuatoriana es una adopción idéntica de la Norma Internacional CODEX STAN 192-1995. Adoptada en 1995 y revisada en 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016.

ICS: 67.220.20

455
Páginas

© CODEX 2016 – Todos los derechos reservados.
© INEN 2016

Figura 11. Normas INEN Aditivos
Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2016

2. DEFINICIONES

- a) Se entiende por **aditivo alimentario** cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.⁴
- b) **Ingesta diaria admisible (IDA)** es una estimación efectuada por el JECFA de la cantidad de aditivo alimentario, expresada en relación con el peso corporal, que una persona puede ingerir diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para su salud.⁵
- c) **Ingesta diaria admisible "no especificada" (NE)**⁶ es una expresión que se aplica a las sustancias alimentarias de muy baja toxicidad cuyo ingesta alimentaria total, derivada de su uso en las dosis necesarias para conseguir el efecto deseado y de su concentración admisible anterior en los alimentos, no representa, en opinión del JECFA, un riesgo para la salud, teniendo en cuenta los datos (químicos, bioquímicos, toxicológicos y de otro tipo) disponibles.

Por el motivo susodicho, así como por las razones expuestas en las distintas evaluaciones del JECFA, este organismo no considera necesario asignar un valor numérico a la ingesta diaria admisible. Todo aditivo que satisfaga este criterio deberá emplearse conforme a las buenas prácticas de fabricación que se definen más adelante en la Sección 3.3.

- d) **Dosis máxima de uso** de un aditivo es la concentración más alta de éste respecto de la cual la Comisión del Codex Alimentarius ha determinado que es funcionalmente eficaz en un alimento o categoría de alimentos y ha acordado que es inocua. Por lo general se expresa como mg de aditivo por kg de alimento.

La dosis de uso máxima no suele corresponder a la dosis de uso óptima, recomendada o normal. De conformidad con las buenas prácticas de fabricación, la dosis de uso óptima, recomendada o normal, difiere para cada aplicación de un aditivo y depende del efecto técnico previsto y del alimento específico en el cual se utilizaría dicho aditivo, teniendo en cuenta el tipo de materia prima, la elaboración de los alimentos y su almacenamiento, transporte y manipulación posteriores por los distribuidores, los vendedores al por menor y los consumidores.

3. PRINCIPIOS GENERALES PARA EL USO DE ADITIVOS ALIMENTARIOS

El uso de aditivos alimentarios de conformidad con esta Norma exige el cumplimiento de todos los principios que se establecen en las Secciones 3.1 a 3.4.

3.1 Inocuidad de los aditivos alimentarios

- a) Únicamente se aprobarán e incluirán en la presente Norma los aditivos alimentarios que, en la medida en que puede juzgarse por las pruebas que dispone el JECFA, no presentan riesgos apreciables para la salud de los consumidores en las dosis de uso propuestas.

Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2016

9.4 Anexo 4. Obtención de extractos de guayusa



Figura 13. Obtención de polvo fino de guayusa
Moscoso, 2024



Figura 14. Solventes orgánicos utilizados para extracción
Moscoso, 2024



Figura 15. Obtención de extractos mediante rotavapor
Moscoso, 2024



Figura 16. Obtención de extractos mediante rotavapor
Moscoso, 2024

9.5 Anexo 5. Datos tabulados de porcentaje actividad antimicrobiana



Figura 17. Preparación de extractos de guayusa y placas listas para siembra de microorganismo
Moscoso, 2024



Figura 18. Extractos de guayusa y placas listas para siembra de microorganismo
Moscoso, 2024



Figura 19. Siembra de placas y colocación de discos
Moscoso, 2024



Figura 20. Colocación de discos en las placas
Moscoso, 2024



Figura 21. Muestras de blanco, extractos y antibiótico
Moscoso, 2024



F
Moscoso, 2024 al 30 %

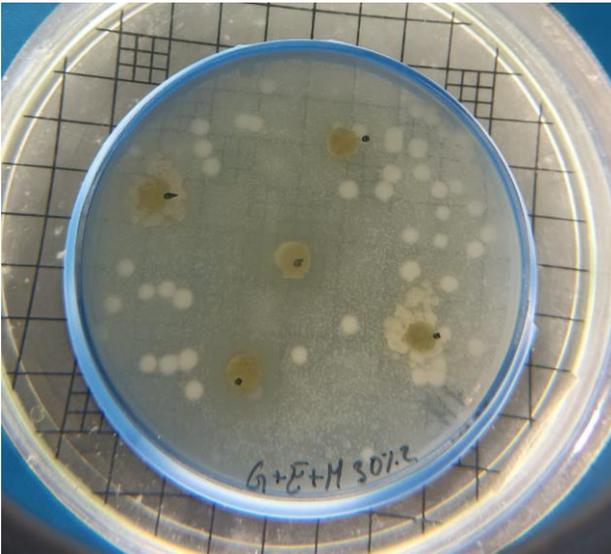


Figura 23. Muestras de metanol + guayusa al 30 %
Moscoso, 2024



Figura 24. Muestras de disco en blanco
Moscoso, 2024

Tabla 12. Datos tabulados de los once tratamientos

	Subm	Repeti									
	uestra	ción 1	ción 2	ción 3	ción 4	ción 5	ción 6	ción 7	ción 8	ción 9	ción 10
G+E		100.0									
30%	1	0	80.00	37.50	57.14	0.00	42.86	42.86	75.00	0.00	87.50
	2	0	0.00	50.00	0.00	50.00	57.14	50.00	57.14	57.14	71.43
	3	50	0.00	0.00	37.50	71.43	62.50	71.43	57.14	71.43	27.27
	4	0	75.00	42.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	37.50	0.00
	5	0	0.00	0.00	33.33	0.00	33.33	85.71	71.43	0.00	0.00
G+E											
40%	1	0	0.00	50.00	57.14	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00	37.50
	2	0	0.00	37.50	57.14	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00
	3	0	0.00	25.00	62.50	28.57	0.00	0.00	42.86	28.57	0.00
	4	0	0.00	0.00	42.86	0.00	0.00	0.00	0.00	25.00	25.00
	5	0	0.00	0.00	50.00	50.00	0.00	0.00	42.86	22.22	0.00
Etano											
I	1	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	66.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G+M											
30%	1	50.00	100.	37.50	0.00	0.00	71.43	0.00	50.00	0.00	0.00
	2	0	75.00	0.00	0.00	83.33	0.00	75.00	0.00	0.00	85.71
	3	66.67	60.00	0.00	37.50	0.00	37.50	0.00	0.00	0.00	36.36
	4	0	75.00	28.57	0.00	0.00	0.00	37.50	0.00	50.00	0.00
	5	0	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	33.33	28.57
G+M											
40%	1	125.0	80.00	37.50	42.86	66.67	85.71	100.0	50.00	83.33	25.00
	2	100.0	0.00	25.00	71.43	83.33	42.86	0.00	0.00	57.14	28.57
	3	50.00	0.00	50.00	12.50	42.86	62.50	0.00	0.00	0.00	36.36
	4	75.00	50.00	42.86	0.00	0.00	116.6	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.00	66.67	0.00	0.00	66.67	0.00	0.00	28.57	22.22	42.86
Meta											
nol	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G+E+											
M											
30%	1	0	100	50.00	57.14	0	0	0	0	0	50.00
	2	0	0.00	0.00	42.86	33.33	0.00	37.50	0.00	57.14	28.57
	3	0	80.00	50.00	12.50	0.00	37.50	57.14	0.00	71.43	0.00
	4	0	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	37.50	0.00
	5	0	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	28.57	57.14	66.67	71.43
G+E+											
M	1	0	80	0	0	0	28.57	0	62.5	0	0

40%											
	2	0	0.00	50.00	28.57	0.00	28.57	37.50	42.86	0.00	0.00
	3	0	0.00	37.50	37.50	0.00	0.00	0.00	28.57	0.00	0.00
	4	0	0.00	0.00	28.57	0.00	83.33	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0	0.00	28.57	0.00	0.00	0.00	57.14	0.00	0.00	0.00
M+E	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Antibi											
ótico	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Blanc											
o	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Datos tabulados para realizar prueba no paramétrica de Kruskal Wallis de los tratamientos.

Moscoso, 2024

Tabla 13. Análisis de varianza

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	422866.08	10	42286.61	88.13	<0.0001
Error	258618.95	539	479.81		
Total	681485.03	549			

Análisis de datos: Tratamientos 1 – 11.

Moscoso, 2024

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% de inhibición T1		50	37.97	32.52	42.86	145.44	<0.0001
% de inhibición T10		50	100.00	0.00	100.00		
% de inhibición T11		50	0.00	0.00	0.00		
% de inhibición T2		50	16.69	22.05	0.00		
% de inhibición T3		50	3.67	12.16	0.00		

Figura 25. Análisis estadístico extracto etanol

Moscoso, 2024

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% de inhibición T10		50	100.00	0.00	100.00	144.48	<0.0001
% de inhibición T11		50	0.00	0.00	0.00		
% de inhibición T4		50	23.38	30.86	0.00		
% de inhibición T5		50	36.57	34.24	36.93		
% de inhibición T6		50	0.00	0.00	0.00		

Figura 26. Análisis estadístico extracto metanol
Moscoso, 2024

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% de inhibición T10		50	100.00	0.00	100.00	132.87	<0.0001
% de inhibición T11		50	0.00	0.00	0.00		
% de inhibición T7		50	22.53	28.64	0.00		
% de inhibición T8		50	13.20	22.71	0.00		
% de inhibición T9		50	0.00	0.00	0.00		

Figura 27. Análisis estadístico extracto etanol+metanol
Moscoso, 2024

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% de inhibición T1		50	37.97	32.52	42.86	211.07	<0.0001
% de inhibición T10		50	100.00	0.00	100.00		
% de inhibición T11		50	0.00	0.00	0.00		
% de inhibición T2		50	16.69	22.05	0.00		
% de inhibición T3		50	3.67	12.16	0.00		
% de inhibición T4		50	23.38	30.86	0.00		
% de inhibición T5		50	36.57	34.24	36.93		
% de inhibición T6		50	0.00	0.00	0.00		
% de inhibición T7		50	22.53	28.64	0.00		
% de inhibición T8		50	13.20	22.71	0.00		
% de inhibición T9		50	0.00	0.00	0.00		

Figura 28. Resultados de prueba no paramétrica de Kruskal Wallis
Moscoso, 2024

9.6 Anexo 6. Datos recopilados de las fichas crecimiento de cepa bacteriológico

Tabla 14. Placa 1, tratamiento 1.

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.6
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	16.8
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	22.3
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	32.4
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40.1
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	51.6

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando. Moscoso, 2024

Tabla 15. Placa 2, tratamiento 1.

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.4
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.4
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	21
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	29
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.4

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando. Moscoso, 2024

Tabla 16. Placa 3, tratamiento 1

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.2
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.2
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	21.1
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	29.1
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40.1
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.5

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 17. Placa 4, tratamiento 1.

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.7
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.8
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	22
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	30.3
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	41.3
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	49.7

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 18. Placa 5, tratamiento 1.

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.1
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	14.3
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	22.4
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	30.4
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	41.5
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	49.9

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 19. Placa 6, tratamiento 1

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.1
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.2
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.4
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.5
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.4
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.8

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 20. Placa 7, tratamiento 1

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.5
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.6
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.8
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.9
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.8
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.2

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 21. Placa 8, tratamiento 1

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.8
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.9
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	21.1
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	29.2
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40.1
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.5

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 22. Placa 9, tratamiento 1

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.4
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.5
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.7
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.8
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.7
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.1

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 23. Placa 10, tratamiento 1

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.7
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.8
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	21
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	29.1
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	40
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.4

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 24. Placa 1, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.1
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.2
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.3
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.2
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.6

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 25. Placa 2, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	7.3
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	12.2
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	19.4
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	27.5
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	38.4
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	46.8

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 26. Placa 3, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.2
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.1
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.3
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.4
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.3
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.7

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 27. Placa 4, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.4
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.3
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.5
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.6
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.5
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.9

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 28. Placa 5, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	7.6
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	12.5
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	19.7
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	27.8
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	38.7
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.1

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 29. Placa 6, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	7.9
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	12.8
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.1
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.4

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 30. Placa 7, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.7
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.6
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.8
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28.9
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.8
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.2

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 31. Placa 8, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	7.5
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	12.4
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	19.6
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	27.7
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	38.6
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 32. Placa 9, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	8.8
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	13.7
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	20.9
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	29
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	39.9
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	48.3

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

Tabla 33. Placa 10, tratamiento 5

Monitoreo de crecimiento cepa bacteriológica					
Monitoreos	Día	Tiempo	Temperatura	pH	UFC
1	29/5/2023	30 min	37 °C	2.2	0
2	29/5/2023	1h	37 °C	2.2	0
3	29/5/2023	1h30	37 °C	2.2	0
4	29/5/2023	2h	37 °C	2.2	0
5	29/5/2023	2h30	37 °C	2.2	0
6	29/5/2023	3h	37 °C	2.2	0
7	30/5/2023	30 min	37 °C	2.2	7.8
8	30/5/2023	1h	37 °C	2.2	12.7
9	30/5/2023	1h30	37 °C	2.2	19.9
10	30/5/2023	2h	37 °C	2.2	28
11	30/5/2023	2h30	37 °C	2.2	38.9
12	30/5/2023	3h	37 °C	2.2	47.3

Monitoreo de crecimiento de la cepa bacteriológica. 29/05/2023 correspondiente a 24 horas incubando. 30/5/2023 correspondiente a 48 horas incubando.
Moscoso, 2024

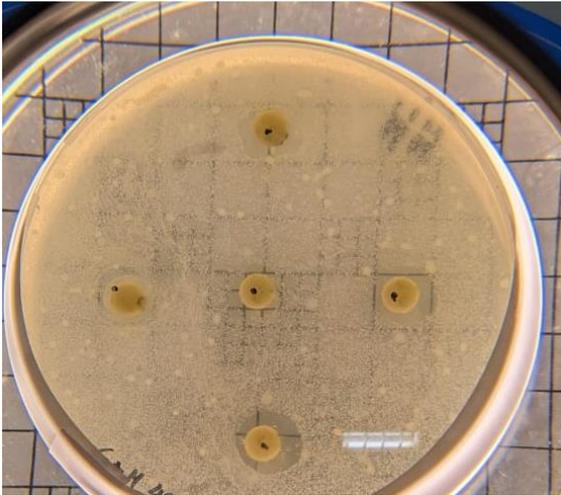


Figura 29. Tratamiento 1 (guayusa + etanol al 30 %)
Moscoso, 2024



Figura 30. Monitoreo tratamiento 5 (guayusa + metanol al 40 %)
Moscoso, 2024

9.7 Anexo 7. Prueba de normalidad

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
% de inhibición	550	0.30	0.50	0.63	<0.0001

Figura 31. Prueba de normalidad Shapiro Wilks
Moscoso, 2024